

การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง



นางสาวสุทธิสา ดัชนี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2558

**IDENTIFICATION OF THE CAUSAL FUNGI OF STEM
AND ROOT BLACK ROT DISEASE IN CASSAVA**

Suttisa Duchanee



**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 2015

การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ศ. ดร. จุติพร มะณีโกวา)

ประธานกรรมการ

(ศ. ดร. ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ

(ศ. ดร. ชูกิจ ลิ้มปิงานงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

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_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผศ. ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ซึ่งแนะแนวทาง อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ดร.โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.จิตติพร มะชิโกวา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ชาญกิจ โกศล เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช คุณชนิษฐา ภูโบริมาณ คุณอุทัย ยศจังหวังริศ เจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุณ คุณมธุกร สมพงษ์ คุณรุ่งทิพย์ สังข์เผือก คุณชานนทร์ แสงจันทร์ คุณธัญมน ผิวทอง คุณจิตมนัส นิกากิจ คุณอนุสราร รัทมณี และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ Plant Pathology and Biopesticides Lab และผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำปรึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อจ่านงค์ คัชณีย์ คุณแม่เล็ก คัชณีย์ คุณพี่มงคล คัชณีย์ คุณพี่ลัดดาวรรณ สิงห์จันทร์ และครอบครัวทุกท่าน ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุทธิสรา คัชณีย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฉ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 สมมติฐาน.....	3
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4

2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการปลูกมันสำปะหลัง.....	5
2.2 ประวัติการปลูกมันสำปะหลัง.....	8
2.3 อนุกรมวิธานและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง.....	8
2.3.1 อนุกรมวิธาน.....	8
2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	9
2.3.3 การปลูกมันสำปะหลัง.....	11
2.4 ข้อมูลทั่วไปของโรคต้นและรากเน่า (stem and root rot).....	12
2.5 ข้อมูลเฉพาะของโรคต้นและรากเน่าดำ (stem and root black rot).....	17
2.6 ชีววิทยาของเชื้อรา Family Botryosphaeriaceae.....	17
2.6.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	18
2.6.1.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.1.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	20
2.6.2	ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา <i>Neocyttalidium</i> sp.	
2.6.2.1	อนุกรมวิธานของเชื้อรา <i>Neocyttalidium</i> sp.....	21
2.6.2.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neocyttalidium</i> sp.....	21
2.6.3	ปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae.....	22
2.6.4	วงจรการเกิดโรค.....	23
2.6.5	การควบคุมโรค.....	23
2.7.	วิธีการตรวจสอบเพื่อระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลัง.....	24
2.7.1	การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	24
2.7.2	การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ จำลองตัว.....	26
2.7.3	การศึกษาลักษณะพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อราในฐานข้อมูล GenBank.....	29
3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1	เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคต้นและรากเน่าจาก จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง.....	35
3.2	แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคต้นและรากเน่า.....	35
3.3	แยกสปอร์เดี่ยว (Single spore) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่ เป็นโรคต้นและรากเน่าดำ.....	36
3.4	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรง ของเชื้อ (Pathogenicity and virulence test).....	37
3.4.1	การทดสอบความสามารถในการก่อโรค ในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน.....	37
3.4.2	การเก็บ Stock ของเชื้อ.....	38
3.4.3	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพแปลงปลูกจำลอง.....	38
3.5	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้.....	40

สารบัญ (ต่อ)

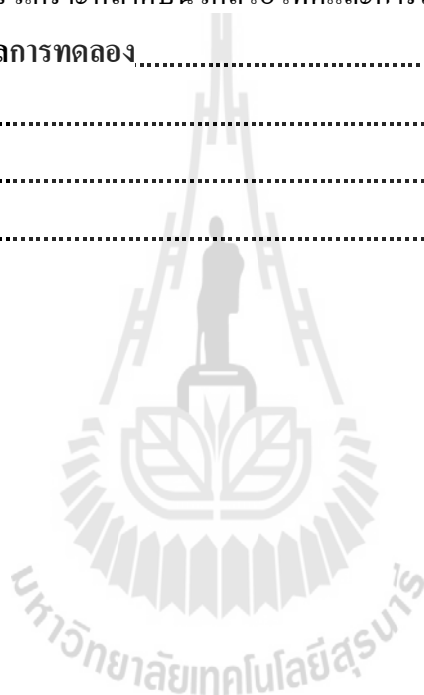
หน้า

3.5.1	ลักษณะสีของโคโลนีและการเจริญเติบโต	40
3.5.2	ลักษณะของพิกนิตีเดีย (pycnidia) และขนาดของ โคนิตีเดีย (conidia).....	41
3.6	การระบุชนิดเชื้อด้วยวิธีชีวโมเลกุล.....	41
3.6.1	การสกัด genomic DNA ของเชื้อ	41
3.6.2	การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	41
3.6.3	การยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี DNA sequencing	42
3.6.4	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของเชื้อ.....	43
3.7	การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ.....	43
4	ผลการทดลอง	
4.1	เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็น โรคต้นและรากเน่าจาก จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัด ไกล่เคียง.....	44
4.2	การแยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการ โรคต้นและรากเน่า.....	45
4.3	การแยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการ โรคต้นและรากเน่าดำ.....	48
4.4	การทดสอบความสามารถในการก่อโรค และประเมินความรุนแรงของเชื้อ (pathogenicity and virulence test).....	53
4.4.1	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและ โรงเรือนทดลอง.....	53
4.4.2	ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพแปลงปลูกจำลอง.....	59
4.5	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้	
4.5.1	การเจริญของโคโลนี.....	63
4.5.2	ลักษณะและสีของโคโลนี	65
4.5.3	ลักษณะและสีของพิกนิตีเดีย (pycnidia).....	66
4.5.4	ลักษณะและขนาดของ โคนิตีเดีย (conidia).....	67
4.6	การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล	
4.6.1	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง.....	75

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6.1.1 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR.....	75
4.6.2 การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลัง ด้วยวิธี DNA sequencing.....	77
4.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ.....	80
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	91
รายการอ้างอิง.....	99
ภาคผนวก.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	130



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ปี 2555-2558.....6
2.2	เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยวและผลผลิตของแหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญ ประเทศไทยปี 2557-2558.....6
2.3	ความต้องการใช้มันสำปะหลัง ปี 2554-2558.....7
2.4	ลักษณะที่สำคัญของโรคต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา <i>Glomerella</i> และ <i>Lasiodiplodia</i>13
2.5	ลักษณะที่สำคัญของโรครากหรือหัวเน่า.....14
2.6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i>25
2.7	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อรา <i>Neoscytalidium</i>26
4.1	เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำ ที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง.....52
4.2	ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนบนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89.....58
4.3	แสดงน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยของมันสำปะหลังในสภาพแปลงปลูกจำลอง หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 เดือน.....62
4.4	แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAS ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน.....64
4.5	ขนาดโคนินเดียของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง.....70
4.6	ขนาด โคนินเดียและ อาร์โซ โคนินเดีย ของเชื้อรา <i>Neoscytalidium</i> sp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง.....71
4.7	สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อ โรคแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp.....72
4.8	สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อ โรคแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา <i>Neoscytalidium</i> sp.....74
4.9	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้ จากมันสำปะหลังแสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำ ทั้ง 3 บริเวณ.....79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.10 แสดงเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> และ <i>Neoscytalidium</i> ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ.....	81
4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบขนาด โคนิเดียและพาราไฟซิส ของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i>	84
4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดของ โคนิเดียและอาร์โธร โคนิเดียของเชื้อรา <i>Neoscytalidium</i>	85



สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	แสดงแสดงองค์ประกอบของต้นมันสำปะหลัง.....10
2.2	แสดงลักษณะอาการของโรคต้นเน่า (stem rot)13
2.3	แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าและ/เน่าเปื่อย (soft rot/wet rot)15
2.4	แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าแห้ง (dry rot).....15
2.5	แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าคอดิน (damping-off or root rot)16
2.6	แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่าดำ (stem and root black rot)16
2.7	แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง17
3.1	แสดงการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงปลูกจำลอง ในถุงกระสอบขนาดใหญ่.....40
4.1	แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่ามันสำปะหลัง ในแปลงปลูก.....44
4.2	แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่ามันสำปะหลัง45
4.3	แสดงความถี่ของเชื้อราที่พบจากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่า.....46
4.4	แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้จากอาการต้นและรากเน่ามันสำปะหลัง.....47
4.5	แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณหัวและขั้วหัวมันสำปะหลัง49
4.6	แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณโคนต้นและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง50
4.7	แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณกิ่ง ใบและก้านใบมันสำปะหลัง51
4.8	ลักษณะของหัวมันสำปะหลังที่หลังปลูกเชื่อเป็นเวลา 7 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ54
4.9	ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื่อเป็นเวลา 15 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ55
4.10	ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื่อเป็นเวลา 45 วันในสภาพโรงเรือน56
4.11	ลักษณะของมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบช้ำและใบไหม้.....57
4.12	แสดงลักษณะอาการต่าง ๆ หลังจากการปลูกเชื่อไอโซเลต 11HSR2 ในสภาพแปลงปลูก จำลองเป็นระยะเวลา 8 เดือน.....61
4.13	แสดงน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยของมันสำปะหลังในสภาพแปลงปลูกจำลองหลัง จากการปลูกเชื่อสาเหตุโรคด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 เดือน.....62

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.14 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของโคโคนีของไอโซเลต L11HSR2	63
4.15 แสดงลักษณะโคโคนีของเชื้อราทั้ง 6 กลุ่ม	66
4.16 แสดงลักษณะ pycnidia paraphysis และ conidioeous cell ของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp	67
4.17 แสดงลักษณะ conidia ของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	69
4.18 แสดงลักษณะอาร์โซโคนิเดียโคนิเดียของเชื้อรา <i>Neoscytalidium</i> sp.....	71
4.19 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตบริเวณ ITS	75
4.20 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตบริเวณ EF1- α	76
4.21 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ Bt.....	76
4.22 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมัน สำปะหลัง ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α	83
4.23 <i>Lasiodiplodia. theobromae</i> ไอโซเลต L18KBSH3	86
4.24 <i>Lasiodiplodia. euphorbicola</i> ไอโซเลต L6HRD, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT	87
4.25 <i>Lasiodiplodia. euphorbicola</i> ไอโซเลต L11HSR2.....	88
4.26 <i>Lasiodiplodia. euphorbicola</i> ไอโซเลต L20FHTB1	89
4.27 <i>Neoscytalidium. dimidiatum</i> Isolate N3DTD2	90

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีชื่อสามัญอื่นเรียกชื่อตามท้องถิ่น ได้แก่ cassava, yuca, mandioa, manioc, tapioca อุดมในประเทศไทยเรียกว่า มันไม้มันสำโรง ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามันต้นเตี้ย ภาคใต้เรียกมันเทศ (เรียกมันเทศว่ามันขลาล) ปัจจุบันเรียกว่ามันสำปะหลัง (กลุ่มอนุรักษณ์น้ำและดิน, 2547; ยุคติ สาริกะภูติ, 2526; Stephen and O'Hair, 1998) จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทนต่อสภาพแล้งได้ดี เป็นพืชพลังงานที่สำคัญในการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญในการผลิตน้ำมันสำหรับรถยนต์ นอกจากนี้ยังเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประชากรในหลายประเทศ (จรุงสิทธิ์ ลิ้มศิลา และอัจฉรา ลิ้มศิลา, 2537; จำลอง เนียม-จำนรรจา, 2547; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558; Allem et al., 2002; Alves, 2002; Henry and Hershey, 2002; Hillocks, 2002) ปลูกมากใน 3 ทวีป คือ แอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ โดยในแอฟริกาและอเมริกาใต้ใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารทั้งของมนุษย์และสัตว์ ส่วนในทวีปเอเชียใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหารและเครื่องดื่ม บรรจุกัมมันท์ อาหารสัตว์ สิ่งทอ กระดาษ ไม้อัด การแพทย์ พลังงาน เป็นต้น (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2532; ชาญ ธิรพร, 2537; ญุภิกา เรืองจารุพันธ์, 2557; พวงเพชร นรินทรภาพร, 2537; สานิต สวัสดิคาญจน์, 2557; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งสิ้นประมาณ 8.96 ล้านไร่ ผลผลิต 32.36 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.56 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558; FAO, 2015) มีส่วนแบ่งทางการตลาดร้อยละ 76 รองลงมา คือ เวียดนาม และกัมพูชา ตามลำดับ ในปี 2558 สามารถส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง 11.19 ล้านตัน มูลค่า 111,716 ล้านบาท ในรูปแบบของมันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมันสำปะหลัง โดยมันอัดเม็ดและมันเส้นส่งออกไปที่ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป ได้แก่ เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส กลุ่มเอเชีย ได้แก่ จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น สำหรับแป้งมันสำปะหลังส่งออกไปที่ประเทศญี่ปุ่น รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน ส่วนการใช้มันสำปะหลังในประเทศใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่เพาะปลูกมากที่สุด รองลงมาคือ ภาคกลางและภาคเหนือ ในปี 2558 จังหวัดนครราชสีมา มีพื้นที่เก็บเกี่ยวทั้งสิ้น 1,549,206 ไร่ และเก็บเกี่ยวผลผลิต 5,922,085 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาการผลิต

มันสำปะหลังในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปจากการปลูกเพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์ไปเป็นปลูกเพื่ออุตสาหกรรม ในปัจจุบันมีการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เอทานอล และไบโอพลาสติก (ศานิต สวัสดิ์กาญจน์, 2557) ทำให้การปลูกมันสำปะหลังมีความต้องการทางการตลาดเพิ่มสูงขึ้น จึงเป็นเหตุให้มีการปลูกติดต่อกันตลอดทั้งปี ส่งผลให้มีการสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งโรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ 1) โรคใบไหม้ (bacterial blight) ความเสียหาย 30-90 เปอร์เซ็นต์ 2) โรคแอนแทรกคโนส (anthracnose) ความเสียหาย 40-80 เปอร์เซ็นต์ 3) โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf spot) ความเสียหาย 14-20 เปอร์เซ็นต์ 4) โรคใบจุดไหม้ (blight leaf spot) ความเสียหาย 12-30 เปอร์เซ็นต์ 5) โรคต้นและรากเน่า (stem and root rot disease) ความเสียหาย 10-100 เปอร์เซ็นต์ (เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง, ม.ป.ป.; รัชนี เจริญสถาพร และอมรรักษ์ ศึกษาคิดใจเดียว, 2553; Charaensatapon et al., 2014)

ปัจจุบันโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตของเกษตรกรมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคต้นและรากเน่า (stem and root rot) ทำให้มันสำปะหลังมีผลผลิตลดลง เพราะเกิดกับท่อนพันธุ์ซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์และที่รากซึ่งเป็นส่วนของผลผลิตโดยตรง ในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีรายงานความเสียหายที่เกิดจากโรสดังกล่าวมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลักษณะอาการต้นและรากเน่าขึ้นอยู่กับเชื้อสาเหตุที่เข้าทำลาย ซึ่งในต่างประเทศแบ่งลักษณะอาการของโรคที่สำคัญออกเป็น 1) โรคต้นเน่า (stem rot) เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulate* และ *Lasiodiplodia theobromae* ซึ่งเกิดกับส่วนของท่อนพันธุ์และลำต้น 2) โรครากเน่า (root rot) มี 4 ลักษณะอาการดังนี้ 2.1) โรคเน่าและ (soft rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะกล้าและระยะลงหัวแล้ว มีอาการหัวเน่าและมีกลิ่นเหม็น ต้นเหี่ยว ใบร่วง แหล่งที่เกิดโรคระบาดคือ ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ และทวีปเอเชีย 2.2) โรครากเน่าแห้ง (dry rot) เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus* sp., *Armillariella* sp., *Rosella* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะลงหัวแล้ว รากและหัวมีอาการเน่าแห้ง ฝ่อ มีกลิ่นเหม็นคล้ายไม้เน่า พบเส้นใยเชื้อราสีขาวคล้ายเส้นด้ายและเห็นเจริญปกคลุมบริเวณโคนต้น ต้นเหี่ยวเหลือง แหล่งที่เกิดโรคระบาดคือ ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ และทวีปเอเชีย 2.3) โรคเน่าคอดิน (damping-off or root rot) เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium* sp. และ *Rhizoctonia* sp. พบในทุกระยะตั้งแต่ท่อนพันธุ์ ต้นกล้า ราก และ หัว ต้นจะเหี่ยวเฉาตายและมีราเม็ดผักกาด (sclerotia) พร้อมกับเส้นใยสีขาวปกคลุมส่วนของโคนต้นที่ติดอยู่กับผิวดิน รากละหัวเน่า ไม่มีกลิ่นเหม็น แหล่งที่เกิดโรคระบาดคือ ทวีปแอฟริกา และ ทวีปอเมริกาใต้ 2.4) โรคเน่าดำ (black rot) เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp. และ *Macrophomina* sp. พบในทุกระยะ มีลักษณะท่อนพันธุ์ ต้น ราก และหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่นเหม็น แหล่งที่เกิดโรคระบาดคือ ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาใต้ ในประเทศไทยรายงานโรคโคนเน่า หัวเน่า เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ต่อมา มีรายงานเพิ่มเติมว่าเกิด

จากเชื้อรา *Rigidoporus (Fomes) lignosus* และ *S. rolfsii* (รังษิณี เจริญสถาพร และอมรรักษ์ กิจใจเดียว, 2553) ในปี พ.ศ. 2555 ญัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และคูสิต อธิณูวัฒน์ รายงานว่าโรคลำต้นเน่าเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และในปี พ.ศ. 2557 กรมวิชาการเกษตร รายงานพบการระบาดของรุนแรงของโรคหัวเน่าของมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *P. meadii* ในพื้นที่ อ. เสิงสาง อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา และ อ. น้ำยืน จ. อุบลราชธานี มากกว่า 10,000 ไร่ สร้างความเสียหายต่อผลผลิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557) ต่อมารังษิณี เจริญสถาพร และคณะ (2557) รายงานว่าโรครากและหัวเน่าในประเทศไทยเกิดจากเชื้อรา *P. melonis* สร้างความเสียหายต่อผลผลิตถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ในพื้นที่ดินเหนียว ดินร่วนปนทราย และในสภาพดินที่มีน้ำขัง (Charaensatapon et al., 2014)

เนื่องจาก โรคดังกล่าวเป็น โรคที่มีความสำคัญต่อผลผลิตมันสำปะหลังซึ่งจะมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงสาเหตุที่แท้จริงของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังอย่างชัดเจน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการระบุเชื้อสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังที่แท้จริงในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง โดยใช้เทคนิคดั้งเดิมร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรค เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง

1.3 สมมติฐาน

โรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังในประเทศไทยมีเชื้อก่อโรคมกกว่า 1 ชนิด นอกเหนือไปจากที่เคยมีรายงานไว้เนื่องจากมีลักษณะอาการที่หลากหลาย

1.4 ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางชีวโมเลกุล รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราดังกล่าวโดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) เพื่อการระบุชนิดที่ถูกต้อง รวมทั้งเปรียบเทียบผลของวิธีการปลูกเชื้อและวิธีการปลูกมันสำปะหลังต่อความรุนแรงของโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลัง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบชนิดเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางป้องกันควบคุมโรคก่อนที่แพร่ระบาดเป็นวงกว้างและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตของมันสำปะหลังได้

1.5.2 สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการ ควบคุม และป้องกันการแพร่ระบาดของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียงได้



บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดเดิมในทวีปอเมริกา ถิ่นกำเนิดของมันสำปะหลังมีอยู่ 2 แห่งเมื่อจำแนกตามชนิดของมันสำปะหลัง คือ พันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก สำหรับมันพันธุ์ป่า (wild species) มีถิ่นกำเนิดบริเวณตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ส่วนมันพันธุ์ปลูก (domesticated species) มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโกและประเทศแถบอเมริกา กลาง (सानิต สวัสดิกาญจน์, 2557; Veltkamp and de Bruijin, 1996) มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และ มันฝรั่ง (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2550) ในประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับที่ 3 ของประเทศรองจากข้าวและยางพารา (ไพบุลย์ พุฒินศิลป์, 2551) ในปี 2558 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกทั้งหมดประมาณ 8.96 ล้านไร่ ผลผลิต 32.36 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.56 ตัน เป็นผู้ผลิตรายใหญ่อันดับ 2 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรีย โดยมีสัดส่วนความต้องการใช้ในประเทศประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิต และแปรรูปเพื่อส่งออก 70-80 เปอร์เซ็นต์ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2558; FAO, 2015) ปี 2558 ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง เป็นอันดับ 1 ของโลก มีส่วนแบ่งทางการตลาด 76 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เวียดนาม และกัมพูชา ตามลำดับ สามารถส่งออกผลิตภัณฑ์มันรวม 11.19 ล้านตัน มูลค่า 111,716 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกปี (ตารางที่ 2.1) (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2558) ซึ่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง คือ มันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมันสำปะหลัง โดยส่งออกมันอัดเม็ดไปยังประเทศเนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น ส่วนแป้งมันสำปะหลังจะส่งออกไปยังญี่ปุ่น ฮองกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน (จักรพงษ์ ชาตธีรักษ์, 2554) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด โดยแหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญ 5 อันดับแรก คือ จังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี สระแก้ว ชลบุรี และ ลพบุรี ในปี 2558 จังหวัดนครราชสีมา มีพื้นที่เก็บเกี่ยวทั้งสิ้น 1,549,206 ไร่ ให้ผลผลิต 5,922,085 ตัน (ตารางที่ 2.2) (ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารแล้ว ยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลและอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น อาหารสัตว์ สารให้ความหวาน ผงชูรส กระดาษและสิ่งทอ เป็นต้น (ญุฑิญา เริงजारุพันธ์, 2557) อุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลังที่สำคัญ คือ 1) มันเส้น ใช้เป็นวัตถุดิบให้กับ

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และมันอัดเม็ด 2) มันอัดเม็ด ส่งออกเป็นวัตถุดิบสำหรับอาหารสัตว์ 3) แป้งมัน เหมาะสำหรับนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงปลอม อีกทั้งสามารถนำแป้งมาข่อยให้เล็กลงเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวาน เช่น น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรักโทส และซอร์บิทอล เป็นต้น นอกจากนี้ แป้งมันยังสามารถเป็นตัวประสานในอุตสาหกรรมกระดาษ เคลือบเส้นใยผ้าในอุตสาหกรรมสิ่งทอ รวมถึงใช้ผสมกับสารเคมีต่าง ๆ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไม้อัดและกาว (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2532; ชาญ ธิรพร, 2537; ญุภิกา เรืองจารุพันธ์, 2557; พวงเพชร นรินทรารพร, 2537; ศานิต สวัสดิคิกาญจน์, 2557; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง ปี 2555-2558

ปี	มันอัดเม็ด		มันเส้น		แป้งมันสำปะหลัง				รวมผลิตภัณฑ์	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	แป้งดิบ	แป้งตัดแปร	แป้งดิบ	แป้งตัดแปร	ปริมาณ	มูลค่า
2555	0.084	577	4.612	33,239	2.236	30,796	0.846	18,930	7.778	83,542
2556	0.059	416	5.755	39,515	2.446	34,880	0.897	20,038	9.157	94,849
2557	0.023	157	6.777	48,873	3.012	41,053	0.947	21,633	10.759	111,716
2558	0.037	280	7.3	52,400	2.91	41,200	0.94	22,200	11.187	116,080
อัตราเพิ่ม (เปอร์เซ็นต์)	-12.15	-12.45	19.09	16.78	12.34	1.99	4.63	4.49	15.46	11.81

หน่วย: ปริมาณ = ล้านตัน, มูลค่า = ล้านบาท
ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2558)

ตารางที่ 2.2 เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยวและผลผลิตของแหล่งผลิตที่สำคัญ ปี 2557-2558

จังหวัด	เนื้อที่เพาะปลูก (ไร่)		เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)		ผลผลิต (ตัน)	
	2557	2558	2557	2558	2557	2558
นครราชสีมา	1,674,339	1,672,896	1,536,026	1,549,206	5,776,880	5,922,085
สระบุรี	33,201	34,476	31,797	34,476	115,314	120,265
ลพบุรี	249,889	260,894	220,847	248,043	767,454	856,450
ชัยนาท	64,434	68,400	63,021	66,859	203,918	212,713
สุพรรณบุรี	37,647	39,949	37,328	39,575	121,200	129,199
ปราจีนบุรี	156,780	154,689	150,038	152,321	498,784	540,881
ฉะเชิงเทรา	294,273	283,848	275,890	281,496	999,880	1,014,003
สระแก้ว	452,652	446,238	366,477	437,586	1,233,331	1,555,773
จันทบุรี	239,688	217,621	228,584	212,794	799,050	730,152
ระยอง	52,869	45,163	44,225	44,175	187,811	194,711
ชลบุรี	279,476	274,826	274,122	267,510	1,158,402	1,140,283
กาญจนบุรี	468,448	470,854	460,146	469,205	1,530,105	1,575,692

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559)

ในปี 2559 คาดว่าความต้องการใช้ในประเทศจะเพิ่มขึ้นจากปี 2558 โดยเฉพาะอย่างยิ่งความต้องการเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นจาก 2.30 ล้านตันของหัวมันสดเป็น 2.90 ล้านตันของหัวมันสด ส่วนความต้องการใช้เพื่อผลิตเป็นมันเส้นและแป้งมันสำปะหลังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 2.3) (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2558) ในการส่งออกปี 2559 คาดว่าจะมีการส่งออกผลิตภัณฑ์มัน เนื่องจากประเทศคู่ค้ายังคงมีความต้องการผลิตภัณฑ์มันทั้งในรูปของมันเส้นและแป้งมันสำปะหลังอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะประเทศจีน (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2558)

ตารางที่ 2.3 ความต้องการใช้มันสำปะหลัง ปี 2554-2558

รายการ	2554	2555	2556	2557	2558	อัตราเพิ่ม (เปอร์เซ็นต์)
ส่งออก	19.599	23.372	26.945	31.705	32.408	14.01
ใช้ในประเทศ	7.094	6.996	8.234	8.64	9.48	8.23
- อุตสาหกรรมต่อเนื่อง	6.444	6.528	6.634	6.74	7.18	2.51
- เอทานอล	0.65	0.468	1.6	1.9	2.3	48.12
รวมความต้องการใช้	26.693	30.368	35.179	40.345	41.888	12.58

หน่วย: ล้านตันหัวมันสด

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร (2558)

มันสำปะหลังที่นิยมปลูกมีสองชนิด คือ 1) ชนิดขม มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกสูงต้องนำไปแปรรูปก่อนนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ พันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร มีทั้งหมด 9 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 1 ระยะเวลา 3 ระยะเวลา 60 ระยะเวลา 90 ระยะเวลา 5 ระยะเวลา 72 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 และระยะเวลา 11 จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อีก 3 พันธุ์คือ เกษตรศาสตร์ 50 หัวขบง 60 และหัวขบง 80 ปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมาหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เกล็ดมังกรจัมโบ้ และ ไจแอนท์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะของ ไร่ระยะของ ไร่ระยะของ พันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) และพันธุ์พิรุณ 1 พัฒนาโดยกรมวิชาการเกษตรและมหาวิทยาลัยมหิดล เป็นต้น 2) ชนิดหวานเป็นมันที่ใช้สำหรับบริโภคโดยตรง มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำไม่มีรสขมและสามารถใช้ทำอาหารได้โดยตรง ได้แก่ พันธุ์ระยะเวลา 2 และพันธุ์ห้าหนาทิ เป็นต้น (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542; ยุคติ สาริกะภูติ, 2526) ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปจากการปลูกเพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์ไปเป็นปลูกเพื่ออุตสาหกรรม (ศานิต สวัสดิ์กาญจน์, 2557) ทำให้การปลูกมันสำปะหลังมีความต้องการทางการตลาดเพิ่มสูงขึ้น จึงเป็นเหตุให้มีการปลูกติดต่อกันตลอดทั้งปี ส่งผลให้มีการสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งโรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ 1) โรคใบไหม้ (bacterial blight) ความเสียหาย 30-90 เปอร์เซ็นต์ 2) โรคแอนแทรกคโนส (anthracnose) ความเสียหาย 40-80 เปอร์เซ็นต์ 3) โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf spot) ความเสียหาย 14-20 เปอร์เซ็นต์ 4)

โรคใบจุดไหม้ (blight leaf spot) ความเสียหาย 12-30 เปอร์เซ็นต์ 5) โรคต้นและรากเน่า (stem and root rot disease) ความเสียหาย 10-100 เปอร์เซ็นต์ (เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง, มปป; รั้งยี เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ คัดใจเดียว, 2553; Charaensatapon et al., 2014)

2.2 ประวัติการปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) หลักฐานพบว่าปลูกในประเทศโคลัมเบียและเวเนซุเอลา มานานกว่า 3,000-7,000 ปี (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) การแพร่กระจายในสมัยที่มีการล่าอาณานิคมในคริสต์ศตวรรษที่ 15 โดยพวกนักค้าทาสได้นำมันสำปะหลังจากบราซิลไปปลูกในทวีปแอฟริกา ต่อมา พ.ศ. 2282 มีชาวโปรตุเกสนำมันสำปะหลังไปปลูกที่เกาะริยูเนียน (Reunion) และแพร่กระจายไปยังมาดากัสกา (ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์, ม.ม.ป.) ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งต่าง ๆ ของโลก 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.) สำหรับประเทศไทยนั้น ไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด สันนิษฐานว่านำเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ประเทศศรีลังกาและฟิลิปปินส์คือประมาณ พ.ศ. 2329-2383 (ยุคติ สาริกะภูติ, 2526; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) ซึ่งมีการปลูกมันสำปะหลังเป็นการค้าเพื่อใช้ทำแป้งและสาकुในภาคใต้ โดยปลูกระหว่างแถวของต้นยางพารากันมากกว่า 70 ปีแล้ว โดยเฉพาะที่จังหวัดสงขลามีอุตสาหกรรมทำแป้งและสาकुจำหน่ายไปยังป็นังและสิงคโปร์ แต่การปลูกมันสำปะหลังทางภาคใต้อายุ ๑ ลดลงเมื่อมีการขยายการปลูกยางพารา ต่อมาได้มีการปลูกในภาคตะวันออก คือ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง และเมื่อความต้องการของตลาดในด้านผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้พื้นที่ในภาคตะวันออกผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกอื่น ๆ จนในปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดของประเทศไทย (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.)

2.3 อนุกรมวิธานและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

2.3.1 อนุกรมวิธาน

มันสำปะหลังมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz เป็นพืชใบเลี้ยงคู่จัดอยู่ในคลาสไดคอตีลีโดเน (Class Dicotyledonea) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า cassava จัดอยู่ในวงศ์ (family) Euphorbiaceae หรือวงศ์มะไฟ (सानิต สวัสดิการุณจัน, 2557; Allem, 2002) วงศ์มะไฟเป็นวงศ์ที่มี

ลักษณะเด่น คือ มียางสีขาวในทุกส่วนของลำต้น เมื่อเคาะใบหรือตัดลำต้นทำให้ยางไหลออกมาได้ง่าย นอกจากมันสำปะหลังแล้ว ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่จัดอยู่ในวงศ์นี้ เช่น ยางพารา สบู่ดำ และละหุ่ง (दन्य सुगुधर, 2537; सनलत सवलदलकगुणुन, 2557)

Class Dicotyledonea

Subclass Archichlamydeae

Order Geraniales or Euphorbiales

Family Euphorbiaceae

Genus *Manihot*

Species *esculenta*

(दन्य सुगुधर, 2537; सनलत सवलदलकगुणुन, 2557; Allem, 2002)

2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มันสำปะหลังประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 5 ส่วน คือ ราก ลำต้น ใบ ช่อดอกและดอก ผลและเมล็ด (จ้ลลลนง เนลยมจ้จ้จ้จ้จ้จ้, 2541, 2547; सनलत सवलदलकगुणुन, 2557) ซึ่งแต่ละส่วนมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

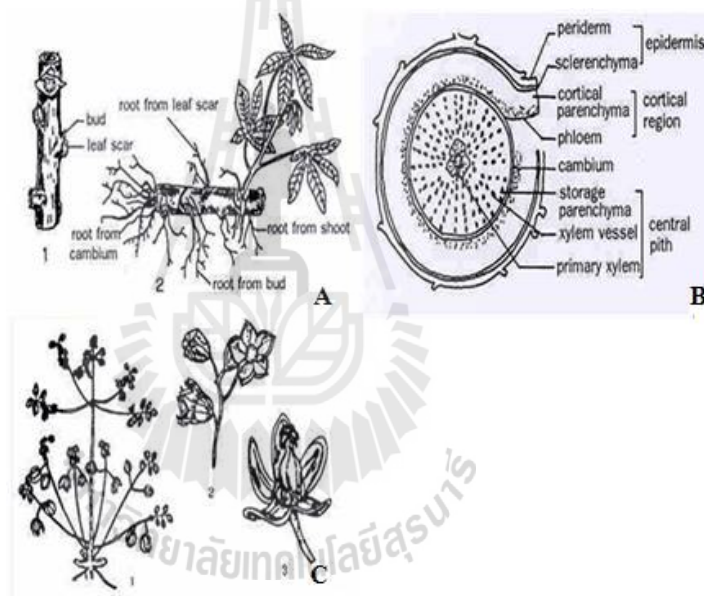
ราก ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) รากเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูกและขยายใหญ่เป็นหัว (thickened root) หัวมันสำปะหลังเมื่อตัดตามขวางมีส่วนประกอบตามภาพที่ 2.1A-B ดังนี้ 1) เปลือกชั้นนอก (periderm) เป็นชั้นของเซลล์ผิวชั้นนอก (epidermal cell) และชั้นของคอร์ก (cork layer) รวมกัน 2) เปลือกชั้นใน (cortical region) เป็นส่วนของคอร์เทกซ์ (cortex) และกลุ่มท่ออาหาร (phloem bundle) เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในเรียกรวมกันว่า peel 3) ส่วนสะสมแป้งหรือไส้กลาง (starchy flesh หรือ central pith) ประกอบด้วยเซลล์พาราเรนไคมา (parenchyma cell) กลุ่มท่อน้ำ (xylem bundle) และท่อน้ำยาง (latex tube) (จ้ลลลนง เจลยมจ้จ้จ้จ้จ้, 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 ความยาวของชั้น (storey length) เหนือรอยแผลใบมีตา (bud) (दन्य सुगुधर, 2537)

ใบ เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เกิดเวียนสลับรอบลำต้น (spiral) มีการจัดเรียงตัว (phyllotaxy) เท่ากับ 2/5 แผ่นใบเว้าลึกเป็นแฉก (lobe) แบบ palmate ใบมีก้านใบ (petiole) ที่โคนก้านใบติดกับลำต้นมีหูใบ (stipule) (दन्य सुगुधर, 2537)

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 (दन्य सुगाहार, 2537)

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



ภาพที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของต้นมันสำปะหลัง (A) ระบบรากเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก (B) องค์ประกอบของลำต้นที่ทำารตัดขวาง (C) ลักษณะช่อดอก (ที่มา: จำลอง เจียมจันรรจา, 2541)

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

2.3.3 การปลูkmันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้นมีอายุอยู่ได้หลายปี การปลูกจะใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อนปักไปในดิน ตรงบริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นรากฝอย หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือน รากจะค่อย ๆ สะสมแป้ง และมีขนาดโตขึ้น เรียกว่า หัวมันและจะสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันได้ หลังจาก 6 เดือน ผ่านไปแล้วโดยจะยึดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาที่อยู่ด้านข้างท่อน มันจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป (คนัย สุภาพาร, 2537) โดยแหล่งที่ปลูkmันสำปะหลังมากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ตลอดปี สามารถปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด แต่จะเจริญได้ดีในดินร่วนปนทราย ไม่มีน้ำขัง เกษตรกรนิยมปลูกในช่วงต้นฤดูฝน คือประมาณเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม เพิ่มอีก 20 เปอร์เซ็นต์ ปลูกในช่วงฤดูแล้ง ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ ส่วนที่เหลือ 13 เปอร์เซ็นต์ จะปลูกในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม สำหรับการปลูกในช่วงต้นฤดูฝนนี้ ผลผลิตหัวสดที่ได้จะสูงกว่า การปลูกในช่วงอื่น แต่ในดินที่มีลักษณะเนื้อดินค่อนข้างหยาบ การปลูกในช่วงฤดูแล้งจะให้ผลผลิตสูงที่สุด ดังนั้นในการตัดสินใจเลือกช่วงการปลูkmันสำปะหลังที่เหมาะสม จึงต้องพิจารณาทั้งปริมาณน้ำฝน และลักษณะของดิน (จำลอง เขียมจันรรจา, 2541) การปลูkmันสำปะหลังมีด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่ การปลูกแบบนอนและแบบปัก (สมพงษ์ กาทอง, 2537; โสภณ สินธุประมา, 2526; ศานิต สวัสดิคกาญจน์, 2557) 1) การปลูกแบบนอน เป็นวิธีการที่นิยมปลูกกันมากในอดีต แต่ปัจจุบันนิยมปลูกกันน้อยมากเนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ท่อนพันธุ์มีการเจริญเติบโตช้า วัชพืชงอกเร็วกว่าท่อนพันธุ์ ทำให้กำจัดวัชพืชยาก และจำนวนต้นรอดตายและจำนวนต้นที่เก็บเกี่ยวค่อนข้างต่ำ แต่การปลูกแบบวางนอนมีข้อดี คือ ไม่ต้องระวังเรื่องการปลูกลบขั้ว โดยมีจำนวนต้นรอดตาย 1,461 ต้น/ไร่ และมีจำนวนต้นเก็บเกี่ยว 1,624 ต้น/ไร่ ในขณะที่การปลูกแบบปัก มีจำนวนต้นรอดตายอยู่ในช่วง 1,919-2,087 ต้น/ไร่ และมีจำนวนต้นเก็บเกี่ยว 2,092-2,235 ต้น/ไร่ (สมพงษ์ กาทอง, 2537; ศานิต สวัสดิคกาญจน์, 2557) 2) การปลูกแบบปัก เป็นวิธีที่นิยมปลูกในปัจจุบัน วิธีการนี้ทำให้ระยะปลูกมีความถูกต้อง แม่นยำ และใกล้เคียงตามคำแนะนำในการปลูกของกรมวิชาการเกษตร การปลูกแบบปักมีข้อดี ได้แก่ ต้นมันสำปะหลังงอกได้เร็ว สะดวกต่อการกำจัดวัชพืชและการปลูกซ่อม และให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกแบบวางนอนถึง 20 เปอร์เซ็นต์ การปลูกแบบปักแบ่งออกเป็น 2 วิธีตามการเอียงของท่อนพันธุ์คือการปักตรง 90 องศา และการปักเอียง 45 องศา อย่างไรก็ตามการปลูกด้วยการปักทั้งสองวิธีให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน โดยอยู่ในช่วง 2.63-2.84 ตัน/ไร่ ในขณะที่การปลูกแบบวางนอนมีผลผลิตหัวสด เท่ากับ 1.65 ตัน/ไร่ นอกจากนี้การปลูกแบบปักทั้งสองวิธียังมีเปอร์เซ็นต์แป้งและเปอร์เซ็นต์มันแห้งสูงกว่าการปลูกแบบนอนด้วย (สมพงษ์ กาทอง, 2537; ศานิต สวัสดิคกาญจน์, 2557) โดยใช้ระยะปลูก 1x1 เมตร ปักท่อนพันธุ์ให้ตั้งตรงลึกในดินประมาณ 10 เซนติเมตร ใช้ท่อนพันธุ์มันที่สดอายุ 10-12 เดือน ตัดทิ้งไว้ไม่เกิน 15 วัน โดยแต่ละท่อนมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร (ฐิติมา วีระ-

ศิลป์, 2542; ยุคติ สาริกะภูติ, 2526) โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกทั้งไปในปัจจุบันได้แก่ พันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร มีทั้งหมด 9 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 1 ระยะเวลา 3 ระยะเวลา 60 ระยะเวลา 90 ระยะเวลา 5 ระยะเวลา 72 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 และระยะเวลา 11 พันธุ์มันสำปะหลังของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มี 3 พันธุ์คือ เกษตรศาสตร์ 50 หัวยบง 60 และหัวยบง 80 (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมาหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เกลือค้มงกรจัมโบ้ และใจแอนท์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะของรับรองพันธุ์โดย กรมวิชาการเกษตร (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) เป็นต้น แต่ในสภาพการปลูกทั่วไป ในช่วง 3-4 ปี ที่ผ่านมามันสำปะหลังมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายโดยแมลงศัตรูที่เข้าทำลายมันสำปะหลังที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยแป้ง และไรแดง เป็นต้น ส่วนโรคที่พบได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคแอนแทรกคโนส โรคลำต้นเน่า และโรคโคนเน่า หัวเน่า เป็นต้น

2.4 ข้อมูลทั่วไปของโรคต้นและรากเน่า (stem and root rot)

