



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช สาขา โรคพืช ภาควิชา

เรื่อง การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum*
สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก

Characterization and Aggressiveness of *Colletotrichum* Species
Causing Chilli Anthracnose

นามผู้วิจัย นางสาวรอนันท์ วิญญูรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัตติยา พงศ์พิสุทธา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล, Dr.sc.agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิขสิขิ มทววิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum*
สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Characterization and Aggressiveness of *Colletotrichum* Species
Causing Chilli Anthracnose

โดย

นางสาวรณันท์ วิญญูรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วารานันท์ วิทยุรัตน์ 2554: การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคนแอนแทรกโนสพริก ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัตติยา พงศ์พิสุทธา, Ph.D. 136 หน้า

จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคนแอนแทรกโนสพริก จำนวน 58 ไอโซเลท ซึ่งเก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงราย นครศรีธรรมราช และ สุโขทัย อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา สามารถจำแนกเชื้อราได้ 3 สปีชีส์ คือ *C. acutatum* (*Ca*) *C. capsici* (*Cc*) และ *C. gloeosporioides* (*Cg*) จากลักษณะโคโลนีสามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ 5 8 และ 7 กลุ่ม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยามีความผันแปรค่อนข้างสูง จึงใช้ร่วมกับเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล โดยการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย universal primer ITS4/ITS5 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส และนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *AluI* *BamHI* และ *RsaI* แยกชิ้นส่วนด้วยปฏิกิริยาอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 2% agarose gel พบว่า *AluI* และ *RsaI* ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของ *Ca* ขณะที่ *BamHI* และ *RsaI* ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของ *Cc* ได้ ส่วน *AluI* สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Ca* และ *Cg* ได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์สามารถจำแนกได้เป็น 3 สปีชีส์ ตรงตามลักษณะสัณฐานวิทยา และงานวิจัยนี้จำแนก *Cg* ได้ 2 กลุ่ม

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหาร casein hydrolysis medium (CHM) และ casein from bovine milk medium (CBM) พบว่าเชื้อราสร้างเอนไซม์บางชนิดมาย่อยอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ ทำให้เกิด clear zone รอบโคโลนี บนอาหาร CHM พบ *Ca* สร้าง clear zone มีความกว้างมากที่สุดคือ 10.10 มม. รองลงมาได้แก่ *Cg* และ *Cc* มีขนาด 2.78 และ 1.85 มม. ตามลำดับ ขณะที่บนอาหาร CBM พบ *Ca* และ *Cg* สร้าง clear zone กว้าง 4.62 และ 0.93 มม. ตามลำดับ ส่วน *Cc* ทุก Isolate ไม่สร้าง clear zone เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลวที่ผสม CBM ความเข้มข้น 1% พบว่า *Cg* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 6.67 ยูนิต/มก. ขณะที่ *Cc* และ *Ca* มีค่า 4.03 และ 3.63 ยูนิต/มก. ตามลำดับ

การทดสอบการปลูกเชื้อบนผลพริกพันธุ์จินดาและบางช้าง โดยใช้ mycelial disc (MD) และ conidial suspension (CS) พบว่าการปลูกเชื้อด้วย MD กับพริกพันธุ์บางช้างด้วย *Ca* และ *Cg* พบการเกิดโรค 100% ขณะที่ *Cc* พบการเกิดโรค 96.67% ส่วนการปลูกเชื้อด้วย CS กับพริกพันธุ์จินดาพบว่าเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ ทำให้เกิดโรคได้ 100% จากการประเมินความรุนแรงของเชื้อในการทำให้เกิดโรค พบว่าผลจากการปลูกเชื้อบนผลพริกพันธุ์จินดามีขนาดใหญ่กว่าบนผลพริกพันธุ์บางช้าง อย่างไรก็ตามพริกพันธุ์บางช้างที่ใช้ inoculum ที่แตกต่างกัน แสดงความรุนแรงของโรคไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบว่าเมื่อนำ *Ca* *Cc* และ *Cg* มาปลูกเชื้อด้วย MD พบพื้นที่การเกิดโรค 16.55 16.06 และ 3.85% ตามลำดับ และเมื่อใช้ CS พบพื้นที่การเกิดโรค 7.43 6.27 และ 3.76% ตามลำดับ เปรียบเทียบการสร้าง clear zone และค่าของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสกับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน เอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้นมาอาจไม่ใช่ตัวแปรสำคัญในการทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ แต่อาจจะเป็นปัจจัยรองในการช่วยให้เชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายพืชได้ง่ายขึ้น

Waranun Winyarat 2011: Characterization and Aggressiveness of *Colletotrichum* Species Causing Chilli Anthracnose. Master of Science (Plant Pathology), Department of Plant Pathology. Thesis
Advisor: Ratiya Pongpisutta Ph.D. 136 pages.

Fifty eight isolates of *Colletotrichum* causing chilli anthracnose collected from Chiang Rai, Nakhon Si Thammarat and Sukhothai, using morphological and physiological characteristics were classified into 3 species as *C. acutatum* (*Ca*) *C. capsici* (*Cc*) and *C. gloeosporioides* (*Cg*). Based on colony characteristics, each species was grouped into 5, 8 and 7 phenotypes, respectively. However, *Colletotrichum* species showed highly variation in morphology, so molecular marker technique was required. PCR analysis of the internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2), were used to identify with universal primers ITS4/ITS5. PCR products were generated approximately 600 bp. Three restriction enzymes, *AluI*, *BamHI* and *RsaI* were used to study polymorphisms in the ITS regions of the isolates. The restriction fragments were generated by electrophoresis in 2% agarose gels. *AluI* and *RsaI* did not cut the DNA fragments of *Ca* while *BamHI* and *RsaI* failed to digest amplified product of *Cc*. *AluI* was useful to distinguish between species of *Ca* and *Cg*. Nucleotide sequencing of ITS products was examined and identified to 3 species as morphological marker identification. Moreover, *Cg* was clustered into 2 groups from this study.

Protease activity was tested on Casein hydrolysis medium (CHM) and casein from bovine milk medium (CBM). Each isolate produced an enzyme digesting both substrates, a clear zone was developed surrounding the fungal colony. The clear zone was assessed on CHM, *Ca* displayed the greatest width of 10.10 mm while *Cg* and *Cc* showed 2.75 and 1.85 mm, respectively. Also, clear zone was evaluated on CBM, *Ca* and *Cg* produced clear zones of 4.62 and 0.93 mm, respectively whereas *Cc* showed no clear zone. Protease activity was detected in 1%CBM. The result indicated that *Cg* produced the highest protease activity of 6.67 unit/mg while *Cc* and *Ca* illustrated the activity of 4.03 and 3.63 unit/mg, respectively.

Inoculation test was studied on two varieties of chilli fruits as Bangchang and Jinda with mycelial disc (MD) and conidial suspension (CS) and found that MD inoculation of *Ca* and *Cg* on Bangchang fruits showed absolutely infection of 100% disease incidence whereas *Ca* illustrated 96.67% of disease incidence. Whilst the conidial suspension inoculation of three species on jinda fruits was the effective method showing disease incidence of 100%. Aggressiveness evaluation of *Colletotrichum* species on Jinda variety showed greater lesion size than on Bangchang variety. On the other hand, there was correlation of inoculum inoculations illustrating severity on Bangchang variety, disease area of MD inoculation of *Ca*, *Cc* and *Cg* were 16.55, 16.06 and 3.85 %, respectively and of CS inoculation were 7.43, 6.27 and 3.76%, respectively. There was no relationship between clear zone production and protease activity to disease severity. Fungal enzyme may not support disease severity but may be a minor factor to support fungal infection to host plant.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ รัตยา พงศ์พิสุทธิธนา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลักและคร. ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้สละเวลา
อันมีค่าในการให้คำปรึกษา แนะนำ ติดตามวิธีการดำเนินการวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้โดยละเอียด รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เสมอมา ขอขอบพระคุณ ดร. จินตนา
อันอาตมังกาม ประธานการสอบ และดร.บุญญวดี จิระวุฒิ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้
คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบ
พระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืชที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

ขอขอบคุณคุณจรรยา สุนทร คุณเทพพนม แสงเพลิง คุณนวรรตน์ อิ่มจิตร และน้องๆ ทุกคน
ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช ที่คอยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา อีกทั้งยังให้ความ
ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ และน้องชาย ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ
ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนทางการเรียนเป็นอย่างดี

วรานันท์ วิญญูรัตน์

สิงหาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	34
สรุปผลการทดลอง	109
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	112
ภาคผนวก	125
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	126
ภาคผนวก ข ปริมาณและขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i>	130
ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	134
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	136

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบและคุณสมบัติของเคซีน	15
2	แหล่งเก็บรวบรวมตัวอย่าง โรคแอนแทรกซ์ในสฟริก	24
3	องค์ประกอบของ Master mix สำหรับปฏิกิริยา PCR-RFLP	28
4	องค์ประกอบของ Master mix สำหรับการตัด ITS product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	29
5	การจัดจำแนกเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ในระดับสปีชีส์ในพื้นที่แหล่งปลูกที่แตกต่างกันโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	35
6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 58 ไอโซเลท	40
7	อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน	64
8	ปริมาณและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)	70
9	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> 3 สปีชีส์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1	70
10	เปรียบเทียบความเหมือน (identity) และความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับเบส เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> 3 สปีชีส์กับยีนในฐานข้อมูล Genbank	71
11	ค่าเฉลี่ยขนาด clear zone ที่เชื้อราสร้างบนอาหาร CHM เป็นเวลา 4 วัน	84
12	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความกว้างของ clear zone ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ที่เจริญบนอาหาร CHM และ CBM เป็นเวลา 4 วัน	86
13	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> สร้างในอาหารเหลวเมื่อใช้ยับสเตรท 2 ชนิด	90
14	ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริกบางซ้าง หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริกจินดา หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc	98
16	ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริกบางช้าง หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension	100
17	ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริกจินดา หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension	102
ตารางผนวกที่		
1	วิธีการเตรียมสารละลาย 0.1 M Potassium phosphate buffer	129
2	ปริมาณและขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 58 ไอโซเลทที่ได้จากการนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ทั้ง 3 ชนิด	131
3	องค์ประกอบของสารที่ใช้ศึกษาการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	135

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการเอสเทอร์ฟิเคชันที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ซึ่งจะได้เอสเทอร์เป็นผลิตภัณฑ์	14
2	พันธะเปปไทด์ คือ พันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่าง C อะตอมในหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนโมเลกุลหนึ่งยึดกับ N อะตอม ในหมู่อะมิโน (-NH ₂) ของกรดอะมิโนอีกโมเลกุลหนึ่ง	15
3	เคซีนไมเซลล์ที่เกิดจากการรวมกันของ α s1-casein, α s2-casein, β -casein, γ -casien และ κ -casien	16
4	ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอส	18
5	พิกัดทางภูมิศาสตร์ในการเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกในสหพริก	23
6	ลักษณะโคโลนีและกลุ่มของสปอร์ ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์	37
7	ลักษณะรูปร่างสปอร์ ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์	38
8	ลักษณะรูปร่าง setae ของเชื้อรา <i>C. capsici</i> และ <i>C. gloeosporioides</i>	38
9	ลักษณะรูปร่าง appressorium ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์	39
10	ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> spp. ประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	67
11	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> spp. โดยใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600 bp	68
12	ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AhaI</i> <i>BamHI</i> และ <i>RsaI</i>	72
13	ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. acutatum</i> ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer ITS4 และ ITS5	73
14	ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. capsici</i> ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer ITS4 และ ITS5	73
15	ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> I ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer ITS4 และ ITS5	74
16	ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> II ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer ITS4 และ ITS5	74

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI ตัดซึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. acutatum</i> โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1	75
18	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Alu</i> I ตัดซึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. capsici</i> โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1	76
19	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด <i>Alu</i> I <i>Bam</i> HI และ <i>Rsa</i> I ตัดซึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> I โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1	77
20	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ เอนไซม์ <i>Alu</i> I <i>Bam</i> HI และ <i>Rsa</i> I ตัดซึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> II โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1	78
21	เปรียบเทียบลำดับเบสและความสัมพันธ์ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 4 ไอโซเลท	79
22	แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา <i>C. acutatum</i> isolate CR 001 กับเชื้อรา <i>C. acutatum</i> isolate PD90-443	80
23	แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา <i>C. capsici</i> isolate NST 004 กับเชื้อรา <i>C. capsici</i> strain 10858	81
24	แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> I isolate SKT 011 กับเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> isolate CM0705	82
25	แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> II isolate SKT 031 กับเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> culture collection ICMP: 17797	83
26	ลักษณะการสร้าง clear zone ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> บนอาหาร CHM เป็นเวลา 4 วัน	85
27	ลักษณะการสร้าง clear zone ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> บนอาหาร CBM เป็นเวลา 4 วัน	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
28	เปรียบเทียบขนาดของ clear zone ที่เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> จำนวน 18 ไอโซเลท สร้างบนอาหาร CHM และ CBM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน	87
29	กิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่เชื้อสร้างบนซับสเตรทที่แตกต่างกัน	89
30	ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกบางซ้างที่เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ เข้าทำลายโดยการปลูกเชื้อด้วย Inoculum ที่แตกต่างกัน	94
31	ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกจินดาที่เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> ทั้ง 3 สปีชีส์ เข้าทำลายโดยการปลูกเชื้อด้วย Inoculum ที่แตกต่างกัน	95
32	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกจินดาและพริกบางซ้างที่ปลูกเชื้อด้วย Inoculum ที่แตกต่างกัน	104
33	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกบางซ้างที่ปลูกเชื้อด้วย Inoculum ที่แตกต่างกัน	105
34	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกจินดาที่ปลูกเชื้อด้วย Inoculum ที่แตกต่างกัน	106
35	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกจินดาและพริกบางซ้างที่ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc (MD)	107
36	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกจินดาและพริกบางซ้างที่ปลูกเชื้อด้วย conidial suspension (CS)	108

การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum*

สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Characterization and Aggressiveness of *Colletotrichum* Species

Causing Chilli Anthracnose

คำนำ

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แหล่งปลูกพริกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ขอนแก่น เลย กาฬสินธุ์ นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา กาญจนบุรี นครปฐม สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และตราด จากข้อมูลการผลิตพริกของไทยปีเพาะปลูก 2549/2550 พบว่ามีพื้นที่ผลิตพริกรวมประมาณ 490,000 ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) จากสถิติของกรมศุลกากรปี 2549 พบว่า มีการส่งออกพริก ทั้งรูปผลสด ซอสพริก พริกแห้ง เครื่องแกงสำเร็จรูป และพริกป่น มีมูลค่ารวม 2,161 ล้านบาท อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าการนำเข้าพริกแห้ง และพริกป่นเพื่อเป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีมูลค่าสูงถึง 762 ล้านบาทต่อปี จากประเทศอินโดนีเซีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และกัมพูชา ซึ่งแนวโน้มปริมาณการนำเข้ามีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์พริกเพื่อการค้าอีกด้วย

ปัญหาที่สำคัญในการปลูกพริกคือโรคและแมลง โรคที่สำคัญและสร้างความเสียหายกับผลผลิตพริกมากที่สุดคือ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถระบาดได้ทั่วทุกภาคของประเทศและเข้าทำลายผลผลิตพริกได้เกือบทุกพันธุ์ ทำให้เกิดความเสียหายทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ เมื่อเกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตพริกลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Pakdeevaporn *et al.*, 2005) โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะการเจริญของพืช (ศักดิ์, 2537) และเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต (บุญญาวดี, 2540) ในประเทศไทยพบเชื้อราสาเหตุโรคนี้อีกคือ *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* (ธารทิพย์ และคณะ, 2548) นอกจากนี้ยังพบการกระจายอยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน โดยปกติจะแสดงอาการรุนแรงกับผลสุกที่มีสีแดง โดยทำให้เกิดแผลยุบตัวลงเล็กน้อยต่อมาจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเชื้อราได้รับอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมก็จะสร้างกลุ่มของ acervulus บนแผลและยังเป็นแหล่งกำเนิดสปอร์จำนวนมาก รวมทั้งยังเป็นแหล่งของเชื้อที่

สามารถแพร่กระจายไปยังพริกต้นอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็วเมื่อสภาพอากาศเหมาะสม ในกรณีที่โรคระบาดอย่างรุนแรง สิ่งแวดล้อมเหมาะสมอาจเกิดโรคบริเวณที่ต้น กิ่ง ใบได้เช่นกัน (ศักดิ์, 2537)

จากความสำคัญที่พริกเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย และยังมีแหล่งปลูกพริกที่สำคัญอยู่ทั่วประเทศทุกภูมิภาคในประเทศไทยมักพบการระบาดของโรคแอนแทรคโนส ในการจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ เช่น ลักษณะของโคโคนี ขนาดและรูปร่างของ conidium ขนาดและรูปร่างของ appressorium การสร้างหรือไม่สร้าง setae รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ (Bernstein *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1996) ข้อมูลดังกล่าวยังไม่เพียงพอในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ เนื่องจาก *Colletotrichum* เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงตามสภาพแวดล้อม ต่อมามีการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล มาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* มีอยู่ด้วยกันหลายเทคนิค เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequence analysis) เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) โดยใช้ Species-specific primer เทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) เทคนิค Random Amplified Polymorphism (RAPD) และ เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นต้น เพื่อช่วยในการจัดจำแนกให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดความรุนแรงของโรค โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ที่เชื้อราสาเหตุสร้างต่อความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

วัตถุประสงค์

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* ในพื้นที่ปลูกพริก 3 แห่ง คือ จังหวัด เชียงราย สุโขทัย และนครศรีธรรมราช
2. จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ในระดับสปีชีส์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อัตราการเจริญเติบโต และการใช้เครื่องหมายโมเลกุล
3. ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ที่เชื้อราสาเหตุสร้างต่อความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

การตรวจเอกสาร

พริกมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอเมริกาคือ อเมริกาใต้และอเมริกากลาง (Safford, 1926) ปัจจุบันพริกได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก สำหรับประเทศไทยนั้นเชื่อกันว่าชาวโปรตุเกสเป็นผู้นำเข้ามาภายในประเทศ (สุชีลา, 2549) พริกเป็นได้ทั้งผักและเครื่องเทศจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่ใช้ในการบริโภคในครัวเรือน และเป็นวัตถุดิบเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามพริกยังมีการนำเข้าและส่งออกแต่ละปีมูลค่าค่อนข้างสูง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าและส่งออกนั้น มีทั้งในรูปแบบผลสด ซอสพริก พริกแห้ง พริกป่น พริกบด และเครื่องแกงสำเร็จรูป (เฉลิมเกียรติ, 2536)

พริกจัดอยู่ในตระกูล Solanaceae เช่นเดียวกับ มะเขือ มะเขือเทศ มันฝรั่ง และยาสูบ โดยทั่วไปเป็นได้ทั้งพืชล้มลุก ไม้พุ่ม และไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ซึ่งกระจายอยู่ทั่วโลก พริกเป็นพืชสกุล *Capsicum* พันธุ์พริกที่ปลูกในปัจจุบันแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ *Capsicum baccatum*, *C. pubescens*, *C. annuum*, *C. frutescens* และ *C. chinense* (Purseglove et al., 1981; Andrews, 1984; Pickersgill, 1988; Pickersgill, 1991)

การจัดจำแนกพริกทั้ง 5 กลุ่มนั้น โดยอาศัยลักษณะของดอกและผล สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *C. annuum* มีลักษณะประจำ ได้แก่ ดอกสีขาว อับละอองเกสรตัวผู้สีฟ้าถึงสีม่วง กลีบเลี้ยงมีหยักคอดที่จุดต่อกับก้านที่ช่อดอกมีเพียงดอกเดียวต่อช่อ แต่บางครั้งอาจมี 2 ดอกต่อช่อ ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ *C. frutescens* มีดอกสีเขียวยอ่อน กลีบเลี้ยงไม่หยัก และไม่คอดที่ฐานของผล อับละอองเกสรตัวผู้สีฟ้า ส่วนใหญ่มีดอกเพียงดอกเดียวต่อช่อ แต่บางครั้งอาจมี 2 ดอกต่อช่อ พันธุ์ป่าของพริกชนิดนี้อาจมีดอก 5 ดอกต่อช่อ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *C. chinense* ดอกสีขาวหรือสีเขียวยอ่อน อับละอองเกสรตัวผู้สีฟ้า กลีบเลี้ยงหยักและคอด ดอกมี 1-3 ดอกต่อช่อ ส่วนกลุ่มที่ 4 คือ *C. pendulum* มีดอกสีขาวและจุดสีเหลืองที่กลีบดอก อับละอองเกสรตัวผู้มีสีเหลือง ยาวและโค้ง ผลห้อยลงของใบแบนคล้ายใบและกลุ่มที่ 5 ได้แก่ *C. pubescens* ดอกใหญ่ สีม่วง ใบมีขนอ่อนๆ ผลสีเหลืองถึงส้มและเมล็ดสีดำ (Bassett, 1986)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริก

พริกเป็นพืชไม้พุ่ม ลำต้นตรง แตกกิ่งก้านสาขาแบบรศมี ต้นมีขนาดพุ่มลักษณะต่างๆ เช่น พุ่มเตี้ย และพุ่มสูง ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว มีขนาดต่างๆกัน ก้านใบมีขนาดความยาวประมาณ 0.5-2.5 เซนติเมตร ใบกว้างมีรูปไข่ ขอบใบเรียบ รากแก้วแข็งแรง แต่มักชะงักการเจริญเนื่องจากการย้ายกล้า มีรากแขนงแตกมากมาย รากฝอยพบมากบริเวณรอบๆต้น ดอกมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยว เกิดที่ข้อ อาจมีหลายดอกเกิดจากข้อติดๆกัน จนคล้ายเป็นดอกช่อ กลีบเลี้ยงสั้น กลีบเลี้ยงมี 4-7 กลีบ กลีบดอกมี 5 กลีบมีสีขาว เขียวอ่อน หรือม่วง ผลมีลักษณะไม่แตกเป็นชนิด berry มีเมล็ดมากพบทั้งผลห้อยหรือผลตั้ง ผลเกิดที่ข้อ ผลพริกมีลักษณะรูปร่าง ขนาด สี แตกต่างกันตามชนิดพันธุ์พริก ฐานของผลเป็นฐานรูปถ้วย หรือจานรองถ้วยซึ่งใช้ในการแยกประเภทของพริก (มณีฉัตร, 2541)

ปัญหาในการปลูกพริกนั้นมีทั้งโรคและแมลงรบกวนอยู่หลายชนิด ทำให้ต้องสูญเสียผลผลิตพริกในปริมาณมากต่อปี โรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด โรคที่มีความสำคัญคือ โรคแอนแทรคโนสหรือโรคกุ้งแห้ง ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่ผลพริกทั้งในแปลงปลูกและหลังการเก็บเกี่ยว

โรคแอนแทรคโนส

โรคนี้อาจติดมากับเมล็ด (สมศิริ และ ไพโรจน์, 2527) ทำให้สามารถทำลายพริกได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ระยะที่พริกอ่อนแอต่อโรคมมากที่สุด คือ ระยะติดผล เมื่อผลพริกเจริญเติบโตเต็มที่หรือระยะที่ผลพริกกำลังเริ่มเปลี่ยนสีไปจนถึงผลสุกสีแดง (Poulos, 1994) อาการเริ่มแรกที่เกิดขึ้นบนผลพริกจะเป็นแผลจุด น้ำน้ำ เนื้อเยื่อแผลยุบตัวลงจากเดิมเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงรีหรือวงกลม ขนาดแผลอาจจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 3-4 เซนติเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของผลพริกด้วย บนแผลจะพบ fruiting body ของเชื้อราเกิดเรียงซ้อนกันเป็นวง พบกลุ่มสปอร์ อาจจะมีสีดำหรือสีชมพูอมส้มก็ได้ ทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของเชื้อที่เข้าทำลายผลพริกนั้น ซึ่งมีรายงานไว้ทั้งหมดถึง 4 สปีชีส์ (Hadden and Black, 1987) เมื่อเนื้อเยื่อบริเวณแผลแห้งยุบตัวลง จะทำให้ผลพริกหักงอคล้ายกุ้งแห้ง อาจพบเชื้อสาเหตุของโรคเข้าทำลายพริกในระยะกล้า ซึ่งทำให้แสดงอาการของโรคเน่าคอดิน (damping-off) ทำให้ใบเป็นแผลจุดหรือทำให้ยอดแห้งได้ แต่ก็พบในบางท้องถิ่นที่เท่านั้น ถ้าเชื้อเข้าทำลายใบและกิ่ง จะทำให้ใบและกิ่งตายจากยอดลงมา (die-back) (สุภลักษณ์, 2536) ในประเทศไทยจะพบโรคแอนแทรคโนสระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกพริก โรคนี้นี้

เข้าทำลายพริกได้ทุกชนิด (สมศิริ, 2521) แต่พริกชี้ฟ้าจะอ่อนแอต่อโรคมกกว่าพริกชี้หนู (อรพรรณ และคณะ, 2535)

การแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสนั้นมีรายงานว่าเมื่อ conidium เจริญเต็มที่จะถูกต้น หรือถูกปล่อยออกมาภายนอก แพร่กระจายได้ดีในน้ำ ลม แมลง หรือสิ่งที่เข้าไปสัมผัส เข้าสู่พืชและ ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้โดยตรง (direct penetration) ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค พืช จะแสดงอาการของโรคให้เห็นภายใน 3 – 5 วัน ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริก ถ้ามีโรคระบาดใน ระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยว อาจมีเชื้อราสาเหตุโรคติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โดยติดที่บริเวณ seed coat ของ เมล็ด ซึ่งเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์เชื้อสามารถอยู่บนเมล็ดพันธุ์ได้นานประมาณ 9 เดือน ทำให้โรค สามารถระบาดไปได้ไกล เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่มีเชื้อติดอยู่ไปปลูก โอกาสเกิดโรคระบาดในแปลงจะ ก่อนข้างสูงและเชื้อยังสามารถอยู่ได้บนเศษซากพืชที่เป็นโรคได้นานถึง 3 ปี (Grover and Bansal, 1968)

เชื้อโรคเจริญเติบโตได้ดีและเข้าทำลายพืชได้มากในช่วงอุณหภูมิ 28 – 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป หากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของโรค เช่น มี น้ำค้างหรือฝนตกติดต่อกันหลายวันและผลพริกกำลังเจริญเติบโต จะทำให้โรคพัฒนาอาการได้ อย่างรวดเร็ว ผลพริกจะร่วงก่อนสุกหรือก่อนแก่เต็มที่ หรืออาจเน่าทั้งผล ทำให้ได้ผลผลิตน้อยและ คุณภาพต่ำ โรคนี้สามารถทำให้ผลผลิตลดลงได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ศักดิ์, 2537; Higgin, 1930; Smith and Crossan, 1958)

เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

โรคแอนแทรคโนสพริก มีรายงานว่า เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายสปีชีส์ เช่น *C. acutatum*, *C. atramentarium*, *C. capsici*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. nigrum*, *C. piperatum* และ *Gliosporium* spp. นอกจากนี้ยังพบว่าสปีชีส์ เป็นสาเหตุของโรคแอน แทรคโนสของพริกและมะเขือเทศได้อีกด้วย (Halsted, 1890; Halsted, 1891; Higgin, 1923; Higgin, 1926; Simmonds, 1965; Mordue, 1967; Barksdale, 1972; Verma, 1973; Miller *et al.*, 1984; Hadden and Black, 1987)

Hadden and Black (1987) ได้ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกพริกทางตอนใต้ของมลรัฐ Louisiana พบเชื้อรา *C. capsici* กับ *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคแอนแทรคโนสใน

หลายพื้นที่ ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* นั้นพบในบางพื้นที่เท่านั้น ขณะที่เชื้อรา *C. coccodes* เคยมีรายงานมาก่อนนี้ว่าเชื้อราสปีชีส์นี้ที่แยกได้จากมะเขือเทศสามารถเข้าทำลายผลพริกได้เช่นกัน

เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้มีการศึกษาและตั้งชื่อขึ้นในปี 1837 โดย Corda ต่อมาได้มีการศึกษาและจัดหมวดหมู่ของราสกุล *Colletotrichum* ขึ้นมาใหม่ (Alexopoulos *et al.*, 1996)

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Ascomycetes
Order	Phyllachorales
Family	Phyllachoraceae
Genus	<i>Colletotrichum</i>

ในต่างประเทศมีรายงานพบระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของรา ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่าจะอยู่ในจีนัส *Glomerella* (Sutton, 1992)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกที่พบได้ในประเทศไทยมีรายละเอียดดังนี้

