การศึกษาเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลังโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางชีวโมเลกุล

Identification of the Causal Agents of Cassava Stem and Root Rot Diseases Based on their Morphological Characteristics and Molecular Data

พรพิมล อธิปัญญาคม[1/*] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[2/] ชนินทร ดวงสอาด[2/] อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[2/]

Pornpimon Athipunyakom[1/*] Suneerat Seemadua[2/] Chanintorn Doungsa-ard[2/] Amonrat Kitjaideaw[2/]

Received 07 Oct 2019/Revised 29 Oct 2019/Accepted 05 Nov 2019

ABSTRACT

Stem and root rot diseases were reported on cassava in Thailand. This study was conducted to identify the causal agents of cassava stem and root rot, occurred in Muak Lek district, Saraburi province; Khon Buri, Soeng Sang and Pak Chong districts, Nakhon Ratchasima province and Aranyaprathet district, Sa Kaeo province. Twenty seven stem and root rot specimens were collected from reported plantations from April 2015 to September 2016. The stem and root rot symptoms were classified into four groups namely, stem and root rot, dried root rot, black root rot and root rot. The identification of causal agent of stem and root rot disease was based on its morphological characteristics and molecular data of ITS region. The ML phylogenetic reconstruction showed that the causal agent, of stem and root rot disease was *Phytophthora melonis*. On the other hand identification results of the causal agents of dried root rot, black root rot and root rot diseases based on morphological data showed that they were *Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum* and *Fusarium* sp., respectively. The above mentioned fungi isolated from four symptoms had been confirmed of their pathogenicity to cassava by Koch's postulates procedure. The isolated *Phytophthora melonis, S. rolfsii, N. dimidiatum* and *Fusarium* sp. were inoculated on to cassava seedlings. It was found that the cassava seedlings inoculated with P. *melonis, S. rolfsii, N. dimidiatum* showed disease symptoms after 15 days of inoculation. However, cassava seedling inoculated with *Fusarium* sp. showed no symptom. We concluded that *P. melonis, S. rolfsii* and *N. dimidiatum* were the causal agents of stem and root rot, dried root rot and black root rot, respectively.

Key words: stem and root rot, cassava, *Phytophthora melonis, Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum*

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

Plant protection research and development office, Department of agriculture, Bangkok, 10900

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

Plant pathology research group, Plant protection research and development office, Department of agriculture, Bangkok, 10900

* Corresponding author : pathipanyakom@gmail.com

บทคัดย่อ

จากการรวบรวมและเก็บตัวอย่างอาการโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลัง ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการโรคที่ ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ครบุรี อ.เสิงสาง และอ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา และ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ระหว่างเดือนเมษายน 2558 – เดือนกันยายน 2559 พบลักษณะอาการที่แสดง 4 ลักษณะ ได้แก่ อาการโคนเน่าและรากเน่า อาการรากเน่าแห้ง อาการรากเน่าดำ และอาการรากเน่า จากการศึกษาเชื้อสาเหตุอาการโคนเน่าและรากเน่า โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ข้อมูล DNA ของตำแหน่ง ITS ของรา *Phytophthora* ด้วย maximum likelihood เมื่อจัดจำแนกโดยใช้ phylogenetic clade พบว่า รา *Phytophthora* จำนวน 19 ไอโซเลต จัดอยู่ใน clade เดียวกับรา ex-type ของรา *Phytophthora melonis* จากการจำแนกเชื้อราจากตัวอย่าง อาการรากเน่าแห้ง อาการรากเน่าดำ และอาการหัวเน่า โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดราที่สามารถจำแนกได้ คือ *Sclerotium rolfsii Neoscytalidium dimidiatum* และ *Fusarium* sp. ตามลำดับ การทดสอบการทำให้เกิดโรคของรา *Phytophthora melonis, Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum* และ *Fusarium solani* พบว่า รา *Phytophthora melonis Sclerotium rolfsii* และ *Neoscytalidium dimidiatum* ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อนำมาแยกเชื้ออีกครั้งก็พบเชื้อสาเหตุเดิมทั้ง 3 ชนิด จึงสรุปได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิด เป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าและรากเน่ามันสำปะหลัง ขณะที่รา *Fusarium* sp. พบว่า ไม่ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังแสดงอาการโรค

คำสำคัญ: โรคโคนเน่าและรากเน่า, มันสำปะหลัง, *Phytophthora melonis Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum*

บทนำ

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตและส่งออกหลักของอาเซียนและตลาดโลก โดยเป็นผู้ส่งออกเป็นอันดับ 1 และเป็นผู้ผลิตอันดับ 2 ของโลก และยังเป็นผู้ผลิตอันดับ 1 ของอาเซียนด้วย สำหรับประเทศไทยเกษตรกรนิยมปลูกกันมาก โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก เพราะมีพื้นที่และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดที่ปลูกมาก ได้แก่ นครราชสีมา ชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี และชัยภูมิ พื้นที่เพาะปลูกของ 5 จังหวัด รวมกันแล้วคิดเป็น 55% ของพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังประมาณ 8.7 ล้านไร่ ซึ่งลดลงจากปี พ.ศ. 2556 ประมาณ 3 แสนไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกมากที่สุด รองลงมา คือ ภาคกลาง และภาคเหนือ ในปี 2558 จ.นครราชสีมา มีพื้นที่ปลูก 1,549,206 ไร่ และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ 5,922,085 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2558; 2561)