แบ่งลักษณะอาการของโรคดังกล่าวออกเป็น 2 ชนิด คือ 1) โรคต้นเน่า (stem rot) เกิดจากเชื้อราหลายชนิด โดยเชื้อราที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก (ตารางที่ 2.4) คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ก่อให้เกิดกับท่อนพันธุ์หรือลำต้นที่แก่แล้วและตกค้างในไร่ ระบบท่อนลำเลียงเน่ากลายเป็นสีดำ โดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์ หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ มีกลุ่มเม็ดพิกนินเดีย (pycnidia) ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตาย (ภาพที่ 2.2 A) (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน, 2545) และเชื้อรา *Glomerella cingulate* พบทั่วไปในท่อนพันธุ์ที่กองไว้หรือตัดทิ้งไว้ในแปลง ระยะแรกท่อนพันธุ์จะเน่าตรงส่วนปลาย และจะลุกลามเข้าไปทำให้เปลือกบวมเน่าต่อไปจะเหี่ยวแห้ง ได้เปลือกเป็นสีดำ บนผิวเปลือกจะเป็นเม็ดนูน ๆ แล้วจะแตกเป็นผง เรียก เพอริเทเซีย (perithecia) (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน, 2545) (ภาพที่ 2.2 B) เชื้อจะแพร่ไปกับท่อนพันธุ์และเข้าทำลายเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อราจะเข้าทางแผล และลุกลามมากขึ้นเมื่อมีความชื้นสูงนอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *Sphaerostibe* และ *Cochilobolus* ที่ก่อให้เกิดอาการลำต้นเน่าและลำต้นไหม้ในมันสำปะหลังแต่พบไม่มากนัก (ศานิต สวัสดิกาญจน์, 2557; Makambila et al., 1994; Msikita et al., 1997; Hillocks and Wydra, 2002; Motokura et al., 2014) 2) โรครากหรือหัวเน่า (root rot) โรคนี้เกิดจากเชื้อราหลายชนิด ทำให้เกิดความเสียหายให้แก่มันสำปะหลังทุกการเจริญเติบโต มี 4 ลักษณะอาการ (ตารางที่ 2.5) 2.1) โรคเน่าและ (soft rot) หรือโรคเน่าเปียก (wet rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะกล้าและระยะลงหัวแล้ว มีอาการหัวเน่าและมีกลิ่นเหม็นต้นเหี่ยว ใบร่วง (ภาพที่ 2.3) 2.2) โรครากเน่าแห้ง (dry rot) เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus* sp.,

Armillariella sp., *Rosella* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะลงหัวแล้ว รากและหัวมีอาการเน่าแห้ง ฝ่อ มีกลิ่นเหม็นคล้ายไม้เน่า พบเส้นใยเชื้อราสีขาวคล้ายเส้นด้ายและเกิดเจริญปกคลุมบริเวณโคน ต้น ต้นเหี่ยวเหลือง (ภาพที่ 2.4) 2.3) โรคเน่าคอดิน (damping-off or root rot) เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium* sp. และ *Rhizoctonia* sp. พบในทุกระยะตั้งแต่ท่อนพันธุ์ ต้นกล้า ราก และหัว ต้นจะเหี่ยวเฉาตาย และมีราเม็ดฝักกาด (sclerotia) พร้อมกับเส้นใยสีขาวปกคลุมส่วนของโคนต้น (ภาพที่ 2.5) 2.4) โรคเน่าดำ(blackrot) เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp. และ *Macrophomina* sp. พบในทุกระยะ มีลักษณะท่อนพันธุ์ ต้น ราก และหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่นเหม็น (ภาพที่ 2.6)

ตารางที่ 2.4 ลักษณะที่สำคัญของโรคต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella* และ *Lasiodiplodia*

ลักษณะ	<i>Glomerella</i>	<i>Lasiodiplodia</i>
เชื้อราสาเหตุโรค	<i>G. cingulata</i>	<i>L. theobromae</i> , <i>L. parva</i>
ส่วนที่เกิดโรค	ท่อนพันธุ์อย่างเดียว	ท่อนพันธุ์ ลำต้นแก่
ตำแหน่งที่เกิดโรค	ส่วนปลายของท่อนพันธุ์	ส่วนโคนของท่อนพันธุ์
สีได้เปลือกของลำต้นที่เน่า	สีดำ	สีน้ำตาลดำ
ส่วนขยายพันธุ์	เม็ดนูนตั้ง (periticia)	เม็ดขนาดเล็ก (pynidia)

ที่มา : สานิต สวัสดิคาญจน์ (2557), Hillocks and Wydra (2002)

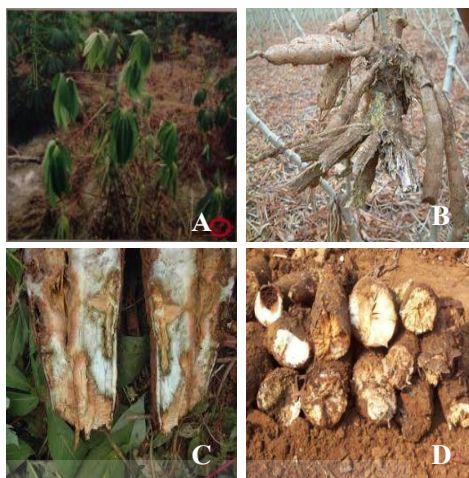


ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะอาการของโรคต้นเน่า (stem rot) (A) เกิดจากเชื้อรา *G.cingulate* มีลักษณะอาการเน่าตรงส่วนปลายของท่อนพันธุ์ สีได้เปลือกของลำต้นเน่าเป็นสีดำ(B)เกิดจากเชื้อรา *L.parva* มีลักษณะอาการเน่าตรงบริเวณ โคนท่อนพันธุ์ สีได้เปลือกของลำต้นเน่าเป็นสีน้ำตาลถึงดำ (ที่มา: Hillocks and Wydra, 2002; Motokura et al., 2014)

ตารางที่ 2.5 ลักษณะที่สำคัญของโรครากหรือหัวเน่า

ลักษณะที่สำคัญ	ชนิดของโรค			
	โรครากเน่าและเน่าเปื่อย	โรครากเน่าแห้ง	โรครากอดดิน	โรครากดำ
เชื้อสาเหตุ	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> <i>Phytophthora drechleri</i> , <i>P. palmivora</i> , <i>P. palmivora</i> var <i>palmivora</i> , <i>P. tropicalis</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>P. nicotianae</i> var <i>parasitica</i> , <i>P. erythroseptica</i> , <i>P. cryptogea</i> , <i>Pythium</i> sp <i>P. sulcatum</i>	<i>Rigidoporus lignosus</i> , <i>Leptorus lingnosus</i> , <i>Phaeolus . manihotis</i> , <i>A.</i> <i>mellea</i> , <i>Rosella necatrix</i> และ <i>Fusarium</i> spp.	<i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	<i>Lasiodiplodia</i> . <i>theobromae</i> , <i>L.</i> <i>euphorbicola</i> , <i>L.</i> <i>pseudotheobromae</i> , <i>N. hyalinum</i> , <i>Macrophomina .</i> <i>phaseolina</i> ,
ระยะที่เกิดโรค	ระยะกล้าและลงหัว	ระยะลงหัว	ทุกระยะ	ทุกระยะ
การมีเส้นใยปกคลุม	ไม่มี	มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย และพบเห็ดบริเวณ โคน ต้น	มีลักษณะเป็น กระจุกสร้างเม็ด sclerotia สีน้ำตาล	มีเส้นใยสีขาวเกาะติด บริเวณ โคนต้น สร้าง เม็ด pynidia สีดำ
บริเวณเน่า	หัวและ	หัว ราก เน่าแห้ง ฝ่อ	หัว ราก ท่อนพันธุ์	หัว ราก ท่อนพันธุ์ ดำ
การมีกลิ่นเน่า แหล่งที่เกิดโรค ระบาด	มีกลิ่นเน่า แอฟริกา อเมริกาใต้ เอเชีย	มีกลิ่นเน่าคล้าย ไม้เน่า แอฟริกา อเมริกาใต้ เอเชีย	ไม่มีกลิ่นเน่า แอฟริกา อเมริกา ใต้	ไม่มีกลิ่นเน่า แอฟริกา อเมริกาใต้ เริ่มพบการระบาดใน ประเทศไทย

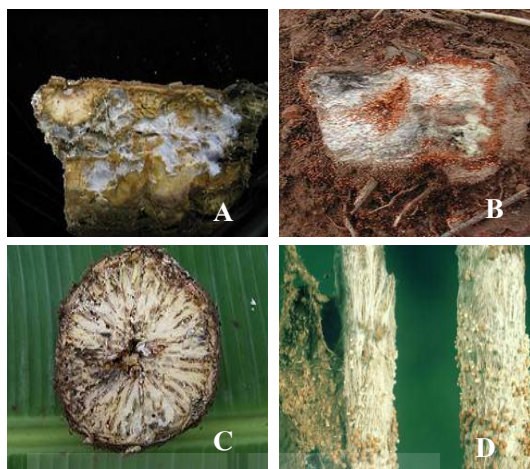
ที่มา : ศานิต สวัสดิการุจน์ (2557), Hillocks and Wydra (2002), Duchanee et al. (2015a)



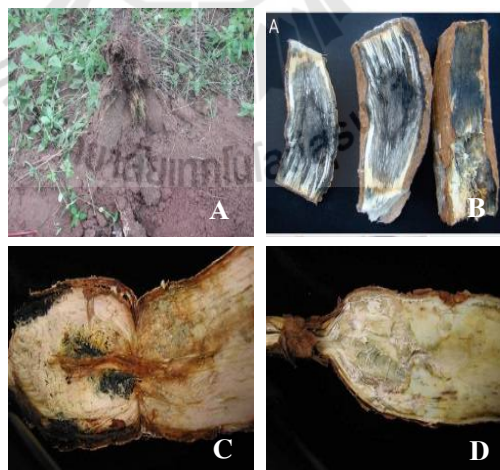
ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะอาการของ โรคเน่าและ/เน่าเปียก (soft rot/wet rot) (A) ลักษณะอาการต้นเหี่ยวเฉา ใบล่างมีสีเหลือง และเหี่ยวแห้งหลุดร่วง (B) ลักษณะอาการหัวเน่าและ มีกลิ่นเหม็น ลำต้นบนดินอาการปกติ (C-D) ลักษณะอาการหัวเน่าและ เนื้อเยื่อสีขาวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีอาการและ เปื่อยยุ่ย (D) (ที่มา: กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545; Hillocks and Wydra 2002; Charaensatapon et al., 2014)



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะอาการของ โรคเน่าแห้ง (dry rot) (A) หัวมันสำปะหลังมีอาการแห้งและฟอ (B) หัวมันสำปะหลังแสดงอาการเน่าแห้ง เนื้อเยื่อภายในเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลแดง (C) หัวมันสำปะหลังแสดง อาการหัวเน่าแห้ง เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล คล้ายรากไม้บริเวณ ใกล้เคียงพบเส้นใยของเชื้อราจะก่อตัวเป็นดอกเห็ดเจริญอยู่ มีกลิ่นเหม็นคล้ายไม้เน่า (D) บริเวณโคนต้น พบเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ (ที่มา: กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545; Hillocks and Wydra 2002)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าคอดิน (damping-off or root rot) (A-B) หัวมันสำปะหลังมีอาการเน่า เนื้อเยื่อเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล มีเส้นใยเชื้อรา สีขาวเจริญปกคลุม (C) หัวมันสำปะหลังแสดงอาการเน่า เนื้อเยื่อเปลี่ยนสี บริเวณท่อลำเลียงน้ำและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าหัวมันตามขวางจะพบเป็นเส้น ๆ (D) บริเวณ โคนต้นพบเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ และพบเม็ด sclerotia เกาะบริเวณ โคนต้นทั้งใต้ดินและบนดิน (ที่มา: กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545; Hillocks and Wydra, 2002)



ภาพที่ 2.6 แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่าดำ (stem and root black rot) (A) แสดงลักษณะอาการหัวเน่าดำ ในแปลงปลูก พบอาการหัวเน่าดำ และ มีกลิ่นเหม็น (B) หัวมันสำปะหลังมีอาการเน่าแห้งเนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง เทา และดำ (C-D) หัวมันสำปะหลังแสดงอาการเน่า เนื้อเยื่อบุบตัว เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง เทา น้ำตาล และดำ (ที่มา: Hillocks and Wydra, 2002; Machado et al., 2014a)

2.5 ข้อมูลเฉพาะของโรคต้นและรากเน่าดำ (stem and root black rot)

เชื้อสาเหตุโรค: เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*, *L. euphorbicola*, *L. pseudotheobromae*, *N. hyalinum*,

ลักษณะอาการ หัวมันสำปะหลังอาการหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีทั้งอาการเน่าแห้งเน่าและ เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันสำปะหลังเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสี เหลือง น้ำตาล เทา และดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 (A-D) บริเวณ โคนต้นที่ติดอยู่กับผิวดินพบมีด pycnidia สีดำนูนหรือน้ำตาลดำกระจายรอบโคนต้นหรือบริเวณท่อนพันธุ์เดิม ดังแสดงในภาพที่ 4.7 (E-H) ระบบลำเลียงเน่าเป็นสีดำ โดยจะลุกลามจากแผล รอยตัดของท่อนพันธุ์ หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ มีกลุ่มมีด pycnidia ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตาย



ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง(A) อาการหัวเน่าดำ เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล เทาและดำ (B-D) อาการหัวเน่าแห้งดำ เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาและดำ (E-H) พบมีด pycnidia สีดำนูน กระจายบริเวณ โคนต้นเหนือดิน (ที่มา: Duchanee et al., 2015a)

2.6 ชีววิทยาของเชื้อรา Family Botryosphaeriaceae

เชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อราใน Family Botryosphaeriaceae โดยมีเชื้อราสกุลสำคัญที่เข้าทำลาย คือ สกุล *Lasiodiplodia* และ *Scytalidium* (*Neoscytalidium*) ซึ่งมีอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Fungi

Division Amastigomycota

Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Subclass Coelomycetidae

Order Pleosporales

Family Botryosphaeriaceae

Genus *Lasiodiplodia*

Genus *Neocytalidium*

(กาญจนา นิรภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Barnett and Hunter, 1987; Sutton, 1980)

2.6.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

2.6.1.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

เชื้อรา *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) เป็นเชื้อราที่มีความซับซ้อนในการตั้งชื่อ และมีชื่อเรียกได้หลายชื่อเนื่องจากมีรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิดกระจายทั่วไปในเขตร้อน ในปัจจุบันการจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานของเชื้อราชนิดนี้ยังอ้างอิงตามรูปแบบของ Sutton (1980) และ Barnett and Hunter (1987) เดิมเชื้อรา *L. theobromae* ถูกจัดให้อยู่ใน Subdivision Ascomycotina, Class Ascomycetes, Order Pleosporales, Family Botryosphaeriaceae และ Genus *Botryosphaeria* โดยมีรายงานที่อ้างถึง teleomorph state ของเชื้อ *L. theobromae* โดยเรียกชื่อว่า *Botryosphaeria rhodina* ในปี 1867 Curtis (Berk and Curtis, 1867) ได้ทดลองแยกเชื้อ type material ของเชื้อรา *Physalospora rhodina* จากต้น *Rosa rubiginosa* และระบุว่า เป็นเชื้อราชื่อ *Sphaeria rhodina* B.&C. พร้อมกับได้บันทึกชื่อเชื้อรานี้ไว้ในหนังสือ “Geographical and natural history survey of North Carolina” แต่ไม่ได้ลงรายละเอียดเพิ่มเติมไว้แต่อย่างใด (Alves et al., 2008) ต่อมาภายหลัง Cooke ได้ให้คำนิยามอย่างเป็นทางการของเชื้อราเดียวกันนี้ไว้ในชื่อ *P. rhodina* โดยอ้างอิงจากงานของ Berk and Curtis (1867) เนื่องจาก Cooke เป็นบุคคลแรกที่ได้ให้คำนิยามของราชนิดนี้ ดังนั้นในการอ้างอิงถึงราชนิดนี้ในชื่อ *P. rhodina* จึงอ้างอิงภายใต้ชื่อของ Cooke แต่เพียงผู้เดียว ต่อมาในปี 1970 von Arx ได้จัดให้เชื้อราชนิดนี้อยู่ใน Genus *Botryosphaeria* ดังนั้นเชื้อรานี้จึงได้รับการเปลี่ยนชื่อเป็น *B. rhodina* นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระยะ anamorph กับ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* โดยในปี 1925 Stevens ได้แยก ascospore ของเชื้อราชนิดหนึ่งจาก cotton stems ในรัฐฟลอริดา โดยคาดว่าอาจจะเป็น *P. gossypina* แต่ก็ยังไม่ได้พิสูจน์ให้แน่ชัด และยังสามารถแยกเชื้อราในกลุ่มเดียวกับ ascomycete จากต้นไม้ใน Genus *Hicoria*, *Ilex*, *Liquidambar*, *Quercus* และ *Vitis* ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อราที่แยกได้จากพืชทุกชนิดที่กล่าวมาสามารถสร้าง conidia ได้จากหนึ่ง ascospore และได้ถูกพิสูจน์ในภายหลังว่านั่นเป็นเชื้อรา *L. theobromae* โดย Stevens (1926) เพราะฉะนั้น Stevens จึงเชื่อว่า *P. gossypina* แท้ที่จริงก็คือเชื้อราชนิดเดียวกันกับ *P. rhodina* ที่ถูก

อ้างอิงโดย Cooke นั้นเอง อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีรายงานมาสนับสนุนงานวิจัยนี้เพิ่มเติมแต่อย่างใด ต่อมาในปีเดียวกัน Stevens ได้ศึกษาระยะ perfect state ของเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรค stem end rot คือ เชื้อรา *Diplodia* sp. ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลส้ม และได้ระบุว่า เป็นเชื้อราใน Genus *Physalospora* และแยกเชื้อราชนิดเดียวกันได้จากพืชอีกสองชนิดคือ *Persea* และ *Rosa* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกมาได้ Stevens พบว่า ascospore เดียวของเชื้อราดังกล่าว สามารถสร้าง conidia ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ *D. gossypina* ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงรายงานของ Stevens เท่านั้นที่อ้างอิงถึงระยะ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

ในปี 2006 Crous และคณะ ได้ทำการศึกษาและแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่เดิมจัดอยู่ใน Family Botryosphaeriaceae นี้ยังมีความแตกต่างกันอยู่มากในระดับของ phylogenetic lineages ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา จากผลการศึกษาทำให้ Genus *Botryosphaeria* ถูกจำกัดให้มีเชื้อราเพียง 2 ชนิด คือ *B. dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not. และ *B. corticis* (Dermaree & M.S. Wilcox) Arx & E. Müll. แสดงให้เห็นว่าเชื้อราใน Genus *Botryosphaeria* ไม่น่าจะเป็น teleomorph state ของเชื้อรา *L. theobromae* อีกต่อไป (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552) เชื้อราใน Genus *Lasiodiplodia* นอกจากเชื้อรา *L. theobromae* แล้ว ยังมีการค้นพบเพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด เช่น ในปี 2004 Pavlic และคณะ ได้รายงานเชื้อราที่ค้นพบใหม่ในชื่อ *L. gonubiensis* sp. nov. ในปี 2008 Alves และคณะ ได้ศึกษาจัดจำแนกเพิ่มเติมได้แก่ *L. crassispora*, *L. venezuelensis*, *L. rubropurpurea*, *L. gonubiensis*, *L. pseudotheobromae* และ *L. parva* ซึ่งเชื้อรา *L. parva* รายงานว่าพบในดินในแปลงปลูกมันสำปะหลังที่ประเทศโคลัมเบีย ต่อมาในปี 2008 Pavlic และคณะ ได้รายงานเพิ่มเติมอีกหนึ่งสปีชีส์ คือ *L. margaritacea* ในปี 2010 Abdollahzadeh และคณะ ได้ศึกษาจัดจำแนกเพิ่มเติม ได้แก่ *L. citricola*, *L. abnormis*, *L. foiorii*, *L. gilanensis*, *L. hormozaganensis*, *L. iraniensis*, *L. margaritacea*, *L. paraphysaria*, *L. plurivora*, *L. undulat* และ *L. venezuelensis* ในประเทศอิหร่าน ต่อมาในปี 2014 Macado และคณะ ได้ศึกษาจัดจำแนก เชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคโคนและรากเน่า (collar and root rot) ของสับจ๋า ในประเทศบราซิลเพิ่มเติม ได้แก่ *L. viticola*, *L. missouriana*, *L. jathophicola*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. macrospora*, และ *L. subglobosa* ซึ่งสับจ๋าจัดเป็นพืชใน family เดียวกันกับมันสำปะหลัง คือ Euphorbiaceae โดยในปี 2015 Trakunyingcharoen และคณะ ได้รายงานเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. นอกเหนือจาก เชื้อรา *L. theobromae* ที่ก่อให้เกิดโรคพืชในประเทศไทยแล้วยังพบสปีชีส์อื่นๆ ดังนี้ 1) เชื้อรา *L. pseudotheobromae* ก่อให้เกิดโรคในยางพารา ซาหอมหมื่นลี้ กาแฟ มะม่วง อะโวคาโด ฝรั่ง ลำไย มะเดื่อ มะยม ชมพู่ สนสามใบ สนจูนิเปอร์ (juniperus) และ กระดังงา 2) เชื้อรา *L. gonubiensis* ก่อโรคใน ชมพู่ และ 3) เชื้อรา *L. thailandica* ก่อโรคในมะม่วง

และชมพู (Trakunyingcharoen et al., 2015b) โดยศึกษาจากความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางพันธุศาสตร์เป็นสำคัญ (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

Lasiodiplodia spp. พบได้ทุกภูมิภาคของโลก โดยพบได้มากที่สุดในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น กล้าย ลิ่นจีเงาะ มะม่วง น้อยหน่า ทุเรียน พืชตระกูลแตง ลำไยไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ยืนต้น เป็นต้น ทำให้เปลือกผลไม้มีสีน้ำตาลดำ มีของเหลวไหลออกมาเป็นผล มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุม ในลำไยจะทำให้ขั้วผลเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อผลมีสีขาวขุ่น นอกจากก่อให้เกิดโรครากหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว ยังเป็นสาเหตุของโรคยอดแห้งตายของสน โรคยางไหลของพืชตระกูลส้ม (กาญจนา นิรภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552) โรคหัวเน่าของมันเทศ โรคโคนและรากเน่าของสับปะรด (Latha et al., 2009; Machado 2012; Machado et al., 2014b) นอกจากนี้เชื้อรา *Lasiodiplodia* เป็นเชื้อสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังแล้ว ยังมีการรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Scytalidium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ใน family เดียวกันอีกด้วย (Machado et al., 2014a)

2.6.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เส้นใยเมื่อยังอายุน้อยมีสีขาวละเอียดและค่อนข้างฟู ซึ่งจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อโคโลนีแก่เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาดำ เส้นใยมีผนังกัน มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเส้นใยของเชื้อราเมื่ออายุมากจะสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia ซึ่งอาจมีช่องเดี่ยวหรือหลายช่องก็ได้ ภายในประกอบด้วยเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี (hyaline) รูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) มีผนังกัน (septate) บางครั้งอาจพบว่าการแตกกิ่งก้านสาขา มี conidiogenous cells ใสไม่มีสีเช่นกัน ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างเป็นทรงกระบอก มีการแบ่งเซลล์แบบ holoblastic อาจมีการจัดเรียงเซลล์แบบเป็นปล้อง 1-2 ปล้อง (annellations) หรือเรียงตัวในระนาบเดียวกันเพื่อให้ความหนาแน่นมากขึ้น (periclinal thickenings) (Alves et al., 2008; Cilliers et al., 1993) โดย conidiogenous cells จะมีหน้าที่ในการสร้าง conidia ซึ่งเป็น asexual spores โดยสร้างอยู่บนปลายของ conidiophores (Stover, 1972) ลักษณะของ conidia เมื่ออ่อนจะมีเพียงเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (subovoid to ellipsoid-ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง ไม่มีผนังกัน ผนังเซลล์หนาและประกอบไปด้วย granular และผนังเซลล์จะยังคงไม่มีสีไปจนกว่าจะถูกปล่อยออกมาจาก pycnidia จากนั้น conidia จึงจะเริ่มสร้างเม็ดสี สีน้ำตาลเข้ม และสร้างผนังกัน (septum) 1 ชั้นตรงกลาง ทำให้แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่มีขนาดประมาณ 26.2-27x14-14.4 ไมครอน ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Alves et al., 2008, Cilliers et al., 1993)

2.6.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp.

2.6.2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp.

เชื้อรา *Neoscytalidium* sp. เป็นเชื้อราที่มีความซับซ้อนในการตั้งชื่อ และมีชื่อเรียกได้หลายชื่อ โดยในปี 1993 ได้จัดตั้งชื่อเชื้อรา *Scytaalidium* sp. ในระยะพิกนินเดียม (pycnidia stage) ว่า *Hendersonula toruloidea* ต่อมาในปี 1999 Lacaz และคณะได้ทำการเปลี่ยนชื่อเป็น *Natrasia mangiferae* แต่ยังคงให้ชื่อ *Hendersonula toruloidea* และ *Scytaalidium* sp. เป็นชื่อคล้าย ต่อมาปี 2006 Crous และคณะได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Neoscytalidium dimidiatum (hyalinum)* (Machado et al., 2012) ในปี 1997 Msikita และคณะรายงานว่าพบ จากการสำรวจโรครากและต้นเน่า (root and stem rot) ของมันสำปะหลังในแอฟริกาตะวันออก พบเชื้อรา *Natrasia mangiferae* เข้าทำลายมันสำปะหลังก่อให้เกิดโรคดังกล่าวสูงถึง 40.6 เปอร์เซ็นต์ ทำการพิสูจน์โรคพบว่าก่อให้เกิดโรคจริง ต่อมาในปี 2002 Hillocks and Wydra รายงานว่าโรครากดำ (black rot) ของมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *S. lignicola* ในปี 2005 Msikita และคณะรายงานว่าโรครากและต้นเน่า (root and stem rot) ของมันสำปะหลังในประเทศเบนินเกิดจากเชื้อรา *S. hyalinum* สร้างความเสียหาย 85 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2014 Al-Sadi และคณะรายงานว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ก่อให้เกิดโรครากเน่าของส้มในประเทศโอมาน ต่อมาในปี 2014 Machado และคณะรายงานว่า *N. hyalinum* ก่อให้เกิดโรคโคนและรากเน่า (collar and root rot) ของสับปะรดซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับมันสำปะหลัง และยังก่อให้เกิดโรคหัวเน่าดำ (black root rot) ของมันสำปะหลังในบราซิล ซึ่งในประเทศยังไม่มีการรายงานว่ามีเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. ก่อโรคพืชในประเทศไทย

2.6.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp.

Neoscytalidium sp. มีการสร้างโคนินเดียม (conidia) 2 แบบ โดยแบบที่ 1 จะสร้าง arthroconidia คือมีลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นลูกโซ่ มีสี่เหลี่ยม เรียกลักษณะนี้ว่า *Scytaalidium-like* (Machado, 2012) แบบที่ 2 จะสร้างโคนินเดียมในพิกนินเดียม (pycnidia) ซึ่งเรียกว่า *Fusicoccum-like* (Machado et al., 2012) ซึ่งจะสร้างพิกนินเดียมเฉพาะพืชอาศัยหรือสิ่งยึดเกาะเท่านั้นไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการสร้างโคนินเดียมจากโคนินดิโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cells) ในพิกนินเดียม โคนินดิโอจีนัสเซลล์เป็นแบบโฮโลบลาสติก (holoblastic) คือ โคนินดิโอจีนัสเซลล์เกิดจากผนังด้านในของพิกนินเดียม โคนินดิโอจีนัสเซลล์มีจำนวนคงที่แน่นอน ที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดได้ ซึ่งแต่ละอันจะแยกกันอยู่อย่างเดี่ยว ๆ โดยมีพาราไฟซิส (paraphyses) กั้น โคนินดิโอจีนัสเซลล์มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก สี่เหลี่ยม โคนินเดียมระยะอ่อนเซลล์เดี่ยวใสไม่มีสี แต่ต่อมาจะมีการสร้างผนังกัน แบ่งเป็น 3 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางทึบสีน้ำตาล หัวท้ายใส ผนังจะหนาและเหนียวขึ้น โคนินเดียมมีรูปร่างรีหัวท้ายแหลม (ellipsoid to nearly fusiform) (Machado, 2012; Machado et al., 2012; Machado et al., 2014a, 2014b; Polizzi et al., 2011)

2.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae นั้น มีหลายอย่าง เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่า pH อุณหภูมิ และ แสง โดยแหล่งคาร์บอนจะช่วยเร่งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา เส้นใยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส มอลโตส และแป้ง แต่เจริญได้น้อยในอาหารที่มีน้ำตาลฟรักโทส,ไซโลส และเซลลูโลส นอกจากนี้ในวงศ์ Botryosphaeriaceae ยังเจริญได้ดีในแหล่งที่มีไนโตรเจนเป็นเคซีน ไฮโดรไลเซท โปแทสเซียมไนเตรท และแอลเอสพาราจิน แต่เจริญได้น้อยในดีฟีนิตอลานีน และแอลเมธิโอนีน และค่าความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราจะอยู่ในช่วง pH 4-5 และ 7.1 (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส ในสภาพธรรมชาติ อุณหภูมิที่เชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae สามารถเจริญและก่อให้เกิดโรคในพืชได้ อยู่ในช่วง 25.9-31.5 องศาเซลเซียส (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Singh, 2000) แสงหรือช่วงเวลาในการรับแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีอิทธิพลมากที่สุดต่อการสร้างหรือไม่สร้างพิกนินเดีย จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อราที่ตอบสนองต่อแสง near UV และแสงสีน้ำเงิน การที่เชื้อราจะมีการสร้างพิกนินเดีย จะต้องได้รับแสงนานถึง 16 ชั่วโมงต่อวัน หากได้รับแสงน้อยกว่า 4 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลานานเกิน 23 วันจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Cilliers et al., 1993) แสงที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่จะช่วยกระตุ้นการสร้างพิกนินเดีย คือ 15 ฟุตเทียนต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้น การสร้างพิกนินเดียจะมากขึ้นและจะคงที่ที่ความเข้มข้นของแสง 180 ฟุตเทียน ทั้งนี้แสงมีผลต่อการสร้างพิกนินเดีย และสปอร์ของเชื้อรา แต่ไม่มีผลการการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแต่อย่างใด (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547) การสร้างสปอร์หรือ conidia ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. เกิดขึ้นได้ยากหรือไม่เกิดขึ้นเลยบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) ปกติ แต่ในการจัดจำแนกเชื้อราใน Class Deuteromycetes ซึ่งลักษณะเด่นคือการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ นั้นจะใช้ลักษณะของสปอร์และการสร้างสปอร์เป็นสำคัญ (Baird, 2004) ซึ่งการชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. อาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงราบนผลไม้ที่เป็น host ตามธรรมชาติ เช่นบนผลกล้วย ผลชมพู (อุดม ฟาร์รุ่งสว่าง และคณะ, 2548) และกิ่งไ้วจันผลไม้มีลักษณะเป็นมันมี คือผิวแห้ง แข็งและมีสีดำ conidiomata จะถูกสร้างขึ้นและฝังตัวอยู่ใน host เพื่อรอที่จะปล่อย mature conidia ออกมาเมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามมีรายงานการชักนำให้เกิดสปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน โดยเติมชิ้นส่วนของ host ของเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในปี 2004 Pavlic และคณะชักนำให้เกิดสปอร์โดยการเติม pine needles ที่ปราศจากเชื้อลงในอาหาร 2 เพอร์เซ็นต์ MEA (malt extract agar) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และให้รับแสง แบบ near UV จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ในปี 2008 Alves และคณะใช้การเติม poplar twigs ที่ปราศจากเชื้อลงใน 2 เพอร์เซ็นต์ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้รับแสง

ธรรมชาติ ต่อมาในปี 2012 Machado เติม maize straw ลงใน WA (water agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บในที่มืดสลบกับที่มีแสงโดยแบ่งเก็บในที่มืด 12 ชั่วโมง ที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน นาน 3-4 สัปดาห์ และในปี 2014 Machado และคณะเติม twig of Pinus ลงใน WA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บในที่มืดสลบกับที่มีแสงโดยแบ่งเก็บในที่มืด 12 ชั่วโมง ที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน นาน 3-4 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นให้สร้างสปอร์

2.6.4 วงจรการเกิดโรค

เชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในเศษซากพืช (saprophytic) อาศัยอยู่ในพืชที่เจริญเติบโตแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค (endophytic) และเมื่อมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมยังสามารถก่อให้เกิดโรค (paraphytic) (Alves et al., 2008; Phillips et al., 2013; Machado et al., 2014a, 2014b) เชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ก่อให้เกิดโรครากับท่อนพันธุ์ หรือลำต้นที่แก่แล้ว และตกค้างในไร่ โดยจะอาศัยอยู่ในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้เก็บค้างไว้ในแปลงก่อนนำไปปลูก โดยจะแสดงอาการตั้งแต่ท่อนพันธุ์ไม่งอก ต้องมีการปลูกซ่อมเป็นจำนวนมาก เชื้อเหล่านี้สามารถเข้าทำลายในระยะต้นกล้าโดยจะมีลักษณะอาการแคะแกระน ใบซีดเหลือง ช้ำดำ ต้นเล็กเหี่ยวแห้ง บริเวณต้นมี pycnidia ของเชื้อรา กระจายเต็มต้นบริเวณ โคนต้นเหนือดิน การเข้าทำลายของเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ในระยะ 4 เดือนหลังปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ต้นมันสำปะหลังจะค่อย ๆ โทรม แต่ไม่ตาย มีลักษณะอาการใบร่วง ต้นแห้ง บริเวณ โคนต้นจะแห้ง บ้างต้นแตกเป็นสีน้ำตาลไหม้ถึงค้ำ ระบบท่อน้ำที่อาหารจะเน่ากลายเป็นสีน้ำตาล โดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์ หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลค้ำ มีกลุ่มเม็ด pycnidia ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตายบริเวณ โคนต้นซึ่งเป็นบาดแผลที่ทำให้เชื้อราตัวอื่นสามารถเข้าทำลายได้ (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545; Duchanee et al., 2015a, 2015b) ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเชื้อราดังกล่าว สามารถทำให้ก่อกำเนิดโรคหัวเน่าโดยจะมีลักษณะหัวเน่าดำ อีกทั้งเชื้อราดังกล่าวยังเป็น secondary pathogen ที่เข้าทำลายร่วมกับเชื้ออื่นทำให้มีอาการของโรคหัวเน่าในลักษณะต่าง ๆ รุนแรงมากขึ้น (complex disease) (Banito et al., 2010; Bua and Okello, 2011; Buensanteai and Athinuwat, 2012; Machado et al., 2014a, 2014b) แพร่ระบาดโดยเชื้อจะแพร่ไปกับท่อนพันธุ์และเข้าทำลายเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อราจะเข้าทางแผล และลุกลามมากขึ้นเมื่อมีความชื้นสูง (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545; Messiga et al., 2004)

2.6.5 การควบคุมโรค

เชื้อเหล่านี้มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และยังเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยหลายชนิด สามารถควบคุมโรคดังนี้ 1) การเตรียมแปลงปลูก ควรจะเป็นดินร่วน มีการระบายน้ำดี ไม่ควรเป็นที่เคยมีน้ำท่วมขังหรือใกล้ทางระบายน้ำ หากดินระบายน้ำยาก ควรปลูกโดยวิธียกร่อง ก่อนทำการปลูกควรไถดินและตากแดดไว้ประมาณ 10-15 วัน 2) ทำความสะอาดแปลงก่อนปลูกโดยการทำลาย

เศษพืชที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค 3) คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่สมบูรณ์ ปราศจากโรคเตรียมท่อนพันธุ์ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บอบช้ำ 4) ชุบท่อนพันธุ์ด้วยสารสารเคมี เช่น mancozeb, copper oxychloride (400 ppm.) captan+carbendazim (2,000 ppm.) หรือการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* และ *T. virens* (กลุ่มอนุรักษณ์น้ำและดิน 2545; Buensanteai et al., 2013) 5) หากพบโรคนี้ระบาดมาก่อน หรือที่ดินเป็นที่เปิดป่าใหม่ควรปลูกพืชหมุนเวียนพวง รัชพืชก่อนปลูกมันสำปะหลัง เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคนี้ 6) หากพบอาการรากเน่าเกินกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ควรคปลูกพืชนานอย่างน้อย 6 เดือน 7) ถ้าเป็นพื้นที่ระบาดแล้ว ให้เก็บเศษเหง้ามัน สำปะหลังไปเผาทิ้งให้หมดเนื่องจากเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคที่สามารถอยู่ค้างได้เป็นปี เพื่อเป็นการ ตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อไม่ให้ลุกลามต่อไป 8) ควรปรับสภาพดินให้มีความเป็นด่างสูงขึ้น โดยใช้ปูนขาว หรือปูนมาร์ล (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557)

2.7 วิธีการตรวจสอบเพื่อระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำนสำปะหลัง

2.7.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์

การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะและสีของเส้นใยที่เจริญ บนอาหารที่แตกต่างกัน (ชนิษฐา มากรุ่ง, 2548) การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และอิเล็กตรอน (electron microscope) โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้ในการตรวจสอบลักษณะ ขนาด สีของโคนิเดียและเส้นใย ส่วนการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนเป็นวิธีที่ใช้สำหรับบ่งชี้สภาพการติดเชื้อและรูปร่างลักษณะ ตลอดจนโครงสร้างของ เซลล์เชื้อในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด scanning electron microscope (SEM) สามารถช่วยในการตรวจเกี่ยวกับรูปร่างของเชื้อและสภาพการอยู่อาศัยบนเซลล์พืช และการใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน h transmission electron microscope (TEM) สามารถบอก ได้ถึงตำแหน่งหรือบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อที่มีการตรวจพบเชื้อราสาเหตุโรคกล้องจุลทรรศน์ เป็น การตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุของ โรคหรือไม่ ซึ่งต้องกระทำควบคู่ไปกับ วิธีอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยให้สามารถพิสูจน์ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อสาเหตุของโรสดังกล่าว

การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* โดยทั่วไปพิจารณา จากลักษณะขนาด และรูปร่างของ paraphyses conidiogenous cells และ conidia เป็นสำคัญเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* สรุปลงได้ตามตารางที่ 2.6 และเชื้อรา *Neoscytalidium* อาจสรุปลงได้ตามตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia*

ชนิดของเชื้อรา	ขนาดโคนเดี่ยว		ขนาดพาราไฟซิส		ที่มา
	ยาวกว้าง (ไมโครเมตร)	L/W ratio	ยาวกว้าง	เส้นแบ่ง	
<i>L. citricola</i>	22-27x12-17	1.6	125x3-4	1-5, aseptate	Abdollahzadeh et al., 2010
<i>L. crassipora</i>	27-30x14-17	1.8	45.7x2.7	septate	Burgess et al., 2006
<i>L. egyptiaca</i>	20-24x11-12	1.8	57x2-3	aseptate	Ismail et al., 2012
<i>L. euphorbicola</i>	15-23x9-12	-	76x2-4	septate	Machado et al., 2014b
<i>N. dimidiatum</i>	17-24x10-12	-	40x2-3	septate	Machado et al., 2014a
<i>L. gonubiensis</i>	32-36x16-18.5	1.9	38.1x2.3	aseptate	Pavlic et al., 2004
<i>L. hormozganensis</i>	18-24x11-14	1.7	83 × 2-4	1-7-septate	Abdollahzadeh et al., 2010
<i>L. iraniensis</i>	17-23x11-14	1.6	127x2-4	1-6 septate	Machado et al., 2014b
<i>L. jatrophiicola</i>	22-26x14-17	-	70 × 3	0-1 septate	Machado et al., 2014b
<i>L. macrospora</i>	28-35x15-17	-	105 × 3-4	septate	Machado et al., 2014b
<i>L. mahajangana</i>	15.5-19x11.5-13	-	43 × 3	1-2-septate	Begoude et al., 2010
<i>L. margaritacea</i>	14-17x11-12	-	37.1 × 2.2	-	Pavlic et al., 2008
<i>L. pava</i>	16-23.5x10.5-13	1.5	105 x 3-4	septate	Alves et al., 2008
<i>L. pseudotheobromae</i>	23.5-32 x 14-18	1.7	58 x 3-4	-	Alves et al., 2008
<i>L. pseudotheobromae</i>	16-26 x 10-12	-	65 x 2-3	-	Machado et al., 2014a
<i>L. thailandica</i>	22-25x13-15	-	51 x 1-1.5	septate	Trakunyingcharoen et al., 2015b
<i>L. theobromae</i>	21-31x13-15.5	1.9	55 x 3-4	septate	Alves et al., 2008
<i>L. pseudotheobromae</i>	23-31x13-15	-	45 x 2	aseptate	Machado et al., 2014b
<i>L. pseudotheobromae</i>	24.49-27.49x13.3-14.79	1.8	-	-	Marques et al., 2013
<i>L. pseudotheobromae</i>	23.3-26.8x14.1-17.3	1.6	-	-	Li et al., 2015
<i>L. rubropurpurea</i>	24-33 × 13-17	1.9	42.4 x 2.6	aseptate	Burgess et al., 2006
<i>L. venezuelensis</i>	26-33 × 12-15	2.1	28.3 x 3.5	septate	Burgess et al., 2006
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	22.5-27.5x13-15	-	-	-	Begoude et al., 2010