เชื้อรา *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds

เชื้อรา *C. acutatum* มีพืชอาศัยกว้างและเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญของสตรอเบอร์รี่ พืชอาศัยของเชื้อ *C. acutatum* ได้แก่ แอปเปิล กาแฟ อะโวคาโด ฝรั่ง พริก มะเขือม่วง มะเขือเทศ เป็นต้น เชื้อรา *C. acutatum* ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยที่แตกต่างกัน เช่น โรคแอนแทรคโนสของพริก โรคจุดดำบนผลสตรอเบอร์รี่ อาการใบม้วนหงิกในผักชี กอเน่าในผักชีและไม้ดอก เป็นต้น (Freeman *et al.*, 2001; Than *et al.*, 2007) พืชอาศัยของเชื้อสปีชีส์นี้ที่มีรายงานในประเทศไทย คือ สตรอเบอร์รี่ และพริก เชื้อรา *C. acutatum* ก่อให้เกิดแผลบนผลพริกเริ่มสุก โดยจะเกิดจุดดำน้ำขนาดเล็ก แผลนุ่มลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายขนาด แผลมีลักษณะรูปวงรี ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่ชัดเจน มีตุ่มเล็กๆสีดำเรียงซ้อนกันเป็นรูปวงรีหลายชั้นบริเวณแผล ถ้าความชื้นสูงจะเห็นกลุ่ม conidial mass เยี่ยมสีส้มบริเวณแผล (ชารทิพย และคณะ, 2548)

โคโลนีมีสีขาวไปจนถึงสีเทา เทาปนน้ำตาล สลับกับสีชมพู สีแดงอมม่วง ไม่พบ การสร้างเม็ด sclerotium แต่พบการสร้าง appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างทรงกระบอก รูปไข่ และมีรูปร่างไม่แน่นอน บริเวณขอบมีลักษณะหยักเล็กน้อย appressorium มีขนาด 8.5-10 x 4.5-6 ไมโครเมตร ส่วน conidium มีรูปร่างแบบ fusiform มีลักษณะหัวท้ายแหลมทั้ง 2 ด้าน บางครั้งพบ บ้าง ที่มีลักษณะคอคบบริเวณกลางสปอร์ มีขนาด 8.5-16.5 x 2.5-4 ไมโครเมตร ลักษณะสีของ conidial mass มีสี rose, salmon pink และ orange pink เชื้อรา *C. acutatum* มีลักษณะทางสัณฐาน วิทยาคล้ายกับ *C. gloeosporioides* แต่จะมีความแตกต่างจาก *C. gloeosporioides* โดยมีอัตราการ เจริญเติบโตที่ช้ากว่า (Simmonds, 1965; Dyko and Mordue, 1979; Sutton, 1980; von Arx, 1981; Baxter *et al.*, 1983; Baxter and van der Westhuizen, 1984; Holiday, 1989; Walker *et al.*, 1991)

เชื้อรา *Colletotrichum capsici* (H.syd.) E. Bult. and Bisby

เชื้อรา *C. capsici* มีพืชอาศัยกว้างมาก และไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย เชื้อที่แยกได้จากพริกสามารถเข้าทำลายพืชอื่นๆได้ และสามารถทำให้พืชแสดงอาการได้หลายอย่าง เช่น เน่าคอดิน (damping-off) ยอดเน่า (collar rot) แคงเกอร์ (stem canker) เมล็ดเหี่ยวแห้ง (seedling blight) ใบไหม้ (leaf blight) ใบจุด (leaf spot) ลำต้นและกิ่งแห้งตาย (die-back) โรคน้ำแตร (anthracnose) และ ผลเน่า (fruit rot) พืชอาศัยของเชื้อที่มีรายงานในประเทศไทย คือ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) พริก (*Capsicum* spp.) มะละกอ (*Carica papaya* L.) ขมิ้น (*Curcuma domestica* Valenton) สำหรับต่างประเทศมีรายงานว่า เชื้อเข้าทำลายขมิ้น แควบ้าน (*Sesbania grandiflora* Desv.) ฝ้าย (*Gossypium* spp.) ถั่ว (*Desmodium gangeticum*) และถั่วกัว (*Cyamopsis tetragonoloba* Taub.) (ศุภลักษณ์, 2536)

เชื้อรา *C. capsici* พบครั้งแรกในปี 1913 โดย H. Sydow โดยเรียกว่า *Vermicularia capsici* จากผลพริก (*Capsicum frutescens* L.) และมีรายงานว่า มีพืชอาศัยอย่างน้อย 176 ชนิด (Sutton, 1980) ซึ่งทำให้มีผู้ตั้งชื่อเชื้อราต่างกันไปตามชนิดของพืชอาศัย เช่น ในปี 1947 Ramakrishnan ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* พบว่าเชื้อรา *C. capsici* และ *C. indicum* เป็น synonym กัน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เหมือนกัน เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์แบบพระจันทร์ เสี้ยว ลักษณะการเกิดโรค ซึ่งยังเป็นเชื้อสาเหตุของโรคสมอเน่าของฝ้ายอีกด้วย (Lagiere, 1971) เชื้อ ราสาเหตุเมื่อเข้าทำลายผลพริก ลักษณะแผลจะยุบตัวลง แผลมีรูปร่างวงกลมจนถึงรี ขอบแผล สม่ำเสมอ มีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วบนแผลก่อให้เกิดแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำซึ่งเป็นกลุ่มของ acervulus (สมศิริ, 2521) ขนาดของแผลไม่แน่นอน เรียงซ้อนกันเป็นวง พบว่าเชื้อรา *C. capsici* สามารถเข้า

ทำลายผลพริกได้โดยไม่ผ่านทางบาดแผล (Dastur, 1920) เนื่องจากเมื่อสปอร์ของเชื้อรา ตกลงบนผลพริก เชื้อราจะสร้างส่วนของ appressorium ซึ่งจะงอกขึ้นมาเพื่อเกาะบนผิวของผลพริก จากนั้นจะสร้าง infection tube ขึ้นมาเพื่อแทงผ่านผิวลงไปและปล่อยสารพิษออกมาเพื่อทำลายเซลล์พืช ก่อนที่จะเจริญสร้างเส้นใยและสร้าง acervulus ซึ่งเป็นแหล่งให้กำเนิดสปอร์ต่อไป (Higgin, 1926)

ลักษณะโคโลนิมีการเจริญหนาแน่น เส้นใยมีสีขาว ไปจนถึงเทาเข้มสลับกับสีน้ำตาลเข้ม ไม่พบการสร้างเม็ด sclerotium พบการสร้าง appressorium จำนวนมาก มีสีน้ำตาลอ่อน ไปจนถึงสีน้ำตาลเข้มถึงดำ รูปร่างทรงกระบอก รูปไข่ บริเวณปลาย ขอบมีลักษณะขั้วซ้อนและรูปร่างยาวไม่แน่นอน มีลักษณะต่อยาวเป็นลูกโซ่ มีขนาด 9-14 x 6.5-11.5 ไมโครเมตร สีของ conidial mass มีสี pale buff ไปจนถึง salmon สำหรับ conidium มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีสีครีมอ่อนหรือใสไม่มีสี (hyaline) รูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (falcate) ไปจนถึง fusiform มีลักษณะปลายข้างหนึ่งแหลมอีกข้างค่อนข้างมนถึงปลายเรียวยแหลมทั้ง 2 ด้าน ไม่มีผนังกั้น ขนาด 18-23 x 3.5-4 ไมโครเมตร มีการสร้าง setae มาก setae มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำบนแผล มีฐาน โป่ง ปลายเรียวยแหลม ขนาดประมาณ 5-8 x 250 ไมโครเมตร (Mordue, 1971; Sutton, 1980; von Arx, 1981; Holiday, 1989)

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc.

เชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเป็นเชื้อสาเหตุของพืชหลายชนิดทั่วโลก ในประเทศไทยพบว่าเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของ ฝรั่ง หอมใหญ่ หอมแบ่ง พริกไทย หน่อไม้ฝรั่ง พริก กว๊ายไม้ และกุหลาบ เป็นต้น (ชารทิพย และคณะ, 2548) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่มีพืชอาศัยกว้าง เชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้นมีรายงานว่ามีเชื้อราที่เป็น synonym กันอยู่ถึง 600 สปีชีส์ (Bailey and Jeger, 1992) ตัวอย่างเช่น ในปี 1974 Verma และ Krish ได้ศึกษาเชื้อรา *C. piperatum* (Smith, 1958; Smith and Crossan, 1958; Grover and Bansal, 1968) และ *Gloeosporium piperatum* E.&E. (Higgin, 1926; Higgin, 1930) และพบว่าเป็น synonym ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลักษณะการเกิดโรค เกิดแผลกลมรี ขูบตัวลง ขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 1-2 เซนติเมตรหรืออาจขยายใหญ่กว่านี้ เนื้อเยื่อบริเวณแผลขูบตัวลงเป็นแอ่ง แผลเมื่อเริ่มเกิดใหม่ๆ สีเหลืองส้มและถ้าอายุมากสีจะคล้ำลงเล็กน้อย ซึ่งเป็นกลุ่ม acervulus (สมศิริ, 2521) เรียงซ้อนกันเป็นวงๆ อยู่ในบริเวณแผล ในประเทศเกาหลี มีรายงานว่ามีเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีอยู่ 2 strain คือ strain G และ strain R โดย strain G มีความรุนแรงมากสามารถเข้าทำลายได้ทั้งผลเขียวและผลสุกแดงไม่สร้าง perithecium และ setae ส่วน strain R มีความรุนแรงน้อยและก่อให้เกิดความเสียหายเฉพาะผลสุก

แดง และยังพบการสร้าง perithecium และ setae อีกด้วย (Kim, 1986) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* strain G สร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตพริกในประเทศเกาหลี (Kim *et al.*, 1990)

ลักษณะโคโลนีมีความผันแปรค่อนข้างสูง มีสีขาวปนเทา เทาอ่อนไปจนถึงสีเทาเข้ม เส้นใยมีลักษณะเจริญฟูอัดตัวกันแน่น มีอัตราการเจริญเติบโตสม่ำเสมอ สลับกับสีขาวและมีสีเทา หรือสีเข้มขึ้นเมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้น พบการสร้างและไม่สร้าง setae มีการสร้างเม็ด sclerotium เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่ นอกจากนี้พบการสร้าง appressorium มีรูปร่างทรงกระบอก รูปไข่ รูป obovate บางครั้งพบว่ามีลักษณะแบบ lobed มีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ ขนาด 6-20 x 4-12 ไมโครเมตร ส่วน conidium มีเซลล์เดียว ใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน ตรงฐานตัด ขนาด 12-17 x 3.5-6 ไมโครเมตร สีของ conidial mass มีสี pale salmon (von Arx, 1957; von Arx, 1981; Mordue, 1971; Sutton, 1980; Holiday, 1980; Holiday, 1989; Baxter *et al.*, 1983; Baxter and van der Westhuizen, 1984)

การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยามีงานวิจัยของ รัตติยา และคณะ (2553) ได้รายงานโรคแอนแทรกโนสพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความหลากหลายของลักษณะโคโลนีมากที่สุดถึง 9 กลุ่มและขนาดความยาวของสปอร์มีขนาดผันแปรแตกต่างไปจากที่ Sutton (1980) เคยรายงานว่ามีขนาด 3-4.5 x 9-24 ไมโครเมตร สำหรับ *C. capsici* สามารถจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะโคโลนีแบ่งได้ 6 กลุ่ม ส่วน *C. acutatum* จัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะโคโลนีแบ่งได้ 5 กลุ่มเช่นกัน และยังพบอีกว่าลักษณะรูปร่างของสปอร์นั้นต่างจากที่ Bailey and Jeger (1992) ได้รายงานไว้ว่าสปอร์มีลักษณะปลายเรียวทั้ง 2 ด้าน แต่ที่ทำการศึกษาล้วนพบว่ามีปลายเรียวด้านใดด้านหนึ่ง

ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ส่วนมากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยคุณลักษณะการสร้าง acervulus รูปร่างและขนาดของ conidium และ appressorium การสร้างหรือไม่สร้าง setae ประกอบกับใช้ลักษณะของ teleomorph state ลักษณะและสีโคโลนี อัตราการเจริญเติบโต (von Arx, 1957) อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันหลายประการ เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์และลักษณะของโคโลนี แต่เมื่อนำมา

วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกแล้วกลับพบว่าต่างสปีชีส์กัน ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในแต่ละสปีชีส์ จะมีความผันแปรไปตามภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อราเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ และเพื่อให้เกิดความแม่นยำมากขึ้น ปัจจุบันนี้ได้นำเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) (Adaskaveg and Hartin, 1997) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น เทคนิค PCR ด้วย specie-specific primer เทคนิค ITS-RFLP และการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วน ITS (ITS sequence analysis) (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996)

ยีน ribosomal DNA (rDNA) เป็นยีนที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นยีนอนุรักษ์ (conserve) และส่วนที่ผันแปร (diverse) และมีจำนวนชุดเรียงซ้ำกันตั้งแต่หนึ่งถึงหลายร้อยชุด ในจีโนม rDNA ประกอบไปด้วยยีน 18S, 5.8S, 28S และ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งส่วนของ ITS นั้นนิยมนำข้อมูลลำดับเบสมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อราได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับเบสในส่วน ITS มีความผันแปรในเชื้อราแต่ละชนิด (White *et al.*, 1990)

เทคนิค RFLP (Restriction fragment length polymorphism) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และจะตัดดีเอ็นเอบริเวณที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิด ประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย โมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันหรือมีการเปลี่ยนโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิมเรียกว่า polymorphism หรือมี RFLP (สุรินทร์, 2545)

หทัยชนก (2546) ได้พัฒนาชุดไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ปนเปื้อนในเมล็ดพริก โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ rDNA โดยใช้ universal primer คือ ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) กับ ITS4 (TCC TCC GCT TAT

TGA TAT GC) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา *C.capsici* *C. dematium* และ *C. gloeosporioides* โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อรา *Colletotrichum* เท่านั้น ได้แก่ ไพรเมอร์ F/ITS1-CC และ R/ITS2-CC ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 412 คู่เบส พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ติดมากับเมล็ดพริกได้โดยตรง โดยสามารถตรวจสอบเชื้อราในเมล็ดที่มีการปนเปื้อน 10 เปอร์เซ็นต์และตรวจสอบได้ต่ำสุดถึง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอซึ่งง่ายและรวดเร็วต่อการตรวจสอบอย่างมาก

Abang *et al.* (2002) จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนใบของมันเทศ ในประเทศไนจีเรีย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เทคนิคทางชีวเคมี โดยทำการทดสอบการเจริญของเชื้อราสาเหตุบนอาหาร Casein Hydrolysis Medium (CHM) และใช้เทคนิคทางด้านอนุชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยการนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 5 ชนิด คือ *AluI* *HaeIII* *HhaI* *MspI* และ *RsaI* ซึ่งในการศึกษาอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยามาช่วยในการจัดจำแนก สามารถจัดจำแนกออกมาได้เป็น 4 กลุ่ม คือ FGS SGG FGO และ FGG โดยใช้ลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนี สีของกลุ่มสปอร์ อัตราการเจริญเติบโต รูปร่างและขนาดของสปอร์และแอฟเพอซอเรียม และความรุนแรงในการเกิดโรคบนใบมันเทศ ในการทดสอบการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร CHM พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* ทุกไอโซเลทและ *C. graminicola* เท่านั้นที่เกิดปฏิกิริยาบนอาหาร CHM โดยเกิด clear zone รอบโคโลนีเชื้อราสาเหตุ และในการศึกษาโดยใช้อ่อนชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนก พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยหลายชนิดและพบได้ในหลายพื้นที่ แต่เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด

Freeman *et al.* (2000) ได้ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลอัลมอนต์ อะโวคาโด และ สตรอเบอร์รี่ จากประเทศอิสราเอลและยังแยกเชื้อราบางส่วนได้จากผลอัลมอนต์ในประเทศสหรัฐอเมริกา การจัดจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์นั้นใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคทางด้านอนุชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค ITS-RFLP เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 เมื่อโดยใช้ universal primer คือ ITS1 และ ITS4 ผลจากปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 560 คู่เบส เมื่อนำผลผลิต ITS ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด ได้แก่ *BamHI* *HaeIII* *HhaI* *HindIII* *MspI* *PstI* *RsaI* *StuI* และ *TaqI* จากนั้นนำไปแยกแถบดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* จากการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์ โดยการนำ phylogenetic tree พบว่า *C. acutatum* ไอโซเลท TUT-5954 ที่แยกได้จาก

ผลสตรอบออร์รี่ในประเทศอิสราเอล อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C. acutatum* ไอโซเลท 179 และ 397 ที่แยกได้จากผลสตรอบออร์รี่และไอโซเลท ALM-US-4 ที่แยกได้จากเมล็ดอัลมอนต์ในประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน *C. gloeosporioides* ไอโซเลท AVO-37-43 ที่แยกได้จากอะโวคาโดจากประเทศอิสราเอลอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากแอปเปิลจากประเทศนิวซีแลนด์ และจากที่อื่นๆ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า *C. gloeosporioides* ไอโซเลท 37-4B (อะโวคาโด-อิสราเอล) *C. graminicola* ไอโซเลท DR1 *C. acutatum* ไอโซเลท TUT-5954 (สตรอบออร์รี่-อิสราเอล) ไอโซเลท ALM-US-4 (อัลมอนต์-สหรัฐอเมริกา) และ *Colletotrichum* ไอโซเลท ALM-KSH-10 (อัลมอนต์-อิสราเอล) นั้นมีความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity) ในระดับ 97.03-98.72 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *C. graminicola* ไอโซเลท DR1 มีความเหมือนกับ *C. gloeosporioides* (similarity เท่ากับ 95.11 เปอร์เซ็นต์) มากกว่า *C. acutatum* (similarity เท่ากับ 92.4-92.64 เปอร์เซ็นต์)

Martinez *et al.* (2003) ศึกษาเชื้อรา *C. acutatum* *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอบออร์รี่ โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 5.8S และ ITS ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับ *Colletotrichum* spp. คือ col1 (AAC CCT TTG TGA ACR TAC CTA) และ col2 (TTA CTA CGC AAA GGA GGC T) ได้แถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ ขนาด 462 คู่เบส ส่วน *C. acutatum* นั้นเมื่อใช้ไพรเมอร์จำเพาะคือ acut1 (CCG GAG GAA ACC AAA CTC TAT TTA C) ร่วมกับไพรเมอร์ col2 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 318 คู่เบส สำหรับ *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีความแตกต่างกันอย่างมาก อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MvaI* จะพบความแตกต่างใน 2 สปีชีส์นี้ได้ และแตกต่างไปจาก *C. acutatum* อีกด้วย เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ พบว่า *C. acutatum* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ส่วน *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* ต่างจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

Hong and Kim (2007) ได้ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและลักษณะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกในประเทศเกาหลี โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์และนำส่วนของยีน β -tubulin 2 (exon3-6) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ phylogenetic tree สามารถแยกเชื้อรา *C. acutatum* ได้เป็น 8 กลุ่ม คือ A1-A8.

Sheu *et al.* (2007) ศึกษาลักษณะความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราภายในสปีชีส์เดียวกันและระหว่างสปีชีส์ ของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกใน

ประเทศไต้หวัน โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุล เทคนิค ITS-RFLP และตัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *AluI* *BamHI* และ *RsaI* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทำให้สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ในระดับสปีชีส์ ได้ 4 สปีชีส์ คือ *C. acutatum* *C. boninense* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* โดยเอนไซม์ *AluI* ไม่ตัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ขณะที่เอนไซม์ *BamHI* ไม่ตัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. capsici*

การจัดจำแนกเชื้อกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ได้ จากคุณสมบัตินี้จึงได้นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อที่จะศึกษาลักษณะความแตกต่างของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นแนวทางในการจัดกลุ่มหรือจัดจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์ ได้อีกทางหนึ่ง

การทดสอบปฏิกิริยา casein hydrolysis ได้ถูกนำมาใช้โดยที่เคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ทั่วไปในนมอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียมคือ แคลเซียมเคซิเนต (calcium caseinate) เคซีนจัดเป็นพวกลูโคโพรตีน (phosphoprotein) ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ซึ่งได้จากการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) (ภาพที่ 1) ของกรดฟอสฟอริกกับหมู่ไฮดรอกซิล บริเวณสายไลซีน (lysine chain) ของโปรตีน โครงสร้างโมเลกุลของเคซีนประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide linkage, ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ ซึ่งจะได้ เอสเทอร์ เป็นผลิตภัณฑ์

ที่มา: http://www.hcc.mnscu.edu/chem/V.26/page_id_11273.html

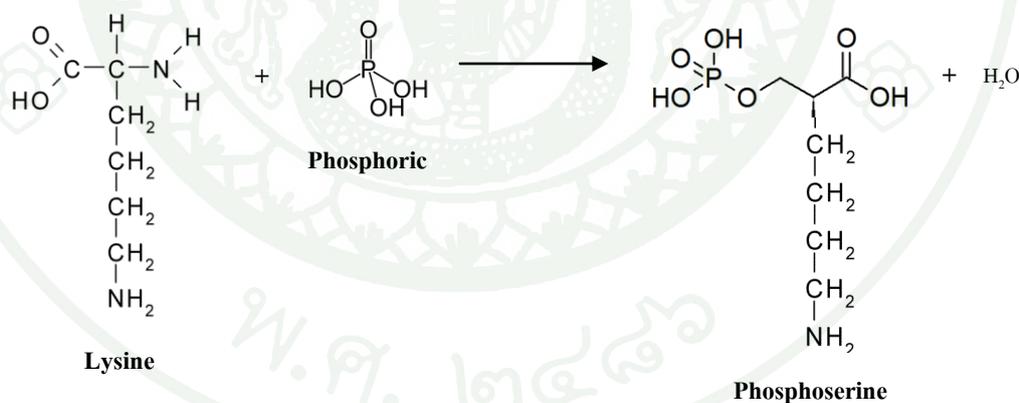
เคซีนมีลักษณะเป็นเม็ดสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส สมบัติของเคซีนจะตกตะกอนที่ pH 4.6 หรือด้วยน้ำย่อยเรนเนต (rennet) เคซีนมีสารประกอบหลักอยู่ 4 ชนิด คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนและไนโตรเจน นอกจากนั้นยังมีฟอสฟอรัสอยู่บ้างเล็กน้อย เคซีนแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด

คือ α_1 -casein, α_2 -casein, β -casein, γ -casien และ κ -casien ดังตารางที่ 1 (นรินทร์, 2528) ซึ่งจะรวมกันเป็นไมเซลล์ (micelle) (ภาพที่ 3) ทั้ง α_1 -casein, β -casein (ไม่ละลายในน้ำนมไม่ว่าจะอยู่แบบเดี่ยวๆหรืออยู่รวมกัน อย่างไรก็ตาม ถ้ามี κ -casien อยู่ด้วย จะรวมเป็นสารเชิงซ้อนที่ละลายในน้ำนมได้เนื่องจากเกิดเป็นไมเซลล์ (Garnier, 1973)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของเคซีน

ชนิดของเคซีน	น้ำหนักโมเลกุล	ปริมาณ (%ของเคซีนทั้งหมด)	จำนวนหมู่ ฟอสเฟตต่อโมเลกุล
α_1 -casein	23,000	38.1	7-9
α_2 -casein	25,000	10.2	10-13
β -casein	24,000	35.7	5
γ -casien	11,600 -20,500	3.2	0-1
κ -casien	19,800	12.8	1

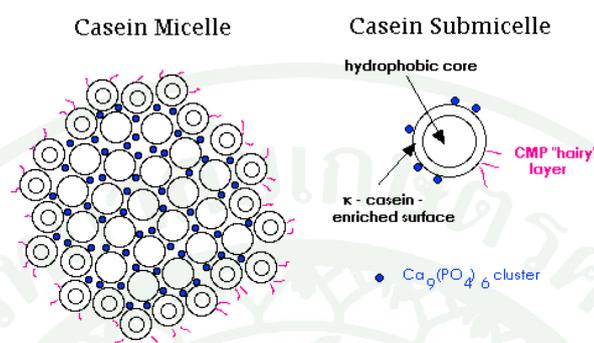
ที่มา: นรินทร์, 2528



ภาพที่ 2 พันธะเปปไทด์ คือ พันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่าง C อะตอมในหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนโมเลกุลหนึ่งยึดกับ N อะตอม ในหมู่อะมิโน (-NH₂) ของกรดอะมิโนอีกโมเลกุลหนึ่ง

ที่มา: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phosphoserine.svg>

โครงสร้างสำหรับเคซีนไมเซลล์คือ K-casein ช่วยให้ไมเซลล์เสถียร แคลเซียมไอออนสามารถทำให้ α s1-casein และ β -casein ตกตะกอน เนื่องจากโปรตีนทั้ง 2 ประเภทนี้เป็นฟอสโฟโปรตีน



ภาพที่ 3 เคซีนไมเซลล์ที่เกิดจากการรวมกันของ α s1-casein, α s2-casein, β -casein, γ -casein และ K-casein

ที่มา: www.foodsci.uoguelph.ca/deicon

สารเคซีนถูกนำมาใช้ในรูปแบบต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น นำไปใช้ทำอาหาร เครื่องสำอาง และนำไปทำผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมเคซีนเพื่อการบริโภค เป็นต้น (Liu and Guo, 2008) สารพวกเคซีนรวมทั้งเจลาตินมักถูกนำมาใช้ในการทดสอบกับจุลินทรีย์ เมื่อเกิดการแตกตัวโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย (catabolized) ทำให้ส่วนโปรตีนขึ้นรอบๆโคโลนีแทนส่วนที่บวม (McDade and Weaver, 1958) ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซิสสามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ (Trevan, 1987)

Shumi *et al.* (2004) ศึกษาการคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus funiculosus* โดยอาศัยลักษณะการย่อยเอนไซม์ protease พบว่าปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *A. funiculosus* แต่ละไอโซเลทมีการสร้างชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างนั้นมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับชนิดและค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ

เคซีนเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านพลาสมาเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงต้องเกิดการย่อยสลายให้เป็นกรดก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน โดยที่เชื้อแบคทีเรียจะจับเอนไซม์ proteolytic ออกมา เพื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสขึ้นมา ทำให้เคซีนแตกตัวออกเป็นกรดอะมิโน และเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จากนั้นเกิดกระบวนการย่อยสลายขึ้น เมื่อนำนมมาผสมกับวุ้นพบว่า เคซีนที่อยู่ในนมทำให้อาหารมีลักษณะขุ่น หากปลูกเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารดังกล่าว แบคทีเรียจะปลดปล่อยเอนไซม์กลุ่ม protease เช่น เคซีนเนส (caseinase) ออกมา ทำให้บริเวณโดยรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญขึ้น เกิดส่วนใส (Lammert, 2007)

Pan *et al.* (2000) ศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Chryseobacterium indologenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยทำการศึกษาทั้งหมด 42 ไอโซเลท ได้จากกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเลือด จำนวน 12 ไอโซเลท และกลุ่มที่แยกได้จากปัสสาวะ เสมหะและแผลไฟไหม้ ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่แพร่กระจาย จำนวน 30 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ protease เมื่อเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อและกลุ่มที่ไม่แพร่กระจายเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ที่พบในทั้ง 2 กลุ่ม ยกเว้นเอนไซม์ protease ที่สร้างโดย ไอโซเลทในกลุ่มที่ติดเชื้อจะมีบทบาทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ protease นั้นอาจมีบทบาทที่สำคัญในเรื่องของความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อ *C. indologenes* ก็เป็นไปได้

มีรายงานของ Medina and Baresi (2007) ซึ่งได้ศึกษาการจำแนกแบคทีเรีย โดยใช้ Trichloroacetic acid (TCA) เพื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารเจลาตินและเคซีน จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Serratia marcescens* สามารถย่อยสลาย TCA ได้ จึงนำวิธีการทดสอบนี้มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้รวดเร็วขึ้น