ในปัจจุบัน พบว่า สาเหตุที่ทำให้พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทยลดลงอย่างต่อเนื่องทุก ๆ ปี เนื่องจากพื้นที่ปลูกถูกเปลี่ยนเป็นพื้นที่อุตสาหกรรม เกษตรกรเปลี่ยนพืชปลูก และสาเหตุที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังและผลผลิตลดลงไปจนเกิดความเสียหาย คือ การเข้าทำลายของแมลงศัตรู และโรคของมันสำปะหลัง โดยพบว่า ในปี พ.ศ. 2557 มีการระบาดของโรคมันสำปะหลังที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ โรคโคนเน่าและรากเน่า โรครากปม และอาการแตกพุ่มแจ้ของมันสำปะหลัง แต่ในปี 2556 รังษี และคณะ (2556) รายงานว่า สาเหตุโรครากและหัวเน่าของมันสำปะหลังในพื้นที่ อ.นิคมพัฒนา จ.ระยอง บนตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่แสดงอาการเหี่ยวเขียวและรากเน่าเกิดจากเชื้อสาแหตุ *Phytophthora meadii* นอกจากนั้น การสำรวจยังพบการระบาดของรา *Sclerotium rolfsii* ที่เข้าทำลายหัวด้วย ต่อมาในปี 2557 Charaensatapon *et al*., (2014)

ศึกษาการระบาดของโรครากเน่า-หัวเน่าของมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora melonis* พบว่า สร้างความเสียหายต่อผลผลิตถึง 80-100% ในพื้นที่ดินเหนียว ดินร่วนปนทราย และในสภาพดินที่มีน้ำขัง

ที่ประเทศบราซิล ปัญหาที่สำคัญของการผลิตมันสำปะหลังของประเทศ คือ ปัญหาเรื่องการระบาดของโรครากเน่าของมันสำปะหลัง ซึ่งมีผลทำให้ผลผลิตลดลงเป็นจำนวนมาก ในปี 2013-2015 Oliveira *et al*., (2016) ได้ทำการสำรวจโรครากเน่าของมันสำปะหลังในประเทศบราซิล และแยกเชื้อได้ทั้งหมดจำนวน 110 ไอโซเลต และนำมาศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่า รา *Phytophthora melonis* เป็นสาเหตุโรครากเน่าของมันสำปะหลังในเขตภาคเหนือของประเทศบราซิล และมีรายงานพบรา *Phytophthora* spp. อีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าของมันสำปะหลัง ได้แก่ *Phytophthora tropicalis*, *P. melonis*, *P. nicotianae*, *P. cryptogea,* และ*P. erythroseptica* (Alvarez *et al*., 2002) นอกจากนี้ ยังพบการระบาดของโรครากดำ (cassava black root rot) ในรัฐ Maranhao และ Paraiba ในประเทศบราซิล เชื้อราจะเข้าทำลายราก ทำให้เกิดอาการรากดำ และได้จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อราสาเหตุอยู่ใน Family Botryosphaeriaceae หลายชนิด ได้แก่ *Lasiodiplodia euphorbicola, Lasiodiplodia pseudotheobromae* และ *Neoscytalidium hyalinum* รายงานนี้เป็นรายงานแรกของโลกที่พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นสาเหตุของโรครากดำของมันสำปะหลัง (Machado *et al*., 2014)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลังในประเทศ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของราใน GenBank และการทดสอบการเกิดโรคเพื่อยืนยันสาเหตุของอาการของโรคที่แท้จริงจะได้หาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมและเก็บตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลังที่แสดงอาการโคนเน่าและหัวเน่าและดินโดยรอบต้นที่แสดงอาการ

เก็บตัวอย่างโรคมันสำปะหลัง ได้แก่ ลำต้น ราก และดิน จากแหล่งปลูกมันสำปะหลัง โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ครบุรี อ.เสิงสาง และ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา และ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ระหว่างเดือนเมษายน 2558 – เดือนกันยายน 2559 เก็บตัวอย่างลำต้นบริเวณรอยต่อระหว่างรอยแผลของโรคและส่วนปกติของพืช สำหรับรากต้องเก็บทั้งรากที่เป็นแผลและรากปกติ ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ห่อแต่ละตัวอย่าง และใส่ถุงพลาสติก บันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ จากนั้น แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกจะนำไปแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ และส่วนที่สองจะเก็บเป็นตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนที่เป็นโรคบาง ๆ ตากให้แห้ง วางตัวอย่างบนกระดาษหนังสือพิมพ์หรือกระดาษฟาง พร้อมใบบันทึกข้อมูลของตัวอย่าง วางกระดาษหนังสือพิมพ์ทับลงบนตัวอย่าง จากนั้น วางตัวอย่างที่ทำเสร็จแล้วระหว่างกรอบไม้อัดตัวอย่าง รัดให้แน่น เปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์หรือกระดาษฟางทุกวันเป็นเวลา 5-10 วัน ใส่ตัวอย่างที่แห้งแล้วลงในซองกระดาษบางใส สอดซองกระดาษที่บรรจุตัวอย่างลงในซองกระดาษแข็ง ซองกระดาษแข็งบรรจุตัวอย่างมีข้อมูลของตัวอย่างกำกับบนหน้าซอง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อสาเหตุ