ตารางที่ 2.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neoscytalidium*

ชนิดของเชื้อรา	ขนาดโคนิเดีย		ที่มา
	ยาวxกว้าง (ไมโครเมตร)	ขนาดอาร์โธรโคนิเดีย ยาวxกว้าง (ไมโครเมตร)	
<i>Neoscytalidium hyalinum(dimidiatum)</i>	10–16×3.5–6.5	4–16.5×8.5	Phillips et al., 2013
<i>N. dimidiatum</i>	8-12×4-5	4-12×2.5-8	Machado et al., 2014b
<i>N. dimidiatum</i>	5-12x3-5	6-12x3-6	Machado et al., 2014a
<i>N.novaehollandiae</i>	10.5-12.5×4-5	5.5-7.5×3.5-4.5	Pavlic et al., 2008

2.7.2 การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่จำลองตัว

ในปัจจุบันเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่จำลองตัว หรือเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ซึ่งสำหรับงานตรวจจำแนกชนิดเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณ DNA งานด้านการโคลนนิ่ง (gene cloning) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในทางการเกษตร PCR ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ และการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคพืช เป็นต้น ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งถูกทำให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denature) เพื่อใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ต้องมีจุดเริ่มต้นเป็นสายคู่ ฉะนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงมีการเติมดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นสั้น ๆ เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นสั้นที่เป็นส่วนเริ่มต้นนี้ เรียกว่า ไพร์เมอร์ (primers) และจะต้องมีการเติมส่วนประกอบอื่น ๆ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ได้แก่ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 4 ชนิด (dNTP) ได้แก่ dGTP, dATP, dCTP และ dTTP (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2557) การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล โดยการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequence) ซึ่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครโมโซมอยู่ใน nucleus ของเซลล์ โดยทำหน้าที่ส่งผ่านข้อมูลทางพันธุกรรม มีองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะตัว และโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายคู่ของ double helix ในแต่ละสายของ DNA เกิดจากการเรียงตัวของ nucleotide โดยการเรียงตัวของ nucleotide ในแต่ละสายของ DNA จะต่อกันด้วยพันธะ phosphodiester bond ซึ่งเกิดจากการต่อระหว่าง phosphate ที่ carbon ตำแหน่ง 5' ของ nucleotide กับหมู่ OH ของ carbon ตำแหน่ง 3' ของ nucleotide ซึ่งเป็น complementary ซึ่งกันและกันมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) จากความสัมพันธ์ดังกล่าว เมื่อทราบลำดับ

nucleotide เพียงสายใดสายหนึ่ง ก็จะสามารถบอกลำดับ nucleotide ที่เป็นคู่ complementary กันได้ เช่นกัน (พัชรีย์ วิทยานุกูล, 2543)

เทคนิค PCR พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะนักชีวเคมีของบริษัท Cetus Corporation (มาลินี อัสวดิษฐเลิศ, 2010) เพื่อใช้ในการจำแนก specific DNA sequence ในสารละลายที่มีกลุ่มของ sequence DNA เป็นจำนวนมากปะปนกันอยู่ แล้วเพิ่มปริมาณส่วน targeted sequence ขึ้นมาเป็นล้านเท่าโดยผ่านวิธีกึ่งอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาเพียง 1 หรือ 2 ชั่วโมงเท่านั้น จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย รวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์มีความไวสูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจะต้องระมัดระวังในการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากภายนอก ในปัจจุบันมีการประยุกต์การทำพีซีอาร์แบบต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชเพื่อความสะดวก รวดเร็ว และถูกต้อง ซึ่งการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบชนิดหรือรูปแบบของเชื้อที่ตรวจ และวัสดุอุปกรณ์ พีซีอาร์ประยุกต์แบบต่าง ๆ ได้แก่ 1) RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) ใช้ทำพีซีอาร์กับ RNA ใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ในการเร่งปฏิกิริยาและสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมก่อน โดยใช้ในไวรัสพืช 2) Multiplex PCR ใช้ไพรเมอร์หลายคู่ หรือเรียกว่า multiprimer PCR วิธีนี้ใช้ในการทดสอบเชื้อหลาย ๆ ชนิดในครั้งเดียว แต่ต้องระวังในการใช้ไพรเมอร์และขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย นิยมใช้ในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา ไวรัส ไวรอยด์ และไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 3) BIO-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคจากเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยตรง โดยนำเชื้อที่เลี้ยงจากอาหารมาใช้ในการทำพีซีอาร์โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ นิยมใช้ใน แบคทีเรีย 4) Real-time PCR เป็นเทคนิคที่นำเทคโนโลยีของฟลูออเรสเซนต์มาใช้ร่วมกับพีซีอาร์ ทำให้วิเคราะห์ผลได้ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาและได้ผลอย่างต่อเนื่อง โดยไม่ต้องรอให้เสร็จสิ้นปฏิกิริยา 5) RAPD-PCR ใช้พีซีอาร์ในการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยการใส่ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและมีขนาดสั้น 10-12 นิวคลีโอไทด์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงทำให้มีโอกาสจับ ดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งและเป็นแบบสุ่ม จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา 6) Nested PCR เป็นการทำให้พีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีตำแหน่งจับอยู่ในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรก ในการทำพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 นี้ อาจใช้ไพรเมอร์คู่เดิม 1 ชนิด คู่ใหม่ 1 ชนิด การใช้ไพรเมอร์ลักษณะนี้เรียกว่า seminested PCR 7) Touch down PCR ปรับให้อุณหภูมิให้สูงกว่าอุณหภูมิที่ควรใช้ ในขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายในรอบแรก ทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอยาก เพื่อป้องกันการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงในรอบต่อมา (ชลิดา เล็กสมบุญ, 2557)

ปฏิกิริยาของ PCR ในแต่ละรอบมีขั้นตอน คือ ปฏิกิริยาการแยกคู่ของสายดีเอ็นเอ (denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติจากที่เคยเป็นเส้นคู่กลายเป็นเส้นเดี่ยวเพื่อเปิดโอกาสให้ primer สามารถเข้าไปจับกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณบนสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ ขั้นตอนนี้ทำได้โดยการใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายพันธะที่ใช้ในการจับคู่กันของเส้นดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (annealing) หลังจากที่ดีเอ็นเอแยกเป็นเส้นเดี่ยวแล้วลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวท่อนสั้น ๆ จะเข้าไปเกาะบริเวณที่เป็นคู่ผสมกันบนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) หลังจาก primer เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบเรียบร้อยแล้ว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นมาถึง 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานด้วยการเชื่อมต่อเบสทั้งสี่ชนิดโดยจะจัดลำดับการเรียงตัวของเบส ตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบจากขั้นตอนนี้การสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จึงเกิดขึ้น หลังจากเสร็จสิ้นสามขั้นตอนถือเป็นหนึ่งรอบของปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมากพอ เมื่อมีการทำซ้ำในขั้นตอน 1-3 ของ PCR ให้มีจำนวนรอบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมาก กล่าวได้ว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคพืช โดยสามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อราที่มีปริมาณน้อยในพืชได้ และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ เฉพาะเจาะจง และมีความไวสูง (sensitive) (รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2557)

ในปี 2008 Alves และคณะ ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* โดยใช้การศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางด้วยชีวโมเลกุลโดยศึกษาบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3-')/ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGAT ATGC-3') ร่วมกับบริเวณ EF1- α โดยใช้ไพรเมอร์ Efl-688F (5'-CGG TCA CTT GAT CTA CAA GTG C-3')/Efl-1251R (5'-CCT CGA ACT CAC CAG TAC CG-3') พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อรา *L. theobromae*, *L. pseudothobromae* และ *L. parva* ต่อมาในปี 2010 Abdollahzadeh และคณะ ได้ศึกษาเชื้อรา *Lasiodiplodia* สปีชีส์ใหม่ในประเทศอิหร่านโดยศึกษาบริเวณ ITS ใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ร่วมกับบริเวณ EF1- α โดยใช้ไพรเมอร์ Efl-688F/Efl-1251R พบสามารถจำแนกเชื้อราได้ *L. pseudothobromae*, *L. theobromae*, *L. hormozganensis*, *L. gilanensis* และ *L. iraniensis* ในปี 2012 Ni และ Yang ได้ศึกษาการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงในเชื้อราแต่ละชนิด ซึ่งเชื้อรา *L. theobromae* ใช้ไพรเมอร์ L1397F (5'-GGA AGG ATC ATT ACC GAG TTT T-3')/L1397R (5'-ACG CTT GAG GGC TGA ACA-3') เมื่อนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พบว่าปรากฏมีขนาดเบส 397 bp ในส่วนของเชื้อรา *Fusicoccum aesculi* ใช้ไพรเมอร์ Bd318F (5'-CAA ACT CCA GTC AGT AAA CGA T-3')/Bd318R (5'-CTC CGA AGC GAG ATG TAT G-3') ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีขนาดเบส 318 bp เชื้อรา *Neofusicoccum mangiferae* ใช้ไพรเมอร์ Bd318F/Np479R (5'-CGA GGT CAA CCT TGA GAA ATA A3-') ซึ่งมี

ขนาดเบส 378 bp และเชื้อรา *N. parvum* ใช้ไพรเมอร์ Np479F (5'-CTC GAC TCT CCC ACC CAA-3')/Np479R ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีขนาดเบส 479 bp ซึ่งเมื่อใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงตรวจสอบเชื้อราชนิดนั้นก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอชนิดนั้นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอชนิดอื่น

2.7.3 การศึกษาลักษณะพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราใน

ฐานข้อมูล GenBank

ปัจจุบันนี้มีการนำข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic data) หรือข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics data) มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา ร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีข้อจำกัดในการจำแนก ข้อมูลทางพันธุกรรมนี้ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และการวิเคราะห์ทางสถิติร่วมกับข้อมูลที่จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลโดยทั่วไป ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ถูกรวบรวมโดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก จะถูกนำไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เรียกว่า GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งเป็นข้อมูลสาธารณะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย บริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อระบุชนิดของเชื้อรา เช่น 1) บริเวณ Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene (ITS) 2) บริเวณ Translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) และ 3) บริเวณ beta -tubulin (β t) เป็นต้น และนำข้อมูลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (เบญจพล ศรีทองคำ, 2559; มัลลิกา มะกรวัฒนะ, 2557; Alves et al., 2008; Phillips et al., 2013; Machado, 2012; Machado et al., 2014a, 2014b; Trakunyingcharoen et al., 2013, 2014, 2015a, 2015b)

1) บริเวณ Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene (ITS) บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกของเชื้อรา และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เนื่องจากสามารถพบได้ในเชื้อราทุกชนิด ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาส่วนใหญ่ จะอยู่บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และมีขนาดแตกต่างกันในเชื้อราแต่ละชนิดอยู่ในช่วงประมาณ 500-900 คู่เบส ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่ทราบถึงบทบาทหน้าที่ของบริเวณ ITS ที่มีต่อเชื้อราแต่พบว่าเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง เหมาะสำหรับการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อราในระดับสปีชีส์ (ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล และพิมพ์ธัมภา เปี่ยมสกุล, 2557; เบญจพล ศรีทองคำ, 2559; มัลลิกา มะกรวัฒนะ, 2557)

2) บริเวณ Translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) ซึ่ง EF-1 α gene เป็นที่นิยมในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราบางชนิด รวมไปถึงการจัดจำแนกที่ซับซ้อน ซึ่งบริเวณนี้ทำหน้าที่ในการควบคุมการผลิตโปรตีน EF1- α ที่มีลำดับอนุรักษ์สูง (highly conserved) และมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) พบกระจายอยู่ทั่วไปในกระบวนการแปลรหัส (translation) ของยูแคริโอต (eukaryotes) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ในขั้นตอน

การต่อสายของพอลิเปปไทด์ (polypeptide) มีบทบาทสำคัญในการนำ aminoacyl tRNA เข้ามายังตำแหน่ง A site ของไรโบโซม เพื่อให้กรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) (เบญจพล ศรีทองคำ, 2559; มัลลิกา มะกรวิวัฒน์, 2557)

3) บริเวณ beta-tubulin (βt) ซึ่ง βt เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนในไมโครทิวบูล ซึ่งประกอบไปด้วย α-tubulin β-tubulin γ-tubulin และ β-tubulin gene sequence มีศึกษากันอย่างกว้างขวางสำหรับการตรวจสอบสายวิวัฒนาการและความผันแปรของเชื้อรา (เบญจพล ศรีทองคำ, 2559; มัลลิกา มะกรวิวัฒน์, 2557)

สายวิวัฒนาการ (evolution) เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโปรตีน จนกระทั่งก่อให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่แตกแขนงออกไปจากสิ่งมีชีวิตเดียวกัน โดยในการศึกษานี้เป็นการศึกษาจากข้อมูลของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในปัจจุบัน และใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อศึกษาย้อนกลับไปเพื่อหาที่มา และความสัมพันธ์ที่เคยมีอยู่ในอดีต นอกจากนั้น การศึกษาดังกล่าวอาจทำให้เราสามารถเรียนรู้ถึงสาเหตุของการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ทำให้สิ่งมีชีวิตบางชนิดสูญพันธุ์ไป หรือทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งความรู้เหล่านี้อาจมีประโยชน์อย่างมากมาสำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน หรือการปรับปรุงพันธุ์พืช และสัตว์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลพันธุศาสตร์เพื่อให้พืชหรือสัตว์มียืนในรูปแบบที่เราต้องการ ได้ผลจากการศึกษาในความสัมพันธ์เหล่านี้ จะมีความชัดเจนขึ้นได้ด้วยแผนภูมิที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ หรือจุดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยแผนภูมิดังกล่าวจะมีโครงสร้างคล้ายกับต้นไม้ ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านสาขา ซึ่งแตกแขนงออกจากจุดร่วมเดียวกัน ดังนั้นจึงเรียกแผนภูมินี้ว่า แผนภูมิด้านไม้ หรือ phylogenetic tree หรือ tree of life หรือ evolutionary tree ในอดีตการสร้าง phylogenetic tree มักสร้างจากข้อมูลของลักษณะปรากฏ หรือ phenotypic data เนื่องจากเป็นข้อมูลที่เก็บบันทึกได้ โดยไม่ยุ่งยากมากนัก อย่างไรก็ตาม ลักษณะปรากฏหลาย ๆ ลักษณะมีอิทธิพลเนื่องจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกด้วย ดังนั้นการใช้ข้อมูลดังกล่าวในการสร้าง tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต จึงมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างสูง การใช้ข้อมูลจากลำดับของดีเอ็นเอในการศึกษาความสัมพันธ์จึงเป็นที่นิยมหลังจากที่เทคโนโลยีด้านเทคโนโลยีชีวโมเลกุลได้ถูกพัฒนาจนมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน (มนัสยา สิงห์โต, 2551; อมรรัตน์ โมพี, 2549)

Phylogenetic tree เป็นแผนภูมิที่มีโครงสร้างคล้ายรากของต้นไม้มี 2 ชนิด คือ 1) Root phylogenetic tree: เป็น phylogenetic tree ที่แสดงให้เห็นถึง common ancestor ของ OUT ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้าง tree โดย OUT จะมีจุดกำเนิดมาจากสิ่งมีชีวิตเดียวกัน และแตกแขนงออกมาเป็นสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างออกไป 2) Unroot phylogenetic tree (starlike phylogenetic tree): เป็น phylogenetic

tree ที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ที่เราต้องการศึกษา โดยหลายกรณีที่ยังไม่สามารถระบุ common ancestor ได้ ดังนั้นลักษณะของ tree จึงแสดงให้เห็นเพียงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดหรือห่างไกลของกลุ่มสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นเท่านั้น แต่จะไม่แสดงจุดเริ่มต้นของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ การสร้าง tree ในกรณีนี้ขอก้าวเฉพาะการใช้ molecular data ในการสร้าง tree เท่านั้น โดยการสร้าง tree ดังกล่าวสามารถแบ่งออกเป็นขั้นตอนสำคัญๆ ได้ทั้งหมด 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1) Selection for sequence for analysis โดยทั่วไปแล้วเราสามารถนำ DNA, RNA หรือลำดับของโปรตีนเพื่อการสร้าง tree ได้ทั้งสิ้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการศึกษาของเรา แต่ในหลายกรณีการสร้าง tree ด้วยข้อมูล DNA sequence นั้นจะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์กว่าการใช้ข้อมูลที่เป็น Protein หรือ RNA sequence ทั้งนี้ด้วยเหตุผลคือ (1) DNA sequence ที่ code เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ๆ ในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันนั้น อาจมีบริเวณ DNA sequence ที่เหมือนและแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เป็นปลาย 5' และ 3' ซึ่งมักเป็นบริเวณที่ไม่มีการ translation และพบว่าบริเวณเหล่านี้เป็นบริเวณที่มีลำดับของ DNA ที่มีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้เราจะไม่สามารถพบได้ถ้าทำการศึกษาใน Protein sequence เนื่องจากเป็น DNA sequence ที่เป็น code ของ Protein ชนิดเดียวกัน (2) จำนวน nonsynonymous substitution (d_n) ซึ่งหมายถึง sequence ที่มีความแตกต่างกันในโปรตีนชนิดเดียวกันกับจำนวน synonymous substitution (d_s) ซึ่งหมายถึง sequence ที่มีความเหมือนกันในโปรตีนชนิดเดียวกัน โดยจำนวนที่แตกต่างกันของ d_n และ d_s อาจเป็นข้อมูลที่บ่งบอกถึงสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ได้ เช่น กรณีที่ $d_n < d_s$ บ่งบอกถึงการเกิด negative selection หรือ purify selection ซึ่งมักเกิดในกรณีที่โปรตีนเหล่านั้นเป็น critical protein สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นไม่สามารถขาดโปรตีนเหล่านี้ หรือโปรตีนเหล่านี้ถ้าเสียสภาพไปแล้วไม่สามารถ function ได้เลย และสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต้องเปลี่ยนแปลงตัวเอง หรือสูญพันธุ์ไปในที่สุด ในขณะที่ถ้า $d_n > d_s$ แสดงถึงการเป็น positive selection ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้สามารถดำรงเผ่าพันธุ์สืบต่อไปได้

ขั้นตอนที่ 2) Multiple sequence alignment of homozygous Protein or DNA ขั้นตอนของการทำการ alignment sequence นี้มีความสำคัญอย่างมากสำหรับการนำข้อมูลเหล่านี้มาสร้าง tree ผลการเรียงลำดับข้อมูล alignment ที่ผิดพลาดจะทำให้ได้ tree ที่มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง Multiple sequence alignment เป็นการ alignment sequence ของ DNA หรือ โปรตีนพร้อมกันหลาย ๆ sequence โดยการ align นี้เป็นการหา residues ที่เป็น homologous ทั้ง column ไปทีละcolumn ตลอดทั้ง sequence โดยการนำ Multiple alignment นั้นจะทำเมื่อโปรตีนหรือ DNA sequence ที่เรากำลังศึกษานั้นมีความสัมพันธ์กับ DNA หรือ Protein sequence อื่นอีกจำนวนมาก โดยความสัมพันธ์กันเช่นนี้มีความเป็นไปได้สูงมากที่จะมีโครงสร้างหรือหน้าที่ที่ใกล้เคียงกันซึ่งสามารถนำไปสู่ข้อมูลของการเกิดวิวัฒนาการได้ผลลัพธ์ของการทำ Multiple alignment จะรายงานคู่ sequence ที่มี similarity score

สูงสุด และลดหลั่นกันลงมาทีละคู่ และ score เหล่านี้จะถูกนำมาสร้างเป็น tree ต่อไป โดยทั่วไป software ที่ใช้ในการสร้าง tree นั้น หลังจากขั้นตอนของการทำ Multiple alignment เรียบร้อยแล้วจะให้ guide tree ซึ่งเป็น tree เบื้องต้น เพื่อใช้สำหรับการสร้าง phylogenetic tree ในขั้นต่อไป

ขั้นตอนที่ 3) Tree building Method วิธีการที่ใช้สำหรับการสร้าง phylogenetic tree ที่นิยมใช้กันปัจจุบันมีดังนี้ คือ (1) Distance-based method และ (2) Character-based method

(1) Distance-based method เป็นวิธีการสร้าง tree ด้วยการคำนวณค่า distance ระหว่าง molecular sequence เพื่อใช้ในการสร้าง tree เป็นวิธีการที่รวดเร็วและไม่ซับซ้อน วิธีการที่ใช้ Distance-based method ที่นิยมมี 2 วิธี คือ (1.1) Unweighted pairs group method with arithmetic mean (UPGMA) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการสร้าง tree โดยมีหลักการคือ นำ distance ของคู่ sequence ที่สั้นที่สุดมาใช้ในการคำนวณเพื่อสร้างเป็น subtree จากนั้นก็ใช้คู่ sequence ที่มีความสั้นรองลงมาใช้ในการสร้าง subtree ถัดไป ทำเช่นนี้จนครบทุกคู่ ก็จะได้ phylogenetic tree ที่สมบูรณ์ (1.2) Neighbor Joining (NJ) เป็นวิธีการสร้าง tree แบบ unrooted tree มีโครงสร้างที่เรียกว่า starlike structure โดยหลักการของวิธีการนี้คือการหาคู่ sequence ที่มี distance ที่สั้นที่สุดในแต่ละขั้นตอน เช่นเดียวกับวิธี UPGMA แต่ตอนที่นำมาสร้าง tree นั้น ที่มี distance สั้นที่สุดจะถูกนำมาวางใกล้กัน และเรียงต่อกัน ถัดกันไปเรื่อยจนครบทุกคู่ วิธีการนี้จะนิยมใช้กันเมื่อมีกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก ที่ต้องการศึกษาหาความสัมพันธ์

(2) Character-based Methods ซึ่งประกอบด้วย 2 วิธีหลัก ๆ คือ Maximum parsimony (MP) และ Maximum likelihood (ML) หลักการของ MP คือ tree ที่ดีที่สุดคือ tree ที่มี branch ที่สั้นที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ในขณะที่ ML นั้นจะมีหลักการการค้นหา tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดในการที่จะเป็น tree ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตอย่างแท้จริง โดย ML จะมีการประมาณหาค่า parameter บางตัวเพื่อใช้ในการบ่งบอกว่า tree ใดควรเป็น tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดในการที่จะเป็น tree ที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ที่แท้จริงได้ เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำที่สุดวิธีการหนึ่ง อย่างไรก็ตามวิธี ML นั้นเป็นวิธีที่มีความซับซ้อนที่สุด

ขั้นตอนที่ 4: Evolution Tree Using Randomizing Test and Bootstrapping หลังจากที่ทำ การสร้าง tree เสร็จเรียบร้อยแล้ว จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องประเมินว่า tree ที่ได้มีความแม่นยำ (accuracy) มากน้อยเพียงใด ซึ่ง accuracy นี้หมายถึงระดับ (degree) ที่จะบ่งบอกว่าจะเป็น tree ที่แท้จริง เทคนิคที่ใช้ในการประเมินความแม่นยำของ tree ที่สร้างได้นั้น เป็นที่นิยมโดยทั่วไปคือ Bootstrapping Technique วิธี Bootstrap นี้ ไม่ใช่เป็นการคำนวณหาค่า accuracy แต่อย่างใด แต่เป็นการแสดงให้เห็นถึงความคงทนของโครงสร้างของ tree (robustness of the tree) โดยหลักการของเทคนิคดังกล่าวคือ การสร้างข้อมูลจำลองจาก output ของ Multiple sequence alignment ด้วยวิธี randomly picking column โดยในแต่ละครั้งที่สร้างข้อมูลจำลองเสร็จ จะมีการสร้าง tree จากข้อมูลจำลอง

ดังกล่าว การสร้างข้อมูลจำลองจะถูกทำซ้ำเป็นจำนวน 100 หรือ 1000 ครั้ง ถ้า tree ที่สร้างจากข้อมูลจำลองเหล่านี้เหมือนกับ original tree มาก หมายถึงว่า original tree ที่ได้มีความเป็นไปได้สูงมากที่จะมีความถูกต้องนั่นเอง ปัจจุบัน (มนัสยา สิงห์โต, 2551; อมรรัตน์ โมพี, 2549) ค่า bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่า bootstrap 85-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า bootstrap 71-84 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า bootstrap 50-71 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดวงกมล ทองอร่าม และคณะ, 2548; Richardson et al., 2000)

ในปัจจุบันเป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้ระบุชนิดของเชื้อราเป็นอย่างมากโดยในปี 2008 Pavlic และคณะได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae ในบริเวณ ITS และ EF1- α โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการและนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราได้อย่างแม่นยำ สามารถจัดจำแนกตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบ่งได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม และจำแนกเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae เพิ่มอีก 7 สปีชีส์ ได้แก่ *Dothiorella longicollis*, *F. ramosum*, *L. mararitacea*, *N. novaehollandiae*, *Pseudofusicoccum adnsoniae*, *P. ardesiacum* และ *P. kimberleyense* ต่อมาในปี 2010 Abdollahzheh และคณะได้ศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ในบริเวณ ITS และ EF1- α มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการและนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ สามารถจัดจำแนกตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* เพิ่มอีก 4 สปีชีส์ คือ *L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis* และ *L. iraniensis* ต่อมาในปี 2014 Machado และคณะได้ศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อรา *Lasiodiplodia*, *Macrophomina* และ *Neoscytalidium* ในบริเวณ ITS EF1- α และ *Bt* มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการและนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ สามารถจัดจำแนกตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* เพิ่มอีก 4 สปีชีส์ คือ *L. euphorbicola*, *L. jathophicola*, *L. macrospora* และ *L. subglobosa* เชื้อรา *Macrophomina* 1 สปีชีส์ คือ *M. phaseolina* และเชื้อรา *Neoscytalidium* 1 สปีชีส์ คือ *N. hyalinum* ต่อมาในปี 2015 Trakunyingcharorn และคณะศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae ในบริเวณ ITS และ EF1- α มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการและนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ สามารถจัดจำแนกตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* เพิ่มอีก 1 สปีชีส์ คือ *L. thailandica*

ในการทดลองนี้จึงจะทำการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง โดย ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ควบคู่กับการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล คือ ศึกษาลักษณะทางด้านชีวโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (PCR) การสังเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) การเปรียบเทียบในฐานข้อมูล Genbank และนำมาวิเคราะห์ที่สายสัมพันธ์วิวัฒนาการสร้างแผนภูมิต้นไม้ เพื่อให้มีความแม่นยำในการระบุเชื้อสาเหตุโรคมยิ่งขึ้น



บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคต้นและรากเน่าจากจังหวัด

นครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง

เก็บรวบรวมตัวอย่างท่อนพันธุ์ ลำต้น ใบ ก้านใบ ราก และหัวมันสำปะหลังที่แสดงอาการ ซึ่งแบ่งเป็น 1) ระยะเวลา 1-4 เดือน คือ ต้นกล้าไม่เจริญเติบโต เจริญเติบโตช้า ใบซีด ใบไหม้ ใบเน่า ช้ำ ก้านใบช้ำเป็นสีน้ำตาลดำ กิ่งเหี่ยว กิ่งไหม้ และกิ่งเน่าช้ำ) ระยะเวลา 5-9 เดือน โดยแบ่งเป็น ลักษณะอาการบนดิน คือ ต้นโทรม ต้นเหี่ยว ยอดไหม้ ใบร่วง ลำต้นแห้ง โคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว โคนเน่า ลักษณะอาการใต้ดิน โคนต้นใต้ดินเน่า ขั้วหัวมันสำปะหลังเน่า รากและหัวเน่า พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างดินที่ไม่แสดงลักษณะอาการบนดินแต่แสดงลักษณะอาการใต้ดินที่อยู่ใกล้กันหรือบริเวณเดียวกัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ๆ มีการแพร่ระบาดของโรคใน 3 จังหวัด 6 อำเภอ ได้แก่ จ.นครราชสีมา ในอ.เมือง อ.ครบุรี และอ.เสิงสาง จ.นครสวรรค์ ใน อ.ตากฟ้า และอ.ตากถี และ จ.ชัยภูมิ ในอ.เทพสถิตย์ ระหว่างเดือนมิถุนายน 2556-พฤษภาคม 2558 ทำการบันทึกรายละเอียด อาการของโรคในแปลงปลูกโดยบันทึกส่วนของพืชที่แสดงอาการ ตำแหน่งที่แสดงอาการ ลักษณะอาการ ลักษณะแผล ลักษณะพิเศษที่พบบริเวณแผล และอายุพืช จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยาของเชื้อราเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ จัดจำแนกลักษณะอาการ จัดกลุ่มลักษณะเชื้อราที่ปรากฏ และนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค ณ ห้องปฏิบัติการ โรคพืชและชีวโมเลกุลพืช อาคาร เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป

3.2 การแยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคต้นและรากเน่า

นำตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคที่เก็บได้ในข้อที่ 3.1 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting technique บนอาหาร water agar (WA) ส่วนตัวอย่างที่คาดว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ใช้อาหารเฉพาะ (selective medium) คือ อาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสม กับ benomyl rifampicillin nystatin ampicillin และ pentachloronitrobenzene (BRNAP) (อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และคณะ, 2555; อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, 2552; Drenth and Sendall, 2001; Masago et al., 1972) โดยทำความสะอาดชิ้นส่วนมันที่เก็บมาด้วยน้ำสบู่หรือน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อติดกับส่วนที่เป็นโรค

จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 1%) เป็นเวลา 1-2 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อใช้ปากกิบ คีบย้ายชิ้นส่วนมันมาล้างในน้ำกลั่น นิ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา ประมาณ 1 นาที ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นใช้เข็มเย็บ เย็บชิ้นส่วนมัน วางบนอาหาร WA ส่วนตัวอย่างที่คาดว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. หลังจากทำความสะอาดและแห้งแล้ว ตัดตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 3x5 เซนติเมตร จากนั้นจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์นำผ่านไฟเป็นเวลา 1-2 วินาที จากนั้นใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อติดกับส่วนที่เป็นโรค เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นใช้ปากกิบ คีบชิ้นส่วนมัน วางบนอาหาร PDA+BRNAP บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นย้ายเส้นใยที่เจริญออก มารอบ ๆ เนื้อเยื่อพืช ตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และไปเลี้ยงบนอาหาร Half potato dextrose agar (HPDA) และ PDA+BRNAP เป็นเวลา 15 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ บันทึกลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการจดจำแนกเชื้อราที่พบทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับเอกสารของวิจัย รั่ววิทยาศาสตร์ (2551); นิรมิต ประทุมรัตน์ (2528); อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ (2552); Barnett and Hunter (1972) และ Drenth and Sendall (2001 จากนั้นเก็บเชื้อลงบน PDA slant agar เก็บในตู้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เบญจพล ศรีทองคำ, 2559) โดยจากการศึกษาเบื้องต้นจากข้อ 3.1 และจากการแยกเชื้อราจากข้อ 3.2 บันทึกสัดส่วนของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้แต่ละชนิด โดยคิดสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด และทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคชนิดที่พบมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและชีวโมเลกุลต่อไป

3.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (single spore) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่เป็นโรคสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำ

นำเชื้อที่แยกได้ ย้ายลงบนอาหาร PDA ที่ผสมกับสเตรปโตมัยซิน (PDAS) อัตราส่วน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวั่นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราย้ายลงในขวดอาหาร WA ปริมาตร 10 มิลลิตรซึ่งบรรจุไม่จุ่มพื้น ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นจำนวน 2 รอบ (ดัดแปลงจาก Machado, 2012) บ่มในที่แสงสลบมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน (ดัดแปลงจาก Latha et al., 2009; Marques et al., 2013; Machado 2012; Machado et al., 2014a, 2014b; Msikita et al., 2005; Trakunyingcharoen et al., 2014) เพื่อให้เชื้อสร้างพิกนิตีเดีย (pycnidia) จากนั้นทำการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore) โดยนำพิกนิตีเดียของเชื้อราที่ได้มาผสมกับกรดแลคติก (100 เปอร์เซ็นต์ lactic acid) ตามวิธีการของ Machado (2012) วัดความเข้มข้นของสปอร์ด้วย Hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น 10^1 - 10^3 โคนิตีเดียต่อมิลลิเมตร โดยปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น

นี้้งมาเชื้อ นำสารแขวนลอยเชื้อเกลี่ย (spread plate) ด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ลงบนอาหาร WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการย้ายโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร PDAS เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (ดัดแปลงจากรุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2557)

3.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ

pathogenicity and virulently test)

นำเชื้อราที่ได้จากในข้อ 3.3 มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของโรคมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ พันธุ์ CMR 89 อายุ 8 เดือน ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

3.4.1.1 ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคลงบนชิ้นส่วนของมันสำปะหลัง 2 ส่วน ได้แก่ หัวและท่อนพันธุ์ 1) คัดเลือกหัวมันสำปะหลังที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-50 มิลลิเมตร ตัดให้ได้ความยาว 100 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก Machado et al. 2014a; Onyeka et al., 2005) นำมาล้างด้วยน้ำเปล่าฟุ้งให้แห้ง จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 30 เปอร์เซนต์ (NaOCl 3 เปอร์เซนต์) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างน้ำเปล่านี้้งมาเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที ฟุ้งให้แห้ง ทำผลโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณกึ่งกลางของหัวมันสำปะหลังให้ลึก 5 มิลลิเมตร โดยเจาะ 1 แผลต่อหัว จากนั้นนำเชื้อราจากข้อ 3.3 เลี้ยงบนอาหาร PDAS บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะขึ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราวางลงบนบริเวณแผลที่ทำการเจาะไว้ 1 ชิ้นวุ้นต่อหัว เก็บในสภาพกล่องชื้น (moistchamber) (Machado, 2012) ทำการให้ความชื้นเพื่อให้สภาพเหมาะสมต่อการเกิดโรค เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลการเกิดโรควินแรกที่มันสำปะหลังแสดงอาการของโรค เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยทำการตรวจวัดขนาดแผลโดยการใช้มิดผ่าตามแนวขวางบริเวณกลางชิ้นวุ้นที่ทำการปลูกเชื้อ วัดขนาดแผลตามเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวมันสำปะหลัง โดยดัดแปลงจาก Trakunyingcharoen et al. (2013) 2) คัดเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-30 มิลลิเมตร ตัดให้ได้ความยาว 100 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก Banito et al., 2010; Machado et al., 2014b; Msikita et al., 1997, 2005; Onyeka et al., 2005) ทำตามวิธีที่ 1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผล หลังจากการปลูกเชื้อ 15 วัน ใช้มิดผ่าตามแนวยาวบริเวณกลางชิ้นวุ้นที่ทำการปลูกเชื้อ วัดขนาดแผลตามแนวยาวของท่อน (ดัดแปลงจาก Chen et al., 2016; Ismail et al., 2012; Li et al., 2015; Trakunyingcharoen et al., 2013, 2015a) วางแผนการทดลองแบบ CRD4 ซ้ำ ๆ ละ 1 หัว/ท่อน ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (re-isolate) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และข้อ 3.3 ตามลำดับ

3.4.1.2 ในสภาพโรงเรือนทดลอง

โดยคัดเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังตามข้อ 3.4.1 จากนั้นนำเชื้อราจากข้อ 3.3 เลี้ยงบนอาหาร PDAS บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราวางลงบนบริเวณแผลที่ทำการเจาะไว้ 1 ขึ้นรู้นต่อท่อน นำพาราฟิล์มพันรอบแผล จากนั้นนำไปปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 4 นิ้วที่บรรจุทรายนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 กรัมต่อกระถางในโรงเรือน เมื่อครบ 15 วันหลังจากปลูกเชื้อนำพาราฟิล์มออก (ดัดแปลงจาก Machado 2012; Machado et al., 2014b; Trakunyingcharoen et al., 2013, 2015a) ทำการตรวจผลหลังจากการปลูกเชื้อ 45 วัน ใช้มีดผ่าตามแนวยาวบริเวณกลางขึ้นรู้นที่ทำการปลูกเชื้อ วัดขนาดแผลตามแนวยาวของท่อน (ดัดแปลงจาก Chen et al., 2016; Ismail et al., 2012; Li et al., 2015; Trakunyingcharoen et al., 2013a, 2015) วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำๆ ละ 1 ท่อน ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และข้อ 3.3 ตามลำดับ คัดเลือกตัวแทนจากไอโซเลตที่มีความรุนแรงที่สุดทั้ง 3 การทดลอง จำนวน 1 ไอโซเลต ไปทดสอบในข้อ 3.4.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงปลูกจำลองต่อไป

ประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 1-5 คะแนน ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก รุ่งทิพย์ สังข์เผือก (2557); Messiga et al. (2004) ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการ 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน

3.4.2 การเก็บ Stock ของเชื้อ

นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคจากข้อ 3.4.1 ทั้งหมดเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนแขวนลอยสปอร์ คูดใส่หลอด microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 ml หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหาร PDB ที่มีส่วนผสมของ 30 เปอร์เซ็นต์ glycerol ในอัตราส่วน 1:1 ละลายตะกอนสปอร์ด้วย vortex mixer แล้วเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Huertas-Gonzalez et al. (1999) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองระยะยาวต่อไป (รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2557)

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพแปลงปลูกจำลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ วิธีการปลูก คือ ปลูกแนวตั้งและแนวนอน ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ วิธีการปลูกเชื้อ คือ 1) การแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา 2) การปลูกเชื้อโดยไม่จุ่มพื้น 3) การปลูกเชื้อผสมลงในดินอัตราส่วน 1:100 4) การ

ปลูกเชื้อผสมลงในดินอัตราส่วน 1:1000 5) การปลูกเชื้อผสมลงในดินอัตราส่วน 1:10000 และ 6) ไม่มีการปลูกเชื้อ (ชุดควบคุม) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ปลูกลงบนถุงกระสอบขนาดใหญ่ (big bag) ขนาดบรรจุ 500 กิโลกรัม นำมาตัดแบ่งครึ่ง นำไปล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำดินใส่ลงในถุงจนเต็ม ขนาดบรรจุประมาณ 200 กิโลกรัมต่อถุงดังแสดงในภาพ 3.1

3.4.3.1 การปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา

โดยนำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุดแล้ว 1 ไอโซเลต เลี้ยงบนอาหาร PDAS บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราย้ายลงในขวดอาหาร WA บ่มในที่แสงสลบมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตามข้อ 3.3 จากนั้นนำท่อนมันสดสับหยาบขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร บรรจุลงในถุงพลาสติกกันร้อน ถุงละ 200 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 รอบ จากนั้นนำไม้จิ้มฟันที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุมใส่ลงในถุงอาหารจำนวน 2 แห่งต่อถุง บ่มที่อุณหภูมิห้องเวลา 15 วัน จากนั้นนำเชื้อบนท่อนมันสดสับหยาบ 2 กิโลกรัมมาผสมน้ำ 5 ลิตร นำท่อนพันธุ์ที่เตรียมไว้ แช่นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก วราภรณ์ สุทธิสา และคณะ, 2553; วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และมนัส ทิตยัวรรณ, 2556; Madiha et al., 2012) ปลูกลงในถุงกระสอบ

3.4.3.2 การปลูกเชื้อด้วยไม้จิ้มฟัน

โดยนำไม้จิ้มฟันที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุมตามข้อ 3.4.3.1 จำนวน 1 แห่ง วางลงบนตาข่ายของท่อนพันธุ์ จำนวน 1 จุดต่อท่อน (ดัดแปลงจาก Ghissi et al., 2014; Juboory and Juber, 2013; Pryor et al., 2000) ปลูกลงในถุงกระสอบ

3.4.3.3 การปลูกเชื้อผสมลงในดิน

โดยนำเชื้อบนท่อนมันสดสับหยาบ ตามข้อ 3.4.3.1 ผสมลงในดิน 3 อัตราส่วนได้แก่ 1) อัตราส่วน 1:100 เชื้อบนท่อนมัน 2 กิโลกรัมหรือ 10 ถุง 2) อัตราส่วน 1:1,000 เชื้อบนท่อนมัน 0.2 กิโลกรัมหรือ 1 ถุง และ 3) อัตราส่วน 1:10,000 เชื้อบนท่อนมัน 20 กรัม ผสมในแต่ละอัตราส่วนลงในถุงกระสอบที่มีดินบรรจุประมาณ 200 กิโลกรัม ผสมให้ทั่ว จากนั้นจึงปลูกมันสำปะหลัง (ดัดแปลงจาก วราภรณ์ สุทธิสาและคณะ, 2553)

โดยการทดลองมีทั้งหมด 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกแนวตั้ง ไม่มีการปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกแนวตั้ง มีการปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกแนวตั้ง มีการปลูกเชื้อด้วยไม้จิ้มฟัน

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกแนวตั้ง มีการปลูกเชื้อผสมลงในดิน 1:100