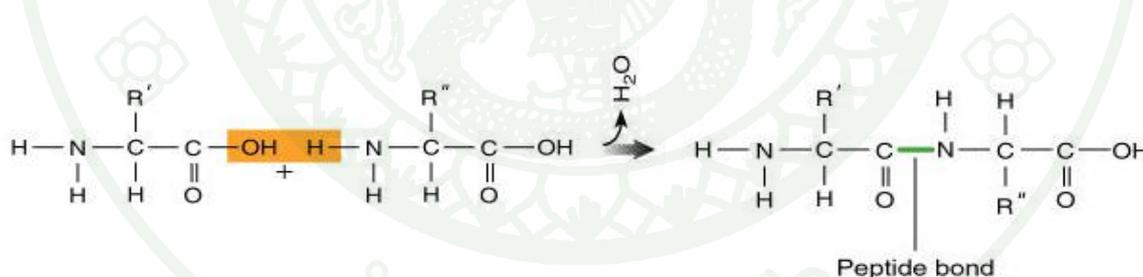
การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคให้ถูกต้องนั้นมีความสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมโรค Wang *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* species ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกับพริก ในประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย ใต้หวัน และไทย โดยศึกษาความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) อาศัยวิธี Internal Transcribed Sequence (ITS) ร่วมกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร Casein Hydrolysis Medium (CHM) ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ protease กับอาหารที่มีเคซีนผสม โดยสามารถจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ 4 สปีชีส์ คือ *C. acutatum* *C. boninense* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* โดยเชื้อราที่สร้างขนาดของ clear zone บนอาหาร CHM ได้มาก

ที่สุดคือเชื้อรา *C. acutatum* รองลงมาคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *C. boninense* ไม่สร้าง clear zone บนอาหาร CHM

เอนไซม์ที่เชื้อราสร้างกับความสามารถในการทำให้เกิดโรค

เชื้อราดำรงชีพได้โดยการรับอาหารจากเศษอินทรีย์วัตถุ โดยการเป็น saprotroph รับอาหารได้จากสิ่งมีชีวิตอื่น โดยการเป็น parasite หรือ biotroph นอกจากนี้ยังได้พึ่งพาสิ่งมีชีวิตอื่น โดยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน ซึ่งเรียกว่าเป็น symbiont โดยสภาพธรรมชาติที่แท้จริง เชื้อรามักได้รับอาหารจากเศษอินทรีย์วัตถุ แต่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเซลล์เชื้อราได้โดยตรง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการย่อยสลายทำให้เศษอินทรีย์วัตถุที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนหรือเซลลูโลส เปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่มีขนาดเล็กก่อนจึงซึมผ่านเซลล์เข้าไปได้ ส่วนสารอาหารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กลูโคส และกรดอะมิโนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง

การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อ (membrane) ของพืชและเซลล์พืช เป็นวิธีการในการเข้าทำลายพืชของเชื้อราวิธีหนึ่ง เอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งได้แก่ เอนไซม์ protease (ภาพที่ 3) ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนโดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เพื่อการสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond ; -CO-NH)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์ protease

ที่มา: www.en.wikipedia.com

เอนไซม์ protease มีชื่อสามัญเรียกได้หลายชื่อเช่น เปปติเดส (peptidase) โปรตีนเอส (proteinase) เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolysis) และโปรติโอไลติก (proteolytic) เป็นต้น

กระบวนการเกิดการสลายพันธะเปปไทด์คือ polarization โดยสารที่มีประจุลบหรือสารที่ชอบนิวเคลียส (nucleophilic) เข้าไปจับที่ตำแหน่งพันธะ carbon-oxygen ทั้งโดยตรงหรือโดยผ่าน

โมเลกุลของน้ำ ปฏิกริยาจะมีการให้โปรตอนกับ peptide nitrogen หรือที่เรียกว่า leaving group ในแต่ละกลุ่มหรือ family ของ protease จะมีชุดของกรดอะมิโนที่มีบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ตำแหน่งต่าง ๆ กัน (James, 1980) เอนไซม์ protease ที่พบในจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติคล้ายกับ แอลฟาโคโมทริปซิน ซึ่งมีความจำเพาะต่อซับสเตรตเหมือนกัน

เอนไซม์ protease มีบทบาทสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในการตัดเปลี่ยนโปรตีน เพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ ในการดำรงอยู่อย่างสมดุล เอนไซม์ชนิดนี้จะแบ่งออกตามขนาดของโมเลกุล ประจุ และความจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรต (substrate) ได้มีการแบ่งโดยใช้ตำแหน่งที่ซับสเตรตเข้าเกาะที่เรียกว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังจัดแบ่งตามความสามารถในการตัดพันธะของสายโพลีเปปไทด์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ protease ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีนเรียกว่า เอนไซม์เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) และเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในสายโปรตีนเรียกว่า เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) (Polgar, 1989)

International Union of Biochemistry (IUB) แบ่ง เอนไซม์ protease ออกเป็น 4 กลุ่มตามการทำงานบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) (National Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984) ได้แก่

1. Serine protease โดยที่ active site มีกรดอะมิโน serine และ histidine
2. Cysteine protease of thiol protease โดยที่ active site มี cysteine และ histidine
3. Aspartic protease โดยที่ active site มีกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acids)
4. Metallo protease โดยที่ active site มีกรดกลูตามิกและอะตอมโลหะ (metal atom)

การศึกษาเอนไซม์ protease ได้มีการแบ่งกลุ่มโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของ serine protease สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ mammalian serine protease และ bacterial serine protease โดยทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างสามมิติ ส่วนในเอนไซม์ metallo protease ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือ mammalian pancreatic carboxypeptidase และ bacterial protease thermolysin (Neurath, 1984)

Louis and Cooke (1985) พบว่ากลุ่มของสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สร้างเอนไซม์ cellulases และ pectinolytic ส่วนเชื้อรา *Mycosphaerella pinodes* แม้จะสร้างเอนไซม์

ทั้ง 2 ชนิดได้ แต่สร้างได้น้อยกว่า โดยเตรียมเลี้ยง culture เชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 8 และ 20 วัน และเชื้อรา *M. pinodes* อายุ 12 และ 20 วัน จากนั้นนำไปตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ cellulases ในอาหารปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 1 เปอร์เซ็นต์ carboxymethyl cellulose (CMC) กับ 100 มิลลิโมล ของโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.2) และผสมด้วยสารแขวนลอยสปอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ pectinolytic นั้นจะเตรียมการคล้ายกัน เพียงแต่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ citrus pectin ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กับสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับอายุของเชื้อรา สำหรับ *C. gloeosporioides* และ *M. pinodes* มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เมื่ออายุเชื้อ 8 และ 12 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้น เมื่ออายุ 20 วันแล้ว กิจกรรมจะลดลงถึง 25 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่ออายุมากกว่า 20 วัน ไปแล้ว ไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดได้ ช่วงระยะเวลาของอายุเชื้อราที่ปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาได้มากนั้น น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยไปกระตุ้นให้สปอร์มีการงอกของ germ tube ได้ดี (Williams and Allison, 1952; Allison, 1962)

Pinti *et al.* (2007) ได้ศึกษาการจับจำแนกและลักษณะของเอนไซม์ aspartyl protease ซึ่งสร้างโดยเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* สาเหตุของโรคเชื้อราสมองอักเสบในผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อเช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องทำให้ติดเชื้อได้ง่าย *C. neoformans* ผลิตเอนไซม์ protease มาย่อยสลายในโตรเจนจากโปรตีน ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความเสี่ยงของโรค เนื่องจากเชื้อสามารถเข้าทำลายและเพิ่มปริมาณในตัวผู้ป่วยได้ง่าย (Ogrydziak, 1993; Aoki *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Perfect *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2003) จากการศึกษาพบว่า ยาในกลุ่มที่ขัดขวางเอนไซม์ protease (Protease inhibitors; PIs) จะมีผลในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค เช่น เชื้อรา *C. neoformans* และ *Candida albicans* ได้ นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของยาในกลุ่มที่ขัดขวางเอนไซม์ protease นั้นส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ aspartyl protease ซึ่งสร้างโดยเชื้อรา *C. albicans* แต่ยังไม่มีความแน่ชัดว่าสามารถยับยั้งการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ได้

ความสามารถของเชื้อในการทำให้พืชเป็นโรค (Pathogenicity)

ความสามารถของเชื้อในการทำให้พืชเป็นโรคนั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรง (virulence) และพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค แม้ว่าจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกันก็ตาม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของพืช และสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ฯลฯ อาจมีผลต่อการ

เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อหรือพืชอาศัยนั้น เชื้อสาเหตุบางชนิดอาจไม่จำเพาะต่อพืชอาศัย ซึ่งอาจจะเข้าทำลายพืชได้มากมายหลายชนิด เนื่องจากเชื้อสาเหตุสามารถสร้างสารพิษหรือเอนไซม์ที่ไม่เฉพาะต่อการเข้าทำลายพืช ระยะที่เชื้อสาเหตุสร้างสารพิษหรือเอนไซม์มาช่วยเพื่อเข้าทำลายพืช คือระยะการแทงผ่าน (penetration) เชื้อสร้างสารเข้าไปย่อยเซลล์ผิวพืชส่วนที่เชื้อสัมผัสเป็นการเปิด ทางให้เชื้อสาเหตุเข้าสู่พืช (ไพโรจน์, 2525)

ในการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่ากลไกการเกิดโรคนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุ เช่น การสร้างสารพิษและสารทุติยภูมิไปกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเชื้อราและความรุนแรงของการเกิดโรค (Penalva *et al.*, 2001)

Redman and Rodriguez (2002) ศึกษาลักษณะกระบวนการปล่อยเอนไซม์ serine proteinase ออกจากเซลล์ของเชื้อรา *Colletotrichum coccodes* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะเขือเทศและศึกษาความรุนแรงของการเกิดโรค ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรานี้เริ่มจากการที่เชื้อยึดติด (adhesion) กับเนื้อเยื่อพืชจากนั้นจะสร้างส่วนที่แทงผ่าน (penetration) ผนังเซลล์พืชซึ่งเข้าสู่พืชได้ด้วยวิธีการและการสร้างเอนไซม์มาช่วยเช่น เอนไซม์ cutinases pectinases cellulases และ protease (Walton, 1994; Mendgen *et al.*, 1996) จากการศึกษาโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีมาช่วยในการจัดจำแนกลักษณะของกระบวนการปล่อยเอนไซม์ serine proteinase พบว่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ protease กับความสามารถในการเกิดโรคเป็นไปในทิศทางเดียวกัน หากกิจกรรมของเอนไซม์ protease มากความสามารถในการเกิดโรคก็และความรุนแรงของเชื้อรา *C. coccodes* เพิ่มมากขึ้นด้วย

You and Chung (2007) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในพืชตระกูลส้ม คือ โรคแอนแทรคโนสของมะนาว (Key lime anthracnose; KLA) และ โรคผลอ่อนหลุดร่วง (Postbloom fruit drop; PFD) โดยทำการศึกษา ยีน $PacC^{KLAP2}$ ของเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งได้ทำให้กลายพันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์พวก cellulases cutinases xylanase และ catalase ก่อนข้างต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ทำให้การเข้าทำลายและการขยายขนาดของแผลของอาการโรคทั้ง 2 ชนิดค่อนข้างช้า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน $PacC^{KLAP2}$ เป็นยีนที่มีบทบาทต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรานี้

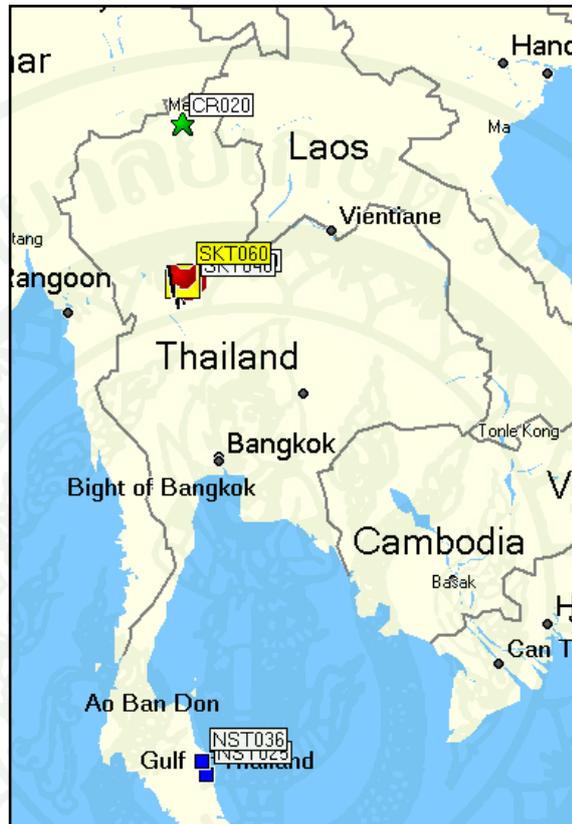
Dunaevsky *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาลักษณะของการปล่อยเอนไซม์ serine proteinase ออกมาภายนอกเซลล์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งในการเข้าทำลายของเชื้อรา

C. gloeosporioides นั้นมีกระบวนการที่ซับซ้อน เนื่องจากเชื้อราจะสร้างสารพิษหรือเอนไซม์บางชนิดออกมาเพื่อย่อยสลายส่วนของผนังเซลล์ของพืช เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้นบริเวณที่เชื้อสัมผัสกับผนังเซลล์พืช ทำให้เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถแทงผ่านเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยตรง จากการศึกษาเอนไซม์ serine proteinase ที่เชื้อรานี้สร้างได้ดีที่สุดเมื่อค่า pH เท่ากับ 9.0-10.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างฟริกที่เป็นโรคแอนแทรกโนสเพื่อใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 5 พิกัดทางภูมิศาสตร์ในการเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกโนสฟริก

เก็บตัวอย่างผลฟริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนสจากแหล่งปลูกฟริก 3 แหล่ง (ตารางที่ 2) คือจังหวัด เชียงราย สุโขทัย และนครศรีธรรมราช (ภาพที่ 5) จากนั้นนำมาแยกเชื้อจากผลฟริก ด้วยวิธี tissue transplanting โดยใช้ clorox 1.2 เปอร์เซ็นต์ หม่าเชื้อที่ผิวพืชและล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งหม่า เชื้อ นำชิ้นส่วนพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อ ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อเชื้อรา สร้างกลุ่มของสปอร์ (conidial mass) จึงนำมาแยกเป็นสปอร์เดี่ยวโดยวิธี single spore isolation (SSI) บนอาหาร water agar (WA) จากนั้นนำเชื้อที่ได้เลี้ยงบนอาหาร potato carrot agar (PCA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยอาศัยลักษณะทาง ลักษณะของเชื้อสาเหตุ

นำเชื้อรา *Colletotrichum* ที่มีอายุ 5 วัน เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน บันทึกลักษณะของโคโคนี รูปร่างและขนาด conidium รูปร่างและขนาด appressorium ลักษณะรูปร่างและการสร้างหรือไม่สร้าง setae ของเชื้อ ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) และ Bailey and Jeger (1992)

ตารางที่ 2 แหล่งเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคแอนแทรคโนสพริก

พื้นที่	พิกัดทางภูมิศาสตร์	พันธุ์พริก	จำนวน
เชียงราย			20
หมู่ 3 ต. แม่กรณ์ อ. เมือง	N 19° 54' E 99° 49'	เกาหลี	
สุโขทัย			20
หมู่ 5 บ้านยางแดง ต. ดงเดือย อ. กงไกรลาศ	N 16° 54' E 99° 59'	แม่ปิ้ง 80	
หมู่ 2 บ้านหนองบัว ต. ท่าฉนวน อ. กงไกรลาศ	N 16° 36' E 99° 49'	แดงสยาม, หยกสยาม	
หมู่ 1 ต. ปากแดง อ. เมือง	N 16° 48' E 99° 53'	แม่ปิ้ง 80	
นครศรีธรรมราช			18
หมู่ 9 ต. เขาพังไกร อ. หัวไทร	N 7° 59' E 100° 14'	แซมเป็ยนสอด	

3. การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยอาศัยลักษณะทาง สรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกข้อมูลโดยวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทุกวัน จนครบ 7 วัน ใช้สูตรคำนวณ
ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของ } dy = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของ } dy - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของ } dx}{2}$$

2

dy = การเจริญเติบโตของวันที่ต้องการศึกษา

dx = การเจริญเติบโตของวันก่อนที่จะทำการศึกษา

4. การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล

4.1 การสกัดและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ

1. สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร PDA ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 7 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ย้ายเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น วุ้น มาเลี้ยงในอาหารเหลว Spezieller Nährstoffarmer broth (SNB) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าบน rotary shaker เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเส้นใยที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (whatman no.1) ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

2. สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zimand *et al.* (1994) โดยทำการบดตัวอย่างเชื้อราตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัม ด้วย liquid nitrogen ให้ละเอียดแล้วถ่ายลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex

4. เติมเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 2.8 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายและตกตะกอนโปรตีน ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปลาย tip คนเบาๆ

5. นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ สารละลาย choroform: isoamyl alcohol (IAA) (อัตราส่วน 24:1) ที่เย็นจัด ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนและกำจัดโปรตีน ผสมให้เข้ากันเบาๆ

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ส่วนบน ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

8. เติมเอนไซม์ Rnase A ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เพื่อย่อยและกำจัด RNA ออกจาก DNA ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปลาย tip คนเบาๆ

9. นำไปปั่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

10. จากนั้นเติม choroform:IAA (24:1) ที่เย็นจัด ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน

11. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที

12. ดูดสารละลายส่วนใส ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf ใหม่

13. เติม absolute alcohol ที่เย็นจัด ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

14. นำไปปั่นเหวี่ยงระดับที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใส ที่เป็น absolute alcohol ที่ ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออกมา

15. เติม 70 % ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง (ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง)

17. ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง โดยการเปิดฝาทิ้งไว้ (air drying method) นาน 20-30 นาที จากนั้นเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือนำมาละลายตะกอนใน 1xTE buffer

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เมื่อละลายตะกอนดีแล้ว เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1.5 % agarose gel ใน 1xTBE buffer บันทึกรูปการเกิดแถบของดีเอ็นเอ

การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้แสง blue light โดยเครื่อง Dark Reader™ Transilluminator (Clare chemical research) แล้วเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน สามารถบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอได้โดยประมาณ นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ถึงคุณภาพดีเอ็นเออีกด้วยซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel โดยชั่งผล agarose gel 1.2 กรัม ใส่ใน 1X TBE buffer (Tris base, 0.5 mM EDTA, Boric acid) ปริมาตร 80 มิลลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายด้วยไมโครเวฟ จนกระทั่ง ควันหลอมละลายหมด รอจนกระทั่งเย็นลงจึงเทลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวีเสียบไว้แล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่ง gel แข็งตัว

2. เมื่อ gel แข็งตัวแล้ว ย้าย gel ลงไปใน horizontal chamber โดยให้ด้านที่มีหวีอยู่ด้านข้าง ลบ แล้วเท 1X TBE buffer ลงท่วมแผ่น gel แล้วดึงหวีออก

3. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ, loading buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA] และ gel star ในสัดส่วน 5:2:3 ไมโครลิตร แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องหวีด้วย pipette

4. ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบ ไปยังขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 3 ใน 4 ของแผ่น gel

5. นำแผ่น gel ไปส่องดูภายใต้แสง blue light และบันทึกภาพด้วยกล้อง digital Canon รุ่น 450D

4.2 การทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction PCR โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดไว้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer คือ ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') และ ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม
2. เตรียม Master mix ซึ่งประกอบด้วย (ดีเอ็นเอตัวอย่าง, Dream *Taq* buffer^{Mg²⁺}, dNTPs, ITS4 primer, ITS 5 primer และ Dream *Taq* polymerase) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของ Master mix สำหรับปฏิกิริยา PCR-RFLP

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร/ 1 ปฏิกิริยา (μl)
1. DNA template	20 ng/μl	20 ng	1.0
2. sterile dH ₂ O	-	-	18.4
3. Dream <i>Taq</i> buffer ^{Mg²⁺}	10X	1X	2.5
4. dNTP	1 mM	0.04 mM	1.0
5. ITS4 primer	10 μm	400 nm	1.0
6. ITS 5 primer	10 μm	400 nm	1.0
7. Dream <i>Taq</i> polymerase	5 u/μl	0.5 u	0.1
รวมทั้งหมด			25

3. นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermal cycler) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ปฏิกิริยา รอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. ตรวจสอบผลผลิต ITS (ITS product) โดยนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1xTBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 75 โวลต์ บันทึกการเกิดแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสง blue light โดยเครื่อง Dark Reader™ Transilluminator (Clare chemical research) และบันทึกภาพด้วยกล้อง digital Canon รุ่น 450D

5. นำผลิตภัณฑ์ ITS มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *AluI* *BamHI* และ *RsaI* โดยการเตรียม Master mix ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของ Master mix สำหรับการตัดผลิตภัณฑ์ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร/ 1 ปฏิบัติ (µl)
1. PCR-product	20 ng/µl	20 ng	10
2. Nuclease-free water	-	-	17
3. Buffer Tango™ ⁺	10X	1X	2
4. Enzyme : <i>AluI</i> , <i>BamHI</i> and <i>RsaI</i>	10u/µl	10u	1
รวมทั้งหมด			30

นำผลิตภัณฑ์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (digested product) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นใช้ pipette ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ไปแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis บน 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1xTBE buffer

ตรวจดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นกับเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้พิจารณาจากความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แล้วคัดเลือกตัวแทนเพื่อนำผลิตภัณฑ์ ITS ส่งไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย

5. ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์โปรติเอสกับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา

Colletotrichum

5.1 ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 58 ไอโซเลท บนอาหาร PDA มีอายุ 5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CHM ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดของ clear zone และศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม R-stat version 2.12.2 เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ

5.2 ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein from bovine milk medium (CBM)

นำเชื้อรา *Colletotrichum* ที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนจากข้อ 5.1 ซึ่งให้ค่า clear zone ที่แตกต่างกันมาทำการศึกษา โดยคัดเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ แต่ละสปีชีส์คัดเลือกไอโซเลทที่สร้าง clear zone ในระดับมากที่สุด และน้อยที่สุด แต่ละระดับ เลือกมา 3 ไอโซเลท (จำนวนทั้งสิ้น 18 ไอโซเลท) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่ออายุครบ 5 วัน ย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CBM ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดของขนาด clear zone และศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม R-stat version 2.12.2

5.3 ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease

5.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* เพื่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 18 ไอโซเลท (ชุดเดียวกับที่ใช้ในการทดลองข้อ 5.2) บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน จากนั้นนำมาทำสารแขวนลอยสปอร์ (conidial

suspension) นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer นำสารแขวนลอยสปอร์มาเติมลงในสารละลาย phosphate buffer plus suger (PBS) ปริมาณสปอร์ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ก่อนทำการเติมสารแขวนลอยสปอร์ลงในสารละลาย PBS ทำการเติมสารละลาย 1 % (w/v) skim milk และ 1 % (w/v) casein from bovine milk ก่อน ซึ่งเป็นสารเหนียวนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นจึงนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาตรวจวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น BOECO model S-22 ทุก 24 ชั่วโมง

5.3.2 การตรวจหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sigma, 2008)

มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. นำสารละลาย 0.65 % (w/v) casein from bovine milk และ 0.65 % (w/v) skim milk ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. เติม crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน centrifuge tube ที่มีสารละลายดังกล่าวข้างต้น ไปเขย่าให้เข้ากัน ส่วนหลอดที่เป็น blank ยังไม่ต้องเติม crude enzyme (protease standard)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติมสารละลาย 110 mM trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ส่วนหลอดที่เป็น blank เติม crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป เพื่อปรับปริมาตรให้เท่ากัน
6. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
7. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย

8. คูดสารละลายส่วนใส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน centrifuge tube ที่มีสารละลาย 500 mM sodium carbonate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.5 mM Folin & Ciocalteu's phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปและเขย่าให้เข้ากัน

9. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

11. ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น BOECO model S-22 บันทึกข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารตั้งต้นต่างกันคำนวณหาค่าเฉลี่ย OD_{660} ของแต่ละตัวอย่าง

นำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน จากนั้นนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับความกว้างของ clear zone ที่เชื้อราสร้างขึ้น (จากการทดลอง 5.2)

5.4 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* บนผลพริก

นำเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 18 ไอโซเลท (ชุดเดียวกับที่ใช้ในการทดลองข้อ 5.2) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA มีอายุ 5 วัน จากนั้นนำมาทดสอบบนผลพริก โดยการปลูกเชื้อด้วย inoculum 2 แบบ คือ 1) mycelial disc เตรียมโดยใช้ cork borer ขนาดเบอร์ 7 เจาะที่ขอบโคโลนีของเชื้อรา และ 2) conidial suspension เตรียมจาก culture ที่มีอายุ 5 วัน นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer ปริมาณ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

พริกที่ใช้ในการทดสอบคือพริกจินดา และพริกบางช้าง ซึ่งมีการเจริญ 2 ระยะ คือ ระยะผลเขียวอมแดง และระยะผลแดง โดยนำพริกมาทำความสะอาดที่ผิว (surface disinfectant) โดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้ทั่วผลพริก จากนั้นใช้เข็มเจาะที่มีความลึกประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเจาะลงบนผลพริก ผลละ 1 แผล นำ mycelial disc 1 ชิ้น หรือ conidial suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวางหรือหยดลงบนแผล แต่ละวิธีการทดลองใช้พริกจำนวน 5 ผลต่อไอโซเลท ส่วนการทดลองควบคุมนั้นใช้อาหาร PDA ที่เจาะเป็น disc สำหรับการทดลอง

ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc และใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อแทน conidial suspension จากนั้นนำไปบ่ม ที่ อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

บันทึกข้อมูลโดยวัดขนาดของแผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน วัดผลการเกิดโรคโดยวิธีของ รัตตา (2542) คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลพริกที่แสดงอาการโรค} \times 100}{\text{จำนวนผลพริกทั้งหมด}}$$

$$\text{ความรุนแรงของโรค} = \frac{\text{พื้นที่ผิวของผลพริกที่แสดงอาการของโรค} \times 100}{\text{พื้นที่ผิวทั้งหมดของผลพริก}}$$

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม R-stat version 2.12.2 เปรียบเทียบ ความสัมพันธ์ของความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นกับการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราในการทดลอง 5.2 และ 5.3

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

7. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เริ่มการทดลองเดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 สิ้นสุดการทดลอง เดือนมกราคม พ.ศ. 2554

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสเพื่อใช้ในการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการ โรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริก 3 จังหวัด ได้จำนวน 58 ไอโซเลท คือจังหวัดเชียงราย (CR) สุโขทัย (SKT) และนครศรีธรรมราช (NST) ได้จำนวน 20 18 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยดูจากลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ซึ่งแผลที่มีอาการเริ่มต้นจะมีลักษณะเป็นแผลน้ำมูก มีสีน้ำตาลเข้มบริเวณรอบแผล แผลบวมเล็กน้อย ต่อมามีแผลจะขยายขนาดออกในลักษณะวงกลม หรือวงรี เกิดเป็นวงคำซ้อนกันเป็นชั้นๆ และมีการสร้างกลุ่มของ conidia เป็นเมือกเยิ้มสีส้มบริเวณแผล (จุมพล และคณะ, 2537)

2. การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ

ในการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ 3 สปีชีส์ คือ เชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จำนวน 19 20 และ 19 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยในพื้นที่จังหวัดเชียงรายพบเชื้อรา *C. acutatum* มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจังหวัดนครศรีธรรมราชพบเชื้อรา *C. capsici* เพียงอย่างเดียว และจังหวัดสุโขทัยยังพบเชื้อรา *C. gloeosporioides* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) จากรายงานของ ธารทิพย์และคณะ (2548) ที่ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* จากพืชอาศัยหลายชนิด จำนวน 110 ไอโซเลท จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์พบว่า ในพริกนั้นพบเชื้อรา *Colletotrichum* 3 สปีชีส์ที่สามารถเข้าทำลายพืชได้ คือ เชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า พริกพันธุ์เกาหลีมีความอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. acutatum* ขณะที่พริกพันธุ์แจ่มเป็ยสอดซึ่งเป็นพริกพันธุ์การค้ายังอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. capsici* เช่นเดียวกับพริกพันธุ์แม่ปิง 80, แดงสยาม และหยกสยามซึ่งอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ตารางที่ 5 การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ในระดับสปีชีส์ในพื้นที่แหล่งปลูกที่แตกต่างกัน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

พื้นที่	จำนวนทั้งสิ้น	<i>C. acutatum</i>	<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
เชียงใหม่	20	19	-	1
สุโขทัย	18	-	-	18
นครศรีธรรมราช	20	-	20	-