2.1 แยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรคของมันสำปะหลังโดยวิธี Tissue transplanting

แยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรคของมันสำปะหลัง โดยตัดตัวอย่างโรคพืชบริเวณเป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2 x 2 มล. ฆ่าเชื้อที่ผิวพืช โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลาย

โซเดียมไฮโปร์คลอไรด์ 5% เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2°ซ. เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุต่อไป

2.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดินโดยการใช้เหยื่อล่อ (bating)

นำตัวอย่างดินมาใส่น้ำ และใส่กลีบดอกแพงพวยขนาด 0.5 x 0.5 ซม. ลงไป ทิ้งไว้ 1-3 วัน แล้วนำกลีบดอกแพงพวยมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และนำชิ้นส่วนของกลีบดอกแพงพวยที่แช่ในน้ำมาซับให้แห้งด้วยกระดาษซับเนื้อเยื่อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้น นำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RNV หรือ BNPRH (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย benomyl 10 ppm., nystatin 25 ppm., PCNB 25 ppm., rifampicin 10 ppm., ampicillin 5,000 ppm., hymexazal 25-50 ppm. โดยมี PDA เป็น basal medium) บ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2°ซ. เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัดส่วนปลายเส้นใยราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างกลีบดอกแพงพวย วางลงบนอาหาร V8 และ PDA

3. การศึกษาเชื้อราสาเหตุอาการโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลัง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราที่แยกได้จากลักษณะอาการของโรคแบบต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ นำลักษณะของราดังกล่าวเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดราใน Class Conidial Ascomycetes Basidiomycetes และ Oomycetes ที่ใช้กันทั่วไป Punja and Damiani (1996), Sutton (1980), Punja (1985), Leslie and Summerell (2006), Ho *et al*., (2007), Gallegly and Hong (2008), Chuang *et al*., (2012), Masratul *et al*., (2013), Machado *et al*., (2014).

3.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรากลุ่ม Phythopthora

<u>การสกัด DNA</u>

ทำการสกัด DNA จากเส้นใยของราโดยใช้วิธี CTAB ของ Doyle and Doyle (1987) ดังนี้ เตรียมเส้นใยของรา นำมาบดใน microtube ที่บรรจุ CTAB buffer 600 ไมโครลิตร ด้วย microtube pestle และบ่ม microtube ที่อุณหภูมิ 65°ซ. นาน 20 นาที เติม $CHCl_3$:IAA (24:1) จำนวน 600 ไมโครลิตร พลิก microtube กลับไปมา จากนั้นนำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 5 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนย้ายลงในหลอด microtube หลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol พลิก microtube กลับไปมา จากนั้น นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ -20°ซ. นาน 20 นาที และนำมาปั่นให้ DNA ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 15 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้น เติม TE buffer 30 ไมโครลิตร เพื่อให้ DNA ที่ตกตะกอนละลาย แล้วเก็บ microtube ที่บรรจุ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. หรือนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

<u>PCR amplification และ DNA sequencing</u>

Nuclear DNA ของราถูกนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยทำปฏิกิริยาตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS5 และ ITS4 (White *et al.*, 1990) ด้วย *Taq* DNA polymerase ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้ คือ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96°ซ. นาน 2 นาที Denaturation ที่อุณหภูมิ 96°ซ. นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 53°ซ.

นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. นาน 1.30 นาที และFinal extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. นาน 10 นาที จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis และตรวจดูภายใต้แสง ultraviolet (UV) transilluminator ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะส่งไป Macrogen Korea เพื่อทำ purification และ direct sequencing

Phylogenetic analysis

นำชุดข้อมูล sequence ของตำแหน่ง ITS ที่ได้มาทำ consensus sequence หรือ contig ในรูปไฟล์ fasta โดยใช้โปรแกรม Geneious 8.0 (Biomatters Limited) จากนั้นทำ alignment ของ sequence ของราที่ศึกษา และ sequence ของราจาก Genbank ซึ่งใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Cooke *et al*., (2000); Scanu *et al*., (2014) และ Oliveira *et al*., (2016) (Table 2) ด้วยโปรแกรม MAFFT (available: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/) (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นดู alignment ที่ได้ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Tamura *et al.,* 2013) ทำการเตรียมชุดข้อมูลในรูปแบบไฟล์ phy เพื่อทำการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA สำหรับการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide (Stamatakis *et al*., 2008) กำหนด command –f a เพื่อวิเคราะห์แบบ rapid bootstrap โดยใช้ random starting tree และ 1000 maximum likelihood bootstrap replicates ทำการวิเคราะห์ด้วย ML criteria จำนวน 4 ครั้ง เพื่อยืนยันความสอดคล้องของ phylogenetic tree

4. การทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test) เพื่อพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulates)

เตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ มาปลูกในกระถางที่ใส่ดินนึ่งฆ่าเชื้อ จนมีอายุ 2 เดือน ทำการปลูกเชื้อที่โคนต้นมันสำปะหลัง โดยเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง (ข้อ 2) บนอาหาร PDA นาน 7 วัน และใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อตัดเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหารให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ซม. จากนั้นใช้เข็มทำแผลบนลำต้นแล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราวางลงบนแผล พ่นน้ำให้ชื้น คลุมด้วยถุงพลาสติค และบ่มไว้ที่ในโรงเรือนทดลอง บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาเกิดโรค จากนั้น นำตัวอย่างที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีของ Koch's postulation

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมและเก็บตัวอย่างอาการโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลัง

รวบรวมและเก็บตัวอย่างอาการโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลัง ได้ตัวอย่างโรคทั้งหมด 27 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการโรคที่ลำต้น ราก และเก็บดินบริเวณต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคมาด้วย พบอาการที่แสดงโคนเน่า รากเน่า 4 อาการ ได้แก่ อาการโคนเน่าและรากเน่า อาการรากเน่าแห้ง อาการรากเน่าดำ และอาการรากเน่า แสดงใน Figure 1

1.1 อาการโคนเน่าและรากเน่า ลักษณะอาการเหนือดิน ใบเหลือง (Figure 1a) ต่อมาใบเหลืองทั้งต้น ใบลู่ลงและแสดงอาการเหี่ยว (Figure 1b) ใบเหลืองเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แห้ง (Figure 1c Figure 1g) รากมีลักษณะฉ่ำน้ำและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเมื่ออาการรุนแรง พบว่า รากเน่าต้นตายไม่เจริญเติบโต (Figure 1h)

1.2 อาการรากเน่าแห้ง ลักษณะอาการมีลักษณะรากเน่าแห้ง บริเวณส่วนที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะพบว่า ราสร้างเส้นใยสีขาว หยาบ และเจริญปกคลุมบริเวณส่วนโคน โคนต้นมีลักษณะอาการบวม ราสร้างเม็ดสเคลอโรเทียม เป็นเม็ดกลมเล็ก ๆ คล้ายเมล็ดผักกาด ซึ่งเมื่อเริ่มเกิดจะเป็นสีขาวแล้วเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลหรือดำเมื่อแก่ สามารถมองเห็นได้ชัดเจน (Figure 2a) หลังจากเข้าทำลายบริเวณโคนต้นแล้ว เส้นใยก็จะเจริญแผ่กระจาย

ขึ้นมายังลำต้นข้างบน และลึกลงไปใต้ดิน ทำลายส่วนรากทั้งหมด ซึ่งมีผลทำให้เกิดอาการเหี่ยวและแห้งตาย

1.3 อาการรากเน่าดำ อาการใบล่างเหี่ยว บริเวณขั้วของรากมีอาการเน่าดำ ลักษณะรากเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากเป็นสีที่เกิดจากเส้นใยของเชื้อรา และเมื่อผ่าหัวมันสำปะหลัง พบว่ามีแผลสีดำ และราสร้างส่วนขยายพันธุ์ของราสีดำบนบริเวณเปลือกของลำต้น พบระบาดที่ อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา (Figure 2b)

1.4 อาการรากเน่า ลักษณะหัวเน่าพบ ราสร้างเส้นใยสีครีมบนโคนต้นและสร้างส่วนขยายพันธุ์ของราสีชมพูอมส้มบนลำต้น พบที่ อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา

2. เชื้อราสาเหตุ และการศึกษาสาเหตุอาการโคนเน่าและหัวเน่าของมันสำปะหลัง

2.1 การแยกเชื้อสาเหตุตามลักษณะอาการที่แสดงโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

จากตัวอย่างโรคมันสำปะหลังที่แสดงอาการที่ลำต้นและราก จำนวน 27 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อราตามลักษณะอาการของโรคที่แสดง โดยวิธี Tissue transplanting และใช้เหยื่อล่อโดยการแยกเชื้อจากดิน พบเชื้อราตามลักษณะอาการแบ่งได้ เชื้อรา 4 ชนิด ดังนี้ (Table 1)

