

ผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

จากการปลูกเชื้อในอ้อยด้วยวิธีการต่าง ๆ 3 วิธี คือ วิธีการฉีดสปอร์ วิธีการแช่ท่อนพันธุ์ ใน spore suspension นาน 24 ชั่วโมง และวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที แล้วบ่มไว้ 1 คืน โดยใช้ teliospore และ sporidia พบว่า วิธีการฉีดสปอร์ด้วย teliospore suspension ใส่ต้นกล้าอ้อยที่มีอายุ 2 สัปดาห์ พืชจะแสดงอาการของโรคโดยสร้างเส้นสีดำและแตกพุ่มตะไคร้ได้รวดเร็วที่สุด โดยพบอาการของโรค หลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน โดยอาการเริ่มจากต้นอ้อยที่ได้รับการปลูกเชื้อเกิดแผลสีน้ำตาลบริเวณที่ทำการฉีดเชื้อและต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต้นกล้าแตกหน่อใหม่ทางด้านข้าง หน่อใหม่ที่เจริญออกมาจะมีลักษณะลำเล็ก เรียกว่าต้นกล้าหัว ๆ ไป จากนั้นต้นอ้อยจะสร้างเส้นสีดำจากหน่อที่แตกตาใหม่ ลักษณะเป็นเส้นสีดำมีส่วนของเนื้อเยื่อบาง ๆ สีขาวห่อหุ้มอยู่ ต้นที่เป็นโรคมียขนาดต้นเล็ก เตี้ยกว่าต้นปกติ (ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4ก) เมื่อทำการปลูกเชื้อโดยการฉีด sporidia suspension พบว่า ต้นพืชจะแสดงอาการของโรคหลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 4ข)

สำหรับการปลูกเชื้อโดยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ โดยการทำให้ผลรอบตาอ้อย 5 แผล จากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิธีการทำให้ผลรอบตาอ้อย 5 แผล จากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที แล้วนำไปเก็บใน moist chamber เป็นเวลา 1 คืน พบว่า การปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธีให้ผลเช่นเดียวกัน โดยหลังทำการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 2 เดือน ต้นกล้ายังไม่แสดงอาการของโรค เมื่ออายุเข้า 3 เดือน ต้นอ้อยที่ได้รับการปลูกเชื้อเริ่มแสดงอาการของโรคคือใบแคบ ใบตั้ง ลำต้นพอมเร็ว มีการแตกตาข้างเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4) และเริ่มสร้างเส้นดำเห็นได้ชัดเจนเมื่ออ้อยได้รับการปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 4 เดือน ลักษณะอาการดังกล่าวเกิดขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อใช้ teliospore และ sporidia suspension

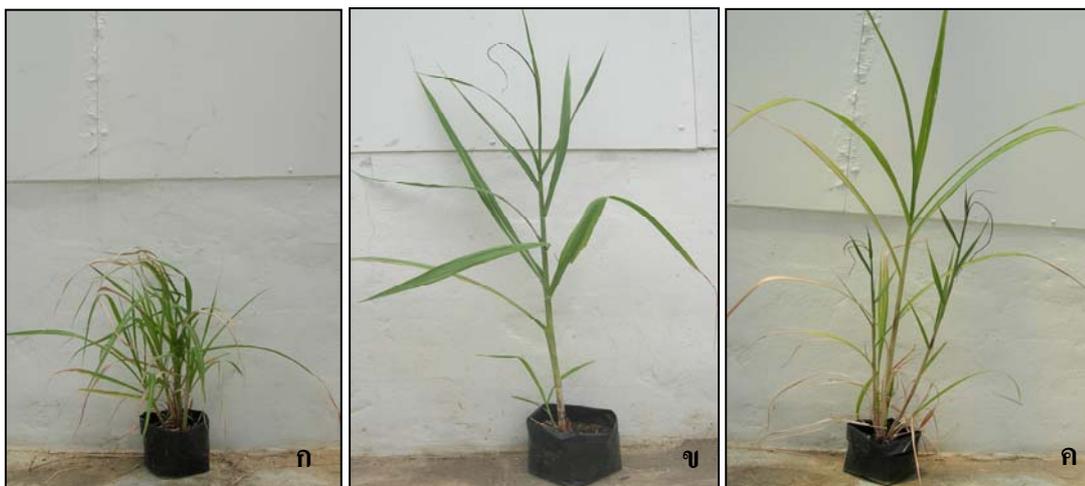


ภาพที่ 3 ลักษณะการสร้างเส้นในอ้อยหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน

ก. ต้นอ้อยปกติ(1) และต้นอ้อยที่เป็นโรค จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension ในอ้อยพันธุ์ H59-3775(2)

ข. อ้อยเป็นโรคสร้างเส้นสีดำที่มีลักษณะบิดเบี้ยวซึ่งเกิดจากการแคระแกรนของลำต้น

ค. อ้อยที่เป็นโรคสร้างส่วนของเชื้อที่มีลักษณะคล้ายเส้นสีดำ



ภาพที่ 4 ลักษณะการเกิดโรคของอ้อยเมื่อได้รับการปลูกเชื้อวิธีการต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน

- ก. ลักษณะการเกิดโรคเมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension
- ข. ลักษณะการเกิดโรคเมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension
- ค. ลักษณะการเกิดโรคเมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension

การตอบสนองของอ้อย 4 พันธุ์ คือ K84-200, อุ้มทอง 1, H59-3775 และ กำแพงแสน 94-13 ต่อการปลูกเชื้อ 3 วิธี โดยใช้ teliospore และ sporidia พบว่า ในอ้อยพันธุ์ K84-200 เกิดโรค 10% เมื่อปลูกเชื้อด้วย วิธีการทำแผล 5 แผลรอบตาอ้อยและแช่ท่อน พันธุ์ใน sporidia suspension 30 นาที แล้วบ่มไว้ใน moist chamber 1 คืน ส่วนการปลูกเชื้อโดย วิธีการอื่น ๆ ไม่พบการสร้างเส้ดำ

อ้อยพันธุ์อุ้มทอง 1 พบการสร้างเส้ดำหลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน ใน วิธีการปลูกเชื้อโดยการฉีด teliospore suspension เข้าสู่ต้นอ้อยที่มีอายุ 2 สัปดาห์ และเมื่ออ้อย อายุครบ 4 เดือน พบอ้อยเป็นโรค 30% เมื่อฉีดด้วย sporidia suspension พบอ้อยเป็นโรค 15% การปลูกเชื้อโดยวิธีการทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผล จากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ้อยเกิดเส้ดำ 10% แต่ไม่พบการสร้างเส้ดำเมื่อแช่ท่อนพันธุ์ ใน sporidia suspension ส่วนวิธีการทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผล จากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที และเก็บในกล่องความชื้นอีกเป็นเวลา 1 คืน พบการสร้างเส้ดำ 5 และ 25 % ในการปลูกเชื้อด้วย teliospore และ sporidia suspension ตามลำดับ

อ้อยพันธุ์ H59-3775 พบการเป็นโรคหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน ในวิธีการฉีด spore suspension เข้าในต้นกล้าอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ เช่นเดียวกับอ้อยพันธุ์อุ้มทอง 1 และพบการ สร้างเส้ดำ 35% หลังจากทำการปลูกเชื้อ 2 เดือน เมื่อปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension และ 5% เมื่อปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension สำหรับวิธีการทำแผลรอบตาอ้อยจากนั้นแช่ท่อน พันธุ์ใน spore suspension 24 ชั่วโมง พบการสร้างเส้ดำเฉพาะวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension เท่านั้น โดยพบต้นที่มีการสร้างเส้ดำ 20 % ในขณะที่การทำแผลท่อนพันธุ์ 5 แผล จากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ 30 นาที ใน spore suspension และเก็บในกล่องความชื้นเป็นเวลา 1 คืน สามารถทำให้อ้อยเกิดโรค 50% และ 20% เมื่อปลูกเชื้อด้วย teliospore และ sporidia suspension ตามลำดับ

อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พบการสร้างเส้ดำในวิธีการปลูกเชื้อโดยการทำแผลรอบตา อ้อย 5 แผลจากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบการ สร้างเส้ดำ 15 % และพบการสร้างเส้ดำ 10 % ในวิธีการฉีด sporidia suspension ส่วนวิธีการ ทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผลจากนั้นแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที และเก็บในกล่อง

ความชื้นเป็นเวลา 1 คีน ไม่พบการสร้างเส้นในทั้งวิธีการปลูกเชื้อด้วย teliospore และ sporidia suspension (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 เพอร์เซ็นต์การเป็นโรคเส้ดำในอ้อยทดสอบ 4 พันธุ์ เมื่อทำการปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension โดยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการปลูกเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเส้ดำ ^{1/}			
	K84-200	อู่ทอง 1	H59-3775	KPS94-13
แช่น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 24 ชม. (ชุดควบคุม)	-	-	-	-
ทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผลและ แช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 24 ชม.	-	10	20	15
ทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผลและ แช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที + moist chamber 1 คีน	-	5	50	-
ฉีด spore suspension 2 ml ใน อ้อยอายุ 2 สัปดาห์	-	30	35	-

หมายเหตุ ^{1/} เพอร์เซ็นต์การเกิดโรคเส้ดำหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน
- คือ ไม่พบการเกิดเส้ดำ

ตารางที่ 2 เปรอร์เซ็นต์การเป็นโรคเส้ด้าในอ้อยทดสอบ 4 พันธุ์ เมื่อทำการปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension โดยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการปลูกเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเส้ด้า ^{1/}			
	K84-200	อู่ทอง 1	H59-3775	KPS94-13
แช่น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 24 ชม. (ชุดควบคุม)	-	-	-	-
ทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผลและ แช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 24 ชม.	-	-	-	-
ทำแผลรอบตาอ้อย 5 แผลและ แช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension 30 นาที + moist chamber 1 คืน	10	25	20	-
ฉีด spore suspension 2 ml ใน อ้อยอายุ 2 สัปดาห์	-	15	5	10

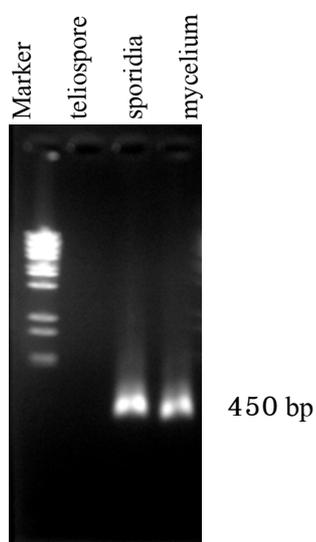
หมายเหตุ ^{1/} เปรอร์เซ็นต์การเกิดโรคเส้ด้าหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน

- คือ ไม่พบการเกิดเส้ด้า

2. การตรวจสอบการเกิดโรคแล้วด้วยเทคนิค PCR

2.1 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

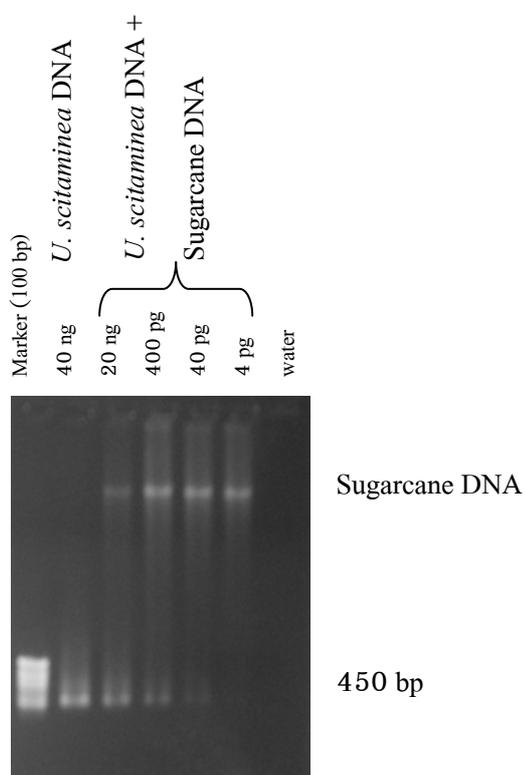
ผลของการตรวจสอบเชื้อ *U. scitaminea* ในระยะ teliospore, sporidia และเส้นใย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *bE4* และ *bE8* พบว่าสามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้จากดีเอ็นเอของเชื้อในระยะของ sporidia และเส้นใย แต่จะไม่พบในส่วนของ teliospore โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp จากการเจริญของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* ระยะ teliospore, sporidia และเส้นใย (mycelium) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ *bE4* และ *bE8*

2.2 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

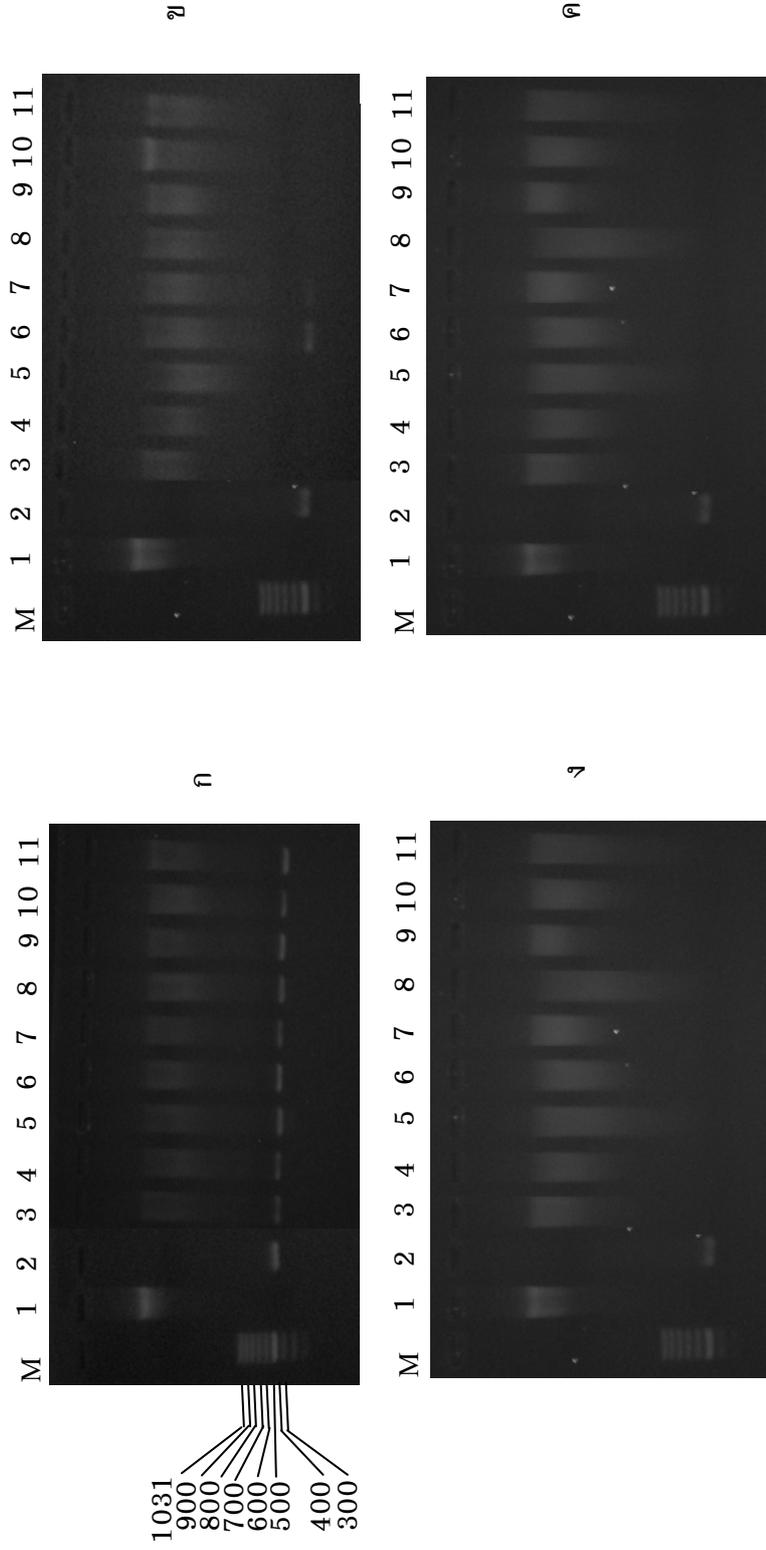
การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ที่มีตัวอย่างอ้อยผสมพบว่าเมื่อผสมดีเอ็นเอของอ้อยปกติกความเข้มข้น 70 ng กับดีเอ็นเอจาก sporidia ที่ระดับ 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของเชื้อเพียงอย่างเดียว 40 ng พบว่า สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้ที่ระดับดีเอ็นเอของเชื้อที่เข้มข้นน้อยที่สุดได้ที่ 40 pg (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR จากการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยผสมดีเอ็นเอของเชื้อราที่ความเข้มข้น 40 ng, 20 ng , 400 pg, 40 pg, 4 pg กับดีเอ็นเอของอ้อย 70 ng