- กรรมวิธีที่ 5 ปลุกแนวตั้ง มีการปลุกเชื้อผสมลงในดิน 1:1,000
- กรรมวิธีที่ 6 ปลุกแนวตั้ง มีการปลุกเชื้อผสมลงในดิน 1:10,000
- กรรมวิธีที่ 7 ปลุกแนวนอน ไม่มีการปลุกเชื้อ
- กรรมวิธีที่ 8 ปลุกแนวนอน มีการปลุกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา
- กรรมวิธีที่ 9 ปลุกแนวนอน มีการปลุกเชื้อด้วยไม้จิ้มฟัน
- กรรมวิธีที่ 10 ปลุกแนวนอน มีการปลุกเชื้อผสมลงในดิน 1:100
- กรรมวิธีที่ 11 ปลุกแนวนอน มีการปลุกเชื้อผสมลงในดิน 1:1,000
- กรรมวิธีที่ 12 ปลุกแนวนอน มีการปลุกเชื้อผสมลงในดิน 1:10,000

ตรวจผลการเกิดโรคหลังจากปลุกเชื้อทุกเดือนเป็นเวลา 8 เดือน โดยประเมินผลการเกิดโรค โดยดูจากระดับอาการเกิดโรค 6 ระดับ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Messiga et al. (2004) ดังนี้ 0 = พืชไม่แสดงอาการต้นและรากเน่า 1 = เกิดต้นเน่าแต่พืชสามารถเจริญเติบโตได้โดยรากไม่เน่า 2 = เกิดต้นเน่าแต่รากเน่า 1-50 เปอร์เซ็นต์ ของราก 3 = เกิดต้นไม่เน่าแต่รากเน่า 51-100 เปอร์เซ็นต์ของราก 4 = ต้นเน่ารากเน่า 1-50 เปอร์เซ็นต์ ของราก 5 = ต้นเน่ารากเน่า 51-100 เปอร์เซ็นต์ 6 = ต้นเน่าไม่มีการเจริญเติบโต



ภาพที่ 3.1 แสดงการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงปลุกจำลองในถุงกระสอบขนาดใหญ่ (big bag)

3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

3.5.1 ลักษณะสีของโคโลนีและการเจริญเติบโต

นำเชื้อราจากข้อ 3.4.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDAS เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดของโคโลนีพร้อมบันทึกลักษณะของเส้นใย สี ทุกวัน วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำต่อไอโซเลต (ขนิษฐา มากรุง, 2548; รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2557)

3.5.2 ลักษณะของพิกนิตีเดีย (pycnidia) และขนาดของโคนิตีเดีย (conidia)

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลต จากข้อ 3.4.1 มาเลี้ยงไว้บนอาหารตามข้อ 3.3 เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ บันทึกภาพและลักษณะของพิกนิตีเดียดัดแปลงจากวิธีของ Phillips et al. (2013) และวัดขนาด 50 โคนิตีเดียต่อไอโซเลต โดยนำพิกนิตีเดียของเชื้อราที่ได้ใส่ลงในกรดแลคติก (100 เปอร์เซ็นต์) ลงบนสไลด์ จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ บันทึกภาพและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการจัดกลุ่มของเชื้อจากลักษณะของโคนิตีเดียโดยดัดแปลงจากวิธีการจัดกลุ่มเชื้อราของ Abdollahzadeh et al. (2010); Alves et al. (2008); Li et al. (2015); Machado et al. (2014a), (2014b); Pavlic et al. (2008); Phillips et al. (2013) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

3.6 การระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีชีวโมเลกุล

3.6.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อ

สกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังที่ผ่านการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำมาเป็นตัวแทนกลุ่ม กลุ่มละ 2 ไอโซเลต โดยดัดแปลงจากวิธีการของรุ่งทิพย์ สังข์เผือก (2557) โดย นำเส้นใยหรือพิกนิตีเดีย ไปบดเป็นผงในไนโตรเจนเหลว โดยใช้โกร่งบดที่เย็นจัด ตักผงที่บดละเอียดแล้วด้วยช้อนตักสารที่แช่ในไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับผงเส้นใย จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนชิ้นส่วนเซลล์ออกจากส่วนที่เป็นของเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน DNA ออกด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะ DNA ติดอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นทิ้งให้แห้งโดยวางคว่ำลงบนกระดาษกรอง 15 นาที ก่อนนำไปทำให้แห้งในสภาพสุญญากาศนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ DNA ที่ได้ ใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นของ DNA 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

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

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ ได้แก่ 1) บริเวณ internal transcribed spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene (ITS) ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')/ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT

GC-3') (Alves et al., 2008; Chen et al., 2016; Li et al., 2015) 2) บริเวณ translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) ไพรเมอร์ Ef1-688F (5'-CGG TCA CTT GAT CTA CAA GTG C-3')/Ef1-1251R (5'-CCT CGA ACT CAC CAG TAC CG-3') (Abdollahzadeh et al., 2010; Alves et al., 2008; Motokura et al., 2014) และ 3) บริเวณ beta -tubulin (β t) ไพรเมอร์ Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') /Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass and Donaldson 1995; Machado et al., 2014b; O'Donnell and Cigelnik 1997) โดยดัดแปลงจากรุ่นที่พิมพ์สังข์เผือก (2557) ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ 1 ไมโครลิตร, 10X amplifier buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ DNTP Mix ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตรด้วย Distillate water นำไปใส่เครื่อง PCR thermocycler (ยี่ห้อ BIO-RAD) กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ Primer โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (สำหรับตำแหน่ง EF1- α และ β t) และที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (สำหรับตำแหน่ง ITS), extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ และจากนั้นปรับอุณหภูมิ Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีตามวิธีของ Machado et al. (2014b) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป นำ PCR product ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตรและ novel juice 6x loading buffer ของบริษัท Gene DireX 1 ไมโครลิตรนำมาตรวจผลิตรหัส PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาทีหรือเมื่อแถบสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพ

3.6.3 การยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี DNA sequencing

นำ PCR product ปริมาณที่ได้ในข้อที่ 3.6.2 ส่งตรวจโดยใช้บริการของบริษัท แอปซิฟิกไซ-เอ็นซ์ จำกัดแล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำนายลักษณะ เพื่อระบุชนิดของเชื้อโดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.6.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของเชื้อ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ได้จากการทดลองและจากฐานข้อมูล Genbank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W (Li et al., 2015) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการทั้งหมด โดยวิธี neighbor joining (NJ) Unweighted pairs group method with arithmetic mean (UPGMA) และ Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Li et al., 2015; Machado et al., 2014a, 2014b; Tamura et al., 2013) (ดังแสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งในแต่ละวิธีกำหนดค่าความเชื่อมั่น (bootstrap analysis) ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หมายถึง กำหนดให้โปรแกรมมีการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการซ้ำกันทั้งหมด 1000 ครั้ง เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นแผนภูมิที่ดีที่สุดและมีความถูกต้องมากที่สุด จากนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป (มัลลิกา มะกรวัฒนะ, 2557; Li et al., 2015; Machado, 2012; Machado et al., 2014a, 2014b) และยืนยันชนิดของเชื้อราโดยเปรียบเทียบลักษณะของสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการของเชื้อ โดยนำข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวโมเลกุล และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการของเชื้อ มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานก่อนนี้เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

3.7 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for windows v.17.0 ตามแผนการทดลองโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีโดยวิธีการของ duncan's multiple range test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคต้นและรากเน่าจากจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดใกล้เคียง

เก็บรวบรวมชิ้นส่วนมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่าจากแปลงปลูก ได้แก่ อำเภอเมือง เสิง-สาง และครบุรี จังหวัดนครราชสีมา อำเภอดากฟ้าและดาคี จังหวัดนครสวรรค์ และอำเภอเทพ-สถิตย์ จังหวัดชัยภูมิ โดยการเก็บลักษณะอาการเน่าต่าง ๆ ทั้งหมดจำนวน 139 ตัวอย่าง พบว่า ลักษณะอาการต่าง ๆ ดังนี้ คือ ในแปลง มีอาการยืนต้นตาย ดังแสดงในภาพ 4.1 (A-B) มีอาการใบ-ล่างเหี่ยว หลุดร่วง ในมันอายุ 5-7 เดือน ดังแสดงในภาพ 4.2 (A) ท่อนพันธุ์ไม่งอก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบเขียวเล็กมีสีซีดใบล่างเหี่ยวช้า กิ่งมีอาการชำรุดในมันอายุ 2-5 เดือน ดังแสดงใน-ภาพ 4.2 (B-C) หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง-น้ำตาล และดำ ดังแสดงในภาพ 4.2 (D-E) บริเวณขั้วหัวมันมีเส้นใยเชื้อราสีขาว ดังแสดงในภาพ 4.2 (F) บริเวณขั้วของรากมีอาการเน่าดำรากไม่เจริญเติบโต ดังแสดงในภาพ 4.2 (G) มี fruiting body สี-ดำของเชื้อราเจริญบริเวณเปลือกของลำต้น ดังแสดงในภาพ 4.2 (H-I) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบ-เนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ (necrotic symptoms on vascular system) ดังแสดงในภาพ 4.2 (J)



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่ามันสำปะหลังในแปลง (A) มีอาการยืนต้น-ตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา (B) มีอาการยืน-ต้นตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา

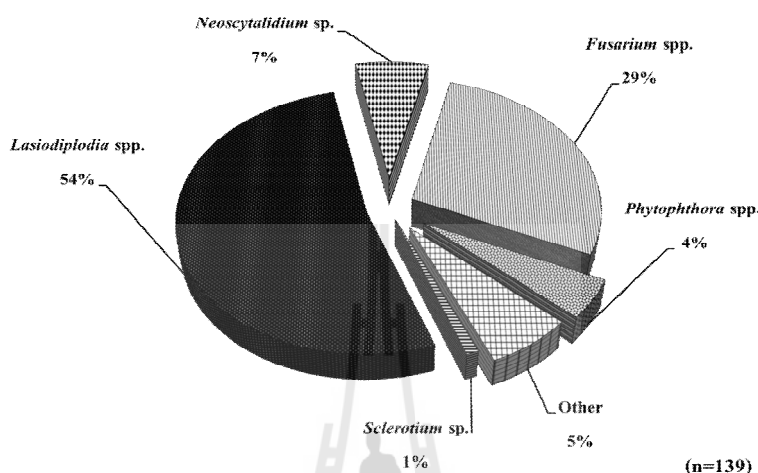


ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะอาการของโรคต้นและรากเน่ามันสำปะหลัง (A) มีอาการใบล่างเหี่ยว หลุดร่วง ในมันอายุ 5-7 เดือน (B-C) ท่อนพันธุ์ไม่งอก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบเรียวกเล็ก มีสีซีด ใบล่างเหี่ยวช้า กิ่งมีอาการช้ำสีดำ ในมันอายุ 2-5 เดือน (D-E) หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง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

4.2 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคต้นและรากเน่า

จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรคจำนวน 139 ไอโซเลต พบเชื้อราจำนวน 5 สกุล โดยพบเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มากที่สุด 54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Fusarium* spp. 29 เปอร์เซ็นต์

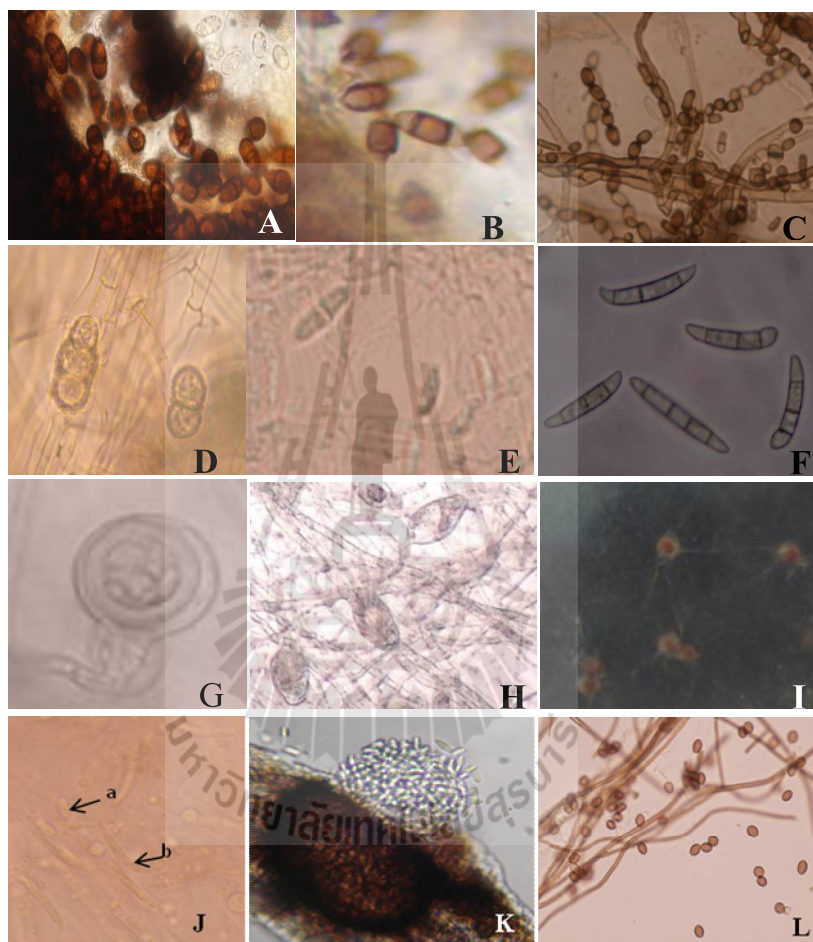
Neoscytalidium sp. 7 เปอร์เซ็นต์ *Phytophthora* spp. 4 เปอร์เซ็นต์ *Sclerotium* sp. 1 เปอร์เซ็นต์ และอื่น ๆ อีก 5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพ 4.3 ซึ่งเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. พบมากที่สุดจึงเลือกที่จะนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล



ภาพที่ 4.3 แสดงความถี่ของเชื้อราที่พบจากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่า

ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ 1) *Lasiodiplodia* spp. โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำเทา คำเขียวมะกอก ฟู ลักษณะของ conidia ซึ่งเจริญภายใน pycnidia สีดำที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบนมันสำปะหลัง มีลักษณะเหมือนกันโดย ระยะอ่อน (immature conidia) มีเซลล์เดียว ใส ไม่มีสี รูปไข่ถึงยาวรี จนถึงค่อนข้างกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ต่อมาระยะแก่ (mature conidia) สร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว และผนังกัน (septum) 1 ชั้น ตรงกลาง ทำให้แบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ดังแสดงในภาพ 4.4 (A) 2) *Fusarium* spp. โคลนีนบนอาหาร PDA มีสีขาวเหลือง ขาวม่วง และขาวชมพู เส้นใยใสมิ่เส้นกัน พบสปอร์ใสมขนาดใหญ่ (macroconidia) หัวท้ายเรียวแหลม มีทั้งลักษณะตรง โค้งคล้ายรูปพระจันทร์เสี้ยว 1-4 เซลล์ สปอร์ขนาดเล็กกลมมา (microconidia) ลักษณะใส 1-2 เซลล์ และสปอร์ระหว่างเส้นใย (chlamydospore) ลักษณะกลมผนังหนา 1-3 เซลล์ ดังแสดงในภาพ 4.4 (D-F) 3) *Neoscytalidium* sp. จากการตรวจสอบเบื้องต้นพบ pycnidia สีดำ เมื่อทำการ cross section ท่อนมันสำปะหลังที่เชื้อเจริญอยู่ พบ conidia ขนาดเล็ก มีลักษณะ 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีสีเข้ม หัวท้ายแหลม ดังแสดงในภาพ 4.4 (B) ซึ่งเมื่อแยกเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบโคลนีสีดำ สร้างสปอร์เรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่ เรียกว่า arthroconidia 1-2 เซลล์ ดังแสดงในภาพ 4.4 (C) 4) *Phytophthora* spp. มีโคลนีนบนอาหาร PDA+BRNAP เป็นสีขาว เส้นใยใสมิ่ไม่มีเส้นกัน พบทั้ง oospore ดังแสดงในภาพ 4.4 (G) และ zoosporangium ดังแสดงในภาพ 4.4 (H) โดยไม่สามารถแยก

ได้บนอาหาร WA หรือ PDA และ 5) *Sclerotium* sp. เส้นใยมีสีขาวเทาฟูบนอาหาร PDA และมีเม็ด sclerotia สีน้ำตาลขนาดเท่าเมล็ดผักกาด ดังแสดงในภาพ 4.4 (I) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราอื่นที่ตรวจสอบเบื้องต้นพบด้วยกล้องจุลทรรศน์แต่ไม่สามารถแยกเชื้อได้ ได้แก่ เชื้อรา *Chaetomium* sp., *Macrophoma* sp. และ *Phomopsis* sp. ดังแสดงในภาพภาพ 4.4 (J-L)

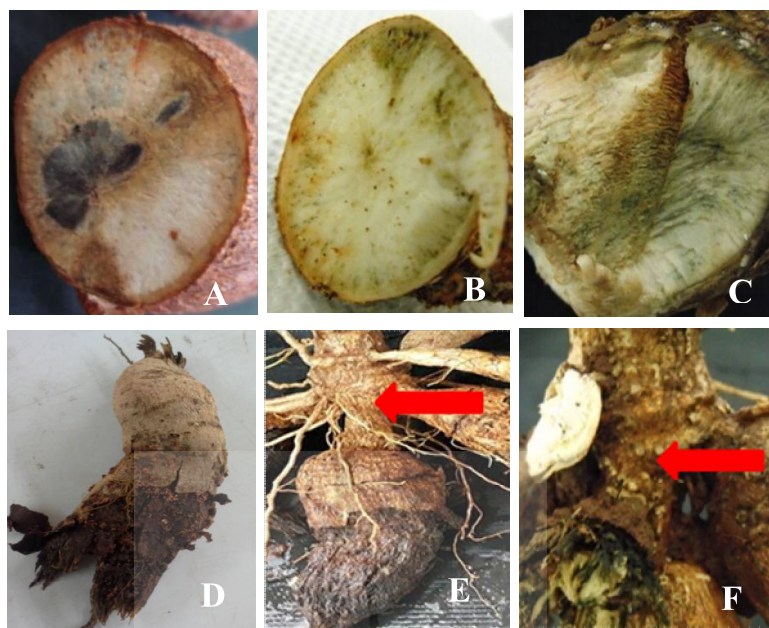


ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะสปอร์หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากต้นและรากของมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่า (A) conidia ของ *Lasiodiplodia* spp. (B-C) conidia และ arthroconidia ของ *Neoscytalidium* sp. (D-F) chlamydospore, microconidia และ macroconidia ของ *Fusarium* spp. (G-H) oospore และ zoosporangium ของ *Phytophthora* spp. (I) เม็ด sclerotia สีน้ำตาลของ *Sclerotium* sp. (J) conidia ของ *Phomopsis* spp. (a) alpha, (b) beta (K) conidia และ pycnidia ของ *Macrophoma* spp. และ (L) conidia ของ *Chaetomium* spp.

4.3 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคต้นและรากเน่าดำ

ลักษณะอาการเน่าที่พบมากที่สุดคือ อาการเน่าดำ โดยมีแผลสีดำร่วมกับอาการเน่าเปื่อย เน่า และเน่าแห้ง เชื้อราที่แยกได้ คือ *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp จัดอยู่ในวงศ์ Botryosphaeriaceae เชื้อราทั้งสองชนิดสามารถแยกได้จากทุกส่วนของมันสำปะหลัง

ในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำ สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต จากตัวอย่างใน จ.นครราชสีมา 29 ไอโซเลต จ.นครสวรรค์ 3 ไอโซเลต และจ.ชัยภูมิ 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) โดยไอโซเลตที่แยกได้ส่วนใหญ่มาจากบริเวณหัวและขั้วหัวมัน จำนวน 15 ไอโซเลต แยกจากหัวมัน 10 ไอโซเลต ได้แก่ L6HRD, L8HDBB, L11HSR2, L15HDBB, L18KBSH3, L20FHTB1, 22HRW, L24HRWH, 26HRWB และ N3DTD2 โดยหัวจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองปนเขียว เทียมะกอก เทา แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ จนกลายเป็นสีดำ (ภาพที่ 4.5 A-D) ส่วนจากขั้วหัวมัน 5 ไอโซเลต ได้แก่ L2SHSR1, L4STR1, L5KBSH1, L12SHRD และ N2SHCA โดยหัวมันมีอาการเน่าเปื่อย เน่า และเน่าแห้งร่วมกันไม่สามารถแยกจากหัวมันได้จึงแยกจากขั้วหัวมัน (ภาพที่ 4.5 E-F) รองลงมา คือบริเวณ โคนต้นเหนือดิน จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ L9STR2, L17STRB, L19KBSH2, L21SRE, L23STWH, L25SRC และ L27SRBT โดยโคนต้นแตก เป็นริ้วสีดำและมีเส้นใยสีขาวปกคลุม (ภาพที่ 4.6 A-B) บริเวณท่อนพันธุ์ จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ L1STRM, L3BSR, L7STRW, L13SRTE, N1SRTEC, N4BBPM และ N5STRST โดยท่อนพันธุ์ไม่ออก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น เหี่ยวแห้ง และมีตุ่มเม็ดสีดำเกาะกระจายทั่วท่อนพันธุ์ (ภาพที่ 4.6 C-D) บริเวณกิ่งมัน จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ L10BBLB และ L28SBB มีอาการกิ่งชำแห้งมีสีดำ และสีน้ำตาลไหม้ (ภาพที่ 4.7 A-B) บริเวณใบมัน 1 ไอโซเลต คือ L14LSR ใบชำ ใบม่วงงอ ใบเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นสีดำ (ภาพที่ 4.7 C) และบริเวณก้านใบ 1 ไอโซเลต คือ L16LSR ก้านใบชำมีสีดำ (ภาพที่ 4.7 D)



ภาพที่ 4.5 แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณหัวและขั้วหัวมันสำปะหลัง (A) อาการหัวเน่าซ้ำ มีการเปลี่ยนสีจากขาวเป็นสีเทาจนถึงสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L6HRD, L8HDBB, L11HSR2 และ L15HDBB (B) อาการหัวเน่าซ้ำมีเส้นดำ เส้นสีเขียวมะกอกแยกได้เชื้อไอโซเลต L22HRW, L24HRWH และ N3DTD2 (C) อาการหัวเน่าซ้ำเขียวมะกอก โดยเน่าบริเวณกลางหัวมันสำปะหลัง แยกได้เชื้อไอโซเลต L20FHTB1 และ L26HRWB (D) อาการหัวเน่าและสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L18KBSH3 (E) อาการหัวเน่าและสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้น แยกได้เชื้อไอโซเลต L4STR1 และ L5KBSH1 (F) อาการหัวเน่าซ้ำสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้น แยกได้เชื้อไอโซเลต L2SHSR1, L12SHRD และ N2SHCA



ภาพที่ 4.6 แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณโคนต้นและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง (A) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว มีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในมีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุมแยกได้เชื้อ ไอโซเลต L17STRB, L19KBSH2, L21SRE, L25SRC และ L27SRBT (B) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว มีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในแต่ไม่มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุม แยกได้เชื้อ ไอโซเลต L9STR2 และ L23STWH, ท่อนพันธุ์แสดงอาการของโรคลำต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลัง (C-D) มีตุ่มเม็ดของเชื้อราสีดำเจริญท่อนพันธุ์ แยกได้เชื้อ ไอโซเลต L13SRTE, N1SRTTC, N4BBPM, N5STRST, L1STRM, L3BSR และ L7STRW



ภาพที่ 4.7 แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำบริเวณกิ่ง ใบและก้านใบมันสำปะหลัง (A) อาการกิ่งไหม้ซ้ำมีสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L10BBLB (B) อาการกิ่งไหม้ซ้ำสีน้ำตาลแดงเข้ม และเหี่ยวแห้ง แยกได้เชื้อไอโซเลต L28SBB (C) อาการใบไหม้เน่าซ้ำสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L14LSR (D) อาการก้านใบไหม้มีแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L16BLSR

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำที่เก็บได้จาก
จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
หัว	L20FHTB1	1	อ.เมือง นม.
	L6HRD L8HDBB L11HSR2	9	อ.เสิงสาง นม.
	L15HDBB L18KBBSH3 22HRW		
	L24HRWH 26HRWB N3DTD2		
ข้าวหัว	L2SHSR1 L4STR1 L5KBSH1	3	อ.เสิงสาง นม.
	L12SHRD N2SHCA	2	อ.ครบุรี นม.
โคนต้น	L9STR2 L19KBSH2 L23STWH,	5	อ.เสิงสาง นม.
	L25SRC L27SRBT		
	L17STRB L21SRE	2	อ.ครบุรี นม.
ท่อนพันธุ์	L1STRM L3BSR L7STRW	3	อ.เมือง นม.
	L13SRTF	1	อ. ดากฟ้า นว.
	N1SRTTC N5STRST	2	อ. ดาคี นม.
	N4BBPM	1	อ. เทพสถิตย์ ชย.
กิ่ง	L10BBLB	1	อ.เมือง นม.
	L28SBB	1	อ.เสิงสาง นม.
ใบ	L14LSR	1	อ.เมือง นม.
ก้านใบ	L16BLSR	1	อ.เสิงสาง นม.

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

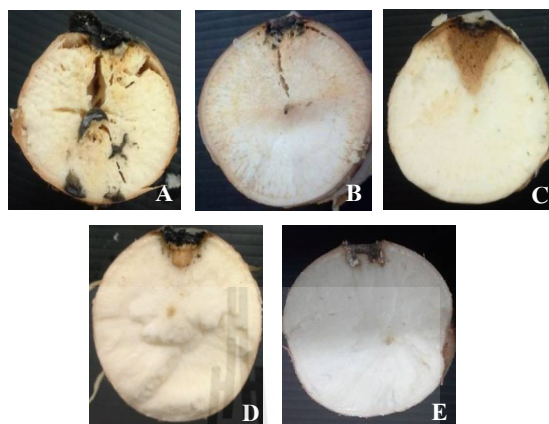
4.4 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ (pathogenicity and virulently test)

4.4.1 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง

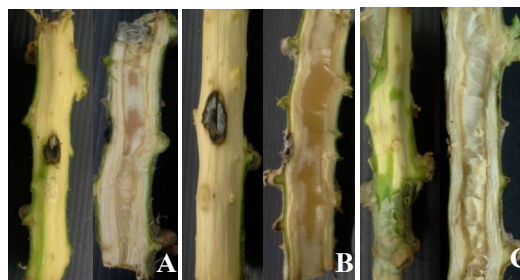
4.4.1.1 ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการปลูกเชื้อราที่แยกได้ พบว่าเชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถก่อโรคให้ทั้งหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้ โดยแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูกเชื้อบนหัวมันและวัดขนาดแผลเน่าจากเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวมันในวันที่ 7 (ตารางที่ 4.2) สามารถจัดกลุ่มได้ 15 กลุ่ม (ภาคผนวก ค) หัวมันแสดงอาการเน่าซ้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลง บริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลดำถึงดำและแห้ง ส่วนบริเวณรอบ ๆ เปลี่ยนสีเป็นเหลืองถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและออกจากกัน ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคพบความรุนแรงทั้งหมด 5 ระดับซึ่งความรุนแรงมากที่สุดระดับ 5 คือเกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L11HSR2 มีขนาดแผลเฉลี่ย 46.63 ± 2.09 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.8 A) ความรุนแรงระดับ 4 คือเกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L6HRD, L12SHRD, L13SRTF, L17STRB, L19KBSH, L20FHTB1, L22HRW, L27SRBT และ L28SBB มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 33.50 ± 2.02 - 42.38 ± 1.32 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.8 B) ความรุนแรงระดับ 3 คือเกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L1STRM, L2SHSR1, L3BSR, L4STR1, L5KBSH1, L7STRW, L8HDBB, L9STR2, L10BBLB, L16BLSR, L18KBSH3, L21SRE, L24HRWH, L25SRC, L26HRWB, N1SR TTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 21.13 ± 2.50 - 31.60 ± 3.93 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.8 C) ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 2 คือเกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L14LSR, L15HDBB และ L23STWH มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 13.88 ± 1.94 - 17.50 ± 1.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.8 D) กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 4.8 E) และแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูกเชื้อบนท่อนพันธุ์ โดยวัดขนาดแผลเฉลี่ยตามยาวจากการผ่าตรงกลางแผลของท่อนพันธุ์ ในวันที่ 15 (ตารางที่ 4.2) สามารถจัดกลุ่มได้ 16 กลุ่ม (ภาคผนวก ค) ท่อนพันธุ์แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือกเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคพบความรุนแรงทั้งหมด 3 ระดับ ซึ่งความรุนแรงมากที่สุดระดับ 3 คือเกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L3BSR, L4STR1, L11HSR2, L12SHRD, L14LSR, L21SRE, L27SRBT, N1SR TTC, N3DTD2 และ N4BBPM มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 33.50 ± 2.90 - 41.25 ± 1.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.9 A) ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 2 คือเกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L1STRM, L2SHSR1, L5KBSH1, L6HRD, L7STRW, L8HDBB, L9STR2, L10BBLB, L13SRTF, L15HDBB, L16BLSR, L17STRB, L18KBSH3, L19KBSH2, L20FHTB1, L22HRW, L23STWH,

L24HRWH, L25SRC, L26HRWB, L28SBB, N2SHCA และ N5STRST มีขนาดผลเฉลี่ยตั้งแต่ 7.00 ± 0.46 - 30.75 ± 8.10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.9 B) กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 4.9 C)



ภาพที่ 4.8 ลักษณะของหัวมันสำปะหลังที่หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการหัวเน่าช้า เนื้อเยื่อยุบตัวลง บริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลดำถึงดำและแห้ง ส่วนบริเวณรอบ ๆ เปลี่ยนสีเป็นเหลืองถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและออกจากกัน (A) ไอโซเลต L11HSR2 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต L6HRD ความรุนแรงระดับ 4 (C) ไอโซเลต L18KBSH3 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต L14LSR ความรุนแรงระดับ 2 และ (E) หัวมันในกรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค

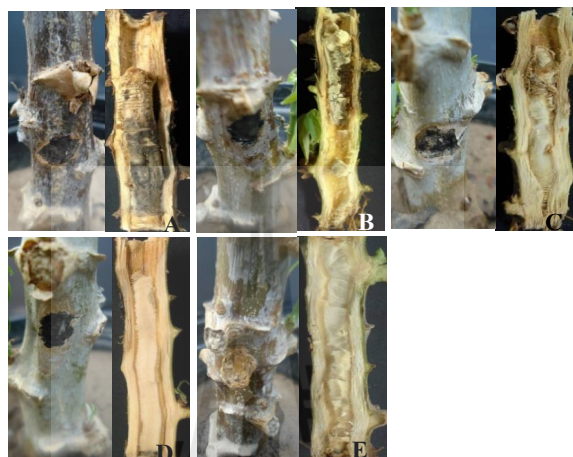


ภาพที่ 4.9 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลาย เปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L12SHRD ความรุนแรงระดับ 3 (B) ไอโซเลต L24HRWH ความรุนแรงระดับ 2 และ (C) ท่อนพันธุ์กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค

4.4.1.2 ในสภาพโรงเรือน

จากการปลูกเชื้อราที่แยกได้ พบว่าเชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถก่อโรคให้มันสำปะหลังได้ โดยแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูกเชื้อบนท่อนพันธุ์ และวัดขนาดแผลเฉลี่ยตามยาวจากการผ่าตรงกลางแผลของท่อนพันธุ์ ในวันที่ 45 (ตารางที่ 4.2) สามารถจัดกลุ่มได้ 19 กลุ่ม (ภาคผนวก ก) ท่อนพันธุ์แสดงอาการต้นแห้งตาย ไม่เจริญเติบโต เจริญเติบโตช้า เนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น และบริเวณเนื้อไม้ถูกทำลาย เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคพบความรุนแรงทั้งหมด 5 ระดับซึ่งความรุนแรงมากที่สุดระดับ 5 คือเกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L1STRM, L2SHSR1, L3BSR, L6HRD, L7STRW, L11HSR2, N1SR TTC, N3DTD2 และ N4BBPM มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ $80.50 \pm 5.81 - 96.25 \pm 3.75$ มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.10 A) ความรุนแรงระดับ 4 คือเกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L8HDBB, L9STR2, L12SHRD, L13SR TF, L19KBSH2, N2SHCA และ N5STRST มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ $59.25 \pm 5.86 - 71.91 \pm 2.97$ มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.10 B) ความรุนแรงระดับ 3 คือเกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L4STR1 L10BBLB L14LSR L15HDBB L17STRB L18KBSH3 L20FHTB1 L21SRE L22HRW และ L23STWH มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ $27.13 \pm 5.91 - 46.75 \pm 7.62$ มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.10 C) ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 2 คือเกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L5KBSH, L16BLSR, L24HRWH, L25SRC, L27SRBT, L26HRWB และ L28SBB มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ $13.88 \pm 2.50 - 18.44 \pm 2.13$

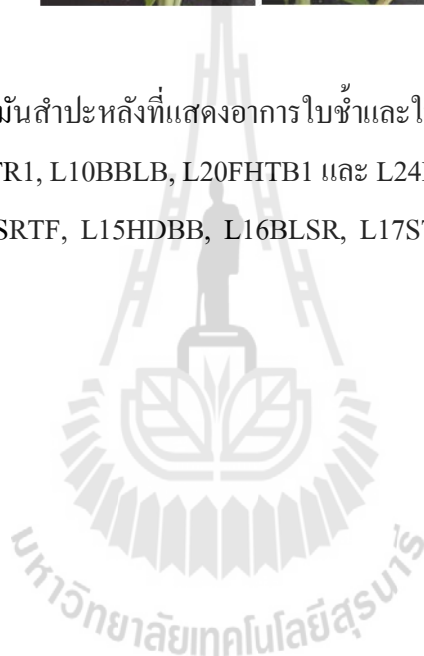
มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.10 D) กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 4.10 E) และพบว่าบางไอโซเลตแสดงอาการใบช้ำ ม้วนขึ้น เที่ยว ได้แก่ L4STR1, L10BBLB, L20FHTB1 และ L24HRWH (ภาพที่ 4.11 A-B) และแสดงอาการใบไหม้ ม้วนขึ้น ได้แก่ L13SRTF, L15HDBB, L16BLSR, L17STRB, L18KBSH3, N4BBPM และ N5STRST (ภาพ 4.11 C-D)



ภาพที่ 4.10 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 45 วันในสภาพโรงเรือน แสดงอาการต้นแห้งตาย ไม่เจริญเติบโต เจริญเติบโตช้า เนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น และบริเวณเนื้อไม้ถูกทำลาย เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L11HSR2 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต L13SRTF ความรุนแรงระดับ 4 (C) ไอโซเลต L20FHTB1 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต L5KBSH1 ความรุนแรงระดับ 2 และ (E) ท่อนพันธุ์กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค



ภาพที่ 4.11 ลักษณะของมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบช้ำและใบไหม้(A-B)ใบช้ำ ม้วนขึ้น เหี่ยว ไอ-โซเลต L4STR1, L10BBLB, L20FHTB1 และ L24HRWH (C-D) ใบไหม้ ม้วนขึ้น ไอ-โซเลต L13SRTF, L15HDBB, L16BLSR, L17STRB, L18KBSH3, N4BBPM และ N5STRST



ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนบนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89

ไอโซเลต	หัวมันสำปะหลัง		ท่อนพันธุ์ในกล่องขึ้น		ท่อนพันธุ์ในโรงเรือน	
	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง ^{2/}	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง
L1STRM	27.50±0.90 ^{d-g1/}	3	24.00±2.27 ^{c-g}	2	86.25±6.25 ^{abc}	5
L2SHSR1	28.00±1.06 ^{c-g}	3	29.00±6.75 ^{b-e}	2	90.00±6.12 ^{ab}	5
L3BSR	29.25±3.13 ^{c-g}	3	37.60±1.92 ^{ab}	3	86.25±5.54 ^{abc}	5
L4STR1	23.75±2.72 ^{c-h}	3	34.50±3.75 ^{ab}	3	31.25±3.15 ^{h-k}	3
L5KBSH1	21.13±2.50 ^{fgh}	3	11.00±2.35 ^{hij}	2	18.44±2.13 ^{jkl}	2
L6HRD	34.25±2.81 ^{b-e}	4	15.63±1.57 ^{g-j}	2	78.16±6.80 ^{a-e}	5
L7STRW	23.88±0.67 ^{c-h}	3	14.38±2.19 ^{g-j}	2	80.50±7.71 ^{a-d}	5
L8HDBB	30.38±3.01 ^{b-f}	3	20.00±5.40 ^{e-i}	2	59.25±5.86 ^{fg}	4
L9STR2	27.00±2.62 ^{d-g}	3	30.25±4.27 ^{a-e}	2	71.00±5.94 ^{c-f}	4
L10BBLB	26.25±1.29 ^{d-h}	3	22.75±1.31 ^{d-g}	2	31.25±3.15 ^{h-k}	3
L11HSR2	46.63±2.09 ^a	5	41.25±1.25 ^a	3	96.25±3.75 ^a	5
L12SHRD	40.08±4.04 ^{abc}	4	37.50±6.61 ^{ab}	3	64.63±8.05 ^{def}	4
L13SRTF	35.25±4.75 ^{a-e}	4	27.75±1.25 ^{b-e}	2	63.25±10.14 ^{d-g}	4
L14LSR	17.00±2.47 ^{ghi}	2	33.50±2.90 ^{a-d}	3	34.50±3.4 ^{hij}	3
L15HDBB	17.50±1.25 ^{ghi}	2	30.75±8.10 ^{a-e}	2	28.75±4.27 ^{h-k}	3
L16BLSR	26.25±4.80 ^{d-h}	3	8.75±2.14 ^j	2	18.33±2.72 ^{jkl}	2
L17STRB	35.00±4.68 ^{a-e}	4	16.75±1.18 ^{f-j}	2	27.75±5.01 ^{ijk}	3
L18KBSH3	26.25±4.80 ^{d-h}	3	9.50±2.02 ^{ij}	2	38.25±8.07 ^{hi}	3
L19KBSH2	35.00±4.68 ^{a-e}	4	10.50±1.66 ^{hij}	2	61.25±8.19 ^{efg}	4
L20FHTB1	42.38±1.32 ^{ab}	4	15.00±2.04 ^{g-j}	2	46.75±7.62 ^{gh}	3
L21SRE	31.6±3.93 ^{b-f}	3	33.75±3.75 ^{a-d}	3	32.13±7.17 ^{h-k}	3
L22HRW	38.13±1.04 ^{a-d}	4	20.50±1.55 ^{e-i}	2	27.13±5.91 ^{i-l}	3
L23STWH	13.88±1.94 ^{hi}	2	16.25±0.52 ^{f-j}	2	30.50±3.33 ^{h-k}	3
L24HRWH	28.5±6.23 ^{c-g}	3	0.63±2.13 ^{e-h}	2	17.63±4.81 ^{kl}	2
L25SRC	31.5±2.02 ^{b-f}	3	8.75±0.52 ^j	2	13.88±2.50 ^{kl}	2
L26HRWB	22.50±6.73 ^{c-h}	3	7.00±0.46 ^j	2	17.88±4.65 ^{kl}	2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนบนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 (ต่อ)

ไอโซเลต	หัวมันสำปะหลัง		ท่อนพันธุ์ในกล่องขึ้น		ท่อนพันธุ์ในโรงเรือน	
	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง ^{2/}	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับ ความ รุนแรง
L27SRBT	40.25±5.09 ^{abc}	4	33.75±3.15 ^{a-d}	3	17.25±1.93 ^{j^{kl}}	2
L28SBB	33.50±2.02 ^{b-f}	4	10.63±1.49 ^{hij}	2	18.00±2.86 ^{kl}	2
N1SR TTC	26.5±1.95 ^{d-g}	3	36.00±4.20 ^{ab}	3	93.00±2.86 ^a	5
N2SHCA	26.3±1.67 ^{d-h}	3	26.50±3.30 ^{b-f}	2	62.75±9.63 ^{d-g}	4
N3DTD2	22.75±0.41 ^{e-h}	3	36.00±4.85 ^{ab}	3	84.50±4.27 ^{abc}	5
N4BBPM	25.50±1.89 ^{d-h}	3	36.75±2.69 ^{ab}	3	80.50±5.81 ^{a-d}	5
N5STRST	24.15±0.31 ^{e-h}	3	30.00±3.11 ^{b-c}	2	71.91±2.97 ^{b-f}	4
Control	6.50±0.56 ⁱ	1	6.03±0.02 ^j	1	9.00±1.29 ^l	1
F-test ^{3/}	**		**		**	
%C.V.	25.87		28.33		22.54	

^{1/}ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

^{2/}การประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 1-5 ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน

^{3/}** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

4.4.2 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพแปลงปลูกจำลอง

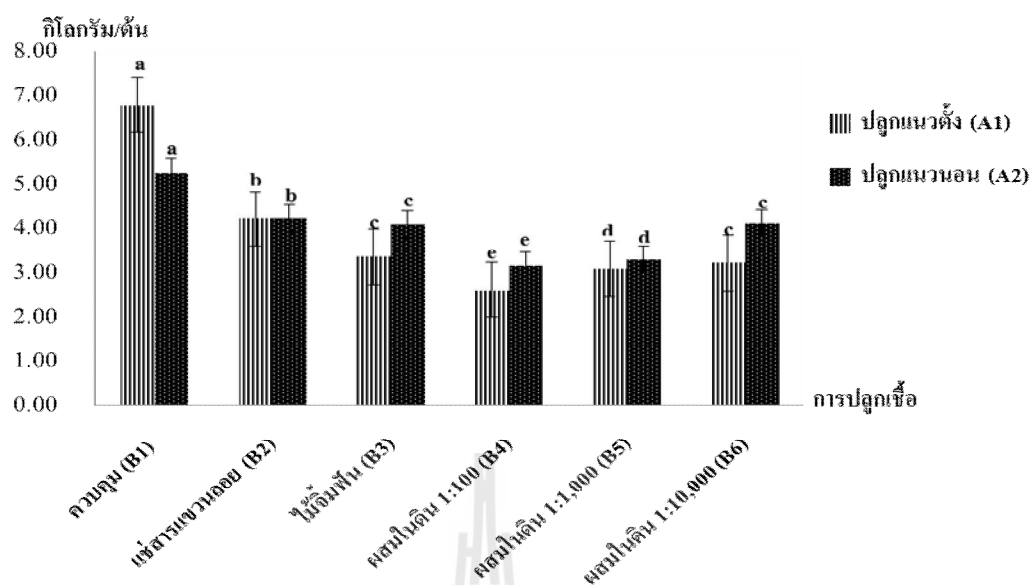
จากผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคในระดับปฏิบัติการและโรงเรือนทั้ง 33 ไอโซเลต คัดเลือกเพียง 1 ไอโซเลต คือ 11HSR2 ที่มีความรุนแรงของโรคสูงที่สุด นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงปลูก วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ วิธีการปลูก และปัจจัยที่ 2 ได้แก่ วิธีการปลูกเชื้อ ศึกษาเป็นระยะเวลา 8 เดือน พบว่าท่อนพันธุ์มีอาการลำต้นเน่าทุกกรรมวิธี รวมทั้งชุดควบคุมด้วย บริเวณโคนต้นมีการสร้าง cork layer ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.12 B-C) บริเวณท่อน้ำท่ออาหารของท่อนพันธุ์เดิมเปลี่ยนเป็นสีเป็นน้ำตาลดำ และบริเวณแกนกลางลำต้น เปลี่ยนเป็นสีเทาดำ (ภาพที่ 4.12 E-H) ซึ่งลำต้นที่แตกออกใหม่ไม่แสดงอาการของโรค แต่กลับพบว่ามีน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยแตกต่างกันซึ่งการปลูกเชื้อผสม

ลงในดินอัตราส่วน 1:100 มีน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยน้อยที่สุด และชุดควบคุมมีน้ำหนัก หัวสดเฉลี่ยมากที่สุด โดยพบว่าน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยของการปลูกเชื้อผสมลงในดิน 1:100 การปลูกเชื้อผสมลงในดิน 1:1000 การปลูกเชื้อผสมลงในดิน 1:10000 การปลูกเชื้อ โดยไม่จุ่มพิน การแช่ท่อนพันธุ์ด้วยเส้นใยของเชื้อรา และชุดควบคุม เท่ากับ 2.90 ± 0.33 , 3.20 ± 1.41 , 3.68 ± 0.51 , 3.73 ± 0.41 , 4.23 ± 0.19 และ 6.03 ± 0.87 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้วิธีการปลูกแนวตั้งร่วมกับชุดควบคุมมีน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 6.80 ± 0.35 กิโลกรัม อย่างไรก็ตาม วิธีการปลูกแนวตั้งร่วมกับการปลูกเชื้อผสมลงในดิน 1:100 มีน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 2.63 ± 0.21 กิโลกรัม นอกจากนี้พบว่า การปลูกแนวอนมีน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยมากกว่าการปลูกแบบแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.13) ลักษณะหัวมันแต่ละกรรมวิธีแสดงในภาคผนวก ก





ภาพที่ 4.12 แสดงลักษณะอาการต่าง ๆ หลังจากการปลูกเชื้อไอโซเลต 11HSR2 ในสภาพแปลงปลูกจำลองเป็นระยะเวลา 8 เดือน (A) หัวมันสำปะหลังไม่แสดงอาการของโรคเน่าดำ (B-D) บริเวณโคนต้น พบมีการสร้าง cork layer ขนาดใหญ่มาห่อหุ้มท่อนพันธุ์มันสำปะหลังเดิมที่มีอาการเน่าดำ ทำให้โคนต้นมีอาการบวม (E-H) เมื่อผ่าบริเวณโคนต้น พบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของท่อนพันธุ์เดิมที่เน่าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ บริเวณแกนกลางเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ (I) บริเวณลำต้นที่แตกใหม่ไม่พบลักษณะอาการเน่าดำ



ภาพที่ 4.13 แสดงน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยของมันสำปะหลังในสภาพแปลงปลูกจำลองหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 เดือน

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยของมันสำปะหลังในสภาพแปลงปลูกจำลอง หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 เดือน

กรรมวิธี	น้ำหนักหัวมันสดเฉลี่ย (กิโลกรัม)						ค่าเฉลี่ย
	B1 ^{4/}	B2	B3	B4	B5	B6	
A1 ^{3/}	6.80±0.35 ^{a1/}	4.23±0.25 ^b	3.37±0.06 ^c	2.63±0.21 ^c	3.10±1.00 ^d	3.23±0.21 ^c	3.89±1.44 ^b
A2	5.27±0.15 ^a	4.23±0.15 ^b	4.10±1.00 ^c	3.17±1.53 ^c	3.30±1.00 ^d	4.13±0.06 ^c	4.03±0.71 ^a
ค่าเฉลี่ย	6.03±0.87 ^a	4.23±0.19 ^b	3.73±0.41 ^c	2.90±0.33 ^c	3.20±1.41 ^d	3.68±0.51 ^c	
CV%							28.27
A							* ^{2/}
B							**
A*B							**

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.01 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05,

^{3/} วิธีการปลูกเชื้อ A1 = การปลูกแนวตั้ง, A2 = การปลูกแนวนอน

^{4/} วิธีการปลูกเชื้อ B1 = ควบคุม, B2 = วิธีการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยเส้นใยของเชื้อรา, B3 = วิธีการปลูกเชื้อโดยไม่จุ่มพื้, B4 = วิธีการผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกด้วยอัตราส่วน 1:100, B5 = วิธีการผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกด้วยอัตราส่วน 1:1,000, B6 = กรรมวิธีการผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกด้วยอัตราส่วน 1:10,000

4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

4.5.1 การเจริญของโคโลนี

ผลการวัดอัตราการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDAS พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเร็วสามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในวัน 1-3 หลังจากวางเชื้อ โดยเชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวถึงสีเทาในวันที่ 1-3 (ภาพที่ 4.14 A) โดยในวันที่ 3-4 จะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ (greenish olivaceous to black) (ภาพที่ 4.14 B) หรือน้ำตาลดำ (brown to black) แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และสีของโคโลนีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออายุมากขึ้น (ภาพที่ 4.14 C) โดยไอโซเลตที่เจริญเร็วสุดได้แก่ ไอโซเลต L8HDBB สามารถเจริญบนจานอาหารหลังวางเชื้อ 1 วัน มีขนาดเฉลี่ย 84.00x84.25 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุดได้แก่ L10BBLB สามารถเจริญบนจานอาหารหลังวางเชื้อ 1 วัน ขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร แต่ในวันที่ 3 หลังวางเชื้อสามารถเจริญเต็มจานอาหารเท่ากับ ไอโซเลตอื่น ๆ ขนาดของโคโลนีแสดงในตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.14 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีของไอโซเลต L11HSR2 (A) เชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวถึงสีเทาในวันที่ 1-3 (B) เปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ (greenish olivaceous to black) ในวันที่ 3-4 (C) โคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออายุมากขึ้น

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAS ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
L1STRM	74.00×74.00	84.80×84.80	90.00×90.00
L2SHSR1	73.00×73.40	86.00×86.00	90.00×90.00
L3BSR	53.00×53.50	80.00×80.00	90.00×90.00
L4STR1	59.00×59.00	84.00×84.00	90.00×90.00
L5KBSH1	75.00×75.00	82.20×82.20	90.00×90.00
L6HRD	65.00×65.00	85.20×85.20	90.00×90.00
L7STRW	74.00×74.00	86.00×86.00	90.00×90.00
L8HDBB	84.00×84.00	89.00×89.00	90.00×90.00
L9STR2	59.00×59.00	84.60×84.60	90.00×90.00
L10BBLB	43.00×43.00	72.80×72.80	90.00×90.00
L11HSR2	70.00×70.00	84.00×84.00	90.00×90.00
L12SHRD	59.80×59.80	84.80×84.80	90.00×90.00
L13SRTF	52.00×52.00	74.20×74.20	90.00×90.00
L14LSR	55.00×55.00	75.80×75.80	90.00×90.00
L15HDBB	54.80×54.80	84.40×84.40	90.00×90.00
L16BLSR	56.20×56.20	84.80×84.80	90.00×90.00
L17STRB	43.40×43.40	78.80×78.80	90.00×90.00
L18KBSH3	66.00×66.00	84.60×84.60	90.00×90.00
L19KBSH2	75.00×75.00	84.20×84.20	90.00×90.00
L20FHTB1	72.40×72.40	84.80×84.80	90.00×90.00
L21SRE	75.00×75.00	85.40×85.40	90.00×90.00
L22HRW	62.40×62.40	83.80×83.80	90.00×90.00
L23STWH	68.80×68.80	85.00×85.00	90.00×90.00
L24HRWH	82.00×82.00	83.40×83.40	90.00×90.00
L25SRC	65.80×65.80	82.80×82.80	90.00×90.00

หมายเหตุ: วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ/ไอโซเลต

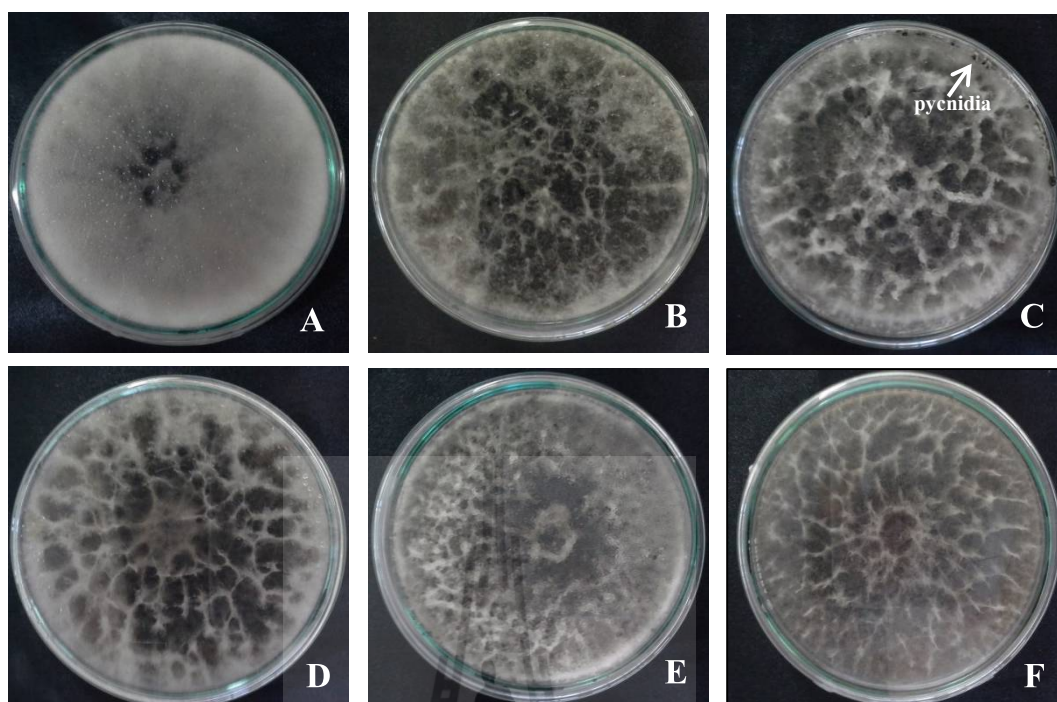
ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAS ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน (ต่อ)

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
L26HRWB	59.00×59.00	83.20×83.20	90.00×90.00
L27SRBT	71.20×71.20	84.00×84.00	90.00×90.00
L28SBB	62.00×62.00	85.40×85.40	90.00×90.00
N1SR TTC	65.80×65.80	85.00×85.00	90.00×90.00
N2SHCA	52.00×52.00	81.00×81.00	90.00×90.00
N3DTD2	61.40×61.40	85.00×85.00	90.00×90.00
N4BBPM	51.40×51.40	83.20×83.20	90.00×90.00
N5STRST	64.80×64.80	83.80×83.80	90.00×90.00

หมายเหตุ: วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ/ไอโซเลต

4.5.2 ลักษณะและสีของโคโลนี

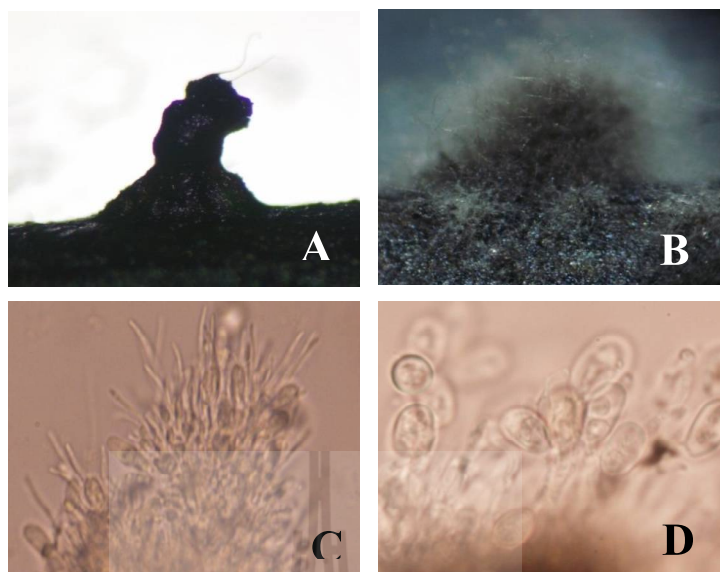
เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงบนอาหาร PDAS มีลักษณะสีโคโลนีคล้ายกัน คือ โคโลนีมีสีเทาดำปนเขียวมะกอก ลักษณะเส้นใยละเอียดค่อนข้างฟู สามารถจับกลุ่มโดยแยกจากลักษณะของเส้นใย ได้ 5 กลุ่มคือ 1) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก พูละเอียดหนาแน่น ได้แก่ ไอโซเลต L2SHSR1, L6HRD, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L17STRB และ L20FHTB1 ดังแสดงในภาพ 4.15 (A) 2) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก พูละเอียดหนาแน่นน้อยกว่ากลุ่ม 1 คือ ไอโซเลต L4STR1, L8HDBB, L9STR2, L19KBSH2, L23STWH, L24HRWH, L27SRBT และ L28SBB ดังแสดงในภาพ 4.15 (B) 3) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก พูละเอียด บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุก และมีการสร้าง pycnidia บริเวณขอบจานอาหารคือ ไอโซเลต L1STRM, L5KBSH1, L7STRW, L15HDBB, L18KBSH3, L21SRE และ L26HRWB ดังแสดงในภาพ 4.15 (C) 4) เส้นใยเหมือนกลุ่ม 3 แต่ไม่มีสร้าง pycnidia คือ ไอโซเลต L11HSR2 ดังแสดงในภาพ 4.15 (D) 5) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูปานกลาง ไม่มีการสร้าง pycnidia คือ ไอโซเลต L3BSR, L10BBLB, L13SR TF, L22HRW และ L25SRC ดังแสดงในภาพ 4.15 (E) ส่วนเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีโคโลนีสีน้ำตาลดำ ลักษณะเส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูเล็กน้อยถึงปานกลาง การจัดเรียงตัวของเส้นใยไม่หนาแน่น และไม่มีการสร้าง pycnidia บริเวณของจานอาหารเลี้ยง คือ ไอโซเลต N1SR TTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST ดังแสดงในภาพ 4.15 (F)



ภาพที่ 4.15 แสดงลักษณะโคโคนีของเชื้อราทั้ง 6 กลุ่ม (A) ไอโซเลต L2SHSR1, L6HRD, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L17STRB และ L20FHTB1 (B) L4STR1, L8HDBB, L9STR2, L19KBSH2, L23STWH, L24HRWH, L27SRBT และ L28SBB (C) L1STRM, L5KBSH1, L7STRW, L15HDBB, L18KBSH3, L21SRE และ L26HRWB (D) L11HSR2 (E) L3BSR, L10BBLB, L13SRTF, L22HRW และ L25SRC (F) N1SRTTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST

4.5.3 ลักษณะและสีของพิกนิตีเดีย (pycnidia)

เชื้อราแต่ละไอโซเลตสร้างฟรุติบอดี (fruiting body) ที่เรียกว่า โคนิดิโอมิตา (conidiomata) แบบพิกนิตีเดีย (pycnidia) มีรูปร่างคล้ายคนโท (flask-shaped) และรูปร่างค่อนข้างกลม (globose) สีน้ำตาลถึงดำ มีช่องเปิด (ostiole) ขึ้นออกมาดังแสดงในภาพ 4.16 (A-B) ภายใน pycnidia ประกอบด้วยเส้นใยพาราไฟซิส (paraphyses) สีไม่มีสี (hyaline) รูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) มีทั้งผนังกั้น (septate) และไม่มีผนังกั้น (aseptate) ดังแสดงในภาพ 4.16 (C) และโคนิดิโอินัสเซลล์ (conidiogenous cell) สีไม่มีสีเช่นกัน ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก มีการแบ่งเซลล์แบบโฮโลบลาสติก (holoblastic) และการจัดเรียงเซลล์แบบเป็นปล้อง 1-2 ปล้อง แอนนิลลาชัน (annellations) ให้กำเนิดโคนิดิ (conidia) โดยสร้างอยู่บนปลายของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ดังแสดงในภาพ 4.16 (D)



ภาพที่ 4.16 แสดงลักษณะ pycnidia paraphysis และ conidiogenous cell ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง (A) pycnidia มีรูปร่างคล้ายคนโท (flask-shaped) มีช่องเปิด (ostiole) ยื่นออกมา (B) pycnidia รูปร่างค่อนข้างกลม (globose) (C) paraphyses ใสไม่มีสี รูปร่างเป็นทรงกระบอก (D) conidiogenous cell ลักษณะยาวรี ใสไม่มีสี ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก (cylindrical)

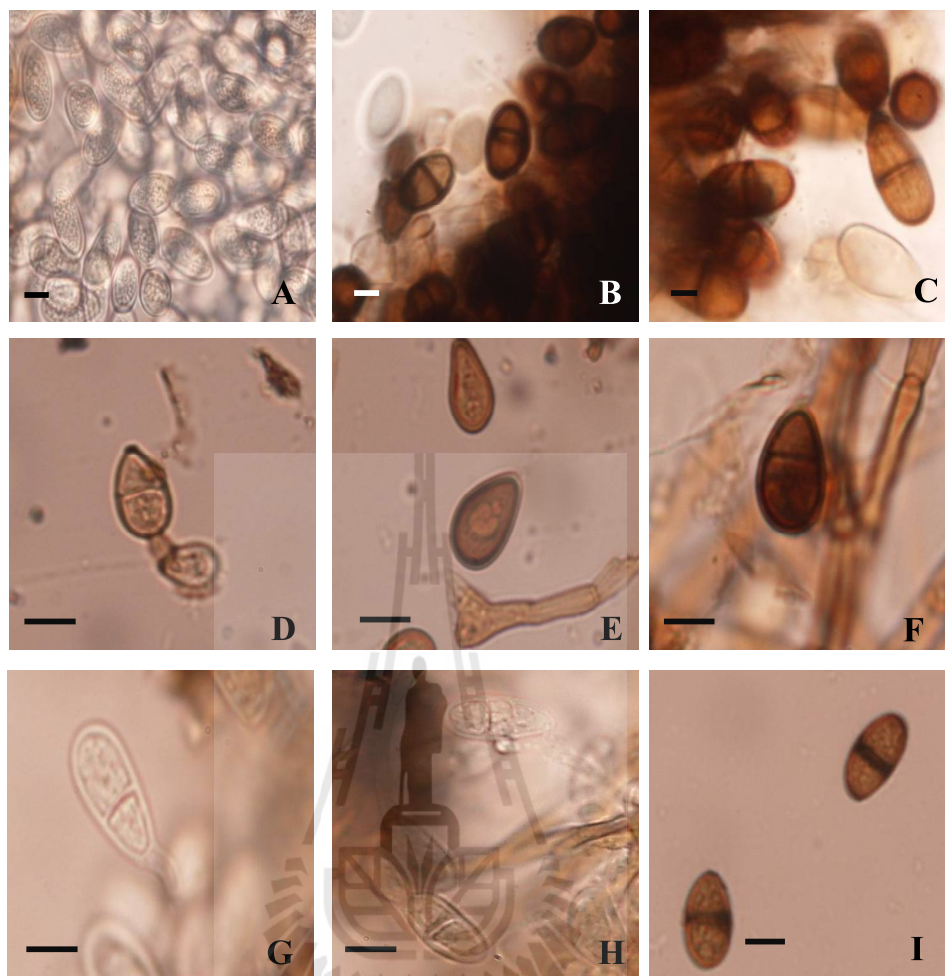
4.5.4 ลักษณะและขนาดของ โคนิเดียม (conidia)

ผลการศึกษาจากการวัดขนาดของโคนิเดียมของเชื้อรา สาเหตุโรคที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 33 ไอโซเลต พบมีเชื้อรา 2 สกุล คือ 1) เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ 2) เชื้อรา *Neoscytalidium* sp.2 ซึ่งมีลักษณะรูปร่างแตกต่างกัน โดยเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มีลักษณะของโคนิเดียม ระยะอ่อน (immature conidia) มีเซลล์เดียว ไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงกลม (subvoid to ellipsoid-ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง ดังแสดงในภาพ 4.17 (A) เมื่อระยะแก่ (mature conidia) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีผนังเซลล์ตามขวาง (septum) 1 ชั้นตรงกลางแบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว (longitudinal striation) ดังแสดงในภาพ 4.17 (B-C) ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มตามขนาดของโคนิเดียมคือ กลุ่ม L M และ S ดัดแปลงจากการจัดแบ่งของ Phillips et al. (2013) ขนาดโคนิเดียมของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. แต่ละไอโซเลต แสดงในตารางที่ 4.5 โดยกลุ่มที่ 1 คือ กลุ่ม L มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต L1STRM, L5KBSH1 และ L28SBB มีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 19.50-32.80x12.40-19.70 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่ม M มีทั้งหมด 13 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต

L4STR1, L7STRW, L9STR2, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L18KBSH3, L19KBSH2, L21SRE, L23STWH, L24HRWH, L25SRC และ L26HRWB มีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 19.00-30.10x10.10-19.32 ไมโครเมตร และกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่ม S มีทั้งหมด 12 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต L2SHSR1, L3BSR, L6HRD, L8HDBB, L10BBLB, L11HSR2, L13SRTF, L15HDBB, L17STRB, L22HRW และ L27SRBT มีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 12.50-26.30x9.51-15.00 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบลักษณะของโคนิเดียระยะอ่อนจะมี 1-2 เซลล์ มีทั้งสีอ่อนและไม่มีสี รูปร่างปลายด้านหนึ่งเรียว อีกด้านกลม เมื่อโคนิเดียระยะแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีผนังหนา 1-2 เซลล์ มีขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่ม S คือ ไอโซเลต L11HSR2 ดังแสดงในภาพ 4.17 (D-F) และในไอโซเลต L20FHTB1 มีลักษณะของโคนิเดียอินัส เซลล์ใส ไม่มีสี แต่มีเส้นแบ่งตรงกลางทำให้มี 1-2 เซลล์ และในระยะอ่อนมี 1-3 เซลล์ เมื่อระยะแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มผนังหนา มี 2 เซลล์ โดยขนาดโคนิเดียมีขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่ม S ดังแสดงในภาพ 4.17 (G-I)

ในส่วนของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีการสร้างโคนิเดีย 2 ลักษณะ ได้แก่ 1) อาร์throโคนิเดีย (arthroconidia) ซึ่งจะสร้างอยู่ภายนอกพิกนินิเดียและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะค่อนข้างกลม ปลายตัด เริ่มแรกอาร์throโคนิเดียใส ไม่มีสี และค่อย ๆ มีสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เซลล์ 1-2 เซลล์เรียงต่อกัน คล้ายลูกโซ่ (formation of chains) เรียกว่า *Scytalidium-like conidia* ดังแสดงในภาพ 4.18 (A) และ 2) โคนิเดียอยู่ภายใน pycnidia โดยจะไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง แต่จะสร้างบนไม้จิ้มฟัน หรือบนผิวของพืชอาศัยเท่านั้น มีลักษณะ หัวท้ายเรียว 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางทึบ เรียกว่า *Fusicoccum-like conidia* ดังแสดงในภาพ 4.18 (B) ซึ่งมีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต N1SRTTC N2SHCA N3DTD2 N4BBPM และ N5STRST ซึ่งมีขนาด conidia เฉลี่ยตั้งแต่ 10.25-16.25x3.63-6.25 ไมโครเมตร และขนาด arthroconidia เฉลี่ยตั้งแต่ 6.25-14.36x2.96-5.12 ไมโครเมตร โดยทุกไอโซเลตแสดงในตารางที่ 4.6

จากการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. เพียงอย่างเดียวพบว่าสามารถจัดจำแนกความแตกต่างได้ในระดับสกุลเท่านั้น ไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ เพราะมีความซับซ้อน และใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องศึกษา ร่วมกับลักษณะ ลักษณะทางด้านชีวโมเลกุล และลักษณะข้อมูลทางพันธุกรรม หรือข้อมูลทางชีวสารสนเทศเพิ่มเติม โดยสรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อโรคในแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังดังแสดงในตาราง 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

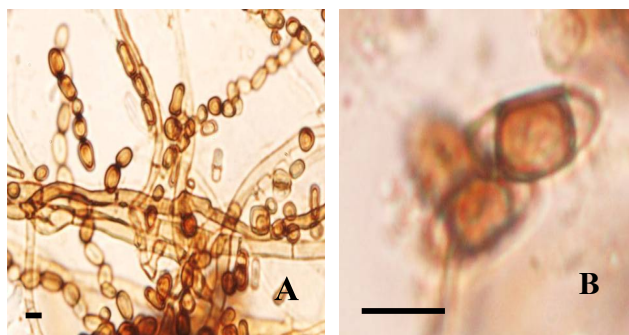


ภาพที่ 4.17 แสดงลักษณะ conidia ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. (A) ลักษณะของโคนิเดียมระยะอ่อน (immature conidia) เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงกลม (subvoid to ellipsoid-ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง (B-C) ลักษณะของโคนิเดียมระยะแก่ (mature conidia) สีน้ำตาลเข้ม มีผนังเซลล์ 2 เซลล์ รูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว (longitudinal striation) (D-F) ลักษณะโคนิเดียมของไอโซเลต L11HSR2 โคนิเดียมระยะอ่อน 1-2 เซลล์ มีสีอ่อน รูปร่างปลายด้านหนึ่งเรียว อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย โคนิเดียมระยะแก่ สีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา 1-2 เซลล์ มีขนาดเล็กมาก (G-I) ลักษณะโคนิเดียมของไอโซเลต L20FHTB1 โคนิเดียมโอบิเจนิส เซลล์ใสไม่มีสี 1-2 เซลล์ โคนิเดียมระยะอ่อน 1-3 เซลล์ และโคนิเดียมระยะแก่ 2 เซลล์ สีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา และมีเส้นแบ่งตามยาว: บาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.5 ขนาดโคนิเดียมของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

ลำดับที่	กลุ่ม	ไอโซเลต	ขนาดโคนิเดียม		L/W ratio
			เส้นแบ่ง	ยาวxกว้าง (ไมโครเมตร)**	
1	L	L1STRM	1	22.87-30.00×13.00 -19.35	1.6
2	L	L5KBSH1	1	19.50-32.80×12.40-19.70	1.9
3	L	L28SBB	1	22.12-30.00×12.50-19.35	1.7
4	M	L4STR1	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6
5	M	L7STRW	1	22.12-30.10×12.50-16.52	1.8
6	M	L9STR2	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6
7	M	L12SHRD	1	20.10-24.50×12.10-14.00	1.8
8	M	L14LSR	1	20.10-24.50×10.10-14.00	1.8
9	M	L16BSLR	1	24.00-28.00×10.36-13.24	2.3
10	M	L18KBSH3	1	24.00-28.00×10.10-17.20	1.8
11	M	L19KBSH2	1	19.00-23.50×11.00-12.50	1.7
12	M	L21SRE	1	24.00-28.00×10.10-17.20	1.8
13	M	L23STWH	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6
14	M	L24HRWH	1	20.00-26.30×10.10-13.24	2.0
15	M	L25SRC	1	24.00-28.00×10.30-12.60	2.2
16	M	L26HRWB	1	24.00-28.00×12.50-19.32	1.7
17	S	L2SHSR1	1	17.54-23.00×10.36-13.24	1.8
18	S	L3BSR	1	16.50-20.50×10.30-12.60	1.7
19	S	L6HRD	1	17.30-23.00×10.25-13.24	1.8
20	S	L8HDBB	1	17.54-23.35×10.36-14.45	1.7
21	S	L10BBLB	1	16.50-22.10×10.30-14.50	1.7
22	S	L11HSR2	1-2	12.50-22.50×10.00-15.00	1.4
23	S	L13SRTF	1	16.00-23.00×9.51-12.50	1.7
24	S	L15HDBB	1	19.80-22.00×12.10-14.00	1.6
25	S	L17STRB	1	17.50-24.10×10.10-12.50	1.8
26	S	L20FHTB1	1-3	17.50-24.10×10.10-12.50	1.8
27	S	L22HRW	1	18.20-21.50×10.00-14.50	1.8
28	S	L27SRBT	1	20.00-26.30×10.10-13.24	2.0

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจากการวัด 50 โคนิเดียมต่อไอโซเลต เลียงเชื้อราบนไม้จิ้มฟันในอาหาร WA เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.18 แสดงลักษณะอาร์โซโคนิเดียโคนิเดียของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. (A) อาร์โซโคนิเดียสร้างอยู่ภายนอก พิตินิเดียรูปร่างค่อนข้างกลมปลายตัด ระยะอ่อนใสไม่มีสีหรือมีสีเข้ม ส่วนใหญ่มีเซลล์เดี่ยวเรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่ (B) โคนิเดีย มี 3 เซลล์ หัวท้ายเรียว เซลล์ตรงกลางทึบ (*Fusicoccum*-like conidia) สร้างอยู่ภายใน pycnidia เท่านั้น: บาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.6 ขนาดโคนิเดียและอาร์โซโคนิเดียของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

ลำดับที่	ไอโซเลต	ขนาดโคนิเดีย		L/W ratio	ขนาดอาร์โซโคนิเดีย	
		ยาวxกว้าง (ไมโครเมตร)*			ยาวxกว้าง (ไมโครเมตร)*	
1	N1SR TTC	11.25-16.25	5.00-6.25	2.5	8.65-14.36	2.96-5.12
2	N2SHCA	11.25-16.25	3.63-4.88	3.2	6.25-13.50	2.96-5.12
3	N3DTD2	10.25-15.25	4.00-5.25	2.8	6.25-14.36	2.96-5.12
4	N4BBPM	10.25-16.25	3.63-6.25	2.8	6.25-12.36	2.96-5.12
5	N5STRST	11.25-16.25	3.63-6.25	2.3	7.50-12.36	2.96-5.12

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจากการวัด 50 โคนิเดียต่อไอโซเลต เลี้ยงเชื้อราบนไม้จิ้มฟันในอาหาร WA เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์

ตารางที่ 4.7 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อโรคแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

ลำดับ ที่	ไอโซเลต	โคโลนี			โคนเดี่ยว			พาราไฟซิส		ระดับความรุนแรง ^{4/}			แสดง อาการ ที่ใบ ^{5/}	บริเวณที่ เข้า ทำลาย มัน สำปะหลัง	สถานที่ เก็บ ^{6/}	
		สี	กลุ่ม ลักษณะ ^{1/}	พิคนเดี่ยว ^{2/}	เส้น แบ่ง	ขนาด(ไมโครเมตร)	L/W	กลุ่ม ขนาด ^{3/}	เส้น แบ่ง	ขนาด ไมโคร เมตร	หัว (ป)	ท่อน (ป)				ท่อน (ร)
1	L1STRM	olive/bla	C	GB	1	22.87-30.00×13.00-19.35	1.6	L	-	-	3	2	5	-	ท่อน	อ.เมือง นม.
2	L2SHSR1	olive/bla	A	GB	1	17.54-23.00×10.36-13.24	1.8	S	-	-	3	2	5	-	ขั้วหัว	อ.สิงสาร
3	L3BSR	olive/bla	D	FS	1	16.50-20.50×10.30-12.60	1.7	S	-	-	3	3	5	-	ท่อน	อ.เมือง นม.
4	L4STR1	olive/bla	B	GB	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6	M	asepta	60x3-4	3	3	3	ใบช้ำ	ขั้วหัว	อ.สิงสาร
5	L5KBSH1	olive/bla	C	GB	1	19.50-32.80×12.40-19.70	1.9	L	-	-	3	2	2	-	ขั้วหัว	อ.สิงสาร
6	L6HRD	olive/bla	A	GB/FS	1	17.30-23.00×10.25-13.24	1.8	S	asepta	60x3-4	4	2	5	-	หัว	อ.สิงสาร
7	L7STRW	olive/bla	C	FS	1	22.12-30.10×12.50-16.52	1.8	M	-	-	3	2	5	-	ท่อน	อ.เมือง นม.
8	L8HDBB	olive/bla	B	FS	1	17.54-23.35×10.36-14.45	1.7	S	asepta	56x3-4	3	2	4	-	หัว	อ.สิงสาร
9	L9STR2	olive/bla	B	GB	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6	M	-	-	3	2	4	-	โคนต้น	อ.สิงสาร
10	L10BBLB	olive/bla	E	GB/FS	1	16.50-22.10×10.30-14.50	1.7	S	-	-	3	2	3	ใบช้ำ	กิ่ง	อ.เมือง นม.
11	L11HSR2	olive/bla	D	FS	1-2	12.50-22.50×10.00-15.00	1.4	S	asepta	46x3-4	5	3	5	-	หัว	อ.สิงสาร
12	L12SHRD	olive/bla	A	GB/FS	1	20.10-24.50×12.10-14.00	1.8	M	asepta	74x3-4	4	3	4	-	ขั้วหัว	อ.ครบุรี นม.
13	L13SRTF	olive/bla	E	GB/FS	1	16.00-23.00×9.51-12.50	1.7	S	asepta	59x3-4	4	2	4	ใบไหม้	ท่อน	อ.ตากฟ้า นว.
14	L14LSR	olive/bla	A	GB/FS	1	20.10-24.50×10.10-14.00	1.8	M	-	-	1	3	3	-	ใบ	อ.เมือง นม.
15	L15HDB	olive/bla	C	FS	1	19.80-22.00×12.10-14.00	1.6	S	-	-	1	2	3	ใบไหม้	หัว	อ.สิงสาร
16	L16BSR	olive/bla	A	GB	1	24.00-28.00×10.36-13.24	2.3	M	-	-	3	2	2	ใบไหม้	ก้านใบ	อ.สิงสาร

ตารางที่ 4.7 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อโรคแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	โคโลนี			โคนิเดียม			พาราไฟซิส			ระดับความรุนแรง ^{4/}			แสดงอาการที่ใบ ^{5/}	บริเวณที่เข้าทำลายมันสำปะหลัง	สถานที่เก็บ ^{6/}
		สี	กลุ่มลักษณะ ^{1/}	พิคนิเดียม ^{2/}	เส้นแบ่ง	ขนาด(ไมโครเมตร)	L/W	กลุ่มขนาด ^{3/}	เส้นแบ่ง	ขนาดไมโครเมตร	หัว (ป)	ท่อน (ป)	ท่อน (ร)			
17	L17STRB	olive/bla	A	GB	1	17.50-24.10×10.10-12.50	1.8	S	-	-	4	2	3	ใบไหม้	โคนต้น	อ.ครบุรี
18	L18KBSH3	olive/bla	C	GB	1	24.00-28.00×10.10-17.20	1.8	M	asepta	50×3-4	3	2	3	ใบไหม้	หัว	อ.เสิงสาง
19	L19KBSH2	olive/bla	B	GB	1	19.00-23.50×11.00-12.50	1.7	M	-	-	4	2	4	-	โคนต้น	อ.เสิงสาง
20	L20FHTB1	olive/bla	A	GB	1-3	17.50-24.10×10.10-12.50	1.8	S	asepta	56×3-4	4	2	3	ใบช้ำ	หัว	อ.เมือง
21	L21SRE	olive/bla	C	GB/ ---	1	24.00-28.00×10.10-17.20	1.8	M	-	-	3	3	3	-	โคนต้น	อ.ครบุรี
22	L22HRW	olive/bla	E	GB/FS	1	18.20-21.50×10.00-14.50	1.8	S	-	-	4	2	3	-	หัว	อ.เสิงสาง
23	L23STWH	olive/bla	B	GB	1	20.00-26.30×10.10-17.20	1.6	M	-	-	2	2	3	-	โคนต้น	อ.เสิงสาง
24	L24HRWH	olive/bla	B	GB	1	20.00-26.30×10.10-13.24	2.0	M	-	-	3	2	2	ใบช้ำ	หัว	อ.เสิงสาง
25	L25SRC	olive/bla	E	GB	1	24.00-28.00×10.30-12.60	2.2	M	-	-	3	2	2	-	โคนต้น	อ.เสิงสาง
26	L26HRWB	olive/bla	C	GB	1	24.00-28.00×12.50-19.32	1.7	M	-	-	3	2	2	-	หัว	อ.เสิงสาง
27	L27SRBT	olive/bla	B	FS	1	20.00-26.30×10.10-13.24	2	S	asepta	63×3-4	4	3	2	-	โคนต้น	อ.เสิงสาง
28	L28SBB	olive/bla	B	GB/FS	1	22.12-30.00×12.50-19.35	1.7	L	-	-	4	2	2	-	กิ่ง	อ.เสิงสาง

^{1/}กลุ่มลักษณะของโคโลนีโดยแบ่งตามภาพที่ 4.17: A=โคโลนีมีเส้นใยขนาดเล็กมาก พูละเอียดหนาแน่นมาก; B=โคโลนีมีเส้นใยขนาดเล็ก พูละเอียดหนาแน่นปานกลาง; C=บริเวณปลายเส้นใย จะมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุก และมีการสร้าง pycnidia บริเวณขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ; D=โคโลนีมีโคโลนีมีเส้นใยมีขนาดเล็ก พูละเอียดหนาแน่นน้อย; E=โคโลนีมีเส้นใยมีขนาดเล็กมาก พูปานกลาง; F=โคโลนีมีสีน้ำตาลดำ เส้นใยมีขนาดเล็ก พูเล็กน้อย การจัดเรียงตัวของเส้นใยไม่หนาแน่น

^{2/}ลักษณะรูปร่างของพิคนิเดียม: FSC= flask-shaped รูปร่างคล้ายคนโท มีช่อง ostiole ขึ้นออกมา, GB=globose มีรูปร่างค่อนข้างกลม; GB/SC=พบทั้งสองลักษณะ

^{3/}กลุ่มขนาดของโคนิเดียมแบ่งตามตารางที่ 4.4: S=โคนิเดียมขนาดเล็ก; M=โคนิเดียมขนาดกลาง; B=โคนิเดียมขนาดใหญ่ ดัดแปลงจาก Phillips et al. (2013)

^{4/}ระดับความรุนแรงของโรค: หัว (ป)=ทดสอบโรคนบนหัวมันสำปะหลังในสภาพห้องปฏิบัติการ; ท่อน (ป)=ทดสอบโรคนบนท่อนมันสำปะหลังในสภาพห้องปฏิบัติการ; ท่อน (ร)=ทดสอบโรคนบนท่อนมันสำปะหลังในสภาพโรงเรือน

^{5/}การทดสอบในสภาพโรงเรือนบางไอโซเลตแสดงลักษณะอาการใบไหม้ และ ใบช้ำ

^{6/}สถานที่เก็บ: นม.= จังหวัดนครราชสีมา; นว.= จังหวัดนครสวรรค์; ชย.= จังหวัดชัยภูมิ

ตารางที่ 4.8 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความรุนแรงในการก่อโรคแต่ละไอโซเลตของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