1. เชื้อรา *Phytophthora spp.* แยกได้จากตัวอย่างที่มีลักษณะอาการโคนเน่าราก รามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ ลักษณะโคโลนี ราสร้างโคโลนีสีขาว ฟู บนอาหาร PDA (Figure 3a) เส้นใยเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 28-32°ซ. อุณหภูมิต่ำสุดที่เส้นใยเจริญ คือ 9°ซ. และอุณหภูมิสูงสุดที่เส้นใยเจริญ คือ 37°ซ. สร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Structures) โดยสร้าง zoospores ใน sporangia บนก้านชู sporangia (sporangiophores) ซึ่งแตกกิ่งก้าน ลักษณะ Sporangia มีรูปร่างคล้ายไข่ (ovoid) และรูปร่างคล้ายวงรี (ellipsoid) (Figure 3b) บริเวณส่วนฐานมีลักษณะกลม และมีรูปร่างหลายแบบ sporangia มีขนาด 25–52 × 22–58 ไมครอน (ขนาดเฉลี่ย 30.6 × 45.8 ไมครอน) ส่วนปลายของ sporangia มี papillate เป็นแบบ semipapillate (Katsura, 1976) ในการศึกษาครั้งนี้ พบลักษณะ sporangia เป็นแบบ semipapillate (Figure 3b) แต่บางครั้ง พบว่า sporangia เป็นแบบ nonpapillate และ noncaducous และสร้าง sporangia ใหม่แบบ internal proliferation (Ho, 1986: Ho *et al*., 1995) ลักษณะ Chlamydospores ผนังหนา รูปร่างค่อนข้างกลม often intercalary มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 19.3–50 ไมครอน (ค่าเฉลี่ย 30 ไมครอน) (Figure 3c) มีส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual Structures) โดยเพศเมียจะสร้าง oogonia ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 27.5–35.0 ไมครอน เพศผู้สร้าง antheridia เป็นแบบ amphigynous และมีรูปร่างค่อนข้างกลม oogonia ผสมกับ antheridia ผสมกันเกิดสปอร์ผนังหนาเรียกว่า oospore (Figure 3d)

ในการศึกษาครั้งนี้ราสาเหตุที่จำแนกได้เป็น *Phytophthora melonis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Oliveira *et al.,* (2016) ที่ได้ศึกษาสาเหตุของโรคหัวเน่าของมันสำปะหลังในประเทศบราซิล ระหว่างปี 2556-2558 และจำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อจำแนกชนิดได้รา *P. melonis* เช่นกัน สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาสาเหตุของโรครากเน่าและหัวเน่าของมันสำปะหลังว่า เกิดจากสาเหตุของรา *Phytophthora* spp. หลายชนิด รังษีและคณะ (2556) รายงานว่าสาเหตุโรครากและหัวเน่าของมันสำปะหลังในพื้นที่ อ.นิคมพัฒนา จ.ระยอง คือ *Phytophthora meadii* และจากการสำรวจยังพบการระบาดของรา *Sclerotium rolfsii* ที่เข้าทำลายหัวด้วย ต่อมาในปี 2557 Charaensatapon *et al.,* (2014) ศึกษาการระบาดของโรครากเน่า-หัวเน่าของมันสำปะหลังและจำแนกชนิดราสาเหตุเป็น *Phytophthora melonis*

Figure 1 Stem and root rot symptoms on cassava caused by *Phytophthora* sp., from Soeng Sang district, Nakhon Ratchasima province a) Leaf chlorosis, yellow leaf b) Leaf and wilt c) Dry and brown d) Defoliation e) Brown and cracked basal stem f) Root rot g) White mycelium can be observed on rotten root. h) Root rot and stunting

Figure 2 a) Dry root rot symptom on cassava caused by *Sclerotium rolfsii*, from Muak Lek district, Saraburi province.b) Black root rot symptom on cassava caused by *Neoscytalidium dimidiatum*, from Soeng Sang district, Nakhon Ratchasima province

Table 1 Fungal pathogen from different disease symptoms specimens of *Manihot esculenta* collected from various locations

Symptoms	Pathogen	Location (district, province)	Isolate	Isolation method
1: Stem and root rot	*Phytophthora melonis*	Muak Lek, Saraburi	DOAC 001	Tissue transplanting
	P. melonis	Muak Lek, Saraburi	DOAC 035*	Tissue transplanting
	P. melonis	Khon Buri, Nakhon Ratchasima	DOAC 036*	Tissue transplanting
	P. melonis	Khon Buri, Nakhon Ratchasima	DOAC 004	Tissue transplanting
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 005	Soil bating
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 006	Soil bating
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 045*	Soil bating
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 008	Soil bating
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 009	Soil bating
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 010	Tissue transplanting
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 011	Tissue transplanting
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 012	Tissue transplanting
	P. melonis	Pak Chong, Nakhon Ratchasima	DOAC 013	Tissue transplanting
	P. melonis	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 033*	Tissue transplanting
	P. melonis	Pak Chong, Nakhon Ratchasima	DOAC 043*	Tissue transplanting
	P. melonis	Aranyaprathet, Sa Kaeo	DOAC 016	Tissue transplanting
	P. melonis	Aranyaprathet, Sa Kaeo	DOAC 017	Tissue transplanting
	P. melonis	Aranyaprathet, Sa Kaeo	DOAC 034*	Tissue transplanting
	P. melonis	Aranyaprathet, Sa Kaeo	DOAC 019	Tissue transplanting
2: Dry root rot	*Sclerotium rolfsii*	Muak Lek, Saraburi	DOAC 020	Tissue transplanting
	S. rolfsii	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 021	Tissue transplanting
3: Black root rot	*Neoscytalidium dimidiatum*	Muak Lek, Saraburi	DOAC 022	Tissue transplanting
	N. dimidiatum	Khon Buri, Nakhon Ratchasima	DOAC 023	Tissue transplanting
	N. dimidiatum	Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 024	Tissue transplanting
	N. dimidiatum	Aranyaprathet, Sa Kaeo	DOAC 025	Tissue transplanting
4: Root rot	*Fusarium* sp.	Muak Lek, Saraburi	DOAC 026	Tissue transplanting
		Soeng Sang, Nakhon Ratchasima	DOAC 027	Tissue transplanting