2.3 การตรวจสอบการเกิดโรคแสด้าอ้อยด้วยเทคนิค PCR

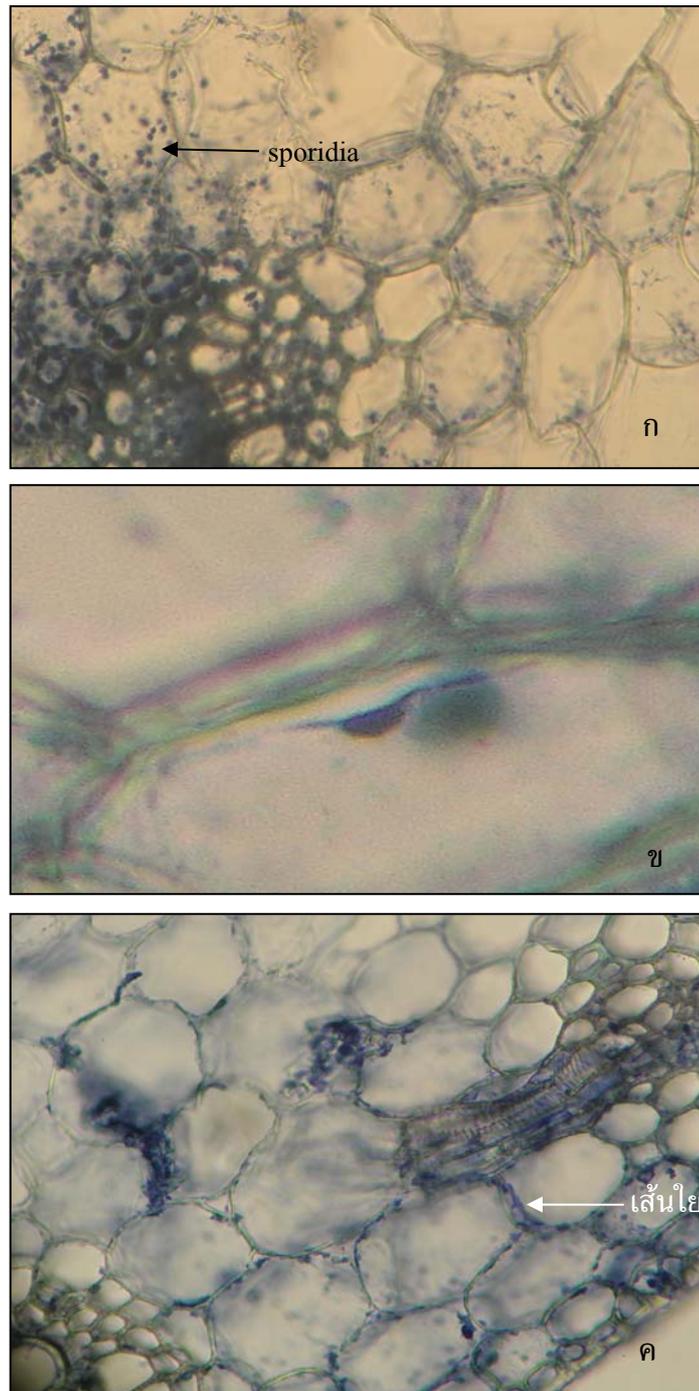
การตรวจสอบเชื้อ *U. scitaminea* ในต้นอ้อยทั้ง 4 พันธุ์ หลังทำการปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension พบว่าสามารถตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *U. scitaminea* ขนาด 450 bp เฉพาะระยะหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบ ตรวจพบ 3 ต้น จากจำนวนทดสอบ 3 ต้น และพบในอ้อยพันธุ์ อุทอง 1 จำนวน 1 ต้น บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อและบริเวณเหนือตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ แต่ไม่พบในอ้อยพันธุ์ K84-200 และ H59-3775 (ภาพที่ 7) ได้ทำการตรวจสอบการเกิดโรคของต้นที่ปลูกเชื้อพร้อมกันหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแสด้าในอ้อยที่ทดสอบ พันธุ์กำแพงแสน 94-13, อุทอง 1 และ H59-3775 เท่ากับ 10, 16 และ 3% ตามลำดับ และไม่พบการเกิดโรคในอ้อยพันธุ์ K84-200