ลำดับที่	ไอโซเลต	โคโลนี		พิกนินเดีย ^{1/}	โคนินเดีย		อาร์โธรโคนินเดีย		ระดับความรุนแรง ^{4/}			แสดงอาการที่ใบ ^{5/}	บริเวณที่เข้าทำลายมันสำปะหลัง	สถานที่เก็บ ^{6/}
		สี	กลุ่มลักษณะ ^{1/}		ขนาด(ไมโครเมตร)	L/W	ขนาด(ไมโครเมตร)	L/W	หัว (ป)	ท่อน (ป)	ท่อน (ร)			
1	N1SRTT	brown/blac	F	GB	11.25-16.25×5.00-6.25	2.5	8.65-14.36×5.12-	2.7	3	3	5	-	ท่อน	อ.ตาคีลี
2	N2SHCA	brown/blac	F	GB	11.25-16.25×3.63-4.88	3.2	6.25-13.50×5.12-	2.3	3	2	4	-	ขั้วหัว	อ.ครบุรี
3	N3DTD2	brown/blac	F	GB	10.25-15.25×4.00-5.25	2.8	6.25-14.36×5.12-	2.2	3	3	5	-	หัว	อ.เสิงสาง
4	N4BBPM	brown/blac	F	GB	10.25-16.25×3.63-6.25	2.8	6.25-12.36×5.12-	2.4	3	3	5	ใบไหม้	ท่อน	อ.เทพ
5	N5STRS	brown/blac	F	GB	11.25-16.25×3.63-6.25	2.3	7.50-12.36×5.12-	2.8	3	2	4	ใบไหม้	ท่อน	อ.ตาคีลี

^{1/}กลุ่มลักษณะของโคโลนีโดยแบ่งตามภาพที่ 4.17: A=โคโลนีมีเส้นใยขนาดเล็กมาก พุละเย็ดหนาแน่นมาก; B=โคโลนีมีเส้นใยขนาดเล็ก พุละเย็ดหนาแน่นปานกลาง; C=บริเวณปลายเส้นใย จะมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุก และมีการสร้าง Pynidia บริเวณขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ; D=โคโลนีมีโคโลนีมีเส้นใยมีขนาดเล็ก พุละเย็ดหนาแน่นน้อย; E= โคโลนีมีเส้นใยมีขนาดเล็กมาก พุปานกลาง; F= โคโลนีมีสีน้ำตาลดำ เส้นใยมีขนาดเล็ก พุเล็กน้อย การจัดเรียงตัวของเส้นใยไม่หนาแน่น

^{2/}ลักษณะรูปร่างของพิกนินเดีย: FSC= flask-shaped รูปร่างคล้ายคนโท มีช่อง ostiole ขึ้นออกมา, GB=glucose มีรูปร่างค่อนข้างกลม; GB/SC=พบทั้งสองลักษณะ

^{3/}กลุ่มขนาดของโคนินเดียแบ่งตามตารางที่ 4.4: S=โคนินเดียขนาดเล็ก; M=โคนินเดียขนาดกลาง; B=โคนินเดียขนาดใหญ่ คัดแปลงจาก Phillips et al. (2013)

^{4/}ระดับความรุนแรงของโรค: หัว (ป)=ทดสอบโรคมบนหัวมันสำปะหลังในสภาพห้องปฏิบัติการ; ท่อน (ป)=ทดสอบโรคมบนท่อนมันสำปะหลังในสภาพห้องปฏิบัติการ; ท่อน (ร)=ทดสอบโรคมบนท่อนมันสำปะหลังในสภาพโรงเรือน

^{5/}การทดสอบในสภาพโรงเรือนบางไอโซเลตแสดงลักษณะอาการใบไหม้ และ ใบช้ำ

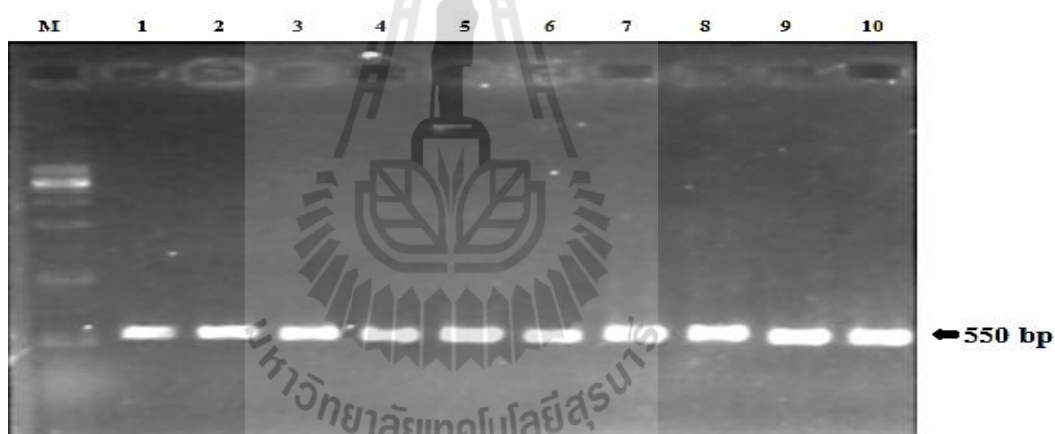
^{6/}สถานที่เก็บ: นม.= จังหวัดนครราชสีมา; นว.= จังหวัดนครสวรรค์; ชข.= จังหวัดชัยภูมิ

4.6 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

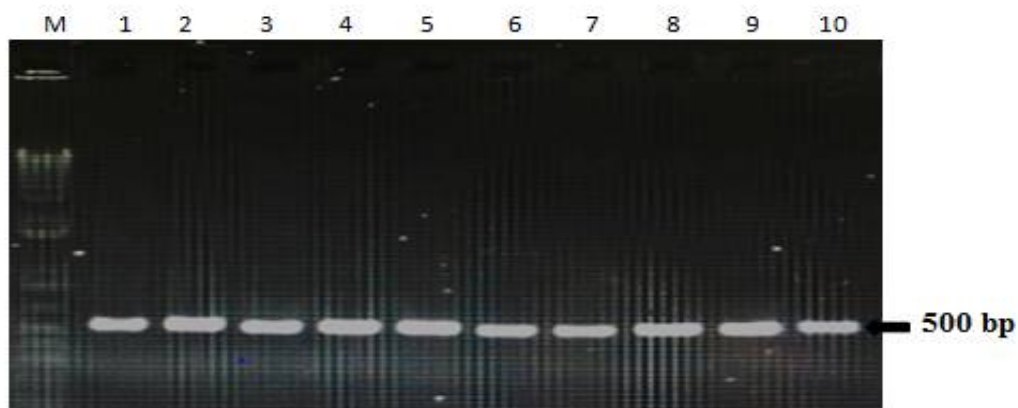
4.6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

4.6.1.1 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อทั้งหมด 33 ไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR ไพร์เมอร์ ทั้ง 3 คู่ สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวได้ คือ 1) บริเวณ ITS ไพร์เมอร์ ITS1/ITS4 (Alves et al., 2008; Li et al., 2015; Chen et al., 2016) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ ประมาณ 550 bp เท่ากัน (ภาพที่ 4.19 2) บริเวณ EF1- α ไพร์เมอร์ Ef1-688F/Ef1-1251R (Abdollahzadeh et al., 2010; Alves et al., 2008; Motokura et al., 2014) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ ประมาณ 500 bp (ภาพที่ 4.20) 3) บริเวณ *Bt* ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b (Glass and Donalson, 1995; Machado et al., 2014b; O'Donnell and Cigelnik, 1997) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 470 bp (ภาพที่ 4.21)



ภาพที่ 4.19 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ ITS lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTEF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT, lane 9 = N1SR TTC และ lane 10 = N3DTD2



ภาพที่ 4.20 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ EF1- α
 lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 =
 L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 =
 L22HRW, lane 8 = L27SRBT, lane 9 = N1SRTTC และ lane 10 = N3DTD2



ภาพที่ 4.21 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ βt lane
 M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 =
 L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 =
 L22HRW, lane 8 = L27SRBT, lane 9 = N1SRTTC และ lane 10 = N3DTD2

4.6.2 การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังด้วยวิธี DNA sequencing

จากการศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังโดยนำ PCR product บริสุทธิ์โดยคัดเลือกจากไอโซเลตที่มีความรุนแรงในการก่อโรคทั้งในหัวและท่อนพันธุ์ในระดับสูง อีกทั้งเป็นตัวแทนจากการแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่งเพื่อยืนยันเชื้อราสาเหตุโรค โดยเลือกตัวแทนทั้งหมด 8 ไอโซเลต ได้แก่ L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH3, L20FHTB1, 27LSRBT และ N3DTD2 ส่งตรวจโดยใช้บริการของบริษัทแปซิฟิกโซ-เอ็นซ์ แล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือน (homology) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์และทำนายลักษณะเพื่อหาชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากผลการหาลำดับเบส (DNA Sequencing) ของเชื้อสาเหตุโรคในบริเวณ ITS EF1- α และ Bt โดยบริเวณ ITS และ EF1- α สามารถได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต แต่บริเวณ Bt ใช้ยืนยันได้เพียง 6 ไอโซเลต และพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* และ *L. theobromae* (ภาคผนวก ง) ซึ่งบริเวณ EF1- α ที่สามารถแยกไอโซเลต N3DTD2 คล้ายคลึงกับเชื้อรา *N. dimidiatum* 100 เปอร์เซ็นต์ ยังเป็นบริเวณที่สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงสูง 99-100 เปอร์เซ็นต์ บริเวณ ITS และบริเวณ Bt สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันถึง 92-100 และ 84-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

โดยไอโซเลต L18 KBSH มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. theobromae* 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 บริเวณ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. theobromae* Accession number KT325578, KM401971 และ KP823018 ตามลำดับ ไอโซเลต L11HSR2 L12SHRD และ L13SRTF มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* 100 เปอร์เซ็นต์ 2 บริเวณ คือบริเวณ ITS และ EF1- α เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. euphorbicola*. Accession number KT325568 และ KT325581 ตามลำดับ ส่วนบริเวณ Bt เชื้อราไอโซเลต L12SHRD และ L13SRTF มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. euphorbicola*. Accession number KP254926 ส่วนไอโซเลต L11HSR2 นั้นไม่สามารถตรวจสอบได้ในบริเวณนี้ โดยไอโซเลต L27SRBT มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* 99 เปอร์เซ็นต์ ใน 2 บริเวณ คือบริเวณ ITS และ EF1- α เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. euphorbicola*. Accession number KT325568 และ KT325581 ตามลำดับ ส่วนในบริเวณ Bt ไม่สามารถตรวจสอบได้ ไอโซเลต L20FHTB1 ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* 100 เปอร์เซ็นต์ 2 บริเวณ คือบริเวณ ITS และ Bt เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. euphorbicola*. Accession number KT325568 และ KP254926 ตามลำดับ ส่วนในบริเวณ EF1- α มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ

Lasiodiplodia sp. 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. Accession number GQ471779 ไอโซเลต L6HRD มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. theobromae* 92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. theobromae* Accession number HG917932 ในบริเวณ ITS ส่วนในบริเวณ EF1- α และ Bt มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. euphorbicola* 100 และ 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. euphorbicola*. Accession number KT325581 และ KP254926 ตามลำดับและในส่วนของ *dimidiatum* ไอโซเลต N3DTD2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. theobromae* 99 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ ITS และ Bt เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *L. theobromae* Accession number KJ596529 และ KR260829 ตามลำดับ ส่วนในบริเวณ EF1- α มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *N. dimidiatum* 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *N. dimidiatum* Accession number KF553902 ในฐานะข้อมูล GeneBank ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* แต่ละสปีชีส์จะมีสามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังที่ระดับความรุนแรงแตกต่างกัน



ตารางที่ 4.9 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคต้นและรากเน่าดำ ทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ ITS EF1- α และ beta-tubulin (Bt) ในฐานะข้อมูล Genbank

ไอโซเลต	ITS				EF1- α				Bt			
	ชื่อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	ชื่อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	ชื่อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
L6HRD	<i>L. theobromae</i>	HG917932	446/486	92%	<i>L. euphorbicola</i>	KT325581	475/475	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KF254926	323/383	84%
L11HSR2	<i>L. euphorbicola</i>	KT325568	451/451	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KT325581	475/475	100%	-			
L12SHRD	<i>L. euphorbicola</i>	KT325568	458/458	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KT325581	475/475	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KF254926	382/384	99%
L13SRTF	<i>L. euphorbicola</i>	KT325568	453/453	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KT325581	467/467	100%	<i>L. euphorbicola</i>	KF254926	367/369	99%
L18 KBSH	<i>L. theobromae</i>	KT325578	456/456	100%	<i>L. theobromae</i>	KM401971	479/479	100%	<i>L. theobromae</i>	KP823018	381/381	100%
L20FHTB1	<i>L. euphorbicola</i>	KT325568	450/450	100%	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	GQ471779	495/496	99%	<i>L. euphorbicola</i>	KF254926	362/362	100%
L27SRBT	<i>L. euphorbicola</i>	KT325568	424/425	99%	<i>L. euphorbicola</i>	KT325581	499/500	99%	-			
N3DTD2	<i>L. theobromae</i>	KJ596529	458/460	99%	<i>N. dimidiatum</i>	KF553902	475/475	100%	<i>L. theobromae</i>	KR260829	347/351	99%

4.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) trees)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ได้จากการทดลองและจากฐานข้อมูล Genbank ดังตารางที่ 4.10 ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างมาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่าจากผลการยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังด้วยวิธี DNA sequencing มีเพียงบริเวณ EF1- α เท่านั้นที่สามารถระบุเชื้อรา *Neoscytalidium* ออกจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* จึงนำข้อมูลสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ของเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลัง ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 วิธี neighbor joining (NJ) กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 ดังแสดงตามภาพที่ 4.22 พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม (clade) ซึ่งกลุ่ม 1 ประกอบด้วย เชื้อรา *Pseudofusicocum adansoniae* B0122 ซึ่งเป็น outgroup กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเชื้อราสกุล *Neoscytalidium* โดยเชื้อราไอโซเลต N3DTD2 มีความใกล้ชิดกับ *N. dimidiatum* ความค่าความเชื่อมั่นที่ 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 3.1 ประกอบด้วย เชื้อราสกุล *Diplodia* sp. และกลุ่มที่ 3.2 ประกอบด้วย เชื้อราสกุล *Lasiodiplodia* โดยเชื้อราไอโซเลต L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *L. euphorbicola* ที่มีความค่าความเชื่อมั่นที่ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเชื่อมั่นในระดับสูง โดยไอโซเลต L20FHTB1 มีความใกล้ชิดกับ *Lasiodiplodia* sp. ความค่าความเชื่อมั่นที่ 87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเชื่อมั่นในระดับสูง เชื้อราไอโซเลต L18 KBSH มีความใกล้ชิดกับ *L. theobromae* มีความค่าความเชื่อมั่นที่ 81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง นอกจากนี้ ได้ศึกษาด้วย วิธี UPGMA และ ML กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เหมือนกันทั้ง 3 วิธี แสดงในภาคผนวก จ.

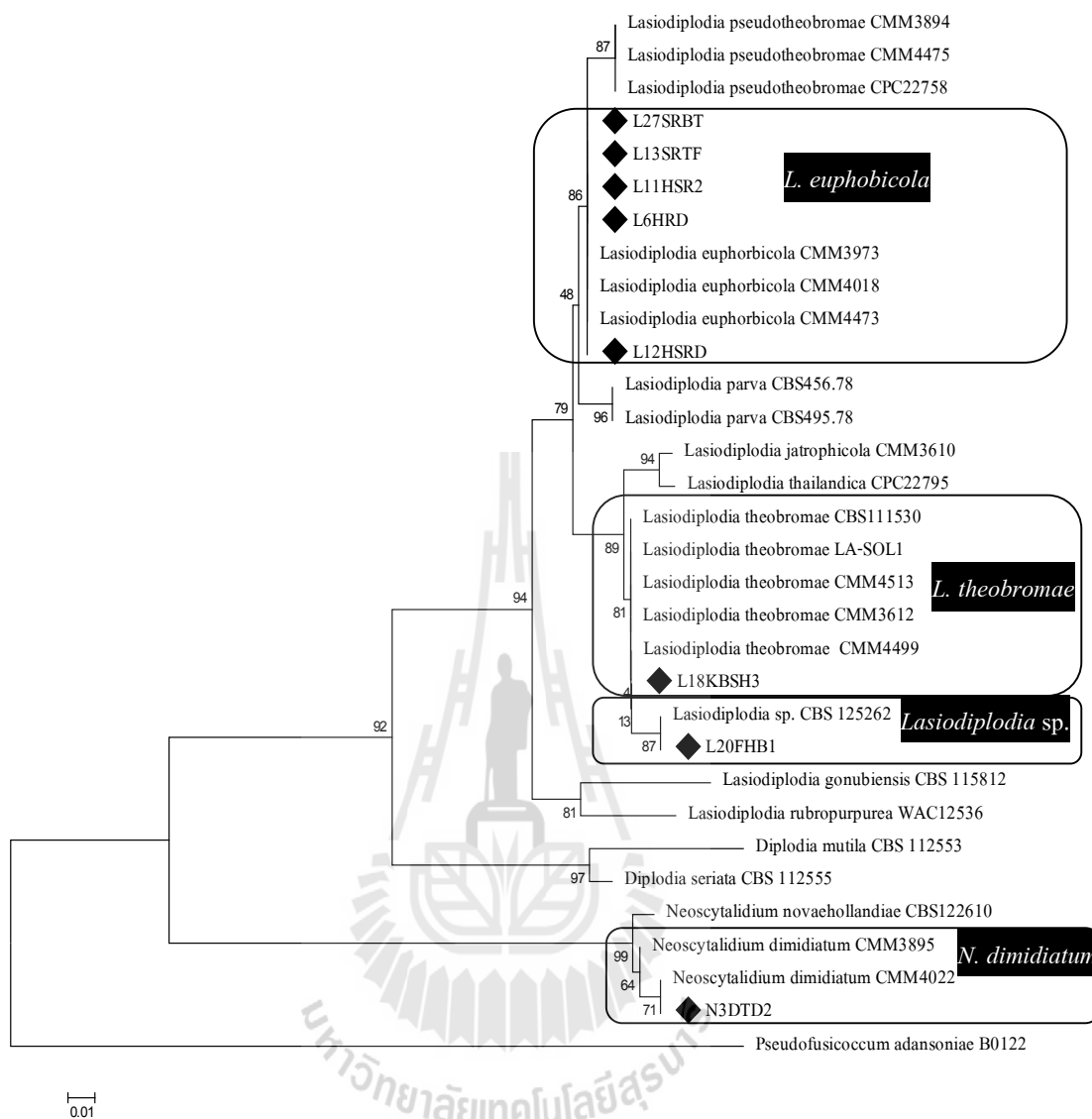
จากผลการศึกษาทั้งทางลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการของเชื้อราพบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังได้ 2 สกุล คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* และสามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Lasiodiplodia* ได้ 2 สปีชีส์ ได้ *L. theobromae* ไอโซเลต L18 KBSH (ภาพที่ 4.23) *L. euphorbicola* ไอโซเลต L6HRD, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT (ภาพที่ 4.24) *L. euphorbicola* ไอโซเลต L11HSR2 (ภาพที่ 4.25) และ *L. euphorbicola* ไอโซเลต L20FHTB1 (ภาพที่ 4.26) โดยเปรียบเทียบขนาดโคนเดี่ยวและขนาดพาราไฟซิสของเชื้อรา *Lasiodiplodia* สปีชีส์ อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และสามารถจำแนกเชื้อรา *Neoscytalidium* ได้ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *N. hyalinum* (*dimidiatum*) ไอโซเลต N3DTD2 (ภาพที่ 4.27) โดยเปรียบเทียบขนาดโคนเดี่ยวและขนาดอาร์โทรโคนเดี่ยวของเชื้อรา *Neoscytalidium* สปีชีส์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.10 แสดงเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

ชนิดของเชื้อรา	ไอโซเลต	พืชอาศัย/แหล่งที่มา	สถานที่เก็บ	ผู้เก็บ	Genbank accession No.		
					ITS	EF1- α	Bt
<i>Neoscytalidium hyalinum(dimidiatum)</i>	CMM4022/282	<i>Manihot esculenta</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF369269	KF553902	KF720790
<i>N. dimidiatum</i>	CMM2895/278	<i>M. esculenta</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF369265	KF553989	KF720786
<i>N. dimidiatum</i>	N3DTD2	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>N.novaehollandiae</i>	CBS122610/CMW26168	<i>Acacia synchronicia</i>	Australia	D. Pavlic & M.J. Wingfield	EF585536	EF585578	-
<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	WAC12536/CBS118740	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103554	DQ103572	-
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa	D. Pavlic	DQ458892	DQ458877	-
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM 3610	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234544	KF226690	-
<i>L. thailandica</i>	CPC 22795	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	T. Trakunyingcharoen	KJ193637	KJ193681	-
<i>L. parva</i>	CBS456.78	<i>Cassava-field soil</i>	Columbia	O. Rangel	EF622083	EF622063	-
<i>L. parva</i>	CBS495.78	<i>Cassava-field soil</i>	Columbia	O. Rangel	EF622085	EF622065	-
<i>L. pseudotheobromae</i>	CPC 22758	<i>Hevea brasiliensis</i>	Thailand	T. Trakunyingcharoen	KJ607141	KJ607151	-
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM3894	<i>M. esculenta</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF369264	KJ452244	-
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM4475	<i>Anacardium spp.</i>	Brazil	M.S.B. Netto	KT728915	KT882611	-
<i>L. euphorbicola</i>	CMM4018	<i>M. esculenta</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF369268	KF553900	KF720788
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3973	<i>M. esculenta</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF369267	KF553902	KF720790
<i>L. euphorbicola</i>	CMM4473	<i>Anacardium spp.</i>	Brazil	M.S.B. Netto	KT325568	KT325581	-

ตารางที่ 4.10 แสดงเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (ต่อ)

ชนิดของเชื้อรา	ไอโซเลต	พืชอาศัย/แหล่งที่มา	สถานที่เก็บ	ผู้เก็บ	Genbank accession No.		
					ITS	EF1- α	β t
<i>L. euphorbicola</i>	L6HRD	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>L. euphorbicola</i>	L12HSRD	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>L. euphorbicola</i>	L13SRTF	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>L. euphorbicola</i>	L27SRBT	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>L. theobromae</i>	CBS 111530	<i>Leucospermum sp.</i>	USA: Hawaii	J.E. Taylor	EF622074	EF622054	-
<i>L. theobromae</i>	LA-SOL1	<i>Vitis vinifera</i>	Peru	E.Rodriguez-Galvez	KM401974	KM401971	-
<i>L. theobromae</i>	CMM4513	<i>Anacardium spp.</i>	Brazil	M.S.B. Netto	KT325577	KT325589	-
<i>L. theobromae</i>	CMM3612	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234546	KF226692	KF254929
<i>L. theobromae</i>	CMM4499	<i>Anacardium spp.</i>	Brazil	M.S.B. Netto	KT325578	KT325587	-
<i>L. theobromae</i>	L18KBSH3	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	CBS125262/CMW26710	<i>Terminalia sambesiaca</i>	Tanzania	J. Roux	GQ471813	GQ471779	GQ471774
<i>Lasiodiplodia sp.1</i>	L11HSR2	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>Lasiodiplodia sp.2</i>	L20FHB1	<i>M. esculenta</i>	Thailand	S. Duchanee & R. Sangpueak	This study		
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 112553	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259093	AY573219	-
<i>D. seriata</i>	CBS 12555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259094	AY573220	-
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CPC 22764/B0122	<i>H. brasiliensis</i>	Thailand	T. Trakunyingcharoen	KJ607149	KJ607159	-



ภาพที่ 4.22 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลัง ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดโคนิเดียมและพาราไฟซิสของเชื้อรา *Lasiodiplodia*

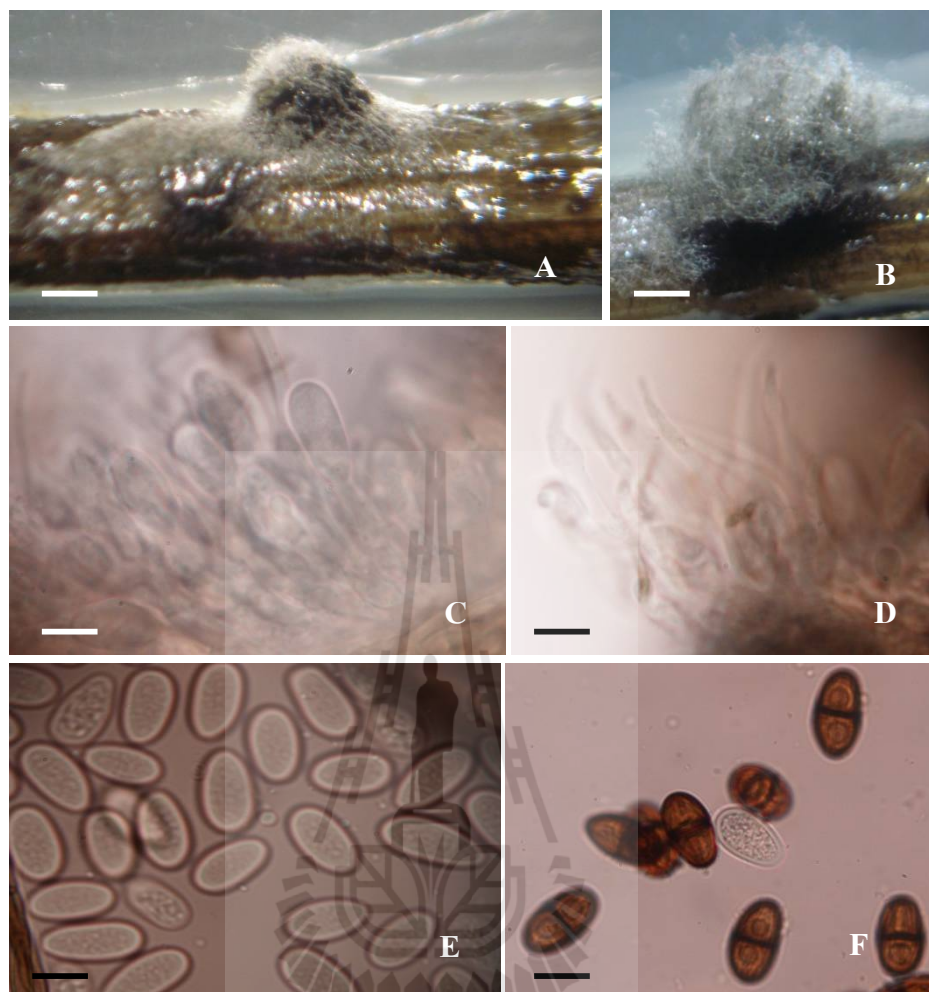
ชนิดของเชื้อรา	ขนาดโคนิเดียม		ขนาด paraphysis		ที่มา
	(ยาวxกว้าง) ไมโครเมตร	L/W ratio	(ยาวxกว้าง)	เส้นแบ่ง	
<i>L. citricola</i>	22-27x12-17	1.6	125x3-4	1-5 aseptate	Abdollahzadeh et al., 2010
<i>L. crassipora</i>	27-30x14-17	1.8	45.7x2.7	septate	Burgess et al., 2006
<i>L. euphorbicola</i>	15-23x9-12	-	76x2-4	septate	Machado et al., 2014b
<i>L. euphorbicola</i>	17-24x10-12	-	40x2-3	septate	Machado et al., 2014a
<i>L. euphorbicola</i>	17-23x10-13	1.8	60x3-4	aseptate	this study (L6HRD)
<i>L. euphorbicola</i>	20-24x12-140	1.8	74x3-4	aseptate	this study (L12SHRD)
<i>L. euphorbicola</i>	16-23x9.5-12.5	1.7	59x3-4	aseptate	this study (L13SRTF)
<i>L. euphorbicola</i>	20-26x10-13	2	63x3-4	aseptate	this study (L27SRBT)
<i>L. euphorbicola</i>	12.5-22.5x10-15	1.4	46x3-4	aseptate	this study (L11HSR2)
<i>L. euphorbicola</i>	17.5-24x10-12.5	1.8	56x3-4	aseptate	this study (L20FHTB1)
<i>L. hormozganensis</i>	18-24x11-14	1.7	83 × 2-4	1-7-septate	Abdollahzadeh et al., 2010
<i>L. iraniensis</i>	17-23x11-14	1.6	127x2-4	1-6 septate	Machado et al., 2014b
<i>L. jatrophiicola</i>	22-26x14-17	-	70 × 3	0(-1) -septate	Machado et al., 2014b
<i>L. macrospora</i>	28-35x15-17	-	105 × 3-4	septate	Machado et al., 2014b
<i>L. mahajangana</i>	15.5-19x11.5-13	-	43 × 3	1-2-septate	Begoude et al., 2010
<i>L. margaritacea</i>	14-17x11-12	-	37.1 × 2.2	-	Pavlic et al., 2008
<i>L. pava</i>	16-23.5x10.5-13	1.5	105x3-4	septate	Alves et al., 2008
<i>L. pseudotheobromae</i>	23.5-32 x 14-18	1.7	58x3-4	-	Alves et al., 2008
<i>L. thailandica</i>	22-25x13-15	-	51x1-1.5	septate	Trakunyingcharoen et al., 2015
<i>L. theobromae</i>	21-31x13-15.5	1.9	55x3-4	septate	Alves et al., 2008
<i>L. theobromae</i>	23-31x13-15	-	45x2	aseptate	Machado et al., 2014b
<i>L. theobromae</i>	24.49-27.49x13.3-14.79	1.8	-	-	Marques et al., 2013
<i>L. theobromae</i>	23.3-26.8x14.1-17.3	1.6	-	-	Li et al., 2015
<i>L. theobromae</i>	24.00-28.00 x10.1-17.2	1.8	50x3-4	aseptate	this study (L18KBSH3)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	22.5-27.5x13-15	-	-	-	Begoude et al., 2010

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดของโคนิเดียและอาร์โธรโคนิเดียของเชื้อรา

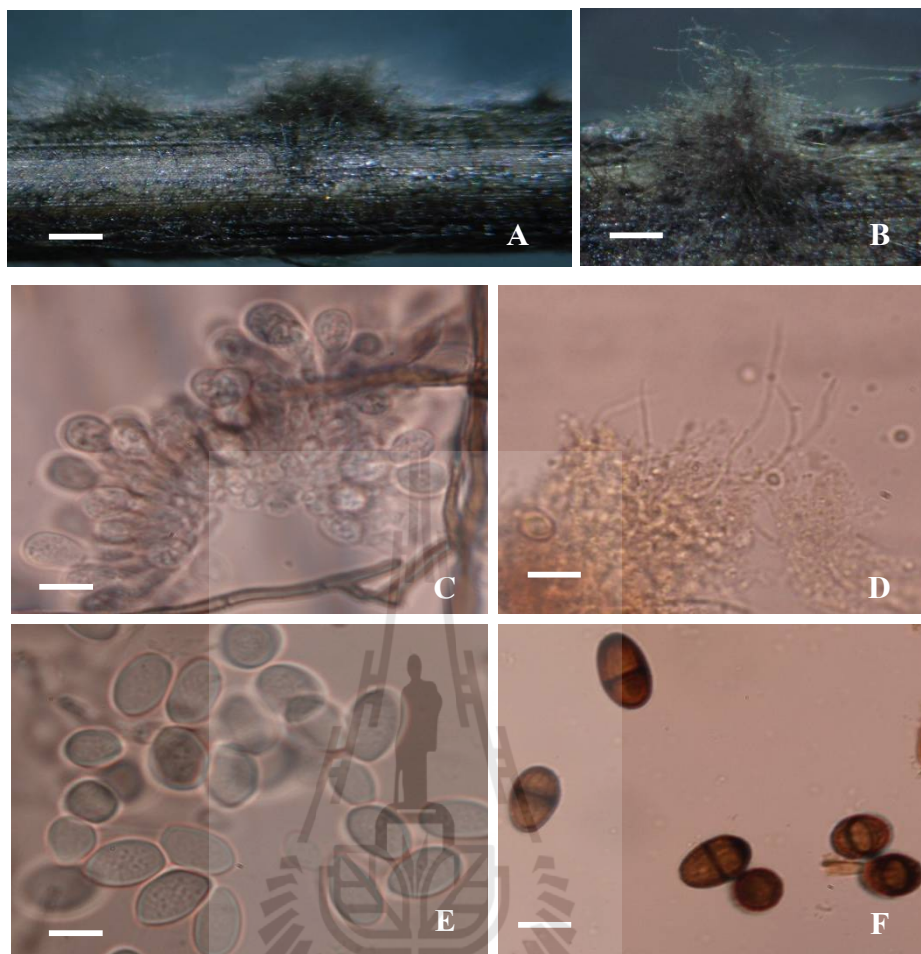
Neoscytalidium

ชนิดของเชื้อรา	ขนาดโคนิเดีย		ที่มา
	ขนาด(ยาวxกว้าง) ไมโครเมตร	ขนาดอาร์โธรโคนิเดีย ขนาด(ยาวxกว้าง) ไมโครเมตร	
<i>N. dimidiatum</i>	10–16×3.5–6.5	4–16.5×8.5	Phillips et al., 2013
<i>N. dimidiatum</i>	8-12×4-5	4-12×2.5-8	Machado et al., 2014b
<i>N. dimidiatum</i>	5-12x3-5	6-12x3-6	Machado et al., 2014a
<i>N. dimidiatum</i>	10-15x4-5	6-14x3-5	this study (N3DTD2)
<i>N. novaehollandiae</i>	10.5-12.5×4-5	5.5-7.5×3.5-4.5	Pavlic et al., 2008

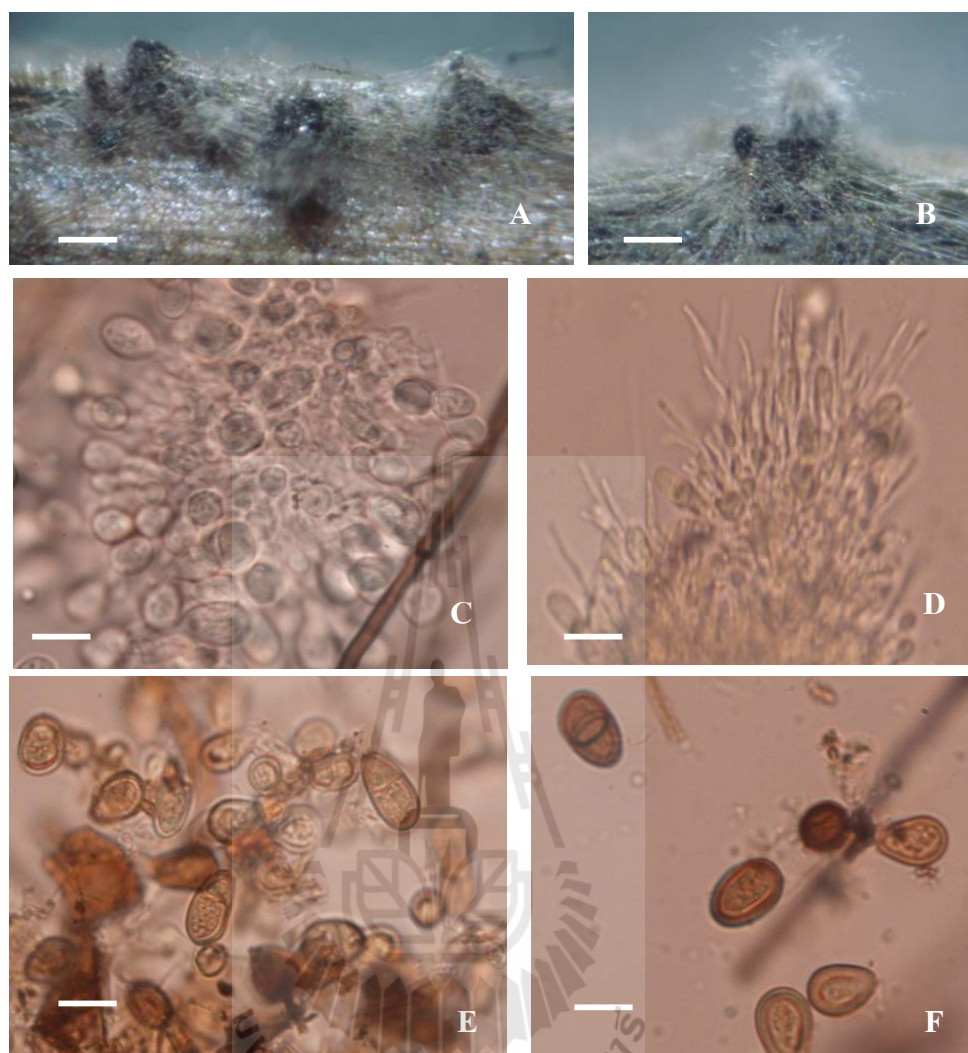




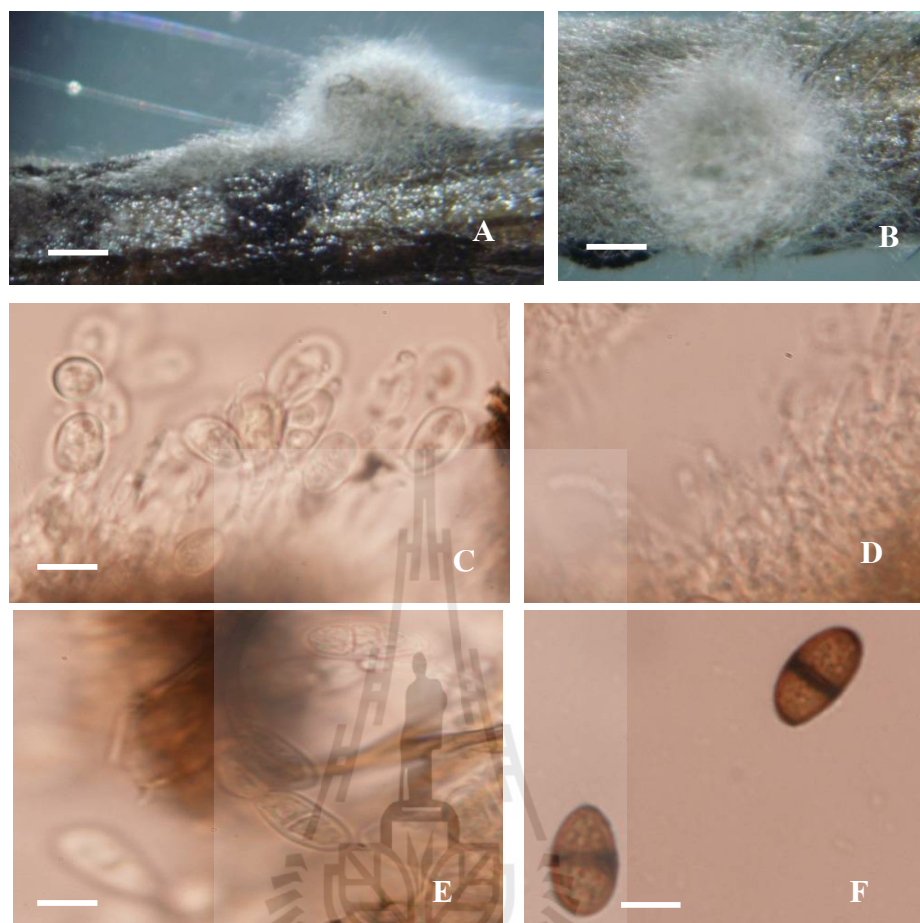
ภาพที่ 4.23 *Lasiodiplodia theobromae* ไอโซเลต L18KBSH3 (A-B) พิคนิตีรูปร่างค่อนข้างกลม เจริญบนไม้จิ้มฟัน(C) โคนิดิโอยีนัส เซลล์ยาริสไไม่มีสี ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก(D) พาราไฟซิส สไไม่มีสี ทรงกระบอก ปลายมน(E) โคนิตีระยะอ่อนสไเซลล์เดี่ยว รูปร่างค่อนข้างรี(F) โคนิตีระยะแก่สีน้ำตาลเข้ม มีผนัง 2 เซลล์รูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว: บาร์ A เท่ากับ 500 ไมโครเมตร B เท่ากับ 100 ไมโครเมตร D-F เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