*Representative isolates of *P. melonis* were selected for molecular study

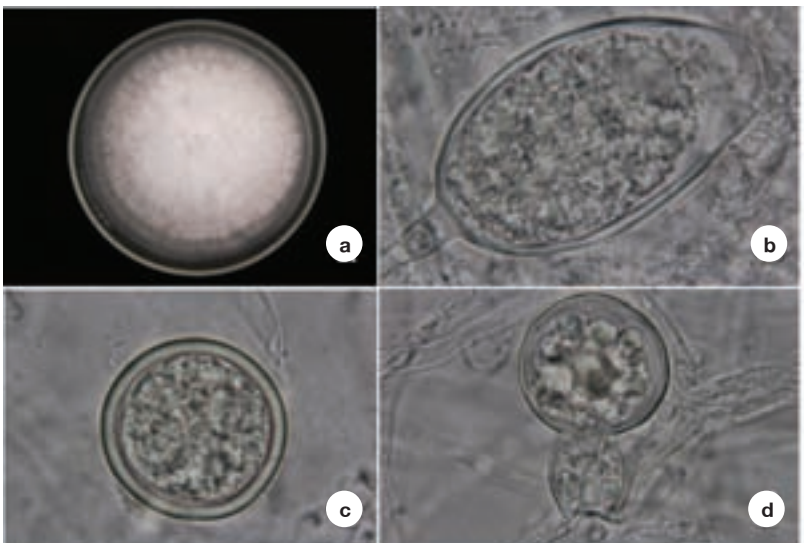

Figure 3 *Phytophthora melonis*a a) White and uffy colony b) Ellipsoid sporangia c) Chlamydospore d) Globose oogonia with an amphigynous antheridia

2. เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการรากเน่าแห้ง จาก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี แยกเชื้อจากตัวอย่าง พบลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหยาบ ขาว สร้างเม็ดสเคลอโรเทียม รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ขนาดต่าง ๆ กัน ค่อนข้างกลม เป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลหรือสีดำ (Figure 4a) มีผนังชั้นนอกประกอบด้วย pseudoparenchyma tissue เส้นใยไม่มีสีหรือมีสีเข้มเล็กน้อย บางครั้งพบการสร้าง clamp connection (Figure 4b)

3. เชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* จากตัวอย่างอาการรากเน่าดำ แยกเชื้อ โดยวิธี Tissue transplanting จำแนกได้รา *Neoscytalidium dimidiatum* สร้างโคโลนีสีเทา ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ เจริญเติบโตเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30$\pm$2°ซ. (Figure 4c) ราสร้างโคนิเดีย (conidia) 2 ชนิด ชนิดที่ 1 ราสร้าง arthroconidia (Figure 4d) เรียกว่า *Scytalidium* – like มีลักษณะสปอร์เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ สีน้ำตาลเข้ม พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดที่ 2 ราสร้างโคนิเดีย เรียกว่า *Fusicoccum*-like ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia พบบนส่วนของพืชที่เป็นโรคเท่านั้น

จากการศึกษาครั้งนี้ พบอาการเน่าดำที่เกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* พบการระบาดที่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ครบุรี อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา และ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Machado *et al*., (2014) ศึกษาโรค cassava black root rot (CBR) พบการระบาดที่เมือง Maranho และ Paraba ประเทศบราซิล โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของราพบ 3 ชนิด จัดอยู่ใน Family Botryosphaeriaceae ได้แก่ *Lasiodiplodia euphorbicola Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Neoscytalidium hyalinum* ซึ่งรา *Neoscytalidium hyalinum* เป็นชื่อพ้องกับรา *Neoscytalidium dimidiatum* และเป็นรายงานครั้งแรกในโลกที่พบว่าราทั้ง 3 ชนิด เป็นสาเหตุของโรครากเน่าดำของมันสำปะหลัง สำหรับในประเทศไทยนั้น Athipunyakom *et al*., (2015) รายงานว่าพบเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) ของแก้วมังกร โดยลักษณะของราที่พบในอาการ

Figure 4 Fungal pathogens isolated from stem and root rot symptoms of cassava
a) colony of *Sclerotium rolfsii* on PDA
b) *Sclerotium rolfsii* produce clamp connection
c) colony of *Neoscytalidium dimidiatum* on PDA
d) *Neoscytalidium dimidiatum* produce arthroconidia in chain