ภาพที่ 7 ผลของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 (ก), อุทอง 1 (ข), H59-3775 (ค) และ K84-200 (ง) หลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder) lane 2 : sporidia เชื้อ *U.scitaminea* ; lane 3, 4, 5 : ต้นที่ 1 ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ; lane 6, 7, 8 ต้นที่ 2 ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ; lane 9, 10, 11 : ต้นที่ 3 ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ในทุกตำแหน่งและทุกต้นที่ทดสอบ (ก, lane 3-11) และพันธุ์อุทอง 1 ในตำแหน่งที่ 1 (ข, lane 6) และตำแหน่งที่ 2 (ข, lane 7)

3. การตรวจสอบการเกิดโรคเส้ด้าอ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ในต้นกล้าอ้อยโดยทำการ cross section และย้อมด้วยสี trypan blue พบว่าวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีในการย้อมติดสีเชื้อราที่เจริญอยู่ในลำต้นอ้อยภายหลังทำการปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension โดยสามารถย้อมติดเชื้อให้เห็นการเจริญของเชื้อภายในลำต้น สีย้อมจะติดส่วนการเจริญ sporidia และเส้นใย sporidia ที่ย้อมติดจะมีลักษณะกลมถึงกลมรี กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อของอ้อย หลังจากทำการฉีด sporidia suspension (ภาพที่ 8ก) เมื่อเชื้อมีการพัฒนาจะเห็นการสร้างเส้นใยของเชื้อ (ภาพที่ 8ข) เจริญในทั้งแบบ intercellular และ intracellular (ภาพที่ 8ค) ในอ้อยทดสอบทั้ง 4 พันธุ์ คือ K84-200, อุ่ทอง 1, H59-3775 และกำแพงแสน 94-13 สามารถตรวจพบเชื้อได้ในทุกส่วนและทุกระยะที่ทำการตรวจสอบ



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* ที่ตรวจพบในต้นกล้าอ้อย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อย้อมด้วยสี trypan blue โดยพบ sporidia