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* จะสร้างโคโลนีสีขาวอมเทา ขาวอมส้มและขาวไปจนถึงเขียวอมเทา โคโลนีมีลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีฟู พบการสร้าง concentric ring ในบางไอโซเลท การสร้างกลุ่มของสปอร์บริเวณกลางโคโลนี กลุ่มของสปอร์มีสี orange bright, orange, salmon orange และ pale salmon จากการอาศัยลักษณะของโคโลนีในการแบ่งกลุ่มพบว่า *C. acutatum* สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม เช่นเดียวกับรายงานของรัตติยา และคณะ (2553) แต่ลักษณะสีของกลุ่มสปอร์ที่ทำการศึกษามีความผันแปรสูงกว่า (ภาพที่ 6, A-E) สปอร์มีลักษณะเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี มีรูปร่างแบบทรงกระบอก (cylindrical) ส่วนปลายของสปอร์มีลักษณะเรียวด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน บางครั้งอาจพบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ (constricted) หรือรูปร่างแบบตรง (straight) มีลักษณะหัวท้ายเรียว (fusiform) (ภาพที่ 7-A) สปอร์มีขนาด 2.5-3.5 x 7.5-23.7 ไมโครเมตร ขนาดของสปอร์นั้นมีความผันแปรมากโดยเฉพาะความยาวของสปอร์ (รัตติยา และคณะ, 2553) ซึ่ง Sutton (1980) รายงานว่า *C. acutatum* มีรูปร่างสปอร์แบบ fusiform มีลักษณะหัวท้ายแหลมทั้ง 2 ด้าน บางครั้งพบบ้างที่มีลักษณะคอดบริเวณกลางสปอร์ สปอร์มีขนาด 2.5-4.0 x 8.5-16.5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae ส่วนการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *C. acutatum* พบการสร้าง appressorium มีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง circular, clavate, long clavate, cylindrical, irregular ไปจนถึง lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่ (ภาพที่ 9) appressorium มีขนาด 5.0-10.0 x 7.5-25.0 ไมโครเมตร (ตารางที่ 6)

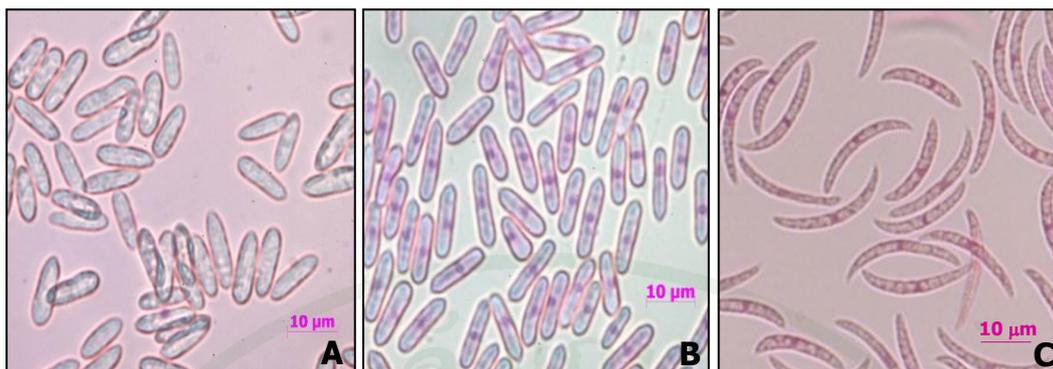
ส่วน *C. capsici* โคโลนีมีสีขาวอมเทา ขาวอมเขียวและเทาไปจนถึงเทาเข้ม เส้นใยฟูเล็กน้อย พบการเกิด concentric ring ชัดเจน ขอบโคโลนีเรียบบางครั้งพบขอบหยัก พบการสร้างกลุ่มของสปอร์ทั่วโคโลนี กลุ่มของสปอร์มีสี salmon orange, salmon, pale salmon, pale peach และ buff จากการอาศัยลักษณะของโคโลนีในการแบ่งกลุ่มพบว่า *C. capsici* สามารถแบ่งได้ 8 กลุ่ม ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Sharma et al (2005) รายงานว่าจากการศึกษาเชื้อรา *C. capsici* จำนวน 37

ไอโซเลท สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราได้ 5 กลุ่ม และจากงานวิจัยของ Sutton (1980) พบสีของ conidial mass มีสี pale buff ไปจนถึง salmon (ภาพที่ 6, F-M) ลักษณะสปอร์ที่พบจะมีลักษณะเซลล์เดียว ใสไม่มีสี มีรูปร่างแบบเสี้ยวพระจันทร์ (falcate) ไปจนถึง แบบตรงมีลักษณะหัวท้ายเรียว (fusiform) (ภาพที่ 7-C) สปอร์มีขนาด 2.5-3.7 x 17.5-28.7 ไมโครเมตร พบการสร้าง setae มีสีดำ มีลักษณะปลายแหลม พบบ้างที่มีลักษณะปลายมน setae มีขนาด 5.0-7.5 x 55.0-240.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 8-A,B) ส่วนการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *C. capsici* พบการสร้าง appressorium มีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง clavate, long clavate, cylindrical, irregular ไปจนถึง lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่ แต่ไม่พบรูปร่าง circular ในเชื้อรา *C. capsici* (ภาพที่ 9) มีขนาด 5.0-17.5 x 10.0-21.2 ไมโครเมตร (ตารางที่ 6) ขนาดของสปอร์ setae และ appressorium นั้นมีขนาดที่ผันแปรไปจากเดิม โดยขนาดของสปอร์มีขนาดประมาณ 3.5-4.0 x 18.0-23.0 ไมโครเมตร setae มีขนาดประมาณ 5.0-8.0 x 250.0 ไมโครเมตร และ appressorium มีขนาด 6.5-11.5 x 9.0-14.0 ไมโครเมตร (Sutton, 1980; von Arx, 1981; Holiday, 1989)

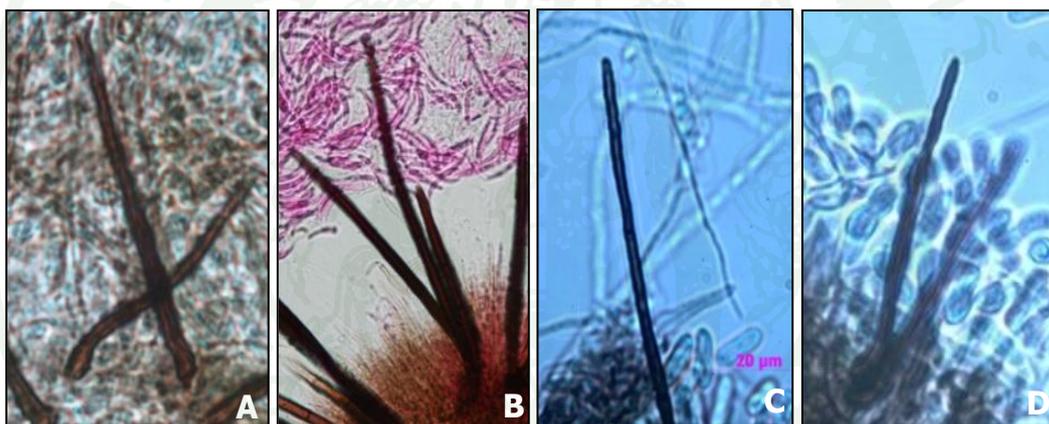
สำหรับ *C. gloeosporioides* เส้นใยมีสีขาวไปจนถึงขาวอมเทา ขาวถึงขาวอมชมพูไปจนถึงสีเขียวมะกอก เส้นใยฟูแน่น บางไอโซเลทพบการสร้าง concentric ring กลุ่มของสปอร์มีสี salmon และ pale salmon จากการอาศัยลักษณะของโคโลนีในการแบ่งกลุ่มพบว่า *C. gloeosporioides* สามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม (ภาพที่ 6, N-T) ซึ่งมีรายงานว่าสปีชีส์นี้มีลักษณะโคโลนีได้หลายแบบ เนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่มีความผันแปรค่อนข้างสูง (Bailey and Jeger, 1992) สปอร์มีลักษณะเซลล์เดียว ใสไม่มีสี มีรูปร่างแบบทรงกระบอกหัวท้ายมน บางไอโซเลทพบว่า ส่วนปลายของสปอร์มีลักษณะเรียวด้านใดด้านหนึ่ง (ภาพที่ 7-B) สปอร์มีขนาด 2.5-5.0 x 7.5-22.5 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Sutton (1980) ที่พบว่าสปอร์มีลักษณะเซลล์เดียว ใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน ตรงฐานตัด และสปอร์มีขนาด 3.5-6.0 x 12.0-17.0 ไมโครเมตร พบการสร้าง setae ในบางไอโซเลทมีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้มและสีดำ มีลักษณะปลายแหลม พบบ้างที่มีลักษณะปลายมน setae มีขนาด 2.5-5.0 x 57.5-135.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 8-C,D) ส่วนการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบการสร้าง appressorium มีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง circular, clavate, long clavate, cylindrical, irregular ไปจนถึง lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่ และยังพบรูปร่าง allantoid เฉพาะในเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ภาพที่ 9) มีขนาด 5.0-12.5 x 10.0-25.0 ไมโครเมตร (ตารางที่ 6) ซึ่ง Sutton (1980) ยังพบการสร้าง appressorium มีรูปร่าง obovate มีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำขนาด 6.0-20.0 x 4.0-12.0 ไมโครเมตร ส่วน conidium ทรงกระบอกหัวท้ายมน ตรงฐานตัด ขนาด 12.0-17.0 x 3.5-6.0 ไมโครเมตร



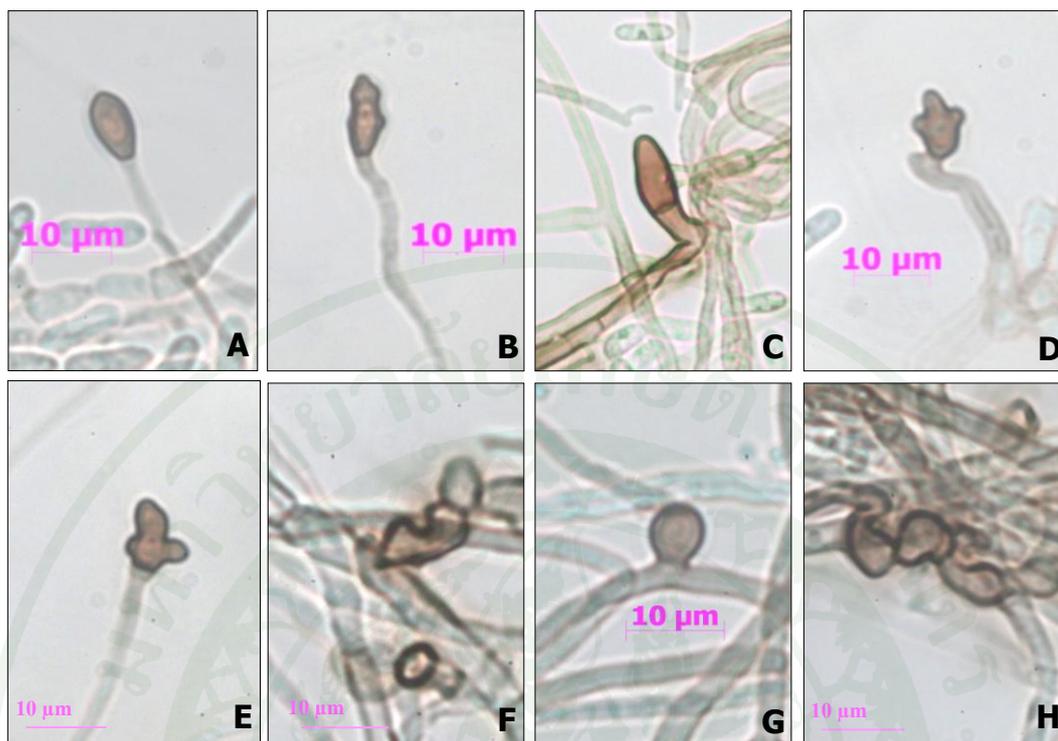
ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีและกลุ่มของสปอร์ ของเชื้อรา *C. acutaum* (A-E), *C. capsici* (F-M) และ *C. gloeosporioides* (N-T)



ภาพที่ 7 ลักษณะรูปร่างสปอร์ ของเชื้อรา *Colletotrichum*: *C. acutaum* (A),
C. gloeosporioides (B) และ *C. capsici* (C)



ภาพที่ 8 ลักษณะรูปร่าง setae ของเชื้อรา *C. capsici* (A-B) และ *C. gloeosporioides* (C-D)



ภาพที่ 9 ลักษณะรูปร่าง appressorium ของเชื้อรา *Colletotrichum*: รูปร่างแบบ clavate (A), long clavate (B), cylindrical (C), irregular (D), lobe (E), allantoid (F), circular (G) และพบลักษณะการเจริญแบบเดี่ยวๆและแบบลูกโซ่ (H)

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 58 ไอโซเลท อายุ 7 วัน

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
CR 001	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียวและพบบ้างที่มี ลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 7.5-12.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาล พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 5.0-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
CR 002	<i>C. acutatum</i>	salmon orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียวและพบบ้างที่มี ลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 10.0-15.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาล พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบ ลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
CR 003	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียว มีรอยคอดบริเวณ กลางสปอร์และพบบ้าง ที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-5.0 x 10.0-23.7	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาล เข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบ การเจริญแบบเดี่ยวๆ และ แบบลูกโซ่	5.0-3.7 x 5.0-15.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
CR 004	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียวและพบบ้างที่มี ลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 8.7-13.7	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาล เข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, cylindrical พบการเจริญ แบบเดี่ยวๆ และแบบ ลูกโซ่	5.0-7.5 x 5.0-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 005	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียว มีรอยคอดบริเวณ กลางสปอร์และพบบ้าง ที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 8.7-12.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาล พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ และ แบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 5.0-10.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
CR 006	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียวและพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 8.7-13.7	ลักษณะ appressorium มี สีนํ้าตาลอ่อน-สีนํ้าตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe, cylindrical พบการเจริญแบบเป็น ลูกโซ่	5.0-10.0 x 5.0-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 007	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียวและพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 8.7-13.7	ลักษณะ appressorium มี สีนํ้าตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเป็นลูกโซ่	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
CR 008	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 8.7-17.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe, cylindrical พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 7.5-17.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 009	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียวและพบบ้างพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform ไปจนถึงรูปร่าง oval	2.5 x 8.7-13.7	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
CR 010	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้าน เดียวและพบบ้างที่มี ลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 7.5-15.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาล เข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการเจริญแบบ เป็นลูกโซ่	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 011-1	<i>C. gloeosporioides</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบ หัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน และพบบ้างที่มีลักษณะ เรียวเพียงด้านเดียวและ พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง fusiform	2.5 x 8.7-13.7	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ และ แบบลูกโซ่	3.7-10.0 x 5.0-15.0	setae มีสีเขียวลักษณะปลาย แหลม มีสีใส ขนาด 2.5 x 117.5-192.5 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
CR 011-2	<i>C. acutatum</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน และพบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านเดียวและพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 10.0-17.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, cylindrical พบการเจริญแบบเป็นลูกโซ่	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 012	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบลักษณะเรียวเพียงด้านเดียว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 10.0-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเป็นลูกโซ่	2.5-7.5 x 5.0-25.0	ไม่พบการสร้าง setae
CR 013	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบลักษณะเรียวเพียงด้านเดียวและพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 7.5-12.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-12.5 x 5.0-15.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
CR 014	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้าง ที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-5.0 x 7.5-17.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
CR 015	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวยาวเพียงด้านเดียว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้าง ที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-5.0 x 7.5-17.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe, cylindrical พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
CR 016	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบเดี่ยว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 8.7-18.7	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเป็นลูกโซ่	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 017	<i>C. acutatum</i>	bright orange	รูปร่าง cylindrical พบเดี่ยว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5 x 8.7-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 5.0-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
CR 018	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้านเดียว มีรอยคอดบริเวณกลางสปอร์และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 8.7-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate พบ การเจริญแบบเป็นลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae
CR 020	<i>C. acutatum</i>	orange	รูปร่าง cylindrical พบ ลักษณะเรียวเพียงด้านเดียวและพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 10.0-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-7.5 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
NST 004	<i>C. capsici</i>	salmon orange	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 22.5-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe, cylindrical พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 5.0-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-10.0 x 70.0-180.0 µm
NST 006	<i>C. capsici</i>	pale peach	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ และ แบบลูกโซ่	3.7-12.5 x 5.0-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-10.0 x 105.0-200.0 µm
NST 007	<i>C. capsici</i>	salmon	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 22.5-30.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาล เข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, lobe พบการเจริญแบบ เดี่ยวๆ	5.0-12.5 x 10.0-21.2	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 80.0-117.5 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
NST 008	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5-3.7 x 20.0-26.2	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, lobe พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-7.5 x 7.5-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 105.0-225.0 µm
		salmon	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 009	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5-3.7 x 20.0-30.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, cylindrical พบ การเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-17.5 x 10.0-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-10.0 x 80.0-205.0 µm
		salmon	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 010	<i>C. capsici</i>	salmon	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5 x 17.5-25.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, cylindrical พบ การเจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 5.0-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 7.5 x 75.0-185.0 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
NST 011	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, cylindrical พบ การเจริญแบบเดี่ยวๆ	2.5-7.5 x 5.0-10.0	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 70.0-182.5 µm
		salmon	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 012	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5 x 18.7-25.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาล เข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการเจริญแบบ เดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 7.5-13.7	setae มีสีดำ มีลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-10.0 x 112.5-240.0 µm
		salmon	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 013	<i>C. capsici</i>	salmon	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-10.0 x 7.5-15.0	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 75.0-172.5 µm
		orange	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
NST 014	<i>C. capsici</i>	pale peach	พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง falcate ไปจนถึงรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 20.0-28.7	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	2.5-5.0 x 5.0-12.5	setae มีสีดำลักษณะปลายแหลม พบบ้างที่มีลักษณะปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 95.0-170.0 µm
NST 016	<i>C. capsici</i>	pale salmon	พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง falcate ไปจนถึงรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 22.5-25.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 5.0-15.0	setae มีสีดำลักษณะปลายแหลม พบบ้างที่มีลักษณะปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 55.0-125.0 µm
NST 017	<i>C. capsici</i>	salmon	พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง falcate ไปจนถึงรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 21.2-27.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-12.5 x 7.5-15.0	setae มีสีดำลักษณะปลายมน พบบ้างที่มีลักษณะปลายแหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 120.0-195.0 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
NST 018	<i>C. capsici</i>	salmon orange	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, cylindrical พบ การเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 7.5-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน สีไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 75.0-150.0 µm
NST 019	<i>C. capsici</i>	buff	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 20.0-25.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-8.7 x 7.5-20.0	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน สีไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 137.5-225 µm
NST 020	<i>C. capsici</i>	pale peach	พบบ้างที่มีลักษณะ รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบ เดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 5.0-12.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม พบบ้างที่มีลักษณะ ปลายมน สีไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 137.5-225 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
NST 021	<i>C. capsici</i>	salmon	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบ เดี่ยวๆ	3.7-8.7 x 7.5-17.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 90.0-152.5 μm
		orange	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 022	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5 x 22.5-30.0	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe, cylindrical พบการเจริญแบบเป็น ลูกโซ่	3.7-10.0 x 6.2-13.7	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 157.5-197.5 μm
		peach	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				
NST 023	<i>C. capsici</i>	pale	พบบ้างที่มีลักษณะ	2.5 x 18.7-27.5	ลักษณะ appressorium มี สีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, lobe พบการ เจริญแบบเดี่ยวๆ	2.5-10.0 x 5.0-12.5	setae มีสีดำลักษณะปลาย แหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 85.0-197.5 μm
		salmon	รูปร่าง falcate ไปจนถึง รูปร่าง fusiform				

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
NST 024	<i>C. capsici</i>	pale salmon	พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง falcate ไปจนถึงรูปร่าง fusiform	2.5 x 22.5-27.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-7.5 x 3.7-15.0	setae มีสีดำลักษณะปลายมน พบบ้างที่มีลักษณะปลายแหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 115.0-182.5 μm
NST 025	<i>C. capsici</i>	pale peach	พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง falcate ไปจนถึงรูปร่าง fusiform	2.5-3.7 x 20.0-27.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	3.7-10.0 x 8.7-16.2	setae มีสีดำลักษณะปลายมน พบบ้างที่มีลักษณะปลายแหลม ใสไม่มีสี ขนาด 5.0-7.5 x 60.0-170.0 μm
SKT 011	<i>C. gloeosporioides</i>	salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-5.0 x 10.0-13.7	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 5.0-25.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 027	<i>C. gloeosporioides</i>	salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน	2.5-5.0 x 12.5-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-12.5 x 7.5-17.5	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 031	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-5.0 x 10.0-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe, alluntoid พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-12.5	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 037	<i>C. gloeosporioides</i>	salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบลักษณะรูปร่าง oval	2.5-3.7 x 10-16.2	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 7.5-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 042	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน	2.5-3.7 x 8.7-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 6.25-15.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 043	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบลักษณะรูปร่าง oval ไปจนถึงรูปร่าง ellipsoid	2.5-3.7 x 7.5-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเป็นลูกโซ่	2.5-7.5 x 7.5-22.5	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 045	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบลักษณะรูปร่าง oval	2.5-3.7 x 10.0-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาล พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-12.5 x 7.5-15.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 046	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์	2.5-3.7 x 8.7-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-12.5 x 7.5-17.5	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 047	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval ไปจนถึงรูปร่าง ellipsoid	2.5-3.7 x 8.7-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาล พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 5.0-17.5	setae มีสีน้ำตาลอ่อนลักษณะปลายแหลม มีสีเข้ม-ใสไม่มีสี บริเวณขอบ setae หักเป็นคลื่น ขนาด 2.5-3.7 x 57.5-135.0 μm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 048	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์	2.5-3.7 x 7.5-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-12.5 x 5.0-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 050	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval ไปจนถึงรูปร่าง ellipsoid	2.5-3.7 x 8.7-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular , lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 5.0-15.0	setae มีสีน้ำตาลเข้มลักษณะปลายแหลม มีสีเข้ม-ใสไม่มีสี บริเวณขอบ setae หักเป็นคลื่น ขนาด 2.5 x 57.5-102.5 μm
SKT 051	<i>C. gloeosporioides</i>	salmon orange	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน และพบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง	2.5-3.7 x 12.5-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	2.5-10.0 x 5.0-15.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
SKT 052	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-5.0 x 10.0-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-7.5 x 5.0-10.0	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 054	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน และพบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง	2.5-3.7 x 7.5-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-12.5 x 7.5-20.0	ไม่พบการสร้าง setae

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (µm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (µm) ^{3/}	Setae
SKT 057	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-5.0 x 8.7-17.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ และแบบลูกโซ่	5.0-10.0 x 7.5-15.0	ไม่พบการสร้าง setae
SKT 058	<i>C. gloeosporioides</i>	ไม่สร้าง conidial mass	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-3.7 x 8.7-15.0	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลอ่อน-สีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, clavate, long clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 5.0-12.5	setae มีสีน้ำตาลเข้ม-สีเขียวกลายเส้นใยลักษณะปลายแหลม มีสีเข้ม-ใสไม่มีสี ขนาด 2.5 x 82.5-125.0 µm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Species	Conidial mass ^{1/}	Spore shape	Spore size (μm) ^{2/}	Appressorium shape	Appressorium size (μm) ^{3/}	Setae
SKT 059	<i>C. gloeosporioides</i>	pale salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์ และพบบ้างที่มีลักษณะรูปร่าง oval	2.5-5.0 x 11.2-16.2	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular, lobe พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 10.0-22.5	setae มีสีน้ำตาลเข้ม-สีดำ ลักษณะปลายแหลม พบบ้างที่มีลักษณะปลายมน ใสไม่มีสี ขนาด 2.5-5.0 x 62.5-132.5 μm
SKT 060	<i>C. gloeosporioides</i>	salmon	รูปร่าง cylindrical พบหัวท้ายมนทั้ง 2 ด้าน พบบ้างที่มีลักษณะเรียวเพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบรอยคอดบริเวณกลางสปอร์	2.5-3.7 x 10.0-12.5	ลักษณะ appressorium มีสีน้ำตาลเข้ม พบรูปร่าง irregular, long clavate, clavate, circular พบการเจริญแบบเดี่ยวๆ	5.0-10.0 x 7.5-20.0	ไม่พบการสร้าง setae

หมายเหตุ ^{1/}สีของกลุ่มสปอร์ตาม color chart (Rayner, 1970)

^{2/}ค่าเฉลี่ยจาก 20 สปอร์ต่อไอโซเลท

^{3/}ค่าเฉลี่ยจาก 20 appressorium ต่อไอโซเลท

ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ส่วนมากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยคุณลักษณะการสร้าง acervulus รูปร่างและขนาดของ conidium และ appressorium การสร้างหรือไม่สร้าง setae ประกอบกับใช้ลักษณะและสีโคโลนี (von Arx, 1957)

3. การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุ

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ใช้ประกอบการจัดจำแนกเชื้อรากลุ่มนี้ได้เช่นกัน (von Arx, 1957) งานวิจัยนี้พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้นมีอัตราการเจริญเติบโตได้เร็วที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา *C. capsici* ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* มีอัตราการเจริญเติบโตน้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเท่ากับ 6.4 5.0 และ 3.6 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากการศึกษาเชื้อราทั้ง 58 ไอโซเลทพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท SKT 045 มีการเจริญเติบโตได้เร็วที่สุด โดยมีอัตรา 7.5 มิลลิเมตร/วัน ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท SKT 047 และ SKT 052 มีการเจริญเติบโตช้าที่สุดในอัตรา 5.5 มิลลิเมตร/วัน ขณะที่เชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลท NST 025 นั้นมีอัตราการเจริญเติบโตได้สูงที่สุดในอัตรา 5.7 มิลลิเมตร/วัน ส่วนเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลท NST 022 นั้นพบการเจริญเติบโตช้าที่สุดในอัตรา 4.2 มิลลิเมตร/วัน สำหรับเชื้อรา *C. acutatum* นั้นพบว่า ไอโซเลท CR 020 มีการเจริญเติบโตในอัตราสูงสุดเท่ากับ 2.6 มิลลิเมตร/วัน ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* ไอโซเลท CR 007 พบว่ามีการเจริญเติบโตช้าที่สุด โดยมีอัตรา 2.0 มิลลิเมตร/วัน

ตารางที่ 7 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

พื้นที่	ไอโซเลท	อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> (มิลลิเมตร/วัน) ^{1/}
เชียงใหม่ (CR)	CR 001	2.5 ^g
	CR 002	2.3 ^g
	CR 003	2.5 ^g
	CR 004	2.5 ^g

ตารางที่ 7 (ต่อ)

พื้นที่	ไอโซเลข	อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> (มิลลิเมตร/วัน) ^{1/}	
เชียงใหม่ (CR) (ต่อ)	CR 005	2.4 ^g	
	CR 006	2.6 ^g	
	CR 007	2.0 ^g	
	CR 008	2.4 ^g	
	CR 009	2.3 ^g	
	CR 010	2.5 ^g	
	CR 011-1	6.4 ^{ab}	
	CR 011-2	2.6 ^g	
	CR 012	2.2 ^g	
	CR 013	2.6 ^g	
	CR 014	2.3 ^g	
	CR 015	2.5 ^g	
	CR 016	2.7 ^g	
	CR 017	2.6 ^g	
	CR 018	2.6 ^g	
	CR 020	2.6 ^g	
	นครศรีธรรมราช (NST)	NST 004	4.6 ^{ef}
		NST 006	5.1 ^{cde}
		NST 007	4.9 ^{def}
		NST 008	4.7 ^{def}
NST 009		5.3 ^{cde}	
NST 010		4.6 ^{ef}	
NST 011		4.7 ^{def}	
NST 012		4.6 ^{ef}	
NST 013		5.0 ^{cde}	
NST 014		5.1 ^{cde}	
NST 016		4.9 ^{def}	
NST 017		4.9 ^{def}	
NST 018		5.1 ^{cde}	
NST 019	4.8 ^{def}		

ตารางที่ 7 (ต่อ)

พื้นที่	ไอโซเลท	อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> (มิลลิเมตร/วัน) ^{1/}
นครศรีธรรมราช (NST) (ต่อ)	NST 020	4.3 ^{ef}
	NST 021	5.6 ^{bcd}
	NST 022	4.2 ^f
	NST 023	5.1 ^{cde}
	NST 024	4.3 ^{ef}
	NST 025	5.7 ^{bcd}
สุโขทัย (SKT)	SKT 011	6.6 ^a
	SKT 027	6.0 ^{ab}
	SKT 031	6.6 ^a
	SKT 037	6.2 ^{ab}
	SKT 042	6.2 ^{ab}
	SKT 043	5.6 ^{bcd}
	SKT 045	7.5 ^a
	SKT 046	6.4 ^{ab}
	SKT 047	5.5 ^{cde}
	SKT 048	5.7 ^{abc}
	SKT 050	6.6 ^a
	SKT 051	6.7 ^a
	SKT 052	5.5 ^{cde}
	SKT 054	6.2 ^{ab}
	SKT 057	6.8 ^a
SKT 058	5.8 ^{abc}	
SKT 059	6.0 ^{ab}	
SKT 060	6.4 ^a	