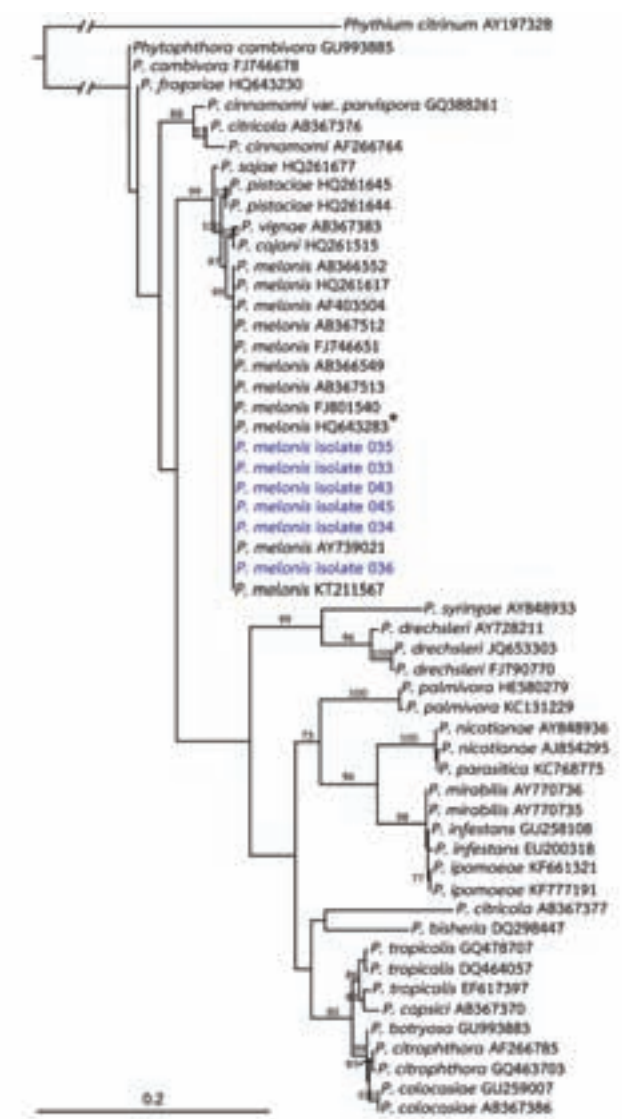

Figure 5 Phylogram of species of *Phytophthora* obtained from maximum likelihood analylis using RAxML with the ITS gene region. Bootstrap support values (70%) from 1,000 replicates are shown above nodes. *Ex-type of *P. melonis* isolate CBS58269

เน่าดำของมันสำปะหลังในการศึกษาครั้งนี้เหมือนกับรา *N. dimidiatum* สาเหตุของโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ของแก้วมังกร

4. เชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากอาการรากเน่า โดยวิธี Tissue transplanting ราสร้างโคโลนีบน PDA จะสร้างเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ต่อมามีการสร้าง sporodochia สีเขียวและสีครีม ทำให้ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะคล้ายเมือกเยิ้ม ราสร้าง microconidia จำนวนมาก รูปไข่ 0-1 septate ขนาด 9-22 x 4-6 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่ยาว และมักจะไม่แตกแขนง

2.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรากลุ่ม *Phytophthora* spp.

จากการจำแนกเชื้อสาเหตุอาการโคนเน่ารากเน่าโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อยืนยันผลการจัดจำแนก โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา และสร้าง phylogenetic tree (Figure 5) ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล DNA ของตำแหน่ง ITS ของรา *Phytophthora* ด้วย maximum likelihood เพื่อเปรียบเทียบรา *Phytophthora* ที่ได้จากการศึกษากับไอโซเลทของรา *P. melonis* ที่มีรายงานบนพืชอาศัยต่าง ๆ เช่น *Cucumis melo*, *Pistacia vera*, *Manihot esculenta* รวมถึงไอโซเลทต่าง ๆ บนฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) เมื่อจัดจำแนกโดยใช้ phylogenetic clade พบว่า รา *Phytophthora* ที่ได้จากการศึกษา รวมทั้งไอโซเลทที่มีรายงานว่าคือ *P. melonis* จัดอยู่ใน clade เดียวกับรา ex-type ของรา *P. melonis* (CBS 582.69) ดังนั้น รา *Phytophthora* ที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและรากเน่า สามารถจัดจำแนกได้เป็น รา *P. melonis*

3. การทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

จากการทดสอบการเกิดโรค พบว่า รา *Phytophthora melonis* ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อ 90 วัน โดยเกิดแผลสีดำลักษณะช้ำบริเวณลำต้นที่แตกออกมาใหม่ เมื่อนำส่วนที่เป็นโรคนั้นมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีของ Koch's postulation พบว่าเชื้อที่แยกใหม่นั้นเป็นเชื้อรา *Phytophthora melonis* สำหรับการทดสอบการเกิดโรคของรา *Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum* และ *Fusarium solani* พบว่า รา *Sclerotium rolfsii* ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อ 90 วัน *Neoscytalidium dimidiatum* ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อ 90 วัน และเมื่อนำมาแยกเชื้ออีกครั้งก็พบเชื้อสาเหตุชนิดเดิมทั้ง 3 ชนิด จึงสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นสาเหตุของโรคมันสำปะหลัง สำหรับรา *Fusarium* sp. พบว่า ต้นกล้ามันสำปะหลังไม่แสดงอาการโรค