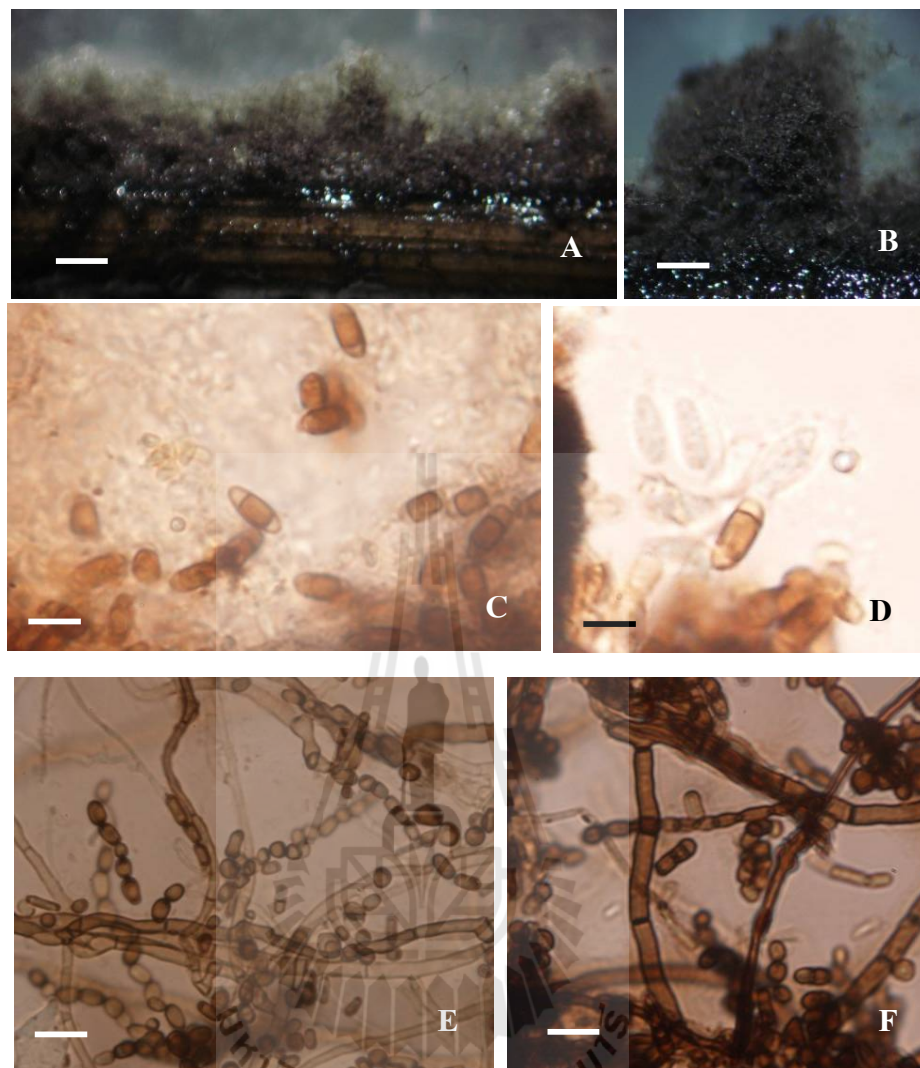
ภาพที่ 4.24 *Lasiodiplodia euphorbicola* ไอโซเลต L6HRD, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT (A-B) พิกนิตีรูปร่างค่อนข้างกลม เจริญบนไม้จุ่มพิน (C) โคนิดิโอบีจัส เซลล์ กลมรี ใสไม่มีสี ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก (D) พาราไฟซิส ใสไม่มีสี ทรงกระบอก ปลายมน บางเส้นใยมีการแตกกิ่ง (E) โคนิดิยะยะอ่อนใส เซลล์เดี่ยว รูปร่างค่อนข้างรี (F) โคนิดิยะยะแก่สีน้ำตาลเข้ม 2 เซลล์ รูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนว ยาว: บาร์ A เท่ากับ 500 ไมโครเมตร B เท่ากับ 100 ไมโครเมตร D-F เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.25 *L. euphorbicola* ไอโซเลต L11HSR2 (A-B) พิกนิตีเดียรูปร่างคล้ายคนโท มีช่องเปิด ขึ้นออกมา เจริญบนไม้จุ่มฟัน (C) โคนิดิโอจีส เซลล์ กลมรี ไส้ไม่มีสี ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก (D) พาราไฟซิส ไส้ไม่มีสี ทรงกระบอก ปลายมน (E) โคนิตีเดียระยะอ่อนใส เซลล์เดี่ยว รูปร่างค่อนข้างรีและกลม (F) โคนิตีเดียระยะแก่สีน้ำตาลเข้ม 1-2 เซลล์ รูปร่างหลากหลาย ทั้งค่อนข้างกลมถึงรี ปลายสอบลง ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว: บาร์ A เท่ากับ 500 ไมโครเมตร B เท่ากับ 100 ไมโครเมตร D-F เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.26 *L. euphorbicola* ไอโซเลต L20FHTB1 (A-B) พิกนิตีเดียรูปร่างค่อนข้างเจริญบนไม้จิ้มฟัน (C) โคนิดิโอดีไนต์ เซลล์ กลมรี ใสไม่มีสี ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างทรงกระบอก (D) พาราไฟซิส ใสไม่มีสี ทรงกระบอก ปลายมน (E) โคนิตีเดียระยะอ่อน ใส 1-3 เซลล์ รูปร่างค่อนข้างรี (F) โคนิตีเดียระยะแก่สีน้ำตาลเข้ม 2 เซลล์ รูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว: บาร์ A เท่ากับ 500 ไมโครเมตร B เท่ากับ 100 ไมโครเมตร D-F เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.27 *Neoscytalidium. dimidiatum* ไอโซเลต N3DTD2 (A-B) พืชชนิดรูปรางก่อนกลมเจริญบนไม้จิ้มฟัน (C-D) โคนิเดีย 3 เซลล์ หัวท้ายเรียว เซลล์ตรงกลางอยู่ภายในพคินิเดีย (E-F) อาร์โธรโคนิเดีย ค่อนข้างกลมปลายตัด ระยะอ่อน ไส้ไม่มีสีหรือ มีสีเข้มส่วนใหญ่มิเซลล์เดี่ยวเรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่: บาร์ A เท่ากับ 500 ไมโครเมตร B เท่ากับ 100 ไมโครเมตร D-F เท่ากับ 10 ไมโครเมตร: บาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังโดยวิธีการจำแนกเชื้อราทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลร่วมกับวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการพบว่า

1. การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคต้นและรากเน่าจากแหล่งปลูกใน 6 อำเภอ ของ 3 จังหวัด สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 139 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา 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 สอดคล้องกับรายงานของต่างประเทศที่พบว่าโรคนีมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศและมีเชื้อราสาเหตุโรคมกกว่าหนึ่งชนิด โดยในปี 1997 ของ Msikita และคณะ รายงานว่า โรคหัวและต้นเน่าของมันสำปะหลังในประเทศเบนินเกิดจากเชื้อราหลายชนิด คือ *Neoscytalidium hyalinum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp., *L. theobromae* จำนวน 56.2, 14.2, 11.8, 7.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และอีก 9.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเกิดจาก *Pythium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* spp. และรายงานว่าเป็นประเทศไนจีเรีย เกิดจากเชื้อราหลายชนิด คือ *N. hyalinum*, *L. theobromae*, *M. phaseolina* และ *Fusarium* spp. จำนวน 40.6, 28.1, 18.7 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต่อมาในปี 2002 Onyeka รายงานว่า โรครากเน่ามันสำปะหลังในประเทศไนจีเรียเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และ *Fusarium* spp. จำนวน 75 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปี 2005 Msikita และคณะ รายงานว่า โรคหัวและต้นเน่าของมันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *N. hyalinum* มากที่สุดจำนวน 56 และ 22-52 เปอร์เซ็นต์ในฤดูร้อนและฤดูฝนตามลำดับ รองลงมาในฤดูร้อน คือ เชื้อรา *M. phaseolina* จำนวน 14.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในฤดูฝน คือ เชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* จำนวน 11.8 และ 7.7. เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในปี 2010 Banito และคณะ รายงานว่า โรครากและต้นเน่าของมันสำปะหลังในประเทศโตโก เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และ *Fusarium* spp. จำนวน 51.3 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ 15.4 เปอร์เซ็นต์ เกิดจาก *Sclerotium rolfsii* และ *Pythium* sp. นอกจากนี้ในปี 2011 Bua และ Okello รายงานว่า โรครากเน่ามันสำปะหลังในประเทศอูกานดา เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* จำนวน 87 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในปี 2012 Machado ได้รายงานว่าเป็น

ประเทศบราซิลพบโรคโคนและรากเน่าของสับปะรดซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *N. hyalinum* และ *Lasiodiplodia* spp. จำนวน 55 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อีก 20 เปอร์เซ็นต์เกิดจากเชื้อรา *Macrophomina* sp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp. และ *Chaetomium* sp. สำหรับในประเทศไทย โรคเน่ามันสำปะหลังยังมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดเชื้อสาเหตุที่ชัดเจนค่อนข้างน้อย ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2553 รังมี เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ ศึกษาค้นคว้าวิจัย รายงานว่าโรคโคนเน่า หัวเน่ามันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp., *Rigidoporus lignosus* และ *S. rolfsii* ต่อมาในปีเดียวกัน ญัฐธิญา เบือนสันเทียะ และคณะ รายงานว่าโรคต้นและรากเน่าของมันสำปะหลัง มีการของเชื้อราหลายชนิด ประกอบด้วย *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Chaetomium* sp., *Macrophoma* sp. และ *Phomopsis* sp. (ญัฐธิญา เบือนสันเทียะ และคณะ, ยังไม่ตีพิมพ์) ต่อมาในปี พ.ศ. 2555 ญัฐธิญา เบือนสันเทียะ และ ศุติศ อธิณูวัฒน์ รายงานว่า โรคลำต้นเน่ามันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* (Buensanteai and Athinuwat, 2012) นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2557 กรมวิชาการเกษตร รายงานว่าโรคหัวเน่าของมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora meadii* (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557) ต่อมาในปีเดียวกัน รังมี เจริญสถาพร และคณะ (2557) รายงานว่าโรครากและหัวเน่ามันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora melonis* (Charaensatapon et al., 2014) อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาโรคโคนและรากเน่าของพืชอื่น อาทิ โรคโคนและรากเน่าของหม่อน โดยในปี พ.ศ. 2553 วราภรณ์ สุทธิสา และนิวัฒน์ เสนาะเมือง พบว่าโรคโคนและรากเน่าของหม่อนเกิดจากเชื้อราหลายชนิดเข้าทำลายร่วมกัน ได้แก่เชื้อรา *L. theobromae*, *Fusarium* spp., *F. solani*, *Phytophthora* spp., *Pythium* sp., *Macrophomina* sp., *Neocosmopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Shaeropsis* sp. และ *S. rolfsii* ซึ่งจากการรายงานต่าง ๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าโรคพืชที่เกิดบริเวณโคนต้นและรากพืชมีแนวโน้มพบการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิดร่วมกัน (complex diseases)

2. ทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน พบว่าแต่ละไอโซเลตมีความรุนแรงแตกต่างกัน และเชื้อสามารถก่อโรคได้ทั้งบนหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 โดยไอโซเลต L11HSR2 รุนแรงที่สุด ลักษณะอาการหัวมันหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แสดงอาการหัวมันเน่า เนื้อเยื่อยุบตัวลง เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองถึงสีน้ำตาล เนื้อเยื่อแตก บริเวณเปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกออกจากกัน นอกจากนี้ลักษณะอาการในท่อนพันธุ์พบอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลรอบๆบริเวณที่ปลูกเชื้อเมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น เปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล บริเวณที่ปลูกเชื้อแสดงอาการเนื้อเยื่อตาย บริเวณเนื้อไม้ เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลดำยาวตามท่อนลำเลียง สอดคล้องกับ Machado และคณะ (2014a) ในประเทศบราซิล พบว่าเชื้อรา *L. pseudotheobromae*, *L. euphrobicola* และ *N. hyalinum* ก่อให้เกิดลักษณะอาการเนื้อเยื่อบริเวณหัวมันสำปะหลังเน่า ยุบตัว และเปลี่ยนจาก

สีขาว เป็นสีน้ำตาลแดง น้ำตาลเข้มและสีดำ นอกจากนี้ Banito และคณะ ในปี 2010 รายงานว่า การทดสอบความสามารถการเกิดโรครากและลำต้นเน่ามันสำปะหลังในประเทศโตโก พบว่าเชื้อรา *L. theobromae*, *Fusarium* spp., *S. rolfsii* และ *Pythium* sp. แสดงอาการบริเวณท่อนพันธุ์และหัวมัน เนื้อเยื่อตายและเน่าช้า โดย *L. theobromae* ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด รองลงมา คือ *Fusarium* spp. เมื่อวัดจากขนาดแผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า เชื้อรา *L. theobromae* ก่อให้เกิดโรครุนแรงแตกต่างจากเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าเชื้อราบางไอโซเลตมีความรุนแรงในการเกิดโรคบนหัวและท่อนพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่รุนแรงในระดับโรงเรือน ซึ่งสอดคล้องกับ Alves et al. (2008); Phillips et al. (2013); Machado et al. (2012); Machado et al. (2014a), (2014b) ที่รายงานว่ เชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในเศษซากพืช (saprophytic) อาศัยอยู่ในพืชที่มีชีวิตแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค (endophytic) และเมื่อมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมยังสามารถก่อให้เกิดโรค (paraphytic) ซึ่งการก่อให้เกิดโรคนั้นขึ้นกับสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ในปี 2545 กรมวิชาการเกษตร (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน 2545) รายงานว่า โรคลำต้นเน่าของ มันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* โดยจะทำให้ระบบท่อลำเลียงเน่าเป็นสีดำ โดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์ หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่า มีกลุ่มเม็ด pycnidia ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกต่อมาแห้งตาย สามารถติดกับท่อนพันธุ์และตกค้างในไร่มันสำปะหลัง เป็นแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุโรค ทั้งนี้เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ในอดีตมีความสำคัญและพบน้อยกว่าโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น (weak parasite) แต่ในปัจจุบันพบการระบาดของเชื้อราดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราดังกล่าว (กลุ่มอนุรักษ์ดินและน้ำ, 2545; Machado et al., 2014a; 2014b; Phillips et al., 2013; Trakunyingcharoen et al., 2014; 2015a; 2015b) นอกจากนี้ เมื่อนำเชื้อราไอโซเลต L11HSR2 ที่มีความรุนแรงสูงสุดไปทดสอบในสภาพแปลงปลูกจำลองเป็นระยะเวลา 8 เดือน พบว่าท่อนพันธุ์มีอาการลำต้นเน่า บริเวณโคนต้นมีการสร้าง cork layer ขนาดใหญ่ เปลือกบวมเน่า บริเวณท่อลำเลียงของท่อนพันธุ์เดิมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และบริเวณแกนกลางลำต้นเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ ซึ่งลำต้นที่แตกออกใหม่และหัวมันสำปะหลังไม่แสดงอาการของโรคเน่าดำ การที่พืชไม่แสดงอาการหัวเน่าดำอาจมีผลมาจากตลอดระยะเวลา 8 เดือน มีการปลูกเชื้อเพียงครั้งเดียว ปริมาณเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อการเกิดโรค และในระยะแรกในการปลูกมีสภาพภูมิอากาศที่ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโดยมีฝนตกต่อเนื่องในระยะเวลา 3 เดือน พืชมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีมากทำให้พืชแข็งแรงไม่อ่อนแอให้เชื้อเข้าทำลายได้ ทั้งนี้พบว่า ผลผลิตน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบวิธีการปลูก พบว่า ในสภาพที่มีเชื้อสาเหตุโรคผสมอยู่ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ พบว่าการปลูกแนวอนให้ผลผลิตสูงสุด 4.03 ± 0.71 กิโลกรัมต่อต้น อย่างไรก็ตามในสภาพที่ไม่มีเชื้อสาเหตุโรค (กรรมวิธีควบคุม) พบว่าการปลูกแนวตั้งให้ผลผลิตน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยสูงสุด 6.80 ± 0.35 กิโลกรัมต่อต้น แต่

การปลูกแนวตั้งร่วมกับการผสมเชื้อสาเหตุโรคลงในดิน อัตราส่วน 1:100 ให้ผลผลิตต่ำสุด 2.63 ± 0.21 กิโลกรัมต่อตัน แสดงว่าสภาพที่มีการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรควิธีการปลูกมีผลต่อผลผลิตของมันสำปะหลัง ดังนั้นในพื้นที่ที่ไม่มีและมีการระบาดของโรคควรใช้วิธีการปลูกแนวตั้งและแนวนอนตามลำดับ สอดคล้องกับ การรายงานของ จำลอง เกียมจันรรจา (2541) ที่รายงานว่า การปลูกแนวตั้งให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกวางนอนถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากข้อมูลนี้สามารถสรุปได้ว่าการปลูกแนวอนสามารถช่วยลดโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังได้

3. นำเชื้อราชนิดที่พบเปอร์เซ็นต์สูงสุด คือ เชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* มาทำการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาจากลักษณะของพิกนินเดียม (pycnidia) พาราไฟซิส (paraphysis) และ โคนินเดียม (conidia) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคนี้ได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต ซึ่งแยกเป็น *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. จำนวน 28 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยแยกจากทุกส่วนของมันสำปะหลังด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร WA และ HPDA ซึ่งกระตุ้นให้เชื้อสร้างพิกนินเดียมโดยเลี้ยงบนไม้จิ้มฟันในอาหาร WA เก็บไว้ในที่มืดสลบแสงวันละ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน สอดคล้องกับวิธีการของ Latha et al. (2009); Marques et al. (2013); Machado (2012); Machado et al. (2014a), (2014b); Trakunyingcharoen et al. (2014) ซึ่งนำเชื้อราดังกล่าวเลี้ยงบน กิ่งของสนและ แกนข้าวโพด สามารถชักนำให้เชื้อสร้างพิกนินเดียมได้ นอกจากนี้อุคม ฟารุงสงและคณะ (2548) รายงานว่า เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. สามารถเพาะเลี้ยงบนผลไม้ที่เป็นพืชอาศัยตามธรรมชาติ เช่น บนผลกล้วย ผลชมพูได้ โดยทิ้งไว้ในผลไม้มีลักษณะเป็นมันมี คือผิวแห้ง แข็งและมีสีดำ เชื้อราจะมีการสร้าง conidiomata และฝังตัวอยู่ในพืชอาศัยเพื่อรอที่จะปล่อย โคนินเดียมออกมาเมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อราบาง ไอโซเลตสามารถสร้างพิกนินเดียม บนอาหาร PDAS เป็นเวลา 14 วันหลังการย้ายเชื้อ ในการศึกษาเชื้อราทั้ง 2 สกุลทางลักษณะสัณฐานวิทยา จำเป็นต้องกระตุ้นให้เชื้อราสร้างพิกนินเดียม โดยวิธีที่เหมาะสมในการกระตุ้นคือ นำมาเลี้ยงบนไม้จิ้มฟันที่วางในอาหาร WA สามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างพิกนินเดียมได้ดี ส่วนการลองเติมชิ้นส่วนของมันสำปะหลังลงในอาหาร เช่น ท่อนมันสำปะหลัง หรือ หัวมันสำปะหลัง ไม่เหมาะสำหรับการเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้เพราะว่า ในขั้นตอนการนั่งมาเชื้อชิ้นส่วนของมันสำปะหลังเนื้อเยื่อเปียกชุ่มและใช้ระยะเวลาในการสร้างพิกนินเดียม หรือไม่สร้างเลย สำหรับผลการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาครั้งนี้พบเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มีลักษณะโคนินเดียมระยะอ่อน เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ระยะแก่ มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังเซลล์ตามขวาง 1 ชั้นตรงกลางแบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว สอดคล้องกับ Latha et al. (2009); Marques et al. (2013); Machado (2012); Machado et al. (2014a), (2014b); Phillips et al. (2013);

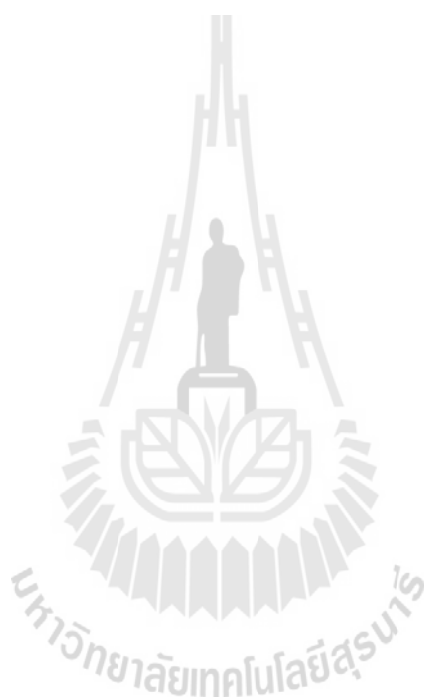
Trakunyingcharoen et al. (2014); (2015a); (2015b) ในส่วนของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีการสร้าง conidia 2 ลักษณะ ได้แก่ 1) อาร์โธโคนิเดีย เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะ ค่อนข้างกลม ปลายตัด เริ่มแรก ใส ไม่มีสี ระยะเวลาที่มีสีน้ำตาลเข้ม 1-2 เซลล์ เรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่ เรียกว่า *Scytaalidium-like conidia* และ 2) โคนิเดีย อยู่ภายในพิกนิตีเดีย โดยจะไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยตรง แต่จะสร้างบนไม้จิ้มฟัน หรือ บนผิวของพืชอาศัยเท่านั้น มีลักษณะ หัวท้ายเรียว 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางทึบ เรียกว่า *Fusicocum-like conidia* สอดคล้องกับ Machado, (2012); Machado et al. (2014a), (2014b); Phillips et al. (2013) เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. สามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวัน 2-3 หลังจากวางบนจานอาหาร โดยในวันที่ 1-3 เชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวถึงสีเทา และ ในวันที่ 3-4 พัฒนาเป็นสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ ส่วนเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีสีโคโลนีสีขาวเทาใน 2-3 วันหลังจากวางเชื้อ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ บนอาหาร PDAS สอดคล้องกับรายงานของ Phillips และคณะ (2013) รายงานว่าเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. บนอาหาร MEA สามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 2 วัน โดยในวันแรกเชื้อราสร้างเส้นใยเป็นสีขาวและเปลี่ยนสีเทาในวันที่ 3 และมีสีโคโลนีเป็นสีเขียวมะกอกปนเทา (olivaceous-gray) หรือ สีเทาดำ (iron gray) ส่วนในอาหาร PDA สามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน ในวันแรกเชื้อราสร้างเส้นใยเป็นสีขาวและเปลี่ยนสีเทา (smoke-gray) หลังจากนั้นจะมีสีโคโลนีสีเขียวเข้ม ทั้งนี้บางสปีชีส์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีการสร้าง pigment เป็นสีต่าง ๆ เช่น เชื้อรา *L. gonubiensis* มีการสร้าง pigment สีแดง ส่วนเชื้อรา *L. gilanensis*, *L. parva* และ *L. pseudotheobromae* มีการสร้าง pigment สีชมพู เป็นต้น ส่วนเชื้อรา *N. hyalinum* และ *N. novaehollandiae* Phillips และคณะ (2013) ได้ศึกษาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า มีการเจริญเร็วสามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 2 วัน ในวันแรกเชื้อราสร้างเส้นใยเป็นสีขาวและเปลี่ยนสีเขียวเข้ม (greenish olivaceous) และ สีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ในวันที่ 3 หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีดำ โดยสีของโคโลนีเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. แต่ละสปีชีส์จะมีสีและลักษณะที่ไม่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. เพียงอย่างเดียวสามารถจัดจำแนกความแตกต่างได้ในระดับสกุลเท่านั้น ไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ เพราะมีความซับซ้อน และใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องศึกษาร่วมกับ ลักษณะทางด้านชีวโมเลกุลและการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ ซึ่งในอดีตการจัดจำแนกความหลากหลายของเชื้อราทั้ง 2 สกุล ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มเติมมากมายทำให้มีการค้นพบสปีชีส์ใหม่เพิ่มมากขึ้น (Latha et al., 2009; Marques et al., 2013; Machado, 2012; Machado et al., 2014a, 2014b; Phillips et al., 2013; Trakunyingcharoen et al., 2014; 2015a; 2015b) นอกจากนี้ ยังเป็นการยืนยันว่า เชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ก่อโรคต้นและรากเน่ามันสำปะหลังนอกเหนือจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่กรมวิชาการเกษตรได้รายงานไว้ในปี 2557

4. ผลการยืนยันชนิดเชื้อทั้ง 33 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย *universal primers* 3 บริเวณ ได้แก่ ITS1/ITS4 Ef1-688F/Ef1-1251R และ Bt2a/Bt2b มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 550, 500 และ 470 bp ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR product ของเชื้อราไอโซเลตตัวแทนที่มีความสามารถในการเกิดโรครุนแรงจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH3, L20FHTB1, L27SRBT และ N3DTD2 มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าบริเวณ EF1- α สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด ยังเป็นบริเวณที่สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงสูง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่บริเวณ ITS และบริเวณ Bt สามารถจำแนกเชื้อราได้เพียงบางสปีชีส์ สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันถึง 92-100 และ 84-100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ เบนจพล ศรีทองคำ (2559) มัลลิกา มะกรวิวัฒนะ (2557) และ Machado et al. (2012) โดยพบว่าในบริเวณนี้ สามารถแยกความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราได้ดีที่สุด จากนั้นนำข้อมูลบริเวณ EF1- α ของเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W และนำข้อมูลมาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ โดยโปรแกรม MEGA 6.0 ด้วยวิธี NJ, UPGMA และ ML โดยกำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 พบว่า สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 สกุล คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* ประกอบด้วย ไอโซเลต L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *L. euphorbica* ที่ระดับความค่าความเชื่อมั่นที่ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเชื่อมั่นในระดับสูง ทั้งนี้ ไอโซเลต L20FHTB1 มีความใกล้เคียงกับ *Lasiodiplodia* sp. มีค่าความเชื่อมั่นที่ 87 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราไอโซเลต L18KBSH3 มีความใกล้เคียง *L. theobromae* มีค่าความเชื่อมั่นที่ 81 เปอร์เซ็นต์ และ *Neoscytalidium* ประกอบด้วย ไอโซเลต N3DTD2 มีความใกล้เคียงกับ *N. dimidiatum* มีค่าความเชื่อมั่นที่ 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับมีความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง และผลการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลทั้ง 3 บริเวณร่วมกับสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ สามารถจำแนกได้ โดยสามารถจำแนกได้เชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* ได้ 2 สปีชีส์ คือ *L. theobromae* 1 ไอโซเลต และ *L. euphorbica* 6 ไอโซเลต สำหรับในสกุล *Neoscytalidium* จำแนกได้ 1 สปีชีส์ คือ *N. hyalinum* 1 ไอโซเลต สอดคล้องกับ Machado และคณะ (2014a) ที่รายงานว่าโรคหัวเน่าดำมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *L. pseudotheobromae*, *L. euphorbica* และ *N. dimidiatum* นอกจากนี้ในปี 2012 Machado รายงานการค้นพบ สปีชีส์ใหม่ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่ก่อโรคโคนและรากเน่าของสับปะรด ในประเทศบราซิล โดยใช้การศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยา การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการร่วมกัน พบสปีชีส์ใหม่โดยรายงานเป็น *Lasiodiplodia* sp. 1 และ *Lasiodiplodia* sp. 2 ซึ่งต่อมาในปี 2014 ยืนยันเป็น เชื้อรา *L. euphorbica* และ *Lasiodiplodia* sp. 2 ต่อมายืนยันเป็น *L. jathophicola* ซึ่งเป็นการพบเป็นครั้งแรกของโลก นอกจากนี้ในปี 2013

Trakunyingcharoen และคณะรายงานการค้นพบ สปีชีส์ใหม่ ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่ก่อโรค ขั้วผลและผลเน่าของมะม่วงในประเทศไทย โดยใช้การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาาร่วมกับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ ร่วมกัน พบสปีชีส์ใหม่โดยรายงานเป็น *Lasiodiplodia* sp. CPC 22795 ซึ่งต่อมาในปี 2015 ยืนยันเป็น เชื้อรา *L. thailandica* ทั้งนี้ในมันสำปะหลังปัจจุบันมีเพียงรายงานของ Machado และคณะ (2014a) เพียงฉบับเดียวที่ทำการศึกษาโรคหัวเน่าค้ำมันสำปะหลังในประเทศบราซิล ที่ศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยาาร่วมกับเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank และวิเคราะห์สาย สัมพันธ์วิวัฒนาการ โดยเชื้อราที่เข้าทำลายก่อให้เกิดโรคหัวเน่าดำ (cassava black root rot) คือ *L. euphorbicola*, *L. pseudotheobromae* และ *N. dimidiatum* ทั้งนี้การยืนยันเชื้อสาเหตุโดยการนำข้อมูล ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank และการ วิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการร่วมกันเพิ่มเติมจำเป็นต้องทำร่วมกันเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุ โรคได้อย่างแม่นยำ

5. จากการทดลองนี้แนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคต สามารถแนะนำข้อมูลของการระบุ ชนิดเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังที่มีการยืนยันแล้วให้เกษตรกรใช้ตรวจสอบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังเบื้องต้น โรคดังกล่าวสามารถแพร่ระบาดพบทั่วไปในท่อนพันธุ์ที่กองไว้หรือตัดทิ้งไว้ในแปลงเป็นระยะ เวลานานเป็นแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุโรค (กลุ่มอนุรักษณ์น้ำและดิน 2545) ในปี 2526 ชาญุ ธิรพร และกำพล นรินทรพร รายงานว่าเมื่อนำต้นมันสำปะหลังปลูกทันทีพบว่า มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดสูงถึง 95.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาต้นพันธุ์ไว้นาน 30 วัน มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอด 83.52 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ เก็บไว้นาน 105 วัน มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดเพียง 28.86 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บต้นมันสำปะหลัง กองไว้ในแปลงเป็นระยะเวลานาน ไม่ควรเก็บนานเกิน 30 วันก่อนนำไปปลูก นอกจากนี้ในปี 2015 Trakunyingcharoen และคณะ (2015b) ได้ศึกษาและจัดจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่ก่อให้เกิด พืชในประเทศไทยพบว่านอกเหนือจาก *L. theobromae* ยังพบสปีชีส์อื่นคือ *L. pseudotheobromae*, *L. gomubiensis* และ *L. thailandica* ก่อให้เกิดโรคพืชหลายชนิด จึงควรหลีกเลี่ยงการปลูกมันสำปะหลัง ในพื้นที่ปลูกเดียวกันหรือใกล้เคียงกับพืชอาศัยอื่นเพื่อลดปริมาณการสะสมของเชื้อสาเหตุโรคและ ลดปริมาณการแพร่ระบาดของโรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลัง ข้อมูลจากการศึกษารุ่นนี้จะ เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้อง เป็นการลดต้นทุนการผลิตมัน สำปะหลัง และสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการป้องกันการแพร่ระบาดของ โรคต้นและรากเน่าค้ำมันสำปะหลังของในบางพื้นที่ปลูกประเทศไทย ทั้งนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังเป็น การศึกษาเพียงพื้นฐานของเชื้อสาเหตุโรคเพียง 2 สกุลเท่านั้น อีกทั้งการทดลองนี้ใช้วิธีดั้งเดิมในการ ระบุเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งใช้ระยะเวลานาน ในการวินิจฉัย ดังนั้นใคร่ขอแนะนำให้มีการทำวิจัย

ต่อเนื่องเพื่อศึกษาเชื้อชนิดอื่น ๆ โดยวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค เช่น เทคนิค Real-time PCR เป็นต้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาควบคุมโรคนี้ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม การใช้สารเคมีที่ถูกต้องและชีววิธีเพิ่มเติม



รายการอ้างอิง

- กาญจนา นิรภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2552). ชีววิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. วารสาร วิทยาศาสตร์ มศว. 25(2): 119-134.
- กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน. (2545). มันสำปะหลัง ใน เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1001: 46.01.
- ขนิษฐา มากรุ่ง. (2548). การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 91 หน้า.
- จักรพงษ์ ชาตะรักษ์. (2554). มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก : <http://50010210339.blogspot.com/>; พืชเศรษฐกิจของไทย.
- จำลอง เจียมจันรรจา. (2541). มันสำปะหลัง. ใน พฤษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47-51.
- จำลอง เจียมจันรรจา. (2547). มันสำปะหลัง. ใน พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 108-127.
- จรุงสิทธิ์ ลิ้มศิลา และอัจฉรา ลิ้มศิลา (2537). ประวัติการแพร่กระจาย ความสำคัญ และดินอากาศที่เหมาะสม. ใน เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1-13.
- เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. (2532). มันสำปะหลัง การปลูก อุตสาหกรรมแปรรูป และการใช้ประโยชน์. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 444 หน้า.
- 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.
- ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2557). โรคพืชและการวินิจฉัย. เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 296 หน้า.
- ชาติชาย ศิริพัฒน์. (2557). รากเน่าหัวเน่าระบาดหนักในไร่มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก : <http://www.thairath.co.th/content/442798>.

- ชาญ ธิรพร. (2537). อุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลังและการใช้ประโยชน์. ใน เอกสาร
วิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและ
สหกรณ์. 177-192.
- ชาญ ธิรพร และ กำพล นรินทรภาพร (2526). การเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา. กรมวิชาการเกษตร.
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 113-118.
- ชัยณรงค์ รัตนกริษากุล และพิมพ์รัมภา เปี่ยมสกุล. (2557). ความหลากหลายในการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ
ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เพื่อการจำแนกเชื้อ. ว. วิทย. กษ. 45: 157-160.
- ญูกา เริงจาร์พันธ์. (2557). ธุรกิจมันสำปะหลัง และผลิตภัณฑ์. บทความทางวิชาการ. สำนักวิจัย
ธุรกิจ: สายงานบริหารความเสี่ยง. ธนาคารแลนด์ แอนด์ เฮาส์ จำกัด (มหาชน). 1-4.
- ฐิติมา วีระศิลป์. (2542). โรคมันสำปะหลัง. ใน พืชทองคำได้แผ่นดินมันสำปะหลัง. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 41-121.
- ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และคณะ. (2555). การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ใน
การควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังด้วยเทคนิค IR. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
สุรนารี. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.slri.or.th/th/index.php?option=com_surname.
- ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, มธุกร สมพงษ์, รุ่งทิพย์ สังข์เผือก สุทธิสา คัชณีย์ และ ไสภณ วงศ์แก้ว.
(2553). โรคของมันสำปะหลังในประเทศไทย. สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชา
เทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. (เอกสารไม่ตีพิมพ์).
- ดนัย สุภาพร. (2537). พฤกษศาสตร์ และพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง. ใน เอกสารวิชาการ
มันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14-29.
- ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงษ์ มหาคำ และ ศทาวุธ นามดี. (2548). การจำแนกพืชสกุล
Caulokaepferia K. Larsen (วงศ์จิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูล
ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. 10(1): 5-12.
- นิรมิต ประทุมรัตน์. (2528). เชื้อราสาเหตุโรคพืช. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 96 หน้า.
- เบญจพล ศรีทองคำ. (2559). ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* species ที่
แยกจากพืชเป็นโรค. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. นครปฐม. 126 หน้า.
- พัชรีย์ วิชาญวดี. (2543). เทคนิคทางอนุชีววิทยา. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://www.si.mahidol.ac.th>.
- เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง. (ม.ม.ป.). โรค-แมลงศัตรูที่สำคัญของมันสำปะหลังและการป้องกันกำจัด.
เอกสารนำเสนอผลงาน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรเพชรบูรณ์.

- ไพบุลย์ ฟูวัฒนศิลป์. (2551). การเพาะปลูกมันสำปะหลังไทยในปี 2552 มีความเสี่ยงสูงขึ้น. [ออนไลน์].
ได้จาก: <http://www.ktb.co.th/ktb/Download/economyresources/EconomyResources>.
- พวงเพชร นรินทรพร. (2537). การใช้ประโยชน์จากหัวมันสำปะหลัง. ใน เอกสารวิชาการมัน
สำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 173-176.
- มนัสยา สิงห์โต. (2551). การจำแนกชนิดของกล้วย (*Musa spp.*) โดยใช้คลอโรพลาสต์ ดีเอ็นเอ.
ปัญหาพิเศษ. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. นครปฐม. 44 หน้า.
- มัลลิกา มะกรวัฒน์. (2557). การระบุชนิดของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์
สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 215 หน้า.
- มาลินี อัสวดิษฐเลิศ. (2553). เทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว.
[ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.biotech.or.th/Guru/>.
- ยุกติ สาริกะภูติ. (2526). มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 7. กรมวิชาการเกษตร. 83 - 87.
- รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิดใจเดียว. 2553. โรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังและแนวทางการ
ป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://soclaimon.wordpress.com/2010/06/11>.
- รุ่งทิพย์ สังข์เผือก. (2557). การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร.
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 126 หน้า.
- วรภรณ์ สุทธิสา และ นิวัฒน์ เสนาะเมือง. (2553). ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium*
species ที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าของหอมอน. *แก่นเกษตร*. 38(3): 301-308.
- วิชัย รักวิทยาศาสตร์. (2551). ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรกำแพงแสน.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 247 หน้า.
- วิพรพรรณ เนืองเม็ก และ มนัส ทิตยัวรรณ. (2556). ศักยภาพของเชื้อรา *Alternaria sp.* ในการเป็น
สารชีวภาพกำจัดวัชพืชเพื่อควบคุมผักตบชวาในกว๊านพะเยา. *แก่นเกษตร*. 41 ฉบับพิเศษ
1: 498-504.
- ศานิต สวัสดิกาญจน์. (2557). มันสำปะหลัง. ใน *พืชอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ. 1-162.
- ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์. (ม.ม.ป.). *ประวัติของมันสำปะหลัง*. [ออนไลน์]. ได้จาก:
http://web.sut.ac.th/cassava/cassava/index.php?name=1cas_source/cas_inthailand/29.
- ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. (2553). *พันธุ์มันสำปะหลัง และการ
จำแนกชนิดพันธุ์*. [ออนไลน์]. ได้จาก:

- <http://www.cassava-devlp-center.com/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=6>.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). **เนื้อที่ปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ปี2557-2559**. [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiBmL2Qw_MAhUKPI8KHcmoDAQQFggdMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.oae.go.th%2Fdownload%2Fprcai%2FDryCrop%2Fcassava.pdf&usq=AFQjCNGrEmB5_VKQsE1GOhDIOu4xRPEmg&sig2=hXWTOh8LKO6R44O30ctvDg.
- สมพงษ์ กาทอง. (2537). การเขตรกรรมมันสำปะหลัง. ใน **เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง**. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 71-83.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. (ม.ม.ป.). **ประวัติความเป็นมาของมันสำปะหลัง**. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://kasetinfo.arda.or.th/arda/cassava/?page_id=206.
- สำนักงานสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2558). **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2559**. สำนักงานสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กรุงเทพฯ. 241 หน้า.
- สมิตรา แสงวนิชย์. 2547. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ปฏิบั้กษาในการควบคุมโรคข้าวเหนียวที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffis & Maubl. บนกล้วยหอมทอง. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. โสภณ สินธุประมา. (2526). ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง. ใน **เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง**. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 9-16.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2552. รา *Phytophthora* สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. **เอกสารวิชาการ**. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 72 หน้า.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. (2555). การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555**. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.
- อมรรัตน์ โมพี. 2549. **ชีวสารสนเทศศาสตร์ทางสัตว**. ภาควิชาสัตวบาล. คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. (เอกสารไม่ตีพิมพ์).
- อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์. (2553). ความหลากหลายของเชื้อ ความต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับยีนต้านทานเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ (แอนแทรกคโนส) ในองุ่น. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**. สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 1-174 หน้า.

- อุดม ฟ้างุ้งนาง, นวลวรรณ ฟ้างุ้งนาง, ทศวรรณ ศรีวะอุไร และ สมศิริ แสงโชติ. (2548). การสำรวจและการคัดเลือกยีสต์จากธรรมชาติที่ต่อต้านรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ. **Postharvest Newsletter**. 4: 4.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, G.E., Zare, R. and Phillips, A.J.L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**. 25: 1-10.
- Allem, A.C. (2002). The Origins and Taxonomy of Cassava. In **Cassava: Biology, Production and utilization**. CABI Publishing. 1-16.
- Al-Sadi, A.M., Al-Ghathithi, A.G., Al-Fahdi, N. and Al-Yahyai, R. (2014). Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. **Int. J. Agric. Biol.** 16: 371-376.
- Alves, A.A.C. (2002). Cassava Botany and Physiology. In **Cassava: Biology, Production and utilization**. CABI Publishing. 67-88.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Divers.** 28:1-13.
- Baird, R.E. (2004). Deuteromycota: The imperfect fungi. In **Plant pathology concepts and laboratory exercise. United States of America**: CRC Press. 133-139.
- Bandyopadhyay, R., Mwangi, M., Aigbe, S.O. and Leslie, J.F. (2006). *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**. 96: 673-676.
- Banito, A., Kpemoua, K. E., Bissang, B. and Wydra, K. (2010). Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of Togo and evaluation of the pathogen virulence. **Pak. J. Bot.** 42(3): 2059-2068.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd edition, Macmillan Publishing Company, New York. 273.
- Begoude, B.A.D., Slippers, B. and Wingfield, M.J. (2010). Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress** 9: 101-123.
- Berk, M.J. and Curtis, M.A. (1867). **Geological and natural history survey of North Carolina. part III: botany**. Containing a catalogue of the indigenous and naturalized plants of the State. 148.

- Bua, B. and Okello, C. (2011). Isolation and identification of cassava root rot of cassava disease causal pathogens from Lira district, Uganda. **African crop science conference proceeding**. 10: 183-186.
- Buensanteai, N. and Athinuwat, D. (2012). The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand Protein Exp. **African Journal of Biotechnology**. 11(84): 14996-15001.
- Burgess, T.I., Sakalidis, M.L. and Hardy, G.E.St.J. (2006). Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between Eucalyptus globulus plantations and native eucalypt forests in Western Australia. **Australasian Ecology**. 31: 559–566.
- Centro internacional de agricultura tropical (CIAT). (1984). **Morphology of the Cassava Plant**. CIATPublishing, Cali. Columbia. 44.
- Charaensatapon, R., Saelee, T., Chulkod, U. and Cheadchoo, S. (2014). Phytophthora Root and Tuber of cassava in Thailand. Field and renewable energy crops research institute. Department of agriculture, Thailand. **Proceedings of 5th Asian Conference on Plant Pathology. Chiang Mai, Thailand**, November 3-6, 2014.
- Chen, S.F., Li, G.Q., Liu, Q.L., Li, J.Q. and Liu, F.F. (2016). Characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* from Rosa rugosa in South China. **Crop Protection**. 79: 51-55.
- Cilliers, A.J., Swart, W.J. and Wingfield, M.J. (1993). A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **S. AFR. For J.** 166: 47-52.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O. and Phillips, A.J.L. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Stud Mycol.** 55: 235- 253.
- Dawah, H.A. Wilson, M.R. and Claridge, M.F. (1997). **Species The units of biodiversity**. London: Chapman and Hall.
- Drenth, A. and Sendall, B. (2001). **Practical guide to detection and identification of Phytophthora**. Version 1.0. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia.
- Duchanee, S., Sangpueak, R. and Buensanteai, N. (2015a). Molecular identification of the causal agent associated with cassava stem and root black rot disease in Thailand. **The 2015 International Forum – Agriculture Biology and Life Science (IFABL)**. 23-25 June 2015. Sapporo. Japan.