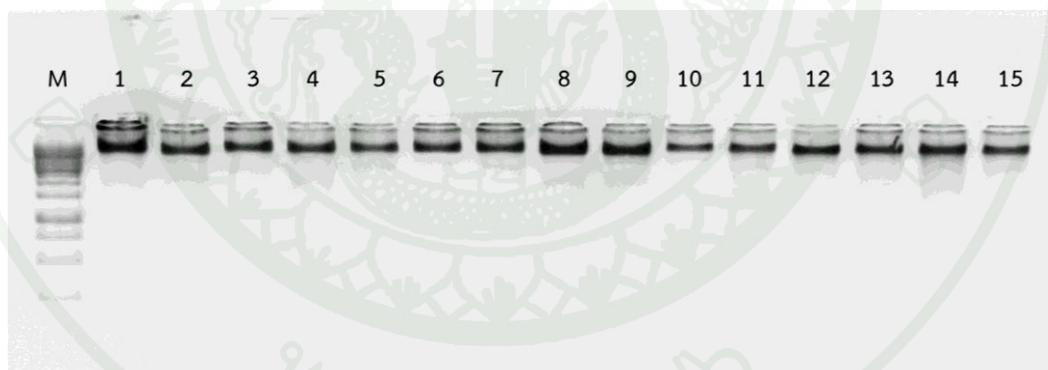
หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)

4. การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล

การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 58 ไอโซเลท พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันหลายประการ เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์และลักษณะของโคโลนี แต่เมื่อนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกแล้วกลับพบว่า เชื้อทดสอบที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเชื้อเดียวกันกลับมีความแตกต่างในระดับสปีชีส์เมื่อใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล ซึ่งความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในแต่ละสปีชีส์นั้นจะได้รับปัจจัยจากสภาพแวดล้อมในการเจริญที่แตกต่างกัน

4.1 การสกัดและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ

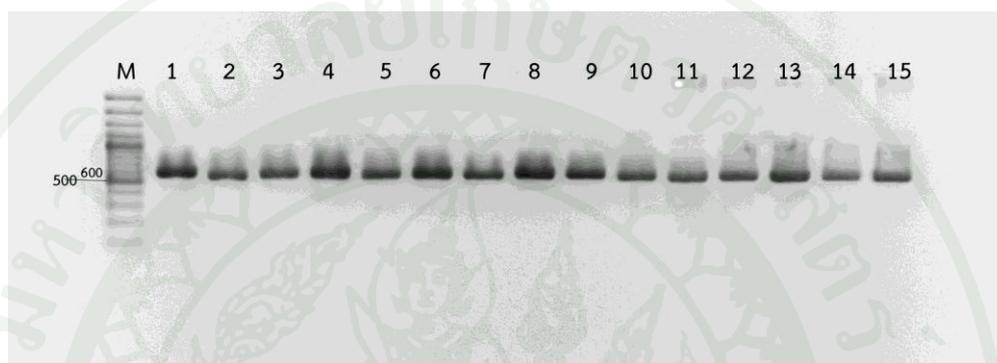
จากการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zimand *et al.* (1994) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1xTBE buffer ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อเทียบจาก 1kb ladder (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ประมาณ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (M = 1kb Ladder, Lane 1-5 = *C. acutatum*, Lane 6-10 = *C. capsici* และ Lane 11-15 = *C. gloeosporioides*)

4.2 การทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction PCR โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1/ITS2 ซึ่งเป็นส่วนของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน (rDNA) ที่มีส่วนประกอบที่เป็นส่วนอนุรักษ์และส่วนที่ผันแปร โดยใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600 bp (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600 bp (M = 100bp plus DNA Ladder, Lane 1-5 = *C. acutatum*, Lane 6-10 = *C. capsici* และ Lane 11-15 = *C. gloeosporioides*)

เมื่อนำผลผลิต ITS ไปศึกษาต่อด้วยเทคนิค RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ *AluI* *BamHI* และ *RsaI* พบว่าเอนไซม์ *AluI* ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *C. acutatum* ได้ ขณะที่ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *C. capsici* ได้ขนาด 200 และ 400 bp ส่วน *C. gloeosporioides* ตัดที่ขนาด 200 และ 380 bp เอนไซม์ *BamHI* ตัดดีเอ็นเอของ *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 500 bp เท่ากัน แต่ไม่ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *C. capsici* สำหรับเอนไซม์ *RsaI* สามารถตัดดีเอ็นเอของ *C. gloeosporioides* เพียงสปีชีส์เดียวซึ่งได้ชิ้นส่วนขนาด 200 และ 380 bp (ตารางที่ 8) จากงานวิจัยของ Abang *et al.* (2002) ซึ่งได้ศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* จาก yam ในประเทศไนจีเรียได้ใช้วิธีเดียวกันนี้ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* *HaeIII* *HhaI* *MspI* และ *RsaI* พบว่า *AluI* ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเชื้อ *C. acutatum* ได้ ขณะที่ *RsaI* ตัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. acutatum* ได้ 2 ชิ้น มีขนาด 250 และ 330 bp ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้นพบว่าเอนไซม์ *AluI* และ *RsaI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอได้ 2 ชิ้น ขนาด 190 และ 380 bp ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับการทดลอง ส่วนเชื้อรา *C. capsici* พบว่าเอนไซม์

AluI ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาด 200 และ 400 bp เช่นเดียวกับรายงานของ DaXing *et al.* (2004) ซึ่งทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่มีสปอร์แบบโค้ง (falcate) จำนวน 38 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค RFLP บนบริเวณ ITS พบว่าเอนไซม์ *AluI* *BsuRI* *Hin6* *HpaII* และ *TagI* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ และเมื่อนำมาจัดกลุ่มพบว่า สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่มจำนวน 3 สปีชีส์ คือเชื้อรา *C. capsici*, *C. circinans* และ *C. truncatum*

จากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดพบว่าสามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 2 กลุ่ม จากเชื้อราจำนวน 19 ไอโซเลท โดยเมื่อนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* พบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ มีขนาด 200 และ 380 bp จำนวน 18 ไอโซเลท ส่วนอีก 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SKT 031 พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 400 และ 600 bp (ภาพที่ 12-C) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับชิ้นดีเอ็นเออาจเกิดจากการที่เอนไซม์ไปจับกับตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่ใช่คู่สมกัน (mismatch) ซึ่งมักจะเกิดการหลุดตัวออกมาก่อนในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า (Williams, 1990) จึงนำไปศึกษาตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. acutatum* ด้วยเอนไซม์ *BamHI* พบว่า *BamHI* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. acutatum* ได้ 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 101 bp ซึ่งอาจได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 101 และ 509 bp (ภาพที่ 17) ส่วนเชื้อรา *C. capsici* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* จะตัดที่ตำแหน่ง 204 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น มีขนาด 204 และ 399 bp (ภาพที่ 18) ขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* I (CG1) และ *C. gloeosporioides* II (CG2) (ภาพที่ 19-20) เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* ตัดที่ตำแหน่ง 205 และ 192 bp ตามลำดับ และเอนไซม์ *BamHI* ตัดที่ตำแหน่ง 99 และ 86 bp ตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์ *RsaI* มาตัดชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเอนไซม์ตัดที่ตำแหน่ง 389 และ 376 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยคัดเลือกจากความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้จำนวน 4 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* *C. gloeosporioides* (CG1) และ *C. gloeosporioides* (CG2) พบว่ามีขนาดของดีเอ็นเอที่ 610, 603, 597 และ 587 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 13-16) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (identity) และความคล้ายคลึง (similarity) กับฐานข้อมูลยีนใน Genbank (www.ncbi.com) ได้ผลดังตารางที่ 10 และภาพที่ 22-25

ตารางที่ 8 ปริมาณและชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* 3 สปีชีส์ที่ได้จากการนำมา
ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

เชื้อรา	ขนาดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bp)		
	<i>AluI</i>	<i>BamHI</i>	<i>RsaI</i>
<i>C. acutatum</i>	nd	500	nd
<i>C. capsici</i>	200,400	nd	nd
<i>C. gloeosporioides</i> I	200,380	500	200,380
<i>C. gloeosporioides</i> II	200,380	500	400,600

หมายเหตุ nd = not digest, RFLP fragment < 75 bp not considered

ตารางที่ 9 ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ
เชื้อรา *Colletotrichum* 3 สปีชีส์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้โปรแกรม CLC
MainWorkbench version 6.1.1

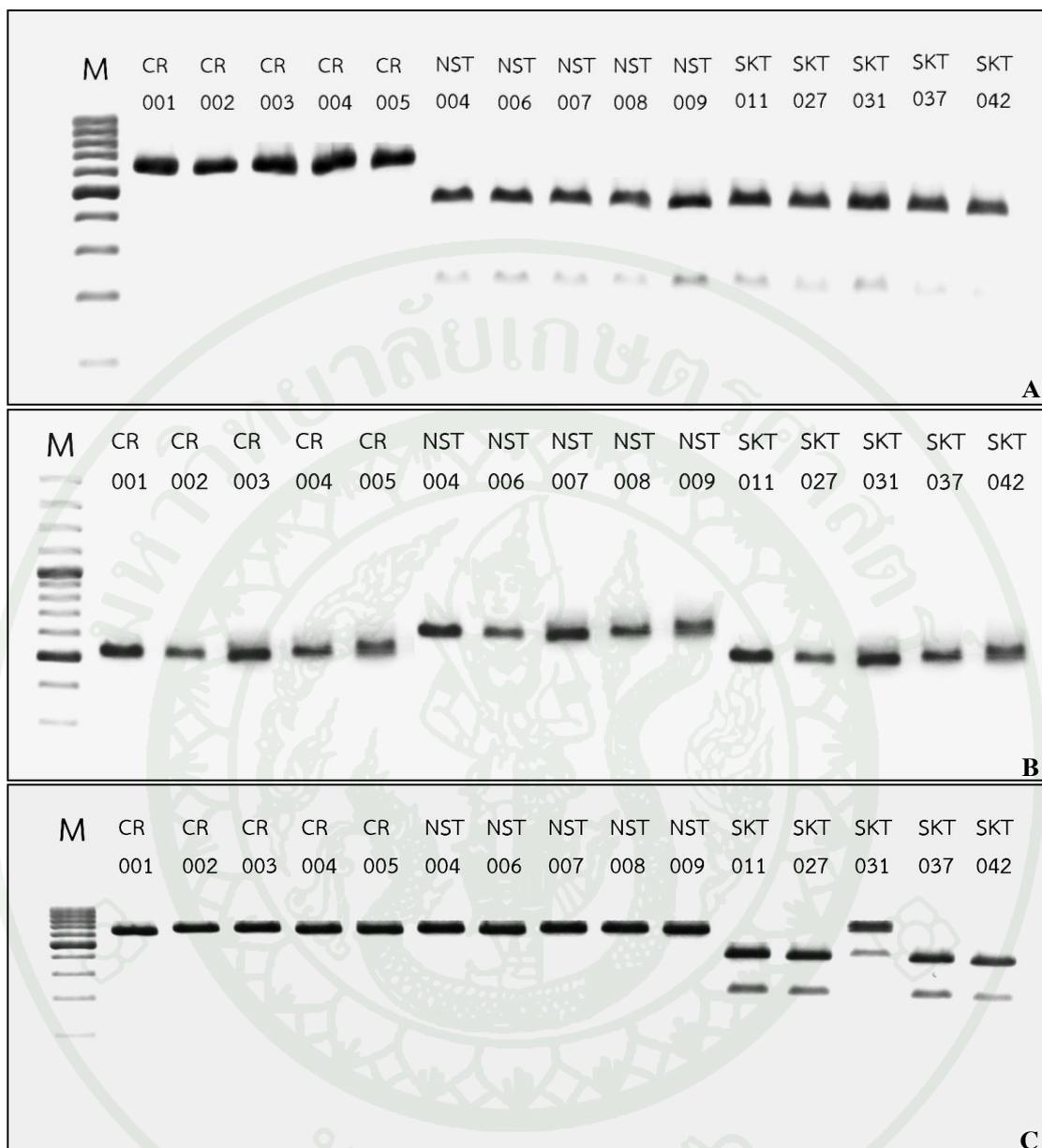
เชื้อรา	ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (bp)					
	<i>AluI</i>		<i>BamHI</i>		<i>RsaI</i>	
	ตำแหน่ง	ขนาด	ตำแหน่ง	ขนาด	ตำแหน่ง	ขนาด
<i>C. acutatum</i>	nd	-	101	101,509	nd	-
<i>C. capsici</i>	204	204,399	nd	-	nd	-
<i>C. gloeosporioides</i> I	205	205,392	99	99,498	389	208,389
<i>C. gloeosporioides</i> II	192	192,395	86	86,501	376	211,376

หมายเหตุ nd = not digest, RFLP fragment < 75 bp not considered

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความเหมือน (identity) และความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับเบส เชื้อรา *Colletotrichum* 3 สปีชีส์กับยีนในฐานข้อมูล Genbank (www.ncbi.com)

Accession	species	% identities	E value
emb AJ749671.1	<i>C. acutatum</i>	577/586 (98%)	0
gb GQ369594.2	<i>C. capsici</i>	592/595 (99%)	0
gb HM575266.1	<i>C. gloeosporioides</i> I	575/580 (99%)	0
gb GU174548.1	<i>C. gloeosporioides</i> II	582/584 (99%)	0

จากการนำไปเปรียบเทียบลำดับเบส (ภาพที่ 21) พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* 3 สปีชีส์ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมทำให้แยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้แต่เชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงจึงมีความแตกต่างกันภายในสปีชีส์อีกด้วย



ภาพที่ 12 ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด: เอนไซม์ *AluI* (A) *BamHI* (B) และ *RsaI* (C), 100bp DNA ladder (Lane M), *C. acutatum* (Lane ที่ 1-5), *C. capsici* (Lane ที่ 6-10) และ *C. gloeosporioides* (Lane ที่ 11-15))

LOCUS CA 610 bp DNA linear UNA 25-Jul-2011
DEFINITION

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 TCCTCCCGGC TTATTGATAT GCTTAAGTTC AGCGGGTATT CCTACCTGAT CCGAGGTCAA
61 CCTGTAAAAA ATTTGGGGGT TTTACGGCAA GAGTCCCTCC GGATCCCAGT GCGAGACGTT
121 AGTTACTACG CAAAGGAGGC TCCGGGAGGG TCCGCCACTA CCTTTAAGGG CCCACGTGTG
181 CCGTGGGGCC CAAAACCAA GCGGTGCTTG AGGGTTGAAA TGACGCTCGA ACAGGCATGC
241 TCGCCAGAAT GCTGGCGAGC GCAATGTGCG TTCAAAGATT CGATGATPCA CTGAATCTG
301 CAATTCACAT TACTTATCGC ATTTGCTGTC GTTCTTCATC GATGCCAGAA CCAAGAGATC
361 CGTTGTTAAA AGTTTTAATT ATTTGCTTGT GCCACTCAGA AGAGACGTCG TGTAATAGA
421 GTTTGGTTTC CTCCGGCGGG GCGCCCGTCC CCGTGGTGGG GGCCGGCGCC GGGAGGGGAG
481 GCCCGCGAGA GGCTTCCCTT GCGCCCGCAA GCAACGGTTA GGTATGTTCA CAAAGGGTTA
541 TAGAGCGGTA ACTCAGTAAT GTCCCTCCGC TGGTTCACCA ACGGAGACCT TGTTACGATT
601 TTTTACTTCC

```

//

ภาพที่ 13 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. acutatum* ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5

LOCUS CC 603 bp DNA linear UNA 25-Jul-2011
DEFINITION

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 TCCTCCGCTT ATTGATATGC TTAAGTTCAG CGGGTATTCC TACCTGATCC GAGGTCAACC
61 TTAGTAAAAA TGGGGGTTT ACGGCTAGAG TCCCTCCGAA TCCCAATGCG AGACGAAATG
121 TTACTACGCA AAGGAGGCTC CGAGAGGGTC CGCCACTACC TTTAAGGGCC TACGTCAACC
181 GTAGAGCCCC AACACCAAGC AGAGCTTGAG GGTTGAAATG ACGTCTGAAC AGGCATGCCC
241 GCCAGAATGC TGGCGGGCGC AATGTGCGTT CAAAGATTCG ATGATTCACT GAATTCGCA
301 ATTCACATTA CTTATCGCAT TTCGCTGCGT TCTTCATCGA TGCCAGAACC AAGAGATCCG
361 TTGTTAAAAG TTTTGATTAT TTGCTTGTGT CACTCAGAAG AAACGTCGTT AAATCAGAGT
421 TTGGTTATCC TCCGGCGGGC GCGCCACCGC CGGACGGGAG AGGGCCGGGA GACGTCTTTT
481 TTAGGGGACG CCTACCCGCC GAAGCAACAG TTAAGGTATG TTCACAAAGG GTTGATGAGC
541 GGTAACCTCAG TAATGTCCCT CCGCTGGTTC ACCAACGGAG ACCTTGTTAC ACTTTTAAAC
601 TTC

```

//

ภาพที่ 14 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. capsici* ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5

LOCUS CG1 597 bp DNA linear UNA 25-Jul-2011
DEFINITION

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 TCCTTCCGGG CTATGATATG CTTAAGTTCA GCGGGTATTC CTACCTGATC CGAGGTCAAC
61 CTTTGGAAAA TTGGGGGTTT TACGGCAAGA GTCCCTCCGG ATCCCAGTGC GAGACGTAAA
121 GTTACTACGC AAAGGAGGCT CCGGGAGGGT CCGCCACTAC CTTTGAGGGC CTACATCAGC
181 TGTAGGGCCC CAACACCAAG CAGAGCTTGA GGGTTGAAAT GACGCTCGAA CAGGCATGCC
241 CGCCAGAATG CTGGCGGGCG CAATGTGCGT TCAAAGATTC GATGATTCAC TGAATTCTGC
301 AATTACACATT ACTTATCGCA TTTCGCTGCG TTCTTCATCG ATGCCAGAAC CAAGAGATCC
361 GTTGTAAAA GTTTTGATTA TTTGCTTGTA CCACTCAGAA GAAACGTCGT TAAATCAGAG
421 TTTGGTTATC CTCCGGCGGG CGCCGACCCG CCCGGGGGCG GGAGGCCGGG AGGGTCGCGG
481 AGACCCTACC CGCCGAAGCA ACAGTTATAG GTATGTTCAC AAAGGGTTGT AGAGCGTAAA
541 CTCAGTAATG TCCCTCCGCT GTTCACCAAC GGAGACCTTG TTACATTTTT TAACCTC

```

//

ภาพที่ 15 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* I ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5

LOCUS CG2 587 bp DNA linear UNA 25-Jul-2011
DEFINITION

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 TGATATGCTT AAGTTCAGCG GGTATTCCTA CCTGATCCGA GGTCAACCTT TGGAAAATTG
61 GGGTTTTTAC GGCAAGAGTC CCTCCGGATC CCAGTGCAG ACGAAAAGTT ACTACGCAAA
121 GGAGGCTCCG GGAGGGTCCG CCACTACCTT TGAGGGCCTA CATCAGCTGT AGGGCCCCAA
181 CACCAAGCAG AGCTTGAGGG TTGAAATGAC GCTCGAACAG GCATGCCCGC CAGAATGCTG
241 GCGGGCGCAA TGTGCGTTCA AAGATTCGAT GATTCACTGA ATCTGCAAT TCACATTACT
301 TATCGCATT CGCTGCGTTC TTCATCGATG CCAGAACCAA GAGATCCGTT GTTAAAAGTT
361 TTGATTATTT GCTTGTACCA CTCAGAAGAA ACGTCGTAA ATCAGAGTTT GGTTATCCTC
421 CGGCGGGCGC CGACCCGCC GGGGGCGGGA GGCCGGGAGG GTCACGGAGA CCCTACCCGC
481 CGAAGCAACA GTTATAGGTA TGTTACAAA GGGTTGTAGA GCGTAAACTC AGTAATGATC
541 CCTCCGCTGG TTCACCAACG GAGACCTTGT TACGATTTTT ACTTCCA

```

//

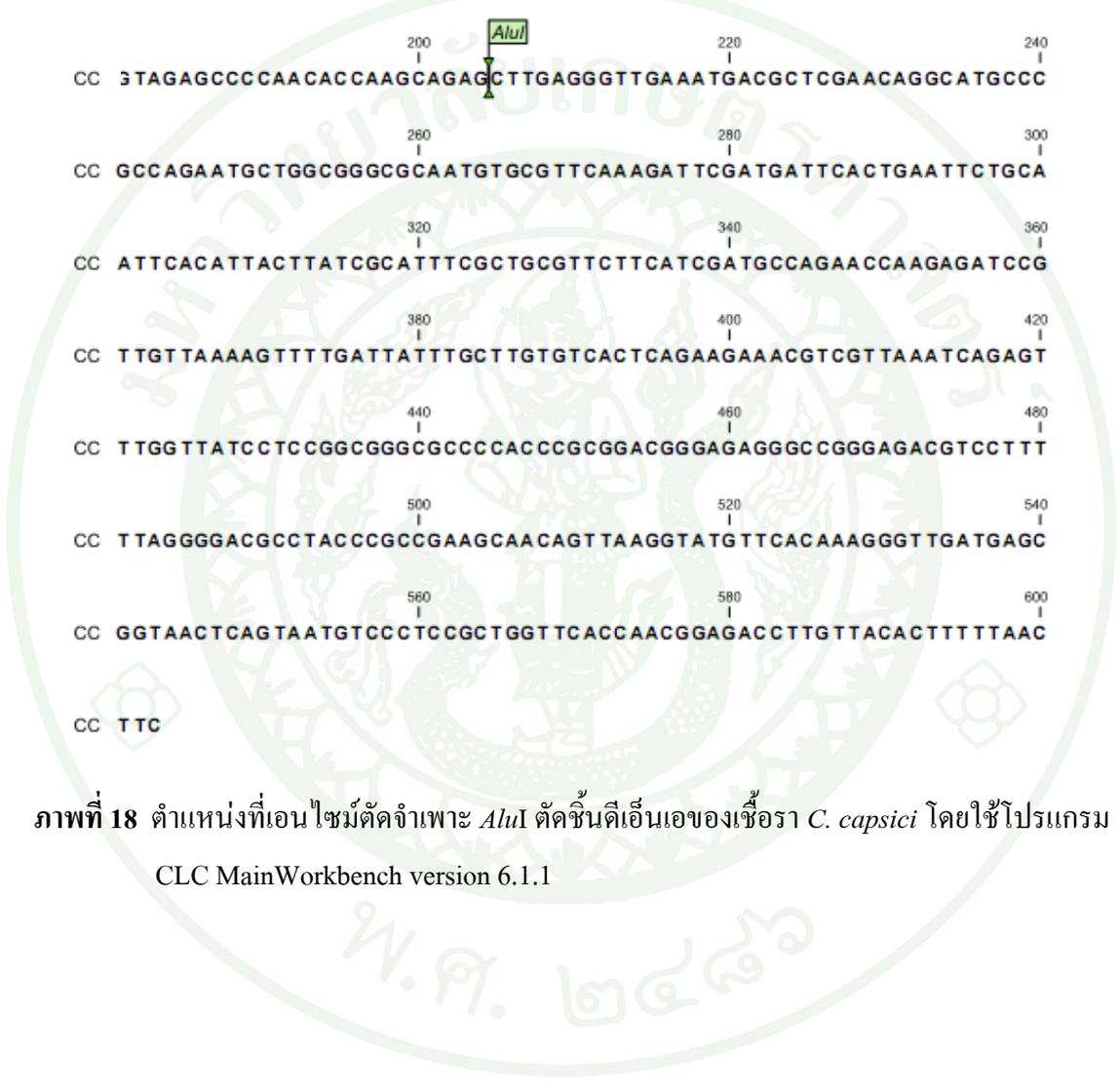
ภาพที่ 16 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* II ที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ universal primer คือ ITS4 และ ITS5

```

      20          40          60
CA1 TCCTCCGGGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAA
      80          100      BamHI          120
CA1 CCTGTAAAAAATTTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTT
      140         160         180
CA1 AGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCCACGTGTG
      200         220         240
CA1 CCGTGGGGCCCCAAAACCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC
      260         280         300
CA1 TCGCCAGAATGCTGGCGAGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTG
      320         340         360
CA1 CAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATC
      380         400         420
CA1 CGTTGTTAAAAGTTTTAATTATTTGCTTGTGCCACTCAGAAGAGACGTCGTGTAATAGA
      440         460         480
CA1 GTTTGGTTTCTCCGGCGGGCGCCCGTCCCGTGGTGGGGGCCGGCGCCGGGAGGGGAG
      500         520         540
CA1 GCCCGCGAGAGGCTTCCCCTGCCCGCGGAAGCAACGGTTAGGTATGTTACAAAAGGGTTA
      560         580         600
CA1 TAGAGCGGTAACCTCAGTAATGTCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGATT
CA1 TTTTACTTCC

```

ภาพที่ 17 ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตัดขึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. acutatum* โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1



```

      20          40          60
      |          |          |
CC  TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACC

      80          100         120
      |          |          |
CC  TTAGTAAAAT TGGGGG TTT TACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCCAATGCGAGACGAAATG

      140         160         180
      |          |          |
CC  T TACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCTACGTCAACC

      200         220         240
      |          |          |
CC  CTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC
      |
      | AluI
      |
      260         280         300
      |          |          |
CC  GCCAGAAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCA

      320         340         360
      |          |          |
CC  ATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG

      380         400         420
      |          |          |
CC  TTGT TAAAAG TTT TGATTATTTGCTTGTGTCACTCAGAAGAAACGTCGT TAAATCAGAGT

      440         460         480
      |          |          |
CC  TTGGTTATCCTCCGGCGGGCGCC CACCCGCGGACGGGAGAGGGCCGGGAGACGTCTT

      500         520         540
      |          |          |
CC  TTAGGGGACGCCTACCCGCCGAAGCAACAGT TAAGGTATGTTCACAAAGGGT TGATGAGC

      560         580         600
      |          |          |
CC  GGTA ACTCAGTAAATGTCCC TCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACACTTT TTAAC

CC  TTC
  
```

ภาพที่ 18 ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ตัดขึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. capsici* โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1

CG1 TCC TTCGGGCTATGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCC TACC TGATCCGAGGTCAAC

CG1 CTTTGGAAAATTGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGA TCC CAGTGCGAGACGTAAA

CG1 GTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGC

CG1 TGTAGGGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC

CG1 CGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGCGATGATTCACTGAATTCTGC

CG1 AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC

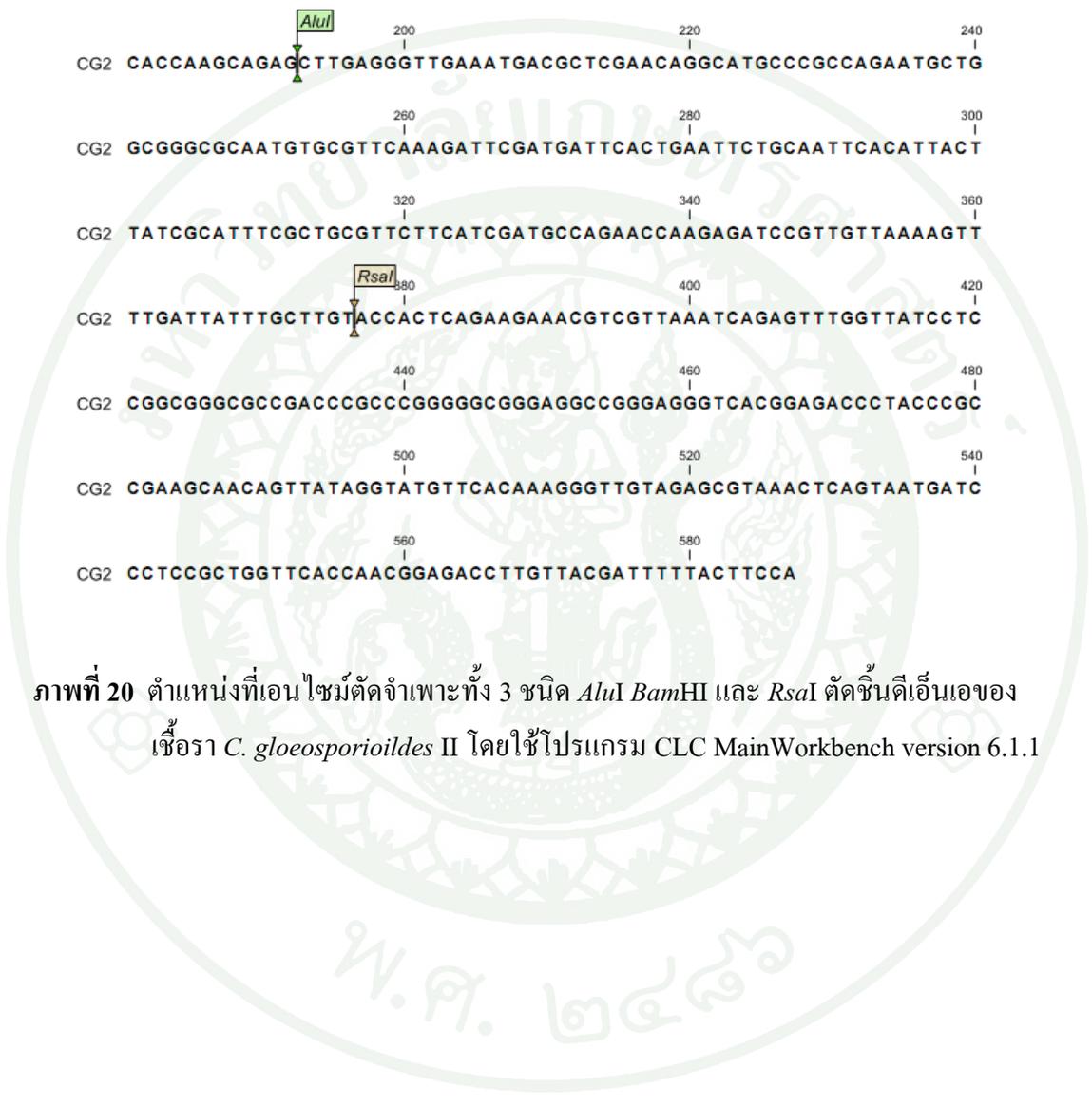
CG1 GTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTACC ACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAG

CG1 TTTGGTTATCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCGCGG

CG1 AGACCCTACCCGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTT CACA AAGGGTTGTAGAGCGTAAA

CG1 CTCAGTAATGTCCCTCCGCTGTT CACCAACGGAGACCTTGTTACATTTT TAACTTC

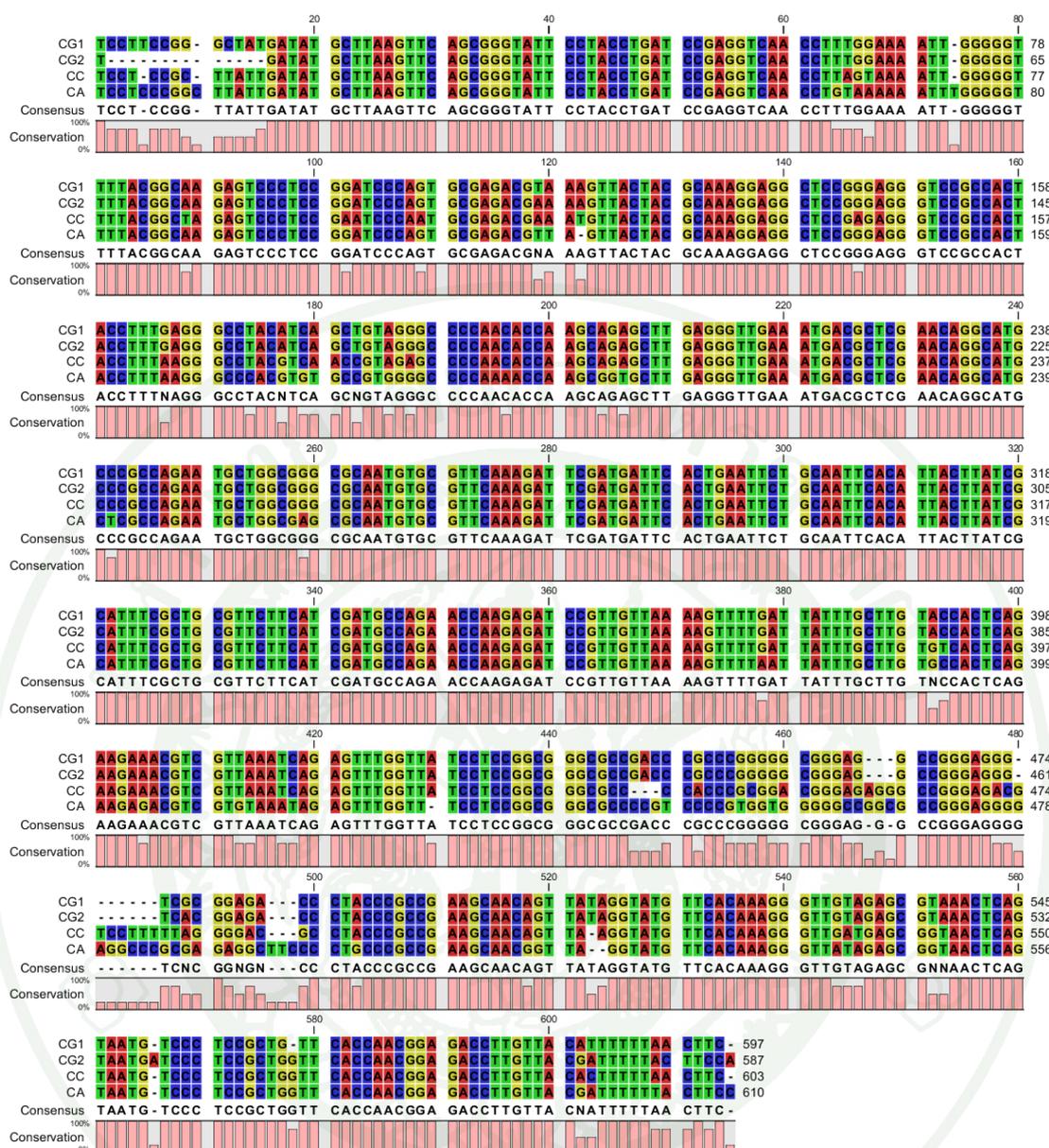
ภาพที่ 19 ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด *AluI* *BamHI* และ *RsaI* ตัดขึ้นดีเอ็นเอของ เชื้อรา *C. gloeosporioides* I โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1



```

      20                               40                               60
CG2  TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTG
      80                               100                              120
CG2  GGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCCGATCCCAAGTGGCAGACGAAAAGTTACTACGCAA
      140                              160                              180
CG2  GGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAA
      200                              220                              240
CG2  CACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTG
      260                              280                              300
CG2  GCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACT
      320                              340                              360
CG2  TATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTT
      380                              400                              420
CG2  TTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGTTATCCTC
      440                              460                              480
CG2  CGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCTACCCGC
      500                              520                              540
CG2  CGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATC
      560                              580
CG2  CCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTACTTCCA
  
```

ภาพที่ 20 ตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด *AluI* *BamHI* และ *RsaI* ตัดขึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* II โดยใช้โปรแกรม CLC MainWorkbench version 6.1.1



ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับเบสและความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 4 โยโซเลท

>gb|GQ369594.2| Colletotrichum capsici strain 10858 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 Length=597

Score = 1079 bits (584), Expect = 0.0
Identities = 592/595 (99%), Gaps = 3/595 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 11  ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGTAAAAT 70
          |||
Sbjct 597  ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGTAAAAT 538

Query 71  TGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCCAATGCGAGACGAAATGTTACTACGCA 130
          |||
Sbjct 537  TGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCCAATGCGAGACGAAATGTTACTACGCA 478

Query 131  AAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCTACGTCAACCGTAGAGCCCC 190
          |||
Sbjct 477  AAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCTACGTCAACCGTAGAGCCCC 418

Query 191  AACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGC 250
          |||
Sbjct 417  AACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGC 358

Query 251  TGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTA 310
          |||
Sbjct 357  TGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTA 298

Query 311  CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAG 370
          |||
Sbjct 297  CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAG 238

Query 371  TTTTGATTATTTGCTTGTGTCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCC 430
          |||
Sbjct 237  TTTTGATTATTTGCTTGTGTCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCC 178

Query 431  TCCGGCGGGCGCCCCACCCGCGGACGGGAGAGGGCCGGGAGACGTCCTTTTAGGGGACG 490
          |||
Sbjct 177  TCCGGCGGGCGCCCCACCCGCGGACGGGAGAGGGCCGGGAGACGTCCTTTTAGGGGACG 118

Query 491  CCTACCCGCCGAAGCAACAGTTAAGGTATGTTCAAAAGGGTTGATGAGCGGTAACCTCAG 550
          |||
Sbjct 117  CCTACCCGCCGAAGCAACAGTTAAGGTATGTTCAAAAGGGTTGATGAGCGGTAACCTCAG 58

Query 551  TAATG-TCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTAC-ACTTTTTAACTTC 603
          |||
Sbjct 57  TAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTTA-CTTC 4

```

ภาพที่ 23 แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา *C. capsici* isolate NST 004 กับเชื้อรา *C. capsici* strain 10858

>gb|HM575266.1| Colletotrichum gloeosporioides isolate CM0705 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 Length=598

Score = 1040 bits (563), Expect = 0.0
Identities = 575/580 (99%), Gaps = 3/580 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 14  TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTG 73
          |||
Sbjct 586  TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTG 527

Query 74  GGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAAAGTTACTACGCAA 133
          |||
Sbjct 526  GGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAAAGTTACTACGCAA 467

Query 134  GGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAA 193
          |||
Sbjct 466  GGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAA 407

Query 194  CACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTG 253
          |||
Sbjct 406  CACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTG 347

Query 254  GCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACT 313
          |||
Sbjct 346  GCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACT 287

Query 314  TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTT 373
          |||
Sbjct 286  TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTT 227

Query 374  TTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTC 433
          |||
Sbjct 226  TTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTC 167

Query 434  CGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCGCGGAGACCCTACCCGC 493
          |||
Sbjct 166  CGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTACCCGC 107

Query 494  CGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATG-TC 552
          |||
Sbjct 106  CGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATC 47

Query 553  CCTCCGCTG-TTCACCAACGGAGACCTTGTAC-ATTTTT 590
          |||
Sbjct 46  CCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACACTTTT 7

```

ภาพที่ 24 แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา *C. gloeosporioides* I isolate SKT 011 กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* isolate CM0705

```

>gb|GU174548.1| Colletotrichum gloeosporioides culture-collection
ICMP:17797
      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 Length=584

Score = 1068 bits (578), Expect = 0.0
Identities = 582/584 (99%), Gaps = 0/584 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  2      GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTGG  61
      |||
Sbjct  584     GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTGG  525

Query  62      GGGTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGAAAAGTTACTACGCAAAG  121
      |||
Sbjct  524     GGGTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAGTTACTACGCAAAG  465

Query  122     GAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAAC  181
      |||
Sbjct  464     GAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAAC  405

Query  182     ACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGG  241
      |||
Sbjct  404     ACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGG  345

Query  242     CGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT  301
      |||
Sbjct  344     CGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT  285

Query  302     ATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTT  361
      |||
Sbjct  284     ATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTT  225

Query  362     TGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTCC  421
      |||
Sbjct  224     TGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTCC  165

Query  422     GCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTACCCGCC  481
      |||
Sbjct  164     GCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTACCCGCC  105

Query  482     GAAGCAACAGTTATAGGTATGTTTACAAAGGGTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATCC  541
      |||
Sbjct  104     GAAGCAACAGTTATAGGTATGTTTACAAAGGGTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATCC  45

Query  542     CTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTACTTC  585
      |||
Sbjct  44      CTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTC  1

```

ภาพที่ 25 แสดงผลการทำ BLASTn ระหว่างลำดับเบสของเชื้อรา *C. gloeosporioides* II isolate

SKT 031 กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* culture collection ICMP: 17797

5. ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์โปรติเอสกับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา

Colletotrichum

เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ได้ จากคุณสมบัตินี้จึงได้นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อที่จะศึกษาลักษณะความแตกต่างของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการจัดกลุ่มหรือจัดจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์ได้อีกทางหนึ่ง

5.1 ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

จากการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 58 ไอโซเลท บนอาหาร CHM บ่มเชื้อไว้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส พบการสร้าง clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ (ตารางที่ 11) โดยขนาด clear zone ที่เชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์สร้างมีขนาดต่างกัน โดยเชื้อรา *C. acutatum* สร้าง clear zone ที่มีขนาดกว้างที่สุด 8.1-10.1 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* สร้าง clear zone ที่มีขนาด 2.2-5.7 และ 1.6-2.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยขนาด clear zone ที่เชื้อราสร้างบนอาหาร CHM เป็นเวลา 4 วัน

พื้นที่แหล่งปลูก	วัน	ความกว้างของขนาด clear zone (mm) ^{1/}		
		<i>C. acutatum</i>	<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
เชียงราย(CR)	2	2.4-7.2(4.8)	-	0.7-3.6(2.2)
	3	6.6-9.5(8.1)	-	1.2-7.3(4.3)
	4	8.4-11.8(10.1)	-	1.6-9.8(5.7)
นครศรีธรรมราช (NST)	2	-	0.3-3(1.6)	-
	3	-	1-3.5(2.25)	-
	4	-	1.1-3.9(2.5)	-
สุโขทัย(SKT)	2	-	-	0.9-4.9(2.9)
	3	-	-	1.9-7.4(4.7)
	4	-	-	2.5-7.8(5.15)

หมายเหตุ ^{1/}(X)= ค่าเฉลี่ยขนาด clear zone ที่เชื้อราสร้างในแต่ละวัน แต่ละสปีชีส์



ภาพที่ 26 ลักษณะการสร้าง clear zone ของเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร CHM เป็นเวลา 4 วัน: *C. acutatum* (A), *C. capsici* (B) and *C. gloeosporioides* (C)

5.2 ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein from bovine milk medium (CBM)

จากการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 18 ไอโซเลท (ที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนจากข้อ 5.1) บนอาหาร CBM พบการสร้าง clear zone รอบโคโลนีของเชื้อรา (ภาพที่ 27) โดยขนาด clear zone ที่เชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์สร้างมีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อรา *C. acutatum* สร้าง clear zone ที่มีขนาดกว้างที่สุด มีขนาด clear zone เท่ากับ 2.2-7.0 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งมีขนาด clear zone เท่ากับ 0.8-1.4 มิลลิเมตร ขณะที่เชื้อรา *C. capsici* ไม่สร้าง clear zone บนอาหาร CBM (ตารางที่ 12)



ภาพที่ 27 ลักษณะการสร้าง clear zone ของเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร CBM เป็นเวลา 4 วัน: *C. acutatum* (A), *C. capsici* (B) and *C. gloeosporioides* (C)

เมื่อนำขนาดของ clear zone ที่เชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ที่สร้างบนอาหาร CBM มาเปรียบเทียบกับขนาดของ clear zone ที่เชื้อรา *Colletotrichum* สร้างบนอาหาร CHM พบว่าขนาดของ clear zone ที่เชื้อราสร้างมีความสอดคล้องกัน (กราฟที่ 1)

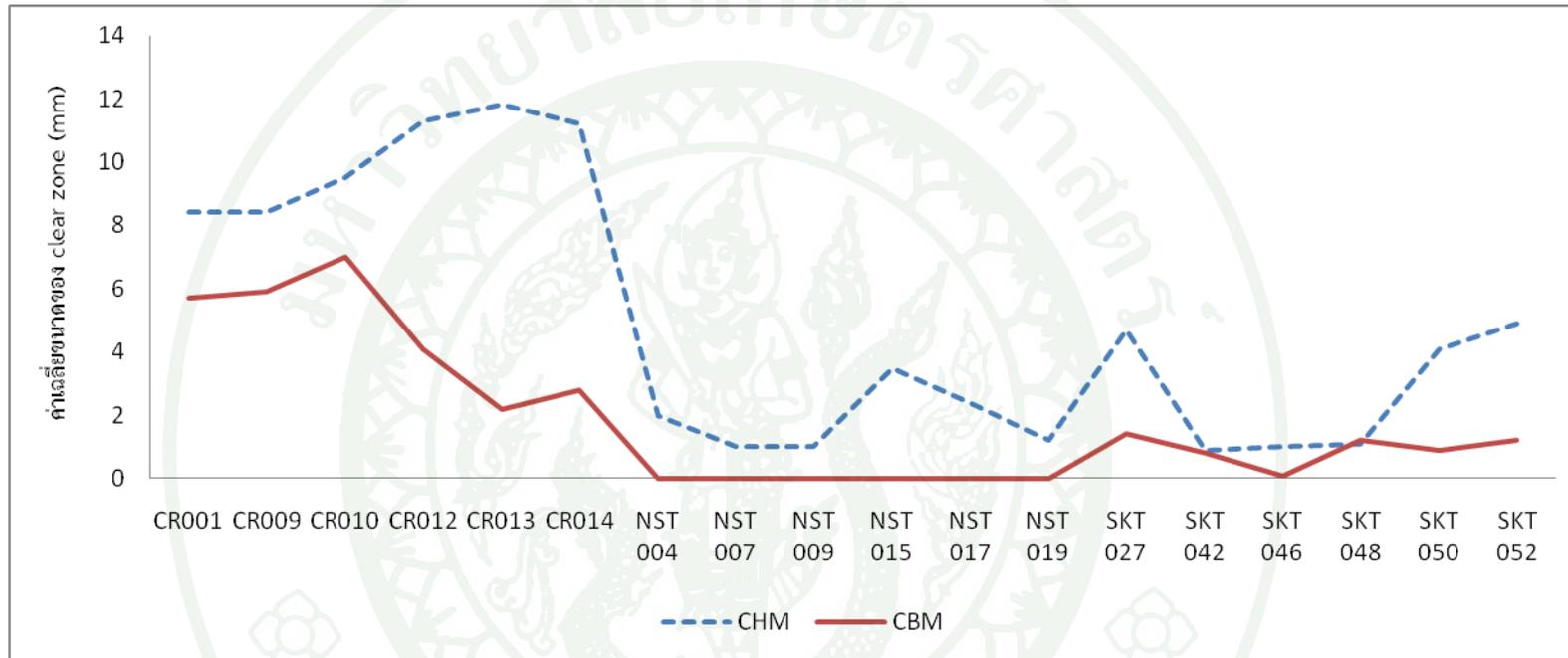
แต่การสร้าง clear zone บนอาหาร CHM ยังมีความชัดเจนมากกว่าอีกทั้งยังสามารถจำแนกเชื้อรา *C. acutatum* ออกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งมีลักษณะพื้นฐานวิทยาเหมือนกันได้อีกด้วย

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความกว้างของ clear zone ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เจริญบนอาหาร CHM และ CBM เป็นเวลา 4 วัน

No.	Isolate	ความกว้างของขนาด clear zone (mm) ^{1/}	
		CHM	CBM
1	CR001	8.4 ^c	5.7 ^b
2	CR009	8.4 ^c	5.9 ^b
3	CR010	9.5 ^b	7.0 ^a
4	CR012	11.3 ^a	4.1 ^c
5	CR013	11.8 ^a	2.2 ^{dc}
6	CR014	11.2 ^a	2.8 ^d
7	NST 004	2.0 ^g	0.0 ^g
8	NST 007	1.0 ^h	0.0 ^g
9	NST 009	1.0 ^h	0.0 ^g
10	NST 015	3.5 ^f	0.0 ^g
11	NST 017	2.4 ^g	0.0 ^g
12	NST 019	1.2 ^h	0.0 ^g
13	SKT 027	4.7 ^{de}	1.4 ^{ef}
14	SKT 042	0.9 ^h	0.8 ^f
15	SKT 046	1.0 ^h	0.1 ^g
16	SKT 048	1.1 ^h	1.2 ^f
17	SKT 050	4.1 ^{ef}	0.9 ^{fg}
18	SKT 052	4.9 ^d	1.2 ^f

หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

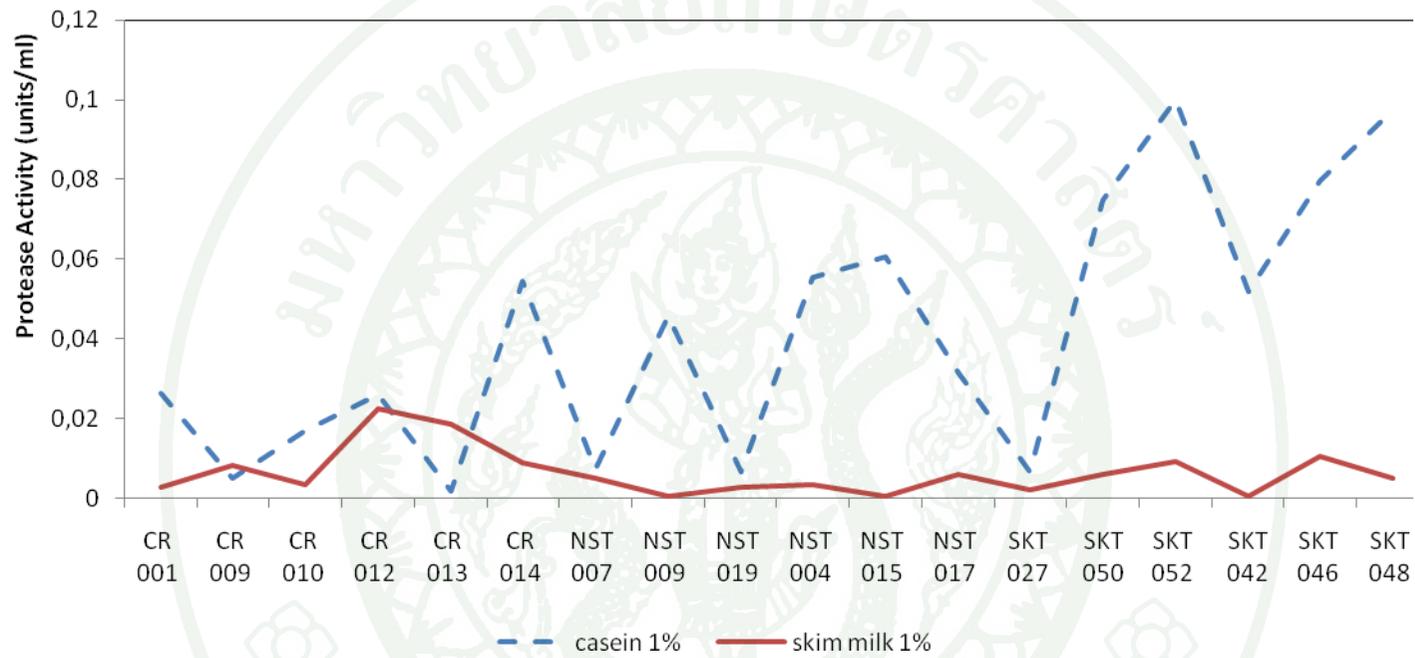
^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบขนาดของ clear zone ที่เชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 18 ไอโซเลต สร้างบนอาหาร CHM และ CBM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน

5.3 ตรวจสอบวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease

จากการตรวจหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sigma, 2008) โดยการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 18 ไอโซเลท (ที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนจากข้อ 5.1) พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ protease มาย่อยยับสเตรททั้ง 2 ชนิดคือ skim milk และ casein bovine milk ได้ โดยพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ในอาหารเหลวที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ casein bovine milk โดยที่เชื้อรา *C. acutatum* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.110-3.630 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วน *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.440-4.033 และ 0.440-6.673 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โดยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท SKT 052 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงที่สุด คือ 6.673 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลท NST 015 และ *C. acutatum* ไอโซเลท CR 014 ซึ่งเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงสุดเท่ากับ 4.030 และ 3.630 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ส่วนการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ในอาหารเหลวที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ skim milk พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.183-1.503 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วน *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.037-0.403 และ 0.037-0.697 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โดยที่เชื้อรา *C. acutatum* ไอโซเลท CR 012 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด 1.503 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท SKT 046 และ *C. capsici* ไอโซเลท NST 017 โดยเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease 0.697 และ 0.403 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่เชื้อราสร้างในอาหารเหลว 1 เปอร์เซ็นต์ skim milk มีความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเกิด clear zone บนอาหาร CHM (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 29 กิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่เชื้อสร้างบนซัพสเตรทที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 13 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum* สร้างในอาหารเหลว
เมื่อใช้ซัพสเตรท 2 ชนิด

No.	Isolate	Activity (units/mg) ^{1/}	
		skim milk (1%)	casein bovine milk (1%)
1	control=PBS	0.000	0.000
2	CR001	0.183	1.760
3	CR009	0.550	0.330
4	CR010	0.220	1.137
5	CR012	1.503	1.723
6	CR013	1.247	0.110
7	CR014	0.587	3.630
8	NST 004	0.220	3.707
9	NST 007	0.330	0.477
10	NST 009	0.037	3.043
11	NST 015	0.037	4.033
12	NST 017	0.403	2.090
13	NST 019	0.183	0.440
14	SKT 027	0.147	0.440
15	SKT 042	0.037	3.447
16	SKT 046	0.697	5.317
17	SKT 048	0.330	6.490
18	SKT 050	0.403	4.987
19	SKT 052	0.623	6.673

หมายเหตุ^{1/}เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน

5.4 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* บนผลพริก

ความสามารถและความรุนแรง (virulence) ของเชื้อในการทำให้พืชเป็นโรคนั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรม (genetic) ของเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของพืชและสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อหรือพืชอาศัยนั้น ในการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชมพบว่า กลไกการเกิดโรคเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุ เช่น การสร้างสารพิษและสารทุติยภูมิไปกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเชื้อราและความรุนแรงของการเกิดโรค (Penalva *et al.*, 2001)

จากการนำเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 18 ไอโซเลท (ที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนจากข้อ 5.1) มาทดสอบบนผลพริกที่ใช้ในการทดสอบคือพริกจินดา และพริกบางช้าง โดยการปลูกเชื้อด้วย inoculum 2 แบบ คือ mycelial disc และ conidial suspension จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส สังเกตและวัดขนาดของแผลบนผลพริกทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ผลพริกแสดงอาการโรคเริ่มแรกจากการเป็นจุดดำ เนื้อเยื่อยุบตัวลงเล็กน้อย แผลมีรูปร่างกลมหรือรี บริเวณขอบมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลสม่ำเสมอ จากนั้นแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น ขอบแผลไม่สม่ำเสมอ มีตุ่มเล็กๆสีดำเรียงซ้อนกันเป็นรูปวงรีหลายชั้นบริเวณแผล ซึ่งเป็นกลุ่มของ acervulus (สมศิริ, 2521) ถ้าความชื้นสูงจะเห็นกลุ่ม conidial mass เยี่ยมีสัมบริเวณแผล (ธารทิพย์ และคณะ, 2548) หลังจากการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธีเป็นเวลา 7 วัน พบการเกิดโรคบนผลพริกทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในพริกบางช้างพบว่าการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc นั้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่าการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่พริกจินดากลับพบว่าการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่าการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc (ตารางที่ 14-17)

ลักษณะอาการบนผลพริกที่ถูกเชื้อรา *C. acutatum* เข้าทำลายก่อให้เกิดแผลจะเกิดจุดดำน้ำขนาดเล็ก แผลบวมเล็กลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายขนาด แผลมีลักษณะรูปร่างเป็นวงรี ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีดำ พบกลุ่มของ acervulus กระจายอยู่ทั่วบริเวณแผล ขอบแผลไม่ชัดเจนมีสีส้มอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาลอ่อน พบกลุ่มของ conidial mass เยี่ยมีสัมบริเวณแผล การใช้ inoculum ที่แตกต่างกันในการปลูกเชื้อพบว่า การปลูกเชื้อด้วย conidial suspension นั้นลักษณะอาการบนผลพริกจะพบการสร้าง acervulus และ conidial mass มากกว่าการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc (ภาพที่ 30,31-A,D) ส่วนเชื้อรา *C. capsici* เมื่อเข้าทำลายผลพริก แผลจะมีลักษณะยุบตัวลง แผลมีรูปร่างวงกลมจนถึงรี ขอบแผลสม่ำเสมอ มีการสร้างกลุ่มของ acervulus ปริมาณมากบริเวณ

กลางแผลและมีการกระจายตัวเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ (concentric ring) บริเวณรอบแผล ขนาดของแผลมีขนาดใหญ่ บริเวณขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ (ภาพที่ 30,31-B,E) และยังพบว่าการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc นั้นรูปร่างของแผลบนผลพริกจะมีลักษณะกลมเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension แผลจะมีลักษณะเป็นวงรีอีกทั้งยังมีการสร้างและการกระจายตัวของ acervulus มากกว่าด้วย จากรายงานของ Dastur (1920) พบว่าเชื้อรา *C. capsici* สามารถเข้าทำลายผลพริกได้โดยไม่ผ่านทางบาดแผล เนื่องจากเมื่อสปอร์ของเชื้อราตกลงบนผลพริกเชื้อราจะสร้างส่วนของ appressorium ซึ่งจะงอกขึ้นมาเพื่อเกาะบนผิวของผลพริก จากนั้นจะสร้าง infection tube ขึ้นมาเพื่อแทงผ่านผิวลงไปและปล่อยสารพิษออกมาเพื่อทำลายเซลล์พืชก่อนที่จะเจริญสร้างเส้นใยและสร้าง acervulus ซึ่งเป็นแหล่งให้กำเนิดสปอร์ต่อไป

ขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* เกิดแผลรูปร่างกลมไปจนถึงวงรี แผลมีลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่ง แผลเมื่อเริ่มเกิดใหม่ๆ สีเหลืองส้มและถ้าอายุมากสีจะคล้ำลงเล็กน้อย ซึ่งจะสร้างกลุ่ม acervulus เรียงซ้อนกันเป็นวงๆ อยู่ในบริเวณแผล ขอบแผลสม่ำเสมอ แต่มีลักษณะไม่ชัดเจน ขอบแผลมีสีส้มอ่อน สีส้มเข้มไปจนถึงสีน้ำตาล และยังพบว่าการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension พบการสร้าง conidial mass สีส้มกระจายตัวทั่วบริเวณแผล (ภาพที่ 30,31-C,F) ในประเทศเกาหลี มีรายงานว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีอยู่ 2 strain คือ strain G และ strain R โดย strain G มีความรุนแรงมากสามารถเข้าทำลายได้ทั้งผลเขียวและผลสุกแดงไม่สร้าง perithecium และ setae ส่วน strain R มีความรุนแรงน้อยและก่อให้เกิดความเสียหายเฉพาะผลสุกแดง และยังพบการสร้าง perithecium และ setae อีกด้วย

ความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์สามารถเข้าทำลายทั้ง 2 สายพันธุ์คือ พริกจินดา และพริกบางช้างได้โดยการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc และ conidial suspension โดยพริกจินดา ที่ปลูกเชื้อด้วย conidial suspension มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการโรคสูงที่สุด รองลงมาคือ พริกจินดาที่ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc พริกบางช้าง ที่ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc และพริกบางช้างที่ปลูกเชื้อด้วย conidial suspension โดยมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 53.12 40.48 22.19 และ 9.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14-17) ซึ่งต่างจากรายงานของ บุญญวัติ (2540) และ รัตตา (2542) ที่พบว่าพริกบางช้างมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคสูง ส่วนพริกจินดานั้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคต่ำ (ภาพที่ 30-34)

เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นกับการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ พบว่า การสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum* อาจไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ซึ่งอาจเป็นเพียงปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายผลพริกได้ แต่ยังมีอีกหลายปัจจัยที่ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายพืชได้





ภาพที่ 30 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกบางซ้างที่เชื้อรา *C. acutatum*
 (A และ D) *C. capsici* (B และ E) และ *C. gloeosporioides* (C และ F) เข้าทำลาย
 โดยการปลูกเชื้อด้วย inoculums ที่แตกต่างกัน : 1. ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc (A-C)
 และ 2. ปลูกเชื้อโดยใช้ conidial suspensions (D-F)



ภาพที่ 31 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกจินดาที่เชื้อรา *C. acutatum* (A และ D) *C. capsici* (B และ E) และ *C. gloeosporioides* (C และ F) เข้าทำลาย โดยการปลูกเชื้อด้วย inoculums ที่แตกต่างกัน : 1. ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc (A-C) และ 2. ปลูกเชื้อโดยใช้ conidial suspensions (D-F)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคนบนผลพริกบางซ้าง หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์: โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm) ^{1/}	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
พริกบางซ้าง	<i>C. acutatum</i>	CR001	13.70 ^{ab2/}	21.03 ^{ab}	100.00 ^a
		CR009	10.90 ^{bcd}	14.53 ^{cd}	100.00 ^a
		CR010	12.90 ^{abc}	16.81 ^{a-d}	100.00 ^a
		CR012	11.80 ^{a-d}	17.41 ^{abc}	100.00 ^a
		CR013	9.90 ^{bcd}	12.60 ^{cde}	100.00 ^a
		CR014	7.70 ^{cde}	16.90 ^{a-d}	100.00 ^a
	<i>C. capsici</i>	NST 004	11.80 ^{a-d}	14.93 ^{bcd}	100.00 ^a
		NST 007	16.40 ^a	21.37 ^a	100.00 ^a
		NST 009	14.60 ^{ab}	13.56 ^{cde}	100.00 ^a
		NST 015	14.30 ^{ab}	22.19 ^a	100.00 ^a
		NST 017	13.30 ^{ab}	13.16 ^{cde}	80.00 ^b
		NST 019	12.50 ^{abc}	11.14 ^{de}	100.00 ^a

ตารางที่ 14 (ต่อ)

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm)	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
	<i>C. gloeosporioides</i>	SKT 027	2.60 ^c	4.54 ^{fg}	100.00 ^a
		SKT 042	3.90 ^c	1.63 ^{fg}	100.00 ^a
		SKT 046	2.60 ^c	0.79 ^g	100.00 ^a
		SKT 048	6.90 ^{de}	3.41 ^{fg}	100.00 ^a
		SKT 050	2.70 ^c	4.87 ^{fg}	100.00 ^a
		SKT 052	6.80 ^{de}	7.87 ^{ef}	100.00 ^a
	C.V.(%)		44.52	48.46	10.66

หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคนบนผลพริกจินดา หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์: โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm) ^{1/}	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
พริกจินดา	<i>C. acutatum</i>	CR001	8.90 ^{c-f}	22.31 ^{c-f}	80.00 ^a
		CR009	15.30 ^{ab}	29.19 ^{a-d}	100.00 ^a
		CR010	13.70 ^{a-d}	34.36 ^{a-d}	100.00 ^a
		CR012	11.70 ^{b-e}	31.84 ^{a-d}	100.00 ^a
		CR013	13.60 ^{a-d}	29.93 ^{a-d}	100.00 ^a
		CR014	16.10 ^{ab}	26.28 ^{b-e}	100.00 ^a
	<i>C. capsici</i>	NST 004	14.20 ^{abc}	29.94 ^{a-d}	100.00 ^a
		NST 007	12.10 ^{b-c}	35.17 ^{abc}	100.00 ^a
		NST 009	18.50 ^a	26.34 ^{b-e}	100.00 ^a
		NST 015	14.30 ^{abc}	33.64 ^{a-d}	100.00 ^a
		NST 017	13.50 ^{a-d}	40.48 ^a	100.00 ^a
		NST 019	18.30 ^a	31.60 ^{a-d}	100.00 ^a

ตารางที่ 15 (ต่อ)

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm)	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
	<i>C. gloeosporioides</i>	SKT 027	5.40 ^{fg2/}	15.20 ^{ef}	100 ^a
		SKT 042	5.90 ^{fg}	21.78 ^{def}	80.00 ^a
		SKT 046	15.70 ^{ab}	36.35 ^{ab}	100.00 ^a
		SKT 048	1.20 ^g	11.23 ^f	40.00 ^b
		SKT 050	6.90 ^{ef}	23.35 ^{b-f}	80.00 ^a
		SKT 052	8.30 ^{def}	31.06 ^{a-d}	100.00 ^a
	C.V.(%)		37.52	36.59	23.96

หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริกบางซ้าง หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์: โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm) ^{1/}	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
พริกบางซ้าง	<i>C. acutatum</i>	CR001	12.30 ^{b-f2/}	7.45 ^{ab}	80.00 ^{ab}
		CR009	14.00 ^{a-d}	6.79 ^{abc}	80.00 ^{ab}
		CR010	18.00 ^{ab}	9.11 ^a	100.00 ^a
		CR012	9.60 ^{c-g}	4.17 ^{cd}	80.00 ^{ab}
		CR013	12.50 ^{a-c}	7.81 ^a	80.00 ^{ab}
		CR014	17.00 ^{abc}	9.30 ^a	100.00 ^a
	<i>C. capsici</i>	NST 004	18.10 ^{ab}	6.69 ^{abc}	100.00 ^a
		NST 007	17.90 ^{ab}	6.86 ^{abc}	100.00 ^a
		NST 009	10.50 ^{b-g}	4.36 ^{bcd}	60.00 ^{ab}
		NST 015	10.50 ^{b-g}	4.14 ^{cd}	80.00 ^{ab}
		NST 017	14.80 ^{a-d}	7.74 ^a	80.00 ^{ab}
		NST 019	20.60 ^a	7.81 ^a	100.00 ^a

ตารางที่ 16 (ต่อ)

พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm)	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
	<i>C. gloeosporioides</i>	SKT 027	7.50 ^{d-g}	2.27 ^d	80.00 ^{ab}
		SKT 042	6.50 ^{efg}	3.26 ^d	80.00 ^{ab}
		SKT 046	3.40 ^g	3.12 ^d	100.00 ^a
		SKT 048	4.10 ^{fg}	2.74 ^d	100.00 ^a
		SKT 050	6.00 ^g	3.08 ^d	60.00 ^{ab}
		SKT 052	20.75 ^{d-g}	8.07 ^a	40.00 ^b
	C.V.(%)		56.93	48.46	43.33

หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยของแผล ความรุนแรงของโรคและความสามารถในการทำให้เกิดโรคนบนผลพริกจินดา หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์: โดยวิธีการปลูกเชื้อด้วย conidial suspension

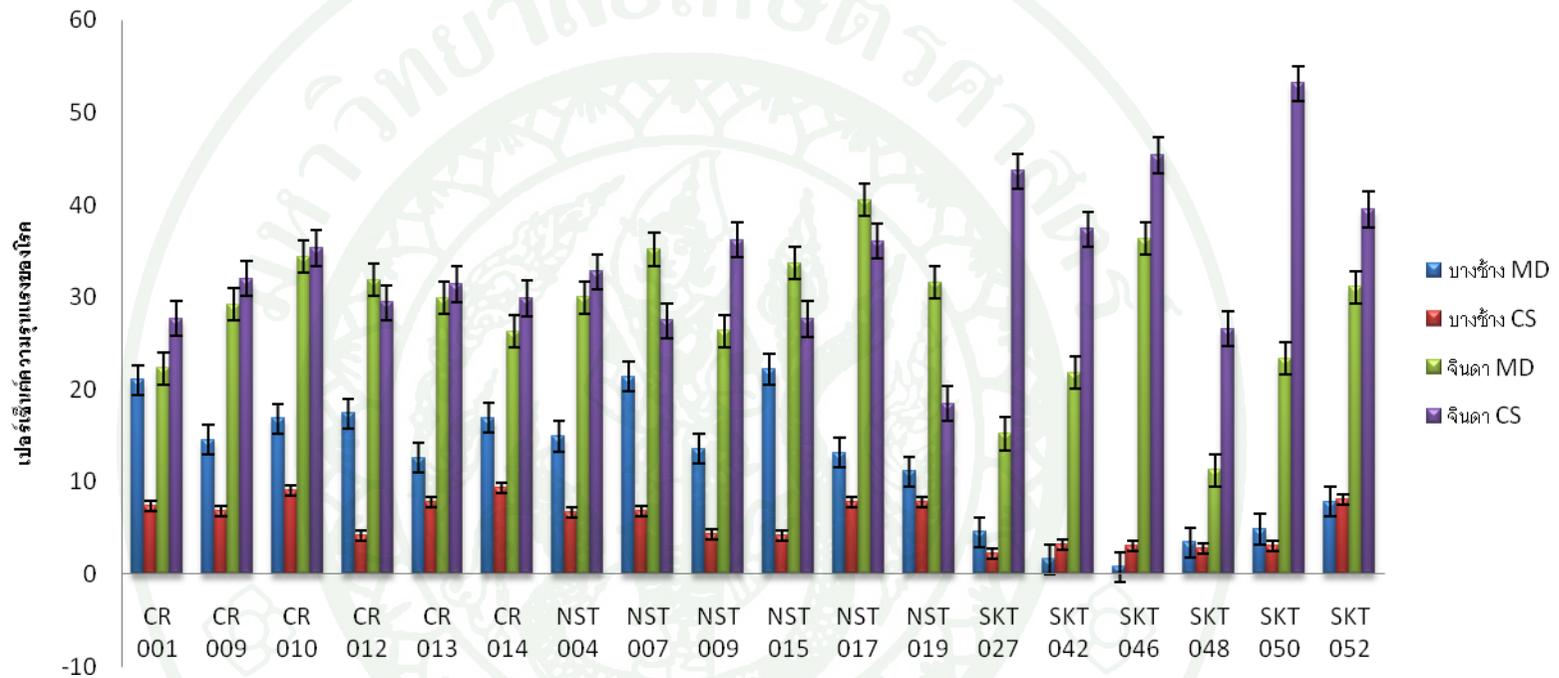
พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm) ^{1/}	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
พริกจินดา	<i>C. acutatum</i>	CR001	20.30 ^{cde2/}	27.65 ^{def}	100.00 ^a
		CR009	21.00 ^{bcd}	32.02 ^{cde}	100.00 ^a
		CR010	21.80 ^{bcd}	35.31 ^{b-c}	100.00 ^a
		CR012	19.40 ^{de}	29.38 ^{cde}	100.00 ^a
		CR013	21.10 ^{bcd}	31.39 ^{cde}	100.00 ^a
		CR014	19.70 ^{cde}	29.88 ^{cde}	100.00 ^a
	<i>C. capsici</i>	NST 004	22.50 ^{bc}	32.75 ^{cde}	100.00 ^a
		NST 007	20.80 ^{b-c}	27.45 ^{def}	100.00 ^a
		NST 009	20.80 ^{b-e}	36.17 ^{b-e}	100.00 ^a
		NST 015	19.00 ^{de}	27.61 ^{def}	100.00 ^a
		NST 017	21.20 ^{bcd}	36.06 ^{d-e}	100.00 ^a
		NST 019	13.30 ^f	18.45 ^f	100.00 ^a

ตารางที่ 17 (ต่อ)

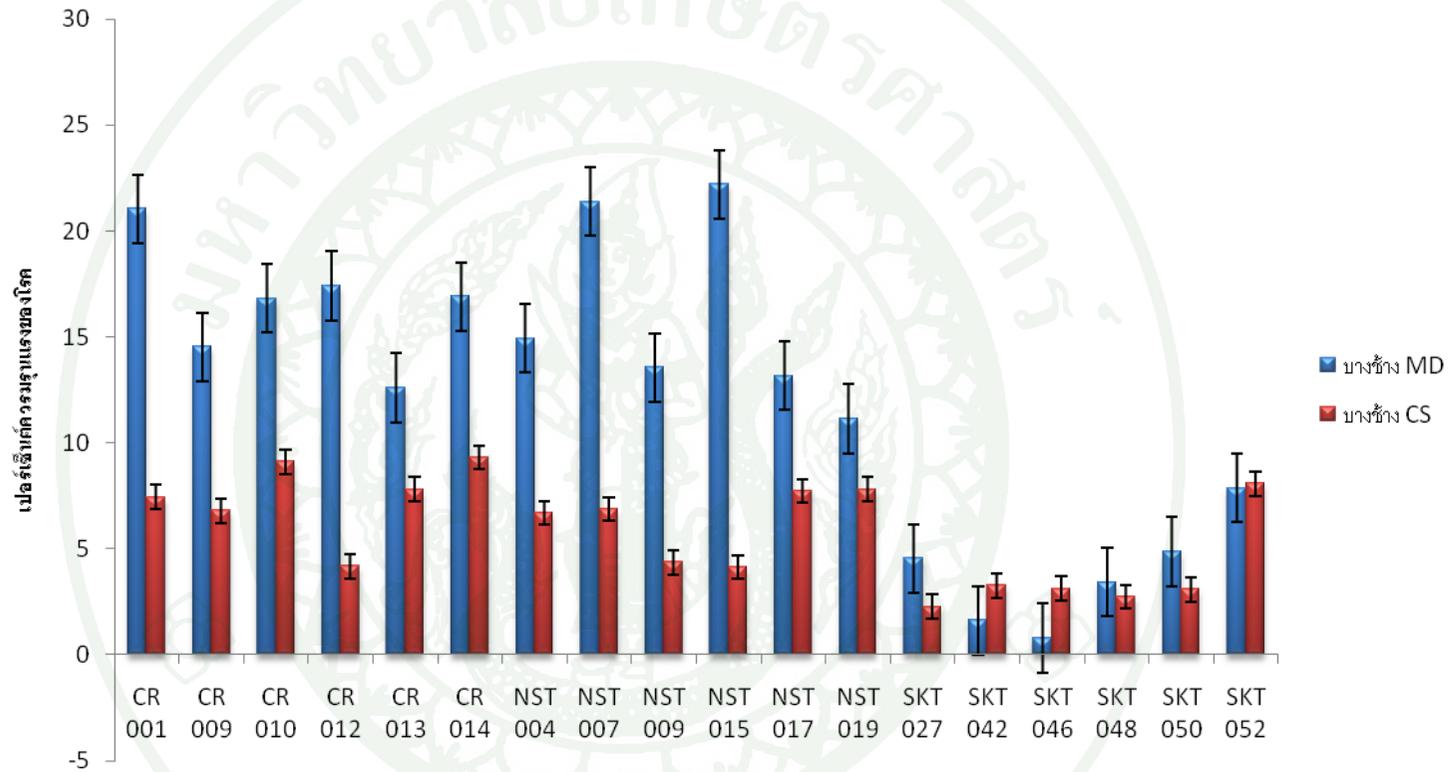
พันธุ์	สปีชีส์	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของแผล (mm)	ความรุนแรง (%)	การเกิดโรค(%)
	<i>C. gloeosporioides</i>	SKT 027	25.80 ^a	43.62 ^{ab}	100.00 ^a
		SKT 042	20.90 ^{b-c}	37.37 ^{bcd}	100.00 ^a
		SKT 046	21.30 ^{bcd}	45.37 ^{ab}	100.00 ^a
		SKT 048	18.00 ^c	26.57 ^{ef}	100.00 ^a
		SKT 050	25.80 ^a	53.12 ^a	100.00 ^a
		SKT 052	23.60 ^{ab}	39.51 ^{bc}	100.00 ^a
	C.V.(%)		11.55	28.86	1.09

หมายเหตุ ^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

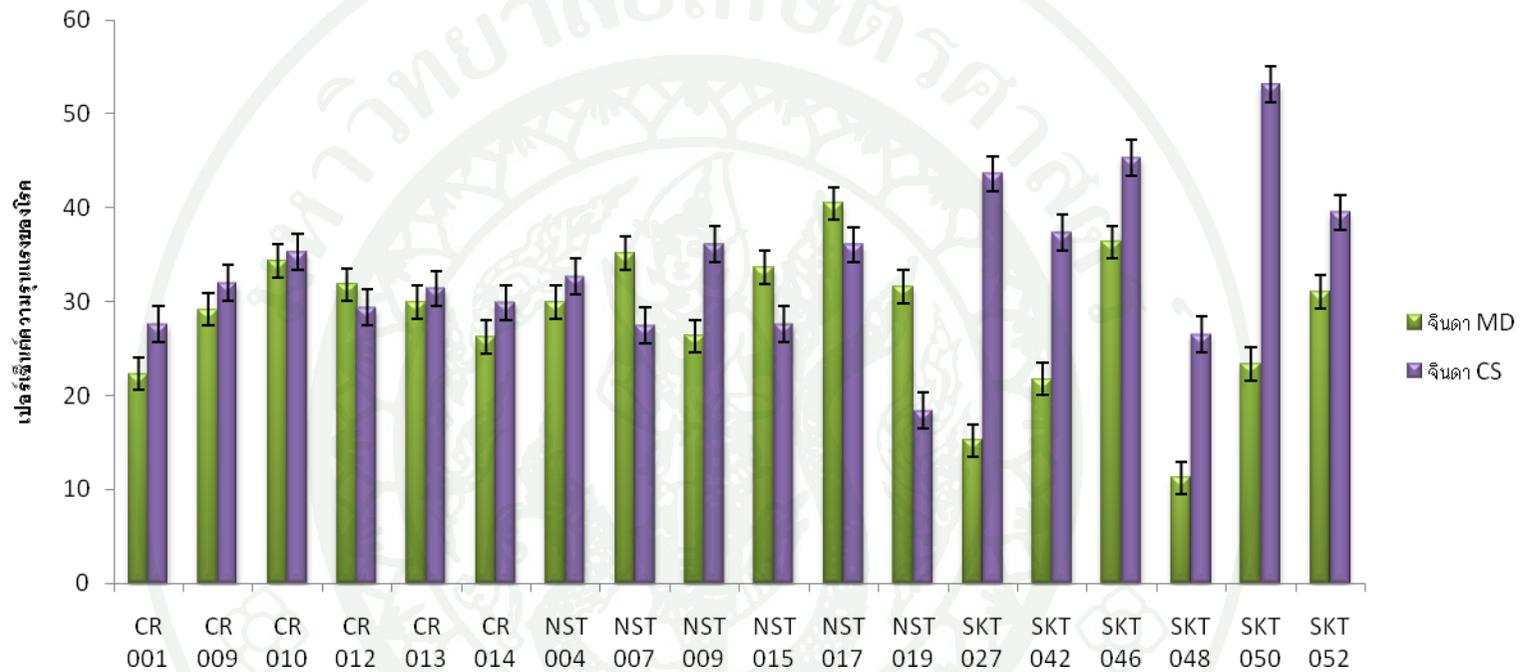
^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P=0.05)



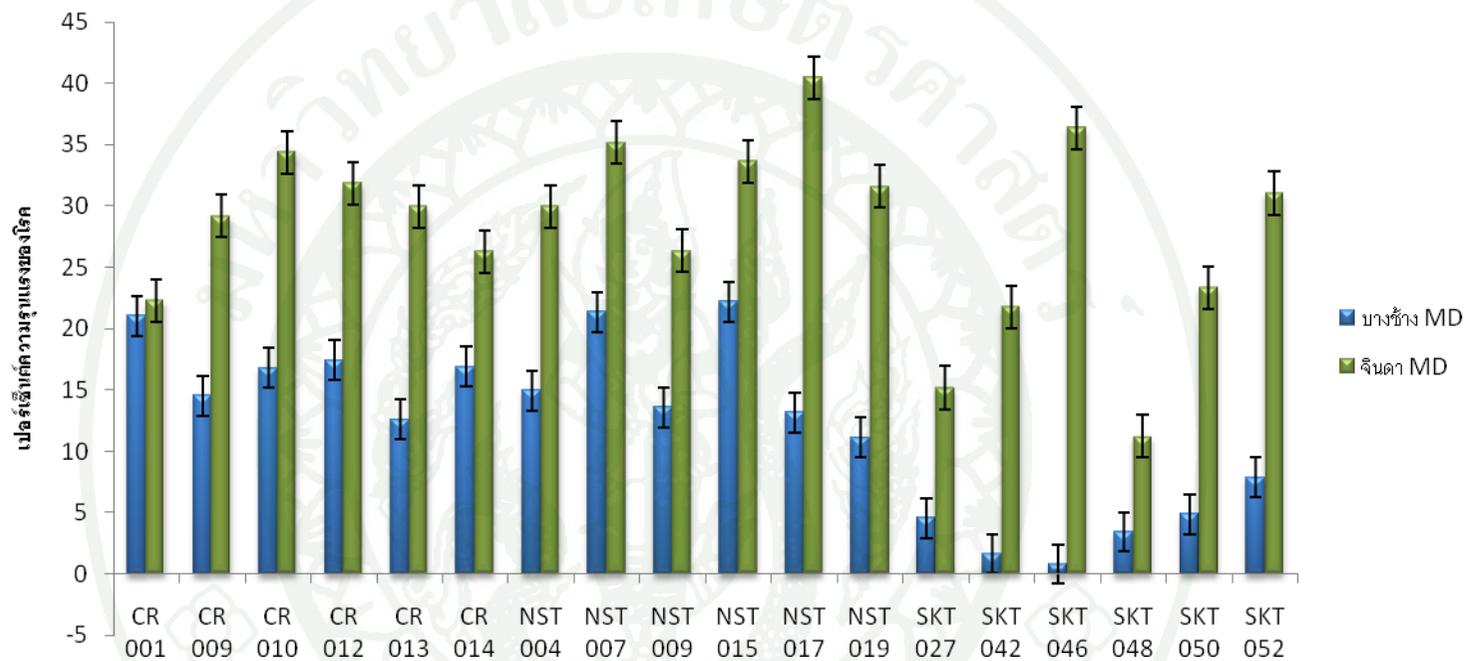
ภาพที่ 32 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกจินดา และพริกบางซังที่ปลูกเชื้อด้วย inoculums ที่แตกต่างกันคือ การใช้ mycelial disc (MD) และ การใช้ conidial suspension (CS)



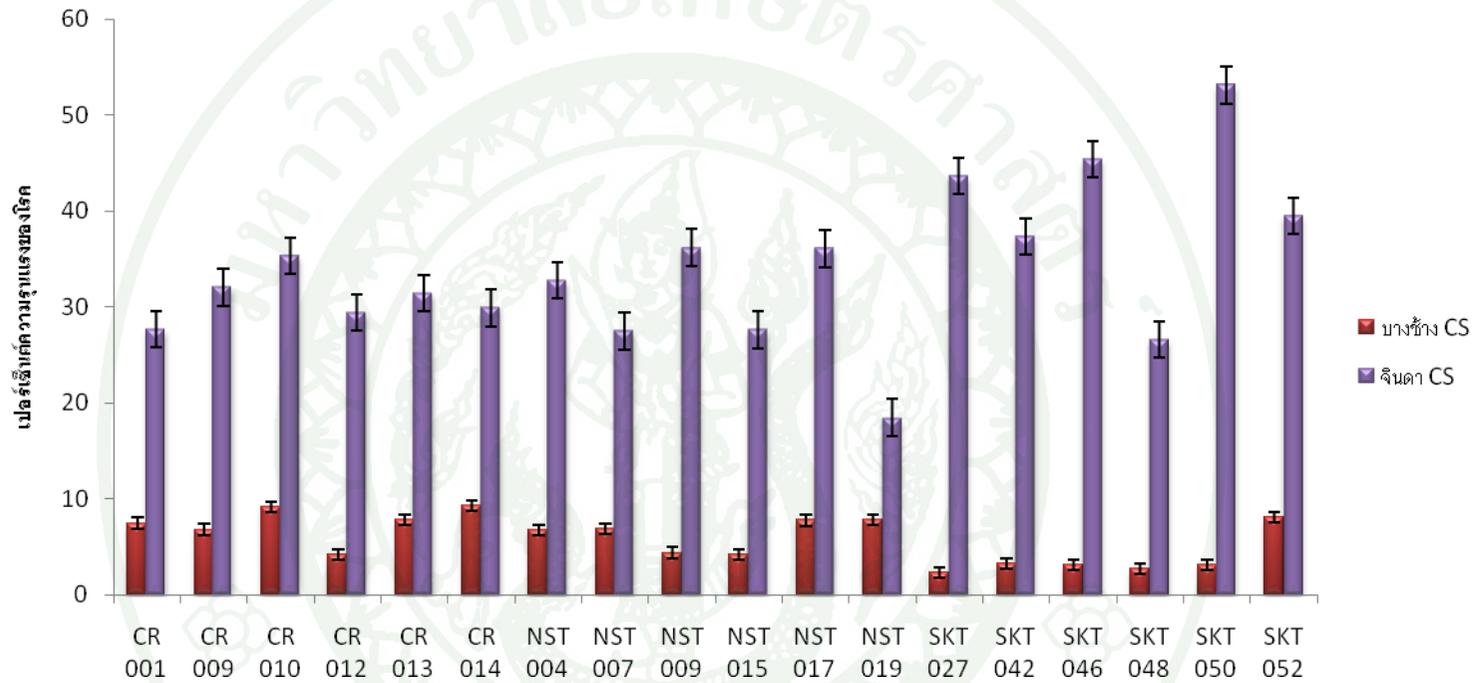
ภาพที่ 33 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกโนส บนผลพริกสายพริกบางซ่างที่ปลูกเชื้อด้วย inoculums ที่แตกต่างกันคือ การใช้ mycelial disc (MD) และ การใช้ conidial suspension (CS)



ภาพที่ 34 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกสายจินดาที่ปลูกเชื้อด้วย inoculums ที่แตกต่างกันคือการใช้ mycelial disc (MD) และ การใช้ conidial suspension (CS)



ภาพที่ 35 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกคโนสบนผลพริกจินดา และพริกบางซ้างที่ปลูกเชื้อด้วย mycelial disc



ภาพที่ 36 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกจินดา และพริกบางช้างที่ปลูกเชื้อด้วย conidial suspension

สรุป

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่แหล่งปลูก 3 จังหวัด คือจังหวัดเชียงราย (CR) สุโขทัย (SKT) และนครศรีธรรมราช (NST) สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้จำนวน 58 ไอโซเลท การจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคได้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุสามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ 3 สปีชีส์ คือ เชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จังหวัดเชียงรายพบเชื้อรา *C. acutatum* มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจังหวัดนครศรีธรรมราชพบเชื้อรา *C. capsici* และสุโขทัยพบเชื้อรา *C. gloeosporioides* คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

อาศัยลักษณะของโคโลนีสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อรา *C. capsici* ได้มากที่สุดถึง 8 กลุ่ม รองลงมาคือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ได้ 7 และ 5 กลุ่ม ตามลำดับ ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีความผันแปรค่อนข้างสูง เนื่องจากรูปร่างและขนาดของ appressorium และสปอร์นั้นอาจไม่แตกต่างกันระหว่างเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ซึ่งมีขนาดสปอร์ 2.5-3.5 x 7.5-23.7 และ 2.5-5.0 x 7.5-22.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ ขณะที่รูปร่างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บางไอโซเลทพบว่า ส่วนปลายของสปอร์มีลักษณะเรียวด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งคล้ายกับรูปร่างสปอร์ของ *C. acutatum* จากความผันแปรที่เกิดขึ้น การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จึงนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล มาช่วยในการจัดจำแนกให้มีความแม่นยำและรวดเร็วขึ้น

การศึกษาปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ ITS4/ITS5 สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณ ยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ซึ่งมีส่วนอนุรักษ์และส่วนที่ผันแปรของเชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากนั้นเมื่อนำผลผลิต ITS มาศึกษาต่อยุ่ด้วยเทคนิค RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ *AluI* *BamHI* และ *RsaI* พบว่า เอนไซม์ *AluI* และ *RsaI* สามารถจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ได้ ส่วนเชื้อรา *BamHI* สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *C. capsici* ออกจากเชื้อ *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ได้เช่นกัน การใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกนั้นพบว่าสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ อีกทั้งยังสามารถจัดจำแนกภายในสปีชีส์ได้อีกด้วย เทคนิค ITS-RFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการช่วยในการจัดจำแนกให้มีความแม่นยำและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร CHM พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* สามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดมาย่อยอาหาร CHM ทำให้ส่วนใสปราศกฏขึ้นรอบๆ โคลโคนีแทนส่วนที่บแสง (clear zone) จากการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ จำนวน 58 ไอโซเลท มีการสร้าง clear zone ที่มีขนาดต่างกัน โดยเชื้อรา *C. acutatum* สร้าง clear zone ที่มีขนาดกว้างที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ตามลำดับ จากขนาดของ clear zone อาจนำมาช่วยในการจัดจำแนกได้ระดับหนึ่ง จากนั้นทำการศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร CBM ซึ่งมีส่วนผสมของซบัสเตรทที่มักนำมาใช้หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease มาทำการทดสอบพบว่า มีขนาดของ clear zone ไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร CHM โดยที่เชื้อรา *C. acutatum* สร้าง clear zone ที่มีขนาดกว้างที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ เชื้อรา *C. capsici* ไม่สร้างส่วนของ clear zone จากการทดลองที่ได้จึงนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* สามารถสร้างเอนไซม์ protease มาย่อยซบัสเตรททั้ง 2 ชนิด แต่จะเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงในอาหารเหลวที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ casein bovine milk โดยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (6.673 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงที่สุด รองลงมาคือ เชื้อรา *C. capsici* (4.030 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และ *C. acutatum* (3.630 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับ ขณะที่การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 สปีชีส์ในอาหารเหลวที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ skim milk พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* (1.503 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) เกิดกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* (0.697 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และ *C. capsici* (0.403 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่เชื้อราสร้างได้ในอาหารเหลว 1 เปอร์เซ็นต์ skim milk มีความสัมพันธ์กับค่าการเกิด clear zone บนอาหาร CHM

การทดสอบการปลูกเชื้อบนผลพริกพันธุ์จินดาและบางช้าง โดยการใช้ mycelial disc (MD) และการใช้ conidial suspension (CS) พบว่าการปลูกเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ด้วย MD กับพริกพันธุ์บางช้าง พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การปลูกเชื้อรา *C. capsici* จะพบการเกิดโรค 96.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการปลูกเชื้อด้วย CS กับพริกพันธุ์จินดาพบว่า เชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ ทำให้เกิดโรคได้ 100% จากการประเมินความรุนแรงของเชื้อในการทำให้เกิดโรค พบว่าผลจากการปลูกเชื้อบนผลพริกพันธุ์จินดามีขนาดใหญ่กว่าบนผลพริกพันธุ์บางช้าง อย่างไรก็ตามพริกพันธุ์บางช้างที่ใช้ inoculum ที่แตกต่างกัน แสดงความรุนแรงของโรคไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบว่าเมื่อนำ *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* มาปลูกเชื้อด้วย MD พบพื้นที่การเกิดโรค 16.55 16.06 และ 3.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้ CS พบพื้นที่การ

เกิดโรค 7.43 6.27 และ 3.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบการสร้าง clear zone และค่าของกิจกรรมเอนไซม์ protease กับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน เอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้นมาอาจไม่ใช่ตัวแปรสำคัญในการทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ แต่อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งในการช่วยให้เชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายพืชได้ง่ายขึ้น



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. สถิติการปลูกตามชนิดพืช. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

จุมพล สารานาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และ จักรพงษ์ เจริญศิริ. 2537. โรคผัก กลุ่มเมื่อนักวิชาการภาคสนาม สำนักวิจัยและพัฒนา เกษตรเขตที่ 6.

เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา. 2536. สถานการณ์การผลิตและการตลาดพริก. ใน เอกสารวิชาการเรื่อง การผลิตการตลาดพริก, น. 1-13. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ชารทิพย์ ภาสบุตร วรรณิการ์ เพ็ญภักตร์ และ ธนิตย์ ปล่องบรรจง. 2548. รวบรวมและจัดจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจ. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ.

นรินทร์ ทองศิริ. 2528. เทคโนโลยีอาหารนม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, น. 23-24.

บุญญาวดี จิระวุฒิ. 2540. การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริก และถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคส่วนเมล็ดและต้นกล้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, น. 270-287. กรุงเทพฯ.

มณีฉัตร นิกกรพันธุ์. 2541. พริก. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัตยา พงศ์พิสุทธา วรานันท์ วิญญูรัตน์ โชติรส รอดเกตุ และ เทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(1) (พิเศษ): 318-321.

- รัตดา อนนกรน โษติ. 2542. ปฏิกริยาที่มีต่อกันระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกับผลพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, น. 198.
- ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, น. 128
- สุชีดา เดชะวงศ์เสถียร. 2549. พริก: การผลิต การจัดการ และการปรับปรุงพันธุ์. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, น. 168.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักร. กรุงเทพฯ.
- สมศิริ จิวสกุล. 2521. เชื้อมวิทยา การถ่ายทอดทางเมล็ดของโรคแอนแทรคโนสของพริกและประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคบนใบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมศิริ แสงโชติ และ ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2527. การถ่ายทอดเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (syd.) Butler & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกผ่านทางเมล็ด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 18: 7-13.
- หทัยชนก คงแก้ว. 2546. การพัฒนาชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อราจีโนม *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ปนเปื้อนในเมล็ดพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพรรณ วิเศษสังข์ จุมพล สารระนาด วิจิต จรัสเจษฎา และ ลักษณะ วรรณเกียรติ. 2535. ปฏิกริยาของพริกบางพันธุ์ต่อโรคแอนแทรคโนส รายงานผลการทดลอง สาขาโรคพืชผักและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, น. 78-82.

- Abang, M. M., S. T. Winter, K. R. Green, P. Hoffmann, H. D. Mignouna and G. A. Wolf. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. **Plant Pathology** 51: 63-71.
- Adaskaveg, J. E and R. J Hartin. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**. 87(9): 979-987.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims and Blackwell. 1996. **Introductory Mycology 4th edition**. John Wiley & Sons, Inc. New York, p. 869.
- Allison, P. V. B. 1962. The influence of conidial matrix on behavior of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Stilbella* sp. **Phytopathology** 52, p. 721.
- Andrews, J. 1984. **Peppers: The domesticated capsicums**. University of Texas Press, Austin, Texas, p. 170.
- Aoki S., S. Ito-Kuwa, K. Nakamura, J. Kato, K. Ninomiya and V. Vidotto. 1994. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia** 128: 143–150.
- Bailey, J. A. and M. J Jeger. 1992. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, UK: CAB International, p. 388
- Barksdale, T. H. 1972. Resistance in tomato to six anthracnose fungi. **Phytopathology** 62: 660-663.
- Bassett, M. J. 1986. **Breeding vegetable crops**. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, p 584.
- Baxter, A. P., G. C. A. van der Westhuizen and A. Eicker. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany** 2: 259-289.

- _____ and G. C. A. van der Westhuizen. 1984. A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany** 3: 265-266.
- Bernstein, B., E. I. Zehr, R. A. Dean and E. Shabi. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. **Plant Diseases** 79: 478-482.
- Brown, A. E., S. Sreenivasaprasad and L. W. Timmer. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime antracnose strain of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology** 86: 523-527.
- Chen, L. C., E. S. Blank and A. Casadevall. 1996. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus Neoformans*. *Clinical and Diagnostic Laboratory*. **Immunology** 3: 570-574.
- Dairy Science and Technology. n.d. **Casein Micelle**. Available Source: www.foodsci.uoguelph.ca/deicon, September 11, 2009.
- Dastur, J. F. 1920. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spald. and its conidial forms, *Gloeosporium piperatum* E. and E. and *C. nigrum* E. and Hals. On chillies and *Carica papaya*. **Annals of Applied Biology** 6: 245-268.
- DaXing, Z., Q. PeiKun and J. ZiDe. 2004. RFLP analysis of ITS region of rDNA in the falcate-spored species of *Colletotrichum*. **Acta Phytopathologica Sinica** 34(5): 431-436.
- Dunaevsky, Ya. E., A. R. Matveeva, G. A. Beliakova, V. I. Domash and M. A. Belozersky. 2006. Extracellular Alkaline Proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry (Moscow)** 72: 345-424.
- Dyko, B. J. and J. E. M. Mordue. 1979. *Colletotrichum acutatum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 630. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, UK.

- Freeman, S., D. Minz., E. Jurkevitch., M. Maymon and E. Shabi. 2000. Molecular Analyses of *Colletotrichum* Species from Almond and Other Fruits. **Phytopathology** 90: 608-614.
- _____, M. Maymon and A. Veibil. 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology** 91: 586-592.
- Garnier, J. 1973. Models of casein micelle structure. Netherlands. **Milk and Dairy Journal** 27: 240-247.
- Grover, R. K. and R. D. Bansal. 1968. Occurrence and overwintering of *Colletotrichum piperatum* on *Capsicum frutescens* in India. **Indian Phytopathology** 21: 116-118.
- Hadden, J. F. and L. L. Black. 1987. Comparison of virulence of tomato and pepper isolates of *Colletotrichum* spp. (Abstract.). **Phytopathology** 77: 641.
- _____ and L. L. Black. 1989. Anthracnose of Pepper Caused by *Colletotrichum* spp. Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics; Taiwan: **Asian Vegetable Research and Development Centre**, pp.189-199.
- Halsted, B. D. 1890. **Report of Botanical**. Department New Jersey Agriculture. Experiment Station Report 11: 358-360.
- _____ 1891. A new anthracnose of peppers. Bulletin of the **Torrey Botanical Club** 18: 14-15.
- Hibbing Community College Chemisty Department. n.d. **Esterification**. Chem-card-lipid. Volume. 26. Available Source: www.hcc.mnscu.edu/chem/V.26/page_id_11273.html, August 11, 2009.
- Higgin, B.B. 1923. **The diseases of pepper**. Georgia Experiment Station Bulletin 141: 48-75.

- _____ 1926. Anthracnose of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Phytopathology** 16: 333-347.
- _____ 1930. **A pepper fruit rot new to the United States**. Georgia Experiment Station Bulletin 162: 10
- Holiday, P. 1980. **Fungal Disease of Tropical Crops**. Cambridge University Press. Cambridge, London, p. 607.
- _____ 1989. **A Dictionary of Plant Pathology**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hong, S. K. and W. G. Kim. 2007. Taxonomic characteristics of *Colletotrichum* spp. and their telomorphs causing anthracnose of chilli peper in korea. **In: First International Symposium on Chili Antracnose**. AVRDC The World Vegetavle center, pp. 34.
- James, M. N. G. 1980. An X-ray crystallographic approach to enzyme structure and function. **Canadian journal of Biochemistry** 58: 251.
- Kim, B. S. 1986. Resistance to *Phytophthora* root rot in introduced peppers (*Capsicum* spp.). **Journal of the Korean. Society of Horticultural Science** 27(1): 11-14. (In Korean with English abstract).
- _____ H. K. Park and W. S. Lee. 1990. Resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper, pp. 184-188. **In: S. K. Green, T. D. Griggs and B. T. Mclean, (eds.). Tomato and Pepper Production in the Topics. Proc. International Symposium on Integrated Management. Practrices**, 1st AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Lagiere, R. 1971. **Contribution a fetude des pourritures des casules du cotonnier en El Salvador** I. Etiologie. *Coton et Fibres Tropicales* 26: 1-13.

- Lammert, J. M. 2007. **Techniques in microbiology: a student handbook**. The United states of America, pp. 123-126.
- Liu, Y. and R. Guo. 2008. pH-dependent structures and properties of casein micelles. **Biophysical Chemistry** 136: 67–73.
- Louis, I and R. C. Cooke. 1985. **Enzymes in conidial matrix of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Mycosphaerella pinodes***. Transactions of the British Mycological Society 84: 742 - 745.
- Martin R. B. 1998. **Free energies and equilibria of peptide bond hydrolysis and formation**, Biopolymers, 45, 351–353. Available Source: www.en.wikipedia.com, September 11, 2009.
- Martinez-Culebras, P. V., A. Querol, M. B. Suarez-Fernandez. M. D. Garcia-Lopez and E. Barrio. 2003. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primer for their identification. **Phytopathology** 151: 135-143.
- McDade, J. J. and R. H. Weaver. 1958. Rapid methods for the detection of gelatin hydrolysis. **Journal of Bacteriology** 77: 60-69.
- Medina, P. and L. Baresi. 2007. Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. Department of Biology, California State University. **Journal of Microbiological Method** 69: 391-393.
- Mendgen, K., M. Hanh and H. Diesing. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annual Review of **Phytopathology** 34: 367-386.
- Miller, A. N., T. J. Ng and T. H. Barksdale. 1984. Comparison of inheritance of resistance to tomato anthracnose caused by two *Colletotrichum* spp. **Plant Diseases** 68: 875-877.

- Mordue, J. E. M. 1967. *Colletotrichum coccodes*. No. 131 Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth. Mycological Institute Kew, Surrey, G.B.
- _____ 1971. *Glomerella cingulata*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. pp. 315-317. Commonwealth. Mycological Institute Kew, UK.
- Moriwaki, J., S. Toyozo and T. Tsukiboshi. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience** 44: 47-53.
- National Nomenclature Committee of the National Union of Bio chemistry. 1984. **Enzyme Nomenclature**. Academic Press, New York.
- Neurath, H. 1984. Evolution of progeolytic enzymes. **Science** 224: 350-357.
- Ogrydziak D. M. 1993. Yeast extracellular proteases. **Critical Reviews in Biotechnology** 13 (1): 1-55.
- Pan, H. J., L. J. Teng, Y. C. Chen, P. R. Hsueh, P. C. Yang, S. W. Ho and K. T. Luh. 2000. High protease activity of *Chryseobacterium indologenes* isolates associated with invasive infection. **Journal Microbiology Immunology and infection** 33: 223-226.
- Pakdeevaporn, P., S. Wasee, P. W. J. Taylor and O. Mongkolporn. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding** 124(2): 206-208.
- Penalva A., R. Baldelli, J. P. Camina, A. L. Cerro, D. Micic and G. Tamburrano. 2001. Physiology and possible pathology of growth hormone secretagogues. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism** 14: 1207-1212.

- Perfect J. R., B. Wong, Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung and P. R. Williamson. 1998.
Cryptococcus neoformans: virulence and host defences. **Medical Mycology** 36: 79–86.
- Pickersgill, B. 1988. Genetic resources of *Capsicum* for tropical regions. *In* **Tomato and Pepper Production in the Tropics**. pp. 2-9. Proceedings of the International Symposium on Integrated Management Practices, Asian Vegetable Research and Development center, Taipei, Taiwan.
- Pickersgill, B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. *In* T. Tsuchiya and P. K. Gupta (eds.), **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution: Part B**. pp. 139-160. Elsevier, New York.
- Pinti, M., C. F. Orsi, L. Gibellini, R. Esposito, A. Cossarizza, E. Blasi, S. Peppoloni and C. Mussini. 2007. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. *Federation of European Biochemical Societies*. 581: 3882-3886.
- Polgar, L. 1989. **Mechanism of protease action**, pp. 87-122. CRC press, Florida, US.
- Poulos, J. M. 1994. *Capsicum* L. *In* Siemonsma, J. S. and K. Piluek. **Plant Resources of South-East Asia**, Bogor, Indonesia.
- Purseglove, J. M., E. G. Brown, C. L. Green and S. R. Robbins. 1981. *Chillies: Capsicum* spp. *In* **Tropical Agriculture Series**, Spices Vol. I. pp. 331-434. Longman Gr. Lsd.
- Ramakrishnan, T. S. 1947. Studies in the genus *Colletotrichum* III. *Proc. Indian Academic of Science*. B 25: 15-27.
- Rayner, R. W. 1970. **A Mycological colour chart**. 34 p. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

- Redman, R. S. and R. J. Rodriguez. 2002. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research** 106: 1427-1434.
- Rodrigues M. L., F. C. dos Reis, R. Puccia, L. R. Travassos and C. S. Alviano. 2003. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. **Microbial Pathogen** 34: 65-71.
- Safford, W. E. 1926. **Our heritage from the American Indians**. Smithsonian Institution Annual Report, pp. 405-410.
- Sharma, P. N., M. Kaur, P. Sharma and A. Pathania. 2005. Morphological and molecular variability in *Colletotrichum capsici* the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of north-western India. **Phytopathology** 153: 232-237.
- Sheu, Z. M., Chen, J. R., and Wang, T. C. 2007. Application of ITS-RFLP analysis for Identifying *Colletotrichum* Species Associated with Pepper Anthracnose in Taiwan. *In* : **First International Symposium on Chili Anthracnose**. p. 35.
- Shumi, W., T. Md. Hossain and M. N. Anwar. 2004. Isolation and Purification of Fungus *Aspergillus funiculosus* G. Smith and its Enzyme Protease. Pakistan. **Journal of Biological Sciences** 7 (3): 312-317.
- Sigma Aldrich. 2008. Sigma's Non-specific protease activity assay-Casein as a substrate. **Journal of Visualized Experiments**. <http://www.jove.com/details.php?id=899>, doi: 10.3791/899.
- Simmonds, J. H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal Agriculture Animal Science** 22: 437-459.

- Smith, R. W. 1958. **Taxonomy, etiology, and control of *Colletotrichum piperatum* (E.&E) E. & H. and *Colletotrichum capsici* (syd.) B. & B.** 74 p. M.S. Thesis, University of Delaware, Newmark.
- _____ and D. F. Crossan. 1958. The taxonomy, etiology and control of *Colletotrichum piperatum* (E. & E) E. & H. and *Colletotrichum capsici* (syd.) B. & B. **Plant Disease** 42: 1099-1103.
- Sreenivasaprasad, S., P. R. Millis, B. M. Meehan and A. E. Brown. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome** 39: 499-512.
- Sutton, B. C. 1980. **The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata**, p. 696. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- _____ 1992. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: ***Colletotrichum: biology, pathology and control*** (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford, UK: 1-26.
- Sydow, H. 1913. Beitrage zur Kenntnis der Pilzflora des südlichen Ostindiens I. **Annales. Mycologici** 11: 329-330.
- Than, P. P., R. Jeewan, K. D. Hyde, S. Pongsupasamit, O. Mongkolporn and P. W. J. Taylor. 2007. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with antracnose infection on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology** (in Press).
- Trevan, M. D. 1987. Enzyme production. In **Biotechnology: The Biological Principles**. (Indian ed.). Tata McGraw Hill Pub. Co., New Delhi, India, pp. 155-225.

- Verma, M. L. 1973. Comparative studies on virulence of isolates of four species of *Colletotrichum parasitic* on chillies. **Indian Phytopathology** 26: 28-31.
- _____ and J. N. Krish. 1974. Perpetuation studies on some isolates of four species of *Colletotrichum* pathogenic on chillies. **Indian Phytopathology** 27: 397-399.
- von Arx, J. A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift** 29: 413-468.
- _____ 1981. **The Genera of Fungi Sporulation in Pure Culture, 3rd edition**. J. Cramer, Vaduz, pp. 240.
- Walker, J., A. Nikandrow and G. D. Millar. 1991. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*. **Mycological Research** 95: 1175-1193.
- Walton, J. D. 1994. Deconstructing the cell wall. **Plant physiology** 104:1113-1118.
- Wang, T. C., Z. C. Sheu, S. K. Green, D. Zhang, Y. Liu, N. Ramachandran, I. Widodo and S. Poonpolgul, 2008. Characterization of *Colletotrichum* species Associated with Pepper Anthracnose in China, India, Indonesia, Taiwan and Thailand. **In First International Symposium on Chili Anthracnose**. AVRDC The World Vegetavle center, pp. 32-33.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Applification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. **In** M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. Sninsky and T. J. White, eds **PCR Protocols: A Guide to Method and Applications**. Academic Press, New York.
- Wikimedia commons. 2007. **Phosphoserine**. Available Source: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phosphoserine.svg>, August 11, 2009.

- Williams J. G. K., A. R. Kublelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids Research** 18: 6531-6535.
- Williams, L. and P. V. B. Allison. 1952. The effect of conidial matrix, hydrogen ion concentration and thiamine on spore germination and pathogenicity of *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology** 42: 478.
- You, B. J. and K. R. Chung. 2007. Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. **Federation of European Microbiological Societies**. 277: 107-114.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* stains. **Mycological Research** 98: 531-534.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

2. Water Agar (WA)

วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

3. Potato Carrot Agar (PCA)

มันฝรั่ง	20	กรัม
แครอท	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

4. Spezieller Nährstoffarmer broth (SNB)

KH_2PO_4	1.0	กรัม
KNO_3	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
น้ำตาล Sucrose	2.0	กรัม
น้ำตาล Dextrose	2.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
น้ำ	1.0	ลิตร

5. Casein hydrolysis medium (CHM)

KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO_4	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Skim milk	3.7	กรัม
น้ำตาล Dextrose	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

6. Casein from bovine milk medium (CSM)

KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO_4	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Casein bovine milk	3.7	กรัม
น้ำตาล Dextrose	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

7. Potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 - K_2HPO_4)

- สารละลาย A : 0.2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- สารละลาย B : 0.2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 45.6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ (ดังตารางผนวกที่ 1)
- จากนั้นผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 1 วิธีการเตรียมสารละลาย 0.1 M Potassium phosphate buffer

สารละลาย A (ml)	สารละลาย B (ml)	pH	สารละลาย A (ml)	สารละลาย B (ml)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0



ภาคผนวก ข
ปริมาณและขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum*

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณและขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 58 ไอโซเลท
ที่ได้จากการนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ทั้ง 3 ชนิด

จำนวน	พื้นที่	รหัส	เอนไซม์		
			<i>AluI</i>	<i>BamHI</i>	<i>RsaI</i>
1	เชียงใหม่	CR 001	nd	510	nd
2	(CR)	CR 002	nd	500	nd
3		CR 003	nd	500	nd
4		CR 004	nd	510	nd
5		CR 005	nd	510	nd
6		CR 006	nd	500	nd
7		CR 007	nd	500	nd
8		CR 008	nd	500	nd
9		CR 009	nd	500	nd
10		CR 010	nd	500	nd
11		CR 011-1	200,400	500	200,400
12		CR 011-2	nd	510	nd
13		CR 012	nd	520	nd
14		CR 013	nd	500	nd
15		CR 014	nd	500	nd
16		CR 015	nd	500	nd
17		CR 016	nd	500	nd
18		CR 017	nd	500	nd
19		CR 018	nd	520	nd
20		CR 020	nd	520	nd
21	นครศรีธรรมราช	NST 004	200,400	nd	nd
22	(NST)	NST 006	200,400	nd	nd
23		NST 007	200,400	nd	nd
24		NST 008	200,400	nd	nd
25		NST 009	200,400	nd	nd

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

จำนวน	พื้นที่	รหัส	เอนไซม์		
			<i>AluI</i>	<i>BamHI</i>	<i>RsaI</i>
26	นครศรีธรรมราช	NST 010	200,400	nd	nd
27	(NST)	NST 011	200,400	nd	nd
28	(ต่อ)	NST 012	200,400	nd	nd
29		NST 013	200,400	nd	nd
30		NST 014	200,400	nd	nd
31		NST 016	200,400	nd	nd
32		NST 017	200,400	nd	nd
33		NST 018	200,400	nd	nd
34		NST 019	200,400	nd	nd
35		NST 020	200,400	nd	nd
36		NST 021	200,400	nd	nd
37		NST 022	200,400	nd	nd
38		NST 023	200,400	nd	nd
39		NST 024	200,400	nd	nd
40		NST 025	200,400	nd	nd
41	สุโขทัย (SKT)	SKT 011	200,380	500	200,380
42		SKT 027	200,380	500	200,380
43		SKT 031	200,380	500	400,600
44		SKT 037	200,380	500	200,380
45		SKT 042	200,380	500	200,380
46		SKT 043	200,380	500	200,380
47		SKT 045	200,380	500	200,380
48		SKT 046	200,380	500	200,380
49		SKT 047	200,380	500	200,380
50		SKT 048	200,380	500	200,380
51		SKT 050	200,380	500	200,380

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

จำนวน	พื้นที่	รหัส	เอนไซม์		
			<i>A</i> luI	<i>B</i> amHI	<i>R</i> saI
52	สุโขทัย (SKT)	SKT 051	200,380	500	200,380
53	(ต่อ)	SKT 052	200,380	500	200,380
54		SKT 054	200,380	500	200,380
55		SKT 057	200,380	500	200,380
56		SKT 058	200,380	500	200,380
57		SKT 059	200,380	500	200,380
58		SKT 060	200,380	500	200,380

หมายเหตุ nd = not digest, RFLP fragment < 75 bp not considered



ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ศึกษาการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ระดับความเข้มข้น	blank	std1	std2	std3	std4	std5
ปริมาณไทโรซีนที่ใช้ ^{1/}	0.00	0.05	0.10	0.20	0.40	0.50
ปริมาณน้ำที่ใช้	2.00	1.95	1.90	1.80	1.60	1.50
สารละลาย Na ₂ CO ₃	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Folin & Ciocalteu's phenol	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ปริมาตรรวม	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00

หมายเหตุ ^{1/}ปริมาณไทโรซีนที่ความเข้มข้น 1.1 มิลลิโมล

- เตรียมสารละลายไทโรซีนสำหรับทำกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบในการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ดังตารางผนวกที่ 3)
- สร้างกราฟมาตรฐานไทโรซีน
- จากนั้นใช้สูตรคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

$$\text{Enzyme (units/ml)} = \frac{(\text{umole tyrosine equivalents released}) \times (11)}{(1) \times (10) \times (2)}$$

- 11 = Total Volume (in milliliters) of assay
 10 = Time of assay (in minutes) as per the unit definition
 1 = Volume of enzyme (in milliliters) of enzymes used
 2 = Volume (in milliliters) used in colorimetric Determination

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววรรณันท์ วิญญูรัตน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 6 พฤษภาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลลพบุรี อ.เมือง จ. ลพบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2549)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	วรรณันท์ วิญญูรัตน์ และ รัตติยา พงศ์พิสุทธา. 2553. การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ <i>Colletotrichum</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41:1 (พิเศษ). 299-302 น. รัตติยา พงศ์พิสุทธา วรรณันท์ วิญญูรัตน์ โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41:1 (พิเศษ). 318-321 น.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนราชกรีฑาสโมสร ทุนศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ทุนศูนย์วิทยการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์