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมและเก็บตัวอย่างอาการโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลัง จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ครบุรี อ.เสิงสาง และ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา และ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ได้ตัวอย่างโรคที่แสดงอาการที่ลำต้นและราก พบอาการที่แสดงโคนเน่ารากเน่า 4 อาการ ได้แก่ อาการโคนเน่าและรากเน่า อาการรากเน่าแห้ง อาการรากเน่าดำ และอาการรากเน่า จากการแยกเชื้อสาเหตุ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวโมเลกุล พบว่า อาการโคนเน่าและรากเน่าเป็นโรคสาเหตุเกิดจากรา *Phytopthora melonis* อาการหัวเน่าลักษณะแห้ง เป็นโรคสาเหตุเกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* อาการเน่าดำเป็นโรคสาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* และรา *Fusarium solani* ที่แยกจากอาการหัวเน่า พบว่าไม่ได้เป็นสาเหตุของอาการหัวเน่า จากการทดสอบการเกิดโรคของรา *Phytophthora melonis, Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum* และ *Fusarium* sp. ที่แยกได้ พบว่า *Phytophthora melonis* ทำให้ต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อ 90 วัน และเมื่อนำมาแยกเชื้ออีกครั้ง

ก็พบเชื้อสาเหตุชนิดเดิม จึงสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด *Phytophthora melonis, Sclerotium rolfsii, Neoscytalidium dimidiatum* เป็นสาเหตุของโรคมันสำปะหลัง

เอกสารอ้างอิง

รังษี เจริญสถาพร ธีรนันท์ แซ่ลี้ อัมพร จุลคต ศักดา เชิดชู และฤทัยรัตน์ น้อยจาด. 2556. *Phytophthora* สาเหตุโรครากและหัวเน่าของมันสำปะหลังในประเทศไทย. หน้า 260-261. *ใน: การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 11* "อารักขาพืชไทยก้าวไกลในประชาคมอาเซียน" 26-28 พฤศจิกายน 2556 ณ โรงแรมเซ็นทาราแอนด์คอนเวนชันเซนเตอร์ จังหวัดขอนแก่น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2*559. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กรุงเทพ. 241 หน้า.

Alvarez, Elizabeth; Llano R., Germn Alberto; Loke, John. 2002. Development of ecological practices to manage Phytophthora root rot of cassava (*Manihot esculenta*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 1 p. Available at: http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/articulos__ciat/phytophthora__root__rot__cassava__alvarez.pdf. Accessed: October 4, 2016

Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2015. Diseases of dragon fruit in Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. *In: International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing*, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.

Canu, B., Hunter, G.C., Linaldeddu, B.T., Franceschini, A., Maddau, L., Jung, T. and S. Denman. 2014. A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. *Forestry Pathology* 44: 1-20.

Charaensatapon R., T. Saelee, U. Chulkod and S. Cheadcoo. 2014. *Phytophthora* root and tuber rot of cassava in Thailland. pp. 66. *In: The 5th Asian Conference on Plant Pathology (ACPP2014).* 3-6 November. 2014. (Thai and Abstract in English)

Chuang, M.F., H.F. Ni, H.R. Yang, S.L. Shu, S.Y. Lai, Y.L. Jiang. 2012. First Report of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *J Phytopath*. 161 (11-12): 841-849.

Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and C.M. Brasier. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet Biol.* 30: 17-32.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15.

Gallegly, M.E., C. Hong. 2008. *Phytophthora*: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 158 pp.

Ho, H.H. 1986. *Phytophthora melonis* and *P. sinensis* synonymous with *P. drechsleri*. Mycologia 78: 907-912

Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S. 1995. The genus Phytophthora in Taiwan. Inst. Bot. Acad. Sinica Monogr. Ser. 15

Ho. H. H., M.E. Gallegly and C.X. Hong. 2007. Redescription of *Phytophthora melonis*. *Mycotaxon* 102: 339-345.

Katoh, K., and Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briengs in Bioinformatics* 9, 286-298.

Katsura, K. 1976. Two new species of Phytophthora causing damping-off of cucumber and trunk rot of chestnut. *Transaction of the Mycological Society of Japan*. 17: 238-242.

Leslie, J F. and B A. Summerell. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ltd. 388 pp.

Machado, A.R., D.B. Pinho, S.A.S. Oiveira and O.L., Pereira. 2014. New occurrences of *Botryosphaeriaceae* causing black root rot of cassava in Brazil. *Trop Plant Pathol*. V.39(6): 464-470.

Masratul Hawa M., B. Salleh and L. Zakaria. 2013. Identification and Molecular Characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker of Red-fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *J Phytopathol* 161(11-12): 841-849.

Oliveira, S.A.S, S.A.V. Boas, C.A.D. Braganca and J.de Oliveira. 2016. First report of *Phytophthora melonis* causing cassava wilt and root rot in Bahia State, Brazil. *Summa Phytopathol., Botucatu,* V. 42, No. 1, p. 107.

Punja ZK.1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Ann Phytopathol* 23:97–127.

Punja ZK and A. Damiani. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia* 88:694–706

Stamatakis, A. 2014. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312-1313.

Stamatakis, A., Hoover, P. and J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst Biol.* 57:758-71.

Sutton BC. 1980. *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30:2725-2729.

White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. *Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal Applications - A Laboratory Manual*, Publisher: Academic Press, pp.315-322