- Duchanee, S., Sangpueak, R., Sompong, M., Wongkeaw, S. and Buensanteai, N. (2015b). Molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae* causing cassava stem and root black rot disease in Thailand. **SUT 3th International Colloquium, 14 - 15 September 2015. School of animal production technology.** IAT. SUT. Thailand.
- Farr, D.F. and Rossman A.Y. (2012). **Fungal Databases.** Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. [On-line]. Available: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2015). **Cassava Thailand.** [On-line]. Available: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Appl Environ Microb** 61: 1323-1330.
- Ghissi, V.C., Reis, E.M. and Deuner, C.C. (2014). Etiology of phomopsis root rot in soybean. **Summa Phytopathol.** Botucatu. 40: 270-272.
- Henry, G. and Hershey, C. (2002). Cassava in South America and Caribbean. In **Cassava: Biology, Production and utilization.** CABI Publishing. 17-40.
- Hillocks, R.J. (2002). Cassava in Africa In **Cassava: Biology, Production and utilization.** CABI Publishing. 41-54.
- Hillocks, R.J. and Wydra, K. (2002). Bacterial Fungal and Nematode Diseases. In **Cassava: Biology, Production and utilization.** CABI 2002. 261-280.
- Ikram, A., Hussain, W., Luqman Satti, M. and Amin, M. (2009). Wiqar Invasive infection in a young immunocompetent soldier caused by *Scytalidium dimidiatum* Journal. **Pak. J. Pathol.** 19 (1): 64-66.
- Ismail, A.M., Cirvilleri, G. and Polizzi, G. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology.** 41: 649–660.
- Juboory, A.H.H. and Juber, S.K. (2013). Efficiency of some inoculation methods of *Fusarium proliferatum* and *F.verticilloides* on the systemic infection and seed transmission on maize under field conditions. **Agric. Biol. J. N. Am.** 4(6): 583-589.
- Lacaz, C.S., Pereira, A.D., Heins-Vaccari, E.M., Cuce, L.C., Benatti, R.C. and Nunes, S. (1999). Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*: report of two cases. Review of the

- taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this coelomycete. Sao Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.** 41:319-23.
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchande T., Paramathma M. and Samiyappan R. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. **Australasian Plant Disease Notes.** 4: 19-20.
- Li, G.Q., Arnold, R.J., Liu, F.F., Li, J.Q. and Chen, S.F. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* Species from *Eucalyptus urophylla* X *grandis*, *Polyscias balfouriana* and *Bougainvillea spectabilis* in Southern China. **Journal of Phytopathology.** 163: 956-967.
- Machado, A.R. (2012). Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **M.S. thesis. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa.** Brazil. 57.
- Machado, A.R. and Pereira, O.L. (2012). Major diseases of the biofuel plant, physic nut (*Jatropha curcas*). **Intech. Croatia.** 59-75.
- Machado, A.R., Pinho, D.B., Dutra, D.C. and Pereira O.L. (2012). Collar and root rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in the biofuel plant *Jatropha curcas*. **Plant Dis.** 96:1697
- Machado, A.R., Pinho, D.B., Oliveira, S.A.S. and Pereira, O.L. (2014a). New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology.** 39(6): 464-470.
- Machado, A. R., Pinho, D. B., and Pereira, O. L. (2014b). Phylogeny, Identification and Pathogenicity of The Botryosphaeriaceae Associated with Collar and Root Rot of the Biofuel Plant *Jatropha curcas* In Brazil, with A Description of New species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity.** 67: 231-247.
- Madiha, N., Hata, E. M., Sijam, K. and Othman, R. (2012). Diazotrophic bacteria as biological control agent for *Lasiodiplodia theobromae* isolated from kenaf seeds. **ARNP Journal of Agricultural and Biological Science.** 7: 12.
- Makambila, C. (1994). The fungal disease of cassava in the republic of Congo, **Center Africa. African crop science journal.** 2(4): 511-517.

- Marques, M.W., Lima, N.B. and de Morais, Jr. M.A. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**. 61: 181–193.
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. and Nakanishi, N. (1972). Selection inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. **Phytophthology**. 67: 425–428.
- Messiga, A. J. N. A., Mwangi M., Bandyopadhyay, R. and Nolte, C. (2004). The status of fungal tuber rots as a constraint to cassava production in the Pouma district of Cameroon. **International institute of tropical Agriculture (IITA)**. Cameroon.
- Motokura, Y., Ueda, K., Saito, N. and Saito, Y. (2014). *Lasiodiplodia* Stem rot of cassava caused by *Lasiodiplodia parva* found in import plant quarantine inspection and it's pathogenicity. **Res. Bull. Pl. Prot. Japan**. 50: 53-62.
- Msikita, W., Bissang, B., James, B. D., Baimey, H., Wilkinson, H. T., Ahounou, M., and Fagbemissi, R. (2005). Prevalence and Severity of *Nattrassia mangiferae* Root and stem rot pathogen of cassava In Bénin. **Plant Disease Journal**. 89: 12-16.
- Msikita, W., Yaninek, J.S., Ahounou, M. and Fangbemissi, R. (1996). First report of *Fusarium moniliforme* causing cassava root, stem, and storage rot. **The American phytopathological Society**. St Paul. USA.
- Msikita, W., Yaninek, J. S., Ahounou, M., Baimey, H., and Fagbemissi, R. 1997. First report of *Nattrassia mangiferae* Root and Stem Rot of Cassava, **The American phytopathological Society**, 81: 1332.1.
- Ni, H. and Yang, H. (2012). A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango. **Eur. J. Plant Pathol**. 133:819–828.
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 7: 103-116.
- Oliveira, S.A.S., Hohenfeld, C.S., Santos, V.D.S., Haddad, F. and Oliveira, E.J.D. (2013). Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesq. agropec. Bras**. 48: 1414-1417.
- Onyeka, T.J. (2002). Cassava root rot in Nigeria: Variability in *Botryodiplodia theobromae* isolate and evaluation of cassava germplasm for root rot resistance. **Ph.D. thesis. University of Ibadan. Nigeria**. 168.

- Onyeka, T.J., Dixon, A.G.O. and Ekpo, E.J.A. (2005). Assessment of laboratory method for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. **Mycopathologia**. 159: 461-467.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Gryzenhout, M. and Wingfield, M.J. (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Stud Mycol**. 50: 313-322.
- Pavlic, D., Wingfield, M.J., Barber, P., Slippers, B., Hardy, G.E.St. and Burgess, T.I. (2008). Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**. 100(6): 851–866.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**. 76: 51-167.
- Polizzi, G., Aiello, D., Castello, I. and Vitale, A. (2011). Occurrence, molecular characterisation, and pathogenicity of *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. **Acta Hort**. 892: 237-243.
- Pryor, B.M., Davis, R.M. and Gilbertson, R.L. (2000). A toothpick inoculation method for evaluating carrot cultivars for resistance to *Alternaria radicina*. **HORTSCIENCE**. 35(6): 1099-1102.
- Punithalingam, E. (1976). *Botryodiplodia theobromae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. **Commonwealth Mycological Institute**. Kew. Surrey. England.
- Rebell, G. and Forster, R.K. (1976). *Lasiodiplodia theobromae* as a cause of keratomycoses. **Sabouraudia**. 14: 155-70.
- Richardson, J.E., Fay M.F., Cronk, Q.C., Bowman, D. and Chase, M.W. (2000). A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**. 87: 1309-1324.
- Singh, R. S. (2000). **Diseases of fruit crops**. 1st edition. Science Publishers. Inc. India.
- Summerbell, R.C., Kraiden, S., Levine, R. and Fuksa, M. (2004). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. **Medical Mycology**. 42: 543-547.
- Sutthisa, W. and Sanoamuang, N. (2011). Pathogenicity and Molecular Detection of *Fusarium solani* Form A and B on Root Rot of Mulberry. **KKU Research Journal**. 16(3): 203-214.

- Stevens, N.E. (1925). The life history and relationships of *Diplodia gossypina*. **Mycologia**. 17: 191-201.
- Stevens, N.E. (1926). Two species of physalospora on citrus and other hosts. **Mycologia**. 18: 206-217.
- Sutton, B.C. (1980). The Coelomycetes. **Commonwealth Mycological Institute**. Kew. Surrey. England.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** 30(12): 2725–2729.
- Trakunyingcharoen, T., Cheewangkoon, R. and To-anun, C. (2013). Phylogeny and pathogenicity of fungal species in the family Botryosphaeriaceae associated with mango (*Mangifera indica*) in Thailand. **J. of Agr. Tech.** 9: 1535–1543.
- Trakunyingcharoen, T., Cheewangkoon, R. and To-anun, C. (2015a). Phylogenetic Study of the Botryosphaeriaceae Species Associated with Avocado and Par rubber in Thailand. **Chiang Mai J. Sci.** 42(1): 104-116.
- Trakunyingcharoen T, Cheewangkoon, R., To-anun, C., Crous, P.W., van Niekerk, J.M. and Lombard, L. (2014). *Botryosphaeriaceae* associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). **Australasian Plant Pathology**. 43: 425–438.
- Trakunyingcharoen, T., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., To-anun, C. and Crous, P.W. (2015b). Caulicolous *Botryosphaeriales* from Thailand. **Persoonia**. 34: 87–99.
- Veltkamp, H.J. and de Bruijin, G.H. (1996). *Manihot esculenta* Cratz. In Plant Resources of South-East Asia. **Backhugs Publishing. Leiden**. 107-113.
- Von Arx, J.A. (1970). The genera of fungi sporulating in pure culture. **Lehre. J. Cramer**. 288.
- Xavier, A.P.M., Oliveira, J.C., Ribeiro, V.L.S. and Souza, M.A.J. (2010). Epidemiological Aspects of Patients with Ungual and Cutaneous Lesions Caused by *Scytalidium spp.* **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 85(6): 805-810.



ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1.1 Water Agar (WA)

วุ้นผง (Agar)	18 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง นำไปต้มจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะ เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 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. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา

2.1 1% Agarose gel (100 ml)

Agarose gel	1.00 กรัม
1x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

2.2 1.5% Agarose gel (100 ml)

Agarose gel	1.50 กรัม
1x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

2.3 TE Buffer (1000 ml)

Tris-HCL	1.211 กรัม
EDTA	9.306 กรัม

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

2.5 1x TBE Buffer (1000 ml)

10x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร
น้ำ DI นึ่งฆ่าเชื้อ	900 มิลลิลิตร

2.6 Extraction Buffer (100 ml)

2% 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)

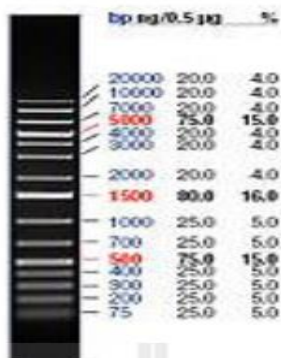
Chloroform	48 มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	2 มิลลิลิตร

2.8 70% ethanol

2.9 Absolute ethanol

Absolute ethanol แช่เย็นอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปใช้

3. DNA size marker

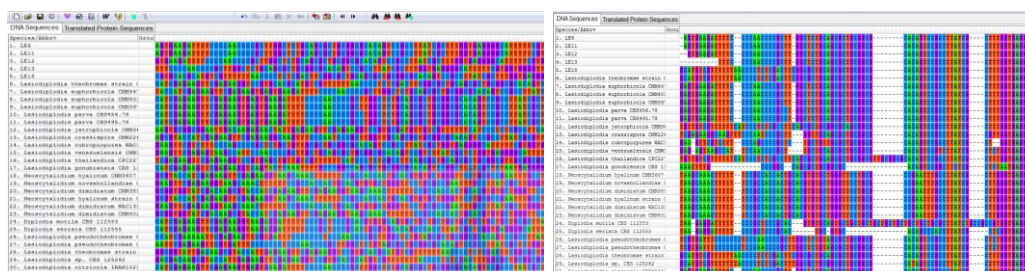


1 Kb DNA Ladder visualization by ethidium bromide staining on 1% agarose gel. Mass values are for 0.5 µg/lane

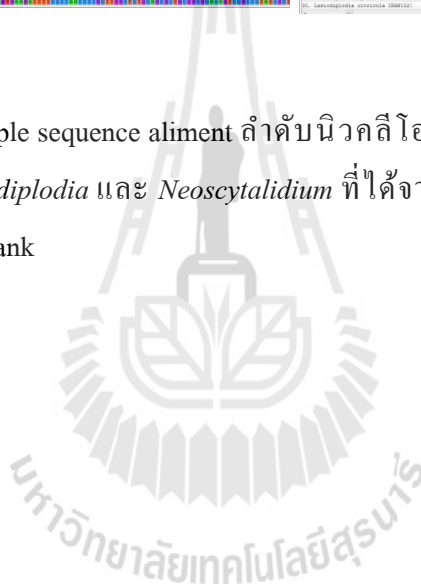


ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

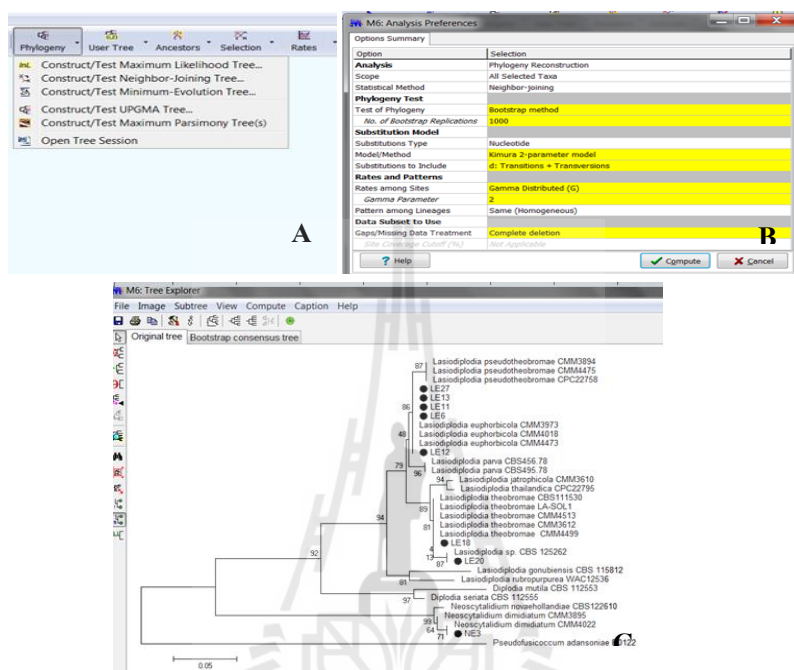
1. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ได้จากการทดลองและจากฐานข้อมูล Genbank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W ดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ 2



ภาพภาคผนวกที่ 1 Multiple sequence alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* และ *Neoscytalidium* ที่ได้จากการทดลองและจากฐานข้อมูล Genbank

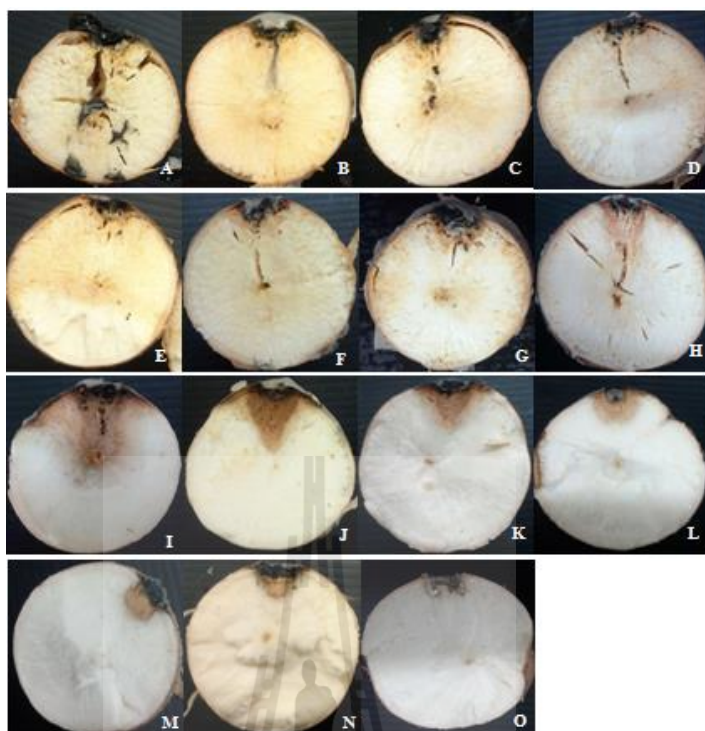


2. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยการ สร้างแผนภูมिवิวัฒนาการต้นไม้ ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ 2 กำหนดค่าความเชื่อมั่น (bootstrap analysis) ให้มีค่าเท่ากับ 1000 ดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ 3 (B) ปรากฏแผนภูมिवิวัฒนาการ ดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ 3 (C)

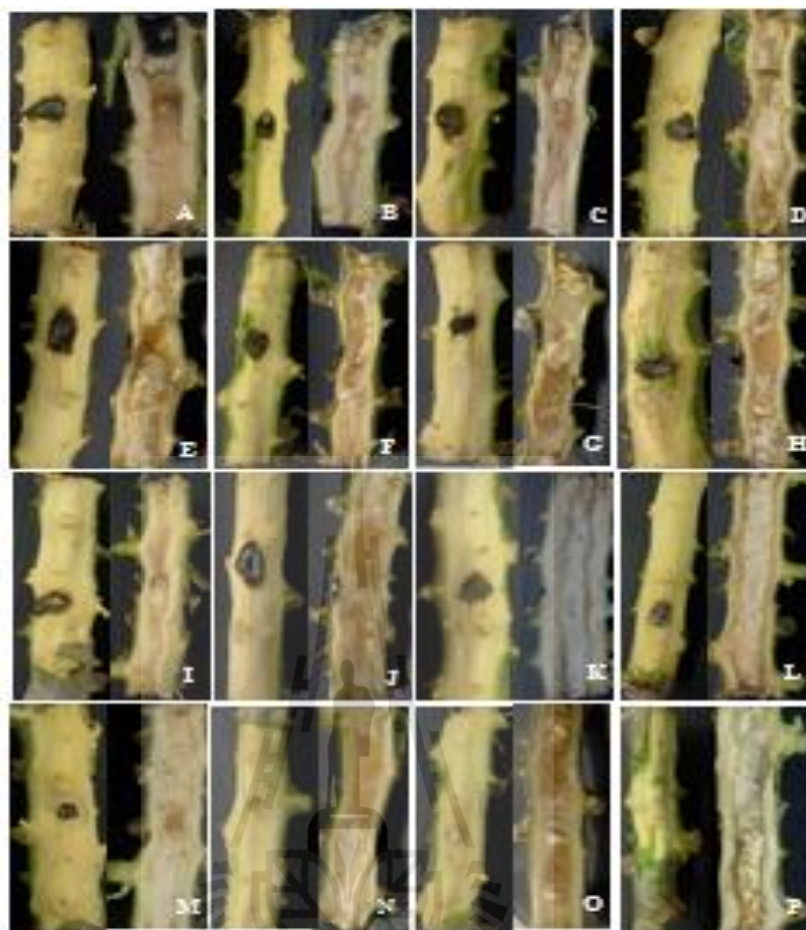


ภาพภาคผนวกที่ 2 วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และ สร้างแผนภูมिवิวัฒนาการต้นไม้ ด้วยโปรแกรม MEGA 6





ภาพภาคผนวกที่ 3 ลักษณะของหัวมันสำปะหลังที่หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการหัวเน่าซ้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลง บริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลดำถึงดำและแห้ง ส่วนบริเวณรอบๆเปลี่ยนสีเป็นเหลืองถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและออกจากกัน (A) ไอโซเลต L11HSR2 (B) ไอโซเลต L20FHTB1 (C) ไอโซเลต L12SHRD และ L27SRBT (D) ไอโซเลต L22HRW (E) ไอโซเลต L13SRTF L17STRB และ L19KBSh2 (F) ไอโซเลต L6HRD (G) ไอโซเลต L8HDBB, L21SRE L25SRC และ L28SBB (H) ไอโซเลต L2SHSR1, L3BSR และ L24HRWH (I) ไอโซเลต L1STRM ,L9STR2 และ N1SR TTC (J) ไอโซเลต L10BBLB, L16BLSR, L18KBSh3 N2SHCA และ N4BBPM (K) ไอโซเลต L4STR1, L7STRW, L26HRWB, N3DTD2 และ N5STRST (L) ไอโซเลต L5KBSh1 (M) ไอโซเลต L15HDBB และ L14LSR (N) ไอโซเลต L23STWH (O) หัวมันสำปะหลังที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (Control) ไม่แสดงอาการของโรค



ภาพภาคผนวกที่ 4 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบๆบริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้นถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำเทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L11HSR2 (B) ไอโซเลต L3BSR, L12SHRD, N1SR TTC, N3DTD2 และ N4BBPM (C) ไอโซเลต L4STR1 (D) ไอโซเลต L14LSR L21SRE และ L27SRBT (E) ไอโซเลต L9STR2 และ L15HDBB (F) ไอโซเลต L2SHSR1 L13SR TF และ N5STRST (G) ไอโซเลต N2SHCA (H) ไอโซเลต L1STRM (I) ไอโซเลต L10BBLB (J) ไอโซเลต L24HRWH (K) ไอโซเลต L8HDBB และ L22HRW (L) ไอโซเลต L17STRB และ L23STWH (M) ไอโซเลต L6HRD L7STRW และ L20FHTB1 (N) ไอโซเลต L5KB SH1 L19KB SH2 และ L28SBB (O) ไอโซเลต L18KB SH3 (P) ท่อนมันสำปะหลังที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (Control) ไม่แสดงอาการของโรค



ภาพภาคผนวกที่ 5 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 45 วันในสภาพโรงเรือน แสดงอาการต้นแห้งตาย ไม่เจริญเติบโต เจริญเติบโตช้า เนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น และบริเวณเนื้อไม้ถูกทำลาย เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L1HSR2 และ N1SRTTC (B) ไอโซเลต L2SHSR1 (C) ไอโซเลต L1STRM L3BSR และ N3DTD2 (D) ไอโซเลต L7STRW และ N4BBPM (E) ไอโซเลต L6HRD (F) ไอโซเลต N5STRST (G) ไอโซเลต L9STR2 (H) ไอโซเลต L12SHRD (I) ไอโซเลต L13SRTF และ N2SHCA (J) ไอโซเลต L19KBSH2 (K) ไอโซเลต L8HDBB (L) ไอโซเลต L20FHTB1 (M) ไอโซเลต L18KBSH3 (N) ไอโซเลต L14LSR (O) ไอโซเลต L4STR1 L10BBLB L15HDBB L21SRE และ L23STWH (P) ไอโซเลต L17STRB (Q) ไอโซเลต L22HRW (R) ไอโซเลต L5KBSH1 L16BLSR L24HRWH L25SRC L26HRWB L27SRBT และ L28SBB (S) ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (Control) ไม่แสดงอาการของโรค



ภาพภาคผนวกที่ 6 แสดงลักษณะของหัวมันสำปะหลังโดยปลูกแนวตั้ง (A) กรรมวิธีควบคุม (B) ปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา (C) ปลูกเชื้อด้วยไม้จิ้มฟัน (D) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกด้วยอัตราส่วน 1:100 (E) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกอัตราส่วน 1:1,000 (F) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกอัตราส่วน 1:10,000



ภาพภาคผนวกที่ 8 แสดงลักษณะของหัวมันสำปะหลังโดยปลูกแนวนอน (A) กรรมวิธีควบคุม (B) ปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ในสารแขวนลอยของเส้นใยเชื้อรา (C) ปลูกเชื้อด้วยไม้จิ้มฟัน (D) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกด้วยอัตราส่วน 1:100 (E) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกอัตราส่วน 1:1,000 (F) ผสมเชื้อลงในดินก่อนปลูกอัตราส่วน 1:10,000



ภาคผนวก ง

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. บริเวณ Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene (ITS), Translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) และ beta-tubulin (β t) โดยพื้นฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Sequence ID: gb| KT325568.1|Length: 532 Number of Matches: 1 *Lasiodiplodia euphorbicola* strain CMM4473 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: 7 to 457 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
833 bits(451)	0.0	451/451(100%)	0/451(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  AGGTTTCGTCGGGCGGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGTATTCTACTACGCTTGA 60
Sbjct 457 AGGTTTCGTCGGGCGGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGTATTCTACTACGCTTGA 398
Query 61  GGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAAT 120
Sbjct 397  GGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAAT 338
Query 121 TCCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAA 180
Sbjct 337  TCCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAA 278
Query 181  GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT 240
Sbjct 277  GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT 218
Query 241  ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT 300
Sbjct 217  ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT 158
Query 301  TAGTTTATTAACCTGTTTATCAGAGCTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGTCCCTTT 360
Sbjct 157  TAGTTTATTAACCTGTTTATCAGAGCTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGTCCCTTT 98
Query 361  GGGCGCCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTCACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCCG 420
Sbjct 97  GGGCGCCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTCACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCCG 38
Query 421  AAGCTCGAAAACTCGGTAATGATCCTTCCGC 451
Sbjct 37  AAGCTCGAAAACTCGGTAATGATCCTTCCGC 7

```

ภาพภาคผนวกที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อ *L. euphorbicola* ไอโซเลต CMM4473 กับเชื้อรา *L. euphorbicola* ไอโซเลต L11HSR2 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

Sequence ID: gb|KT325581.1|Length: 515 Number of Matches: 1 *Lasiodiplodia euphorbicola* strain CMM4473 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds

Range 1: 25 to 499 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
878 bits(475)	0.0	475/475(100%)	0/475(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AGTGAAGATTTTCCCAACCCCGCTTGGCTCTGCAGCGCTGCGGGCCACAGTCCGCCTTA 60
Sbjct 25  AGTGAAGATTTTCCCAACCCCGCTTGGCTCTGCAGCGCTGCGGGCCACAGTCCGCCTTA 84
Query 61  TCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTTCGTGGTGGGGTTTGGCCCGCGCTAGCCTCGTCTGGGT 120
Sbjct 85  TCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTTCGTGGTGGGGTTTGGCCCGCGCTAGCCTCGTCTGGGT 144
Query 121  TCGGCAAAATGACCGCACTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 180
Sbjct 145  TCGGCAAAATGACCGCACTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 204
Query 181  CTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTCTGACGAGCAAAGGCTAACGCGCCCC 240
Sbjct 205  CTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTCTGACGAGCAAAGGCTAACGCGCCCC 264
Query 241  ACTACAGGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGATCCTCAAGTACGCTGGGTCTTGACA 300
Sbjct 265  ACTACAGGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGATCCTCAAGTACGCTGGGTCTTGACA 324
Query 301  AGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGA 360
Sbjct 325  AGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGA 384
Query 361  CCCCGAAGTACTATGTACCGTATCGACGCCCGGGTACCCGTGACTTCATCAAGAACA 420
Sbjct 385  CCCCGAAGTACTATGTACCGTATCGACGCCCGGGTACCCGTGACTTCATCAAGAACA 444
Query 421  TGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATATTGCCCGCGGTAC 475
Sbjct 445  TGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATATTGCCCGCGGTAC 499

```

ภาพภาคผนวกที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α ของเชื้อ *L. euphorbicola* ไอโซเลต CMM4473 กับเชื้อรา *L. euphorbicola* ไอโซเลต L6HRD ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sequence ID: gb|KM401971.1|Length: 521 Number of Matches: 1 *Lasiodiplodia theobromae* strain LA-SOL1 elongation factor 1-alpha gene, partial cds

Range 1: 43 to 521 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
885 bits(479)	0.0	479/479(100%)	0/479(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CGTGACGCATGTCGTTTTTTAACCCTCTCGACTTCGGCGCTGCAGCGCTGCGGCGCAC 60
Sbjct 43  CGTGACGCATGTCGTTTTTTAACCCTCTCGACTTCGGCGCTGCAGCGCTGCGGCGCAC 102
Query 61  AGTCCGCCTTATCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTCGTGGTGGGGTTTGGCCGCGCTAGC 120
Sbjct 103  AGTCCGCCTTATCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTCGTGGTGGGGTTTGGCCGCGCTAGC 162
Query 121  CTCGTCTGGGTTTCGGCAAATGACCGCACTTGGTTTTTTCGACCGCGCTGCGCGAC 180
Sbjct 163  CTCGTCTGGGTTTCGGCAAATGACCGCACTTGGTTTTTTCGACCGCGCTGCGCGAC 222
Query 181  GCGCCTCCCCACTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTGTACGAGCAAAGGC 240
Sbjct 223  GCGCCTCCCCACTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTGTACGAGCAAAGGC 282
Query 241  TAACGCGCCCACTACAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTGG 300
Sbjct 283  TAACGCGCCCACTACAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTGG 342
Query 301  GTTCTTGACAAGCTTAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGG 360
Sbjct 343  GTTCTTGACAAGCTTAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGG 402
Query 361  AAGTTCGAGACCCCGAAGTACTATGTCACCGTCATCGACGCCCGGTACCGTGACTTC 420
Sbjct 403  AAGTTCGAGACCCCGAAGTACTATGTCACCGTCATCGACGCCCGGTACCGTGACTTC 462
Query 421  ATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATATTGCCGC 479
Sbjct 463  ATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATATTGCCGC 521

```

ภาพภาคผนวกที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α ของเชื้อ *L. theobromae* ไอโซเลต LA-SOL1 กับเชื้อรา *L. theobromae* ไอโซเลต L18 KBSH3 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sequence ID: gb| GQ471779.1|Length: 749 Number of Matches: 1 *Lasiodiplodia* sp. CBS 125262

isolate CMW26710 elongation factor 1-alpha gene, partial sequence

Range 1: 25 to 520 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
909 bits(492)	0.0	495/496(99%)	1/496(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  TTCGAG-AGGTCCTGCACGCATGTCGTTTTACCCCTCTCGACTTTGGCGCTGCGGC 59
Sbjct 25  TTCGAGAAAGGTCCTGCACGCATGTCGTTTTACCCCTCTCGACTTTGGCGCTGCGGC 84
Query 60  GCTGCGGCGCATAGTCCGCCTTATCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTCGTGGTGGGGTTTG 119
Sbjct 85  GCTGCGGCGCATAGTCCGCCTTATCGCTTTGGTGAGGGGCATTTTCGTGGTGGGGTTTG 144
Query 120  GCCCGCGCTAGCCTCGTCTGGGTTGCGCAAAATGACCGCACTTGGTTTTGCGACCGG 179
Sbjct 145  GCCCGCGCTAGCCTCGTCTGGGTTGCGCAAAATGACCGCACTTGGTTTTGCGACCGG 204
Query 180  CGTCTGGCCGACGCGCCTCCCACTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTCGT 239
Sbjct 205  CGTCTGGCCGACGCGCCTCCCACTAGCGAAAAATGCTCTGACCACTCATGTACCGTCGT 264
Query 240  ACGAGCAAAGACTAACGCGCCCACTACAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTC 299
Sbjct 265  ACGAGCAAAGACTAACGCGCCCACTACAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTC 324
Query 300  AAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGAC 359
Sbjct 325  AAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGAC 384
Query 360  ATTGCCCTCTGGAAGTTGAGACCCGAACTACTATGTCACCGTCATCGACGCCCGGGT 419
Sbjct 385  ATTGCCCTCTGGAAGTTGAGACCCGAACTACTATGTCACCGTCATCGACGCCCGGGT 444
Query 420  CACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTC 479
Sbjct 445  CACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATTCTC 504
Query 480  ATCATTGCCGCGCGTA 495
Sbjct 505  ATCATTGCCGCGCGTA 520

```

ภาพภาคผนวกที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α ของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ไอโซเลต CBS 125262 กับเชื้อรา *Lasiodiplodia* ไอโซเลต L20FHTB1 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sequence ID: gb|KF553902.1|Length: 737 Number of Matches: 1 *Neoscytalidium dimidiatum* strain 282 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds

Neoscytalidium dimidiatum strain 282 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds
Sequence ID: [gb|KF553902.1](#) Length: 737 Number of Matches: 1

Range 1: 49 to 527 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
885 bits(479)	0.0	479/479(100%)	0/479(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AACTTTTTCCGCCACCACTGCACGTGTGCTGGGTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGC 60
Sbjct 49  AACTTTTTCCGCCACCACTGCACGTGTGCTGGGTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGC 108
Query 61  TTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGTTGGCCCGCGCTAGGCCTCGTTCGGTCTTCGG 120
Sbjct 109  TTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGTTGGCCCGCGCTAGGCCTCGTTCGGTCTTCGG 168
Query 121  CAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTGGACCCGGCGTGCACCGACACGCGCCTCCTAGCG 180
Sbjct 169  CAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTGGACCCGGCGTGCACCGACACGCGCCTCCTAGCG 228
Query 181  TCGCTTGACGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGA 240
Sbjct 229  TCGCTTGACGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGA 288
Query 241  AGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTACGCTTGGGTCCTTGACAAGCTCAAGGC 300
Sbjct 289  AGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTACGCTTGGGTCCTTGACAAGCTCAAGGC 348
Query 301  TGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTGAGACCCCGAAGTA 360
Sbjct 349  TGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTGAGACCCCGAAGTA 408
Query 361  CTATGTCACCGTCATCGACGCCCCGGTCAACGTCATCAAGAATGATCACTGG 420
Sbjct 409  CTATGTCACCGTCATCGACGCCCCGGTCAACGTCATCAAGAATGATCACTGG 468
Query 421  TACCTCCAGGGCGACTGCGCTATTCTCATATTGCTGCCGTAAGTGGTGGTTCGAGG 479
Sbjct 469  TACCTCCAGGGCGACTGCGCTATTCTCATATTGCTGCCGTAAGTGGTGGTTCGAGG 527

```

ภาพภาคผนวกที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- α ของเชื้อ *N. dimidiatum* ไอโซเลต 282 กับเชื้อรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต N3DTD2 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sequence ID: gb| KF254926.1|Length: 417 Number of Matches: 1 *Lasiodiplodia euphorbicola* strain CMM3609 beta-tubulin gene, partial cds

Range 1: 38 to 417 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
366 bits(198)	2e-97	323/383(84%)	9/383(2%)	Plus/Plus

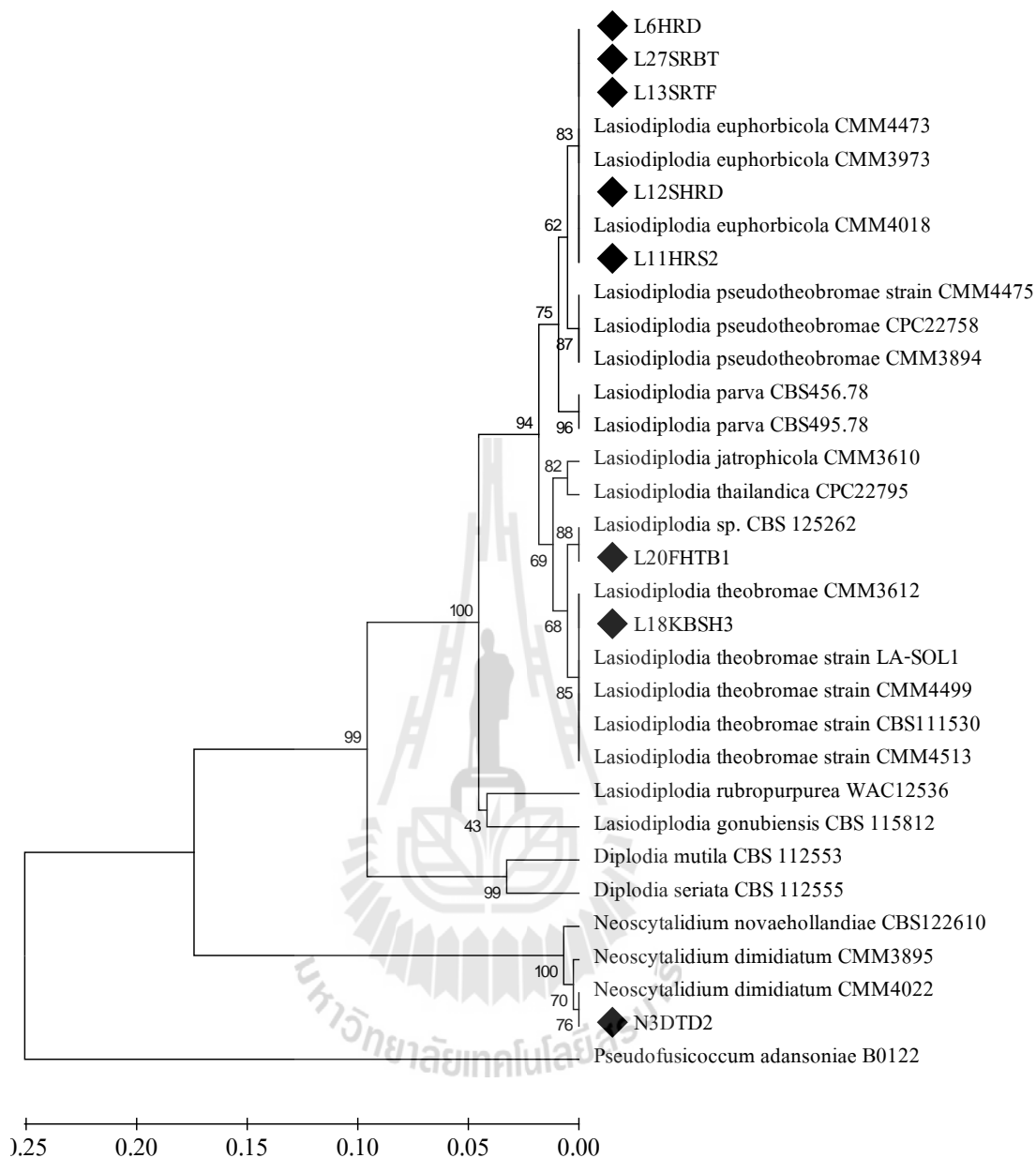
```

Query 1  CTGACGGATGCGATGCC-TAGGCAGA-AATCTCTGGCGA-CGCGGCCTGGAGGGCTCCTG 57
Sbjct 38  CTGACGGAAGCGACACCATAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCAGCGCCTGGATGGCTCCGG 97
Query 58  CGTGT-TGTGTGCGCCTTCTCCGCCGCGCATCGCAATCGTTATACTCGCTGACA-CTACA 115
Sbjct 98  TGTGTAAGTGTGCGCCTTCTCCGCCGCGCATCGCAATCGCTG-ACCCGTAG-CAGCTACA 155
Query 116 ATGGCACCCGAAGCTCCATCTGAACCTCCATGAGCATCTACTTCACCTATATATTCTCTA 175
Sbjct 156 ATGGCACCTCGGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTAAGTCTCTC 215
Query 176  AGTAATGAGATGAACACGTAAAGTATGGCAATCTTCTAAACGCACACTAAGCGTCCAACA 235
Sbjct 216  AATAATTAGACAAACCGTAAAGTATGGCAATCTTCTGAACGCGCAGCAGGGCTCCAACA 275
Query 236  ACTTGTACGTTCCCTCGTGCTGTCCTCATCAACTTCCAGCCGGGGACCATGGATGCC-TCC 294
Sbjct 276  ACAAGTACGTTCCCTCGTGCTGTCCTCGTCGACCTCGAGCCGGGCACCATGGATGCCGTCC 335
Query 295  AGCCCCGGCCCCCTTCCAGCCAGCTTTCGCCCCCACTTTCGTTTCGGCCAGTCTGGT 354
Sbjct 336  -GCGCCGGCCCCCTTCCAGCCAGCTTTCGCCCCCACTTTCGTTTCGGCCAGTCTGGT 394
Query 355  GCCTGTAACAACCTGGGCCAAGGG 377
Sbjct 395  GCCGGTAACAACCTGGGCCAAGGG 417

```

ภาพภาคผนวกที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Bt ของเชื้อ *L. euphorbicola* ไอโซเลต CMM3609 กับเชื้อรา *L. euphorbicola* ไอโซเลต L6HRD ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพภาคผนวกที่ 13 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นและรากเน่า
 ค้ำมันสำปะหลัง ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ elongation
 factor 1-alpha (EF1- α) ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 กำหนดค่า
 bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000



ภาพภาคผนวกที่ 14 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นและรากเน่า ค้ำมันสำปะหลัง ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ elongation factor 1-alpha (EF1- α) ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุทธิสรา ดัชนีชัย เกิดเมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2532 ณ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ ได้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เมื่อปี พ.ศ. 2555 โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุน

ในปี พ.ศ. 2556 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย และทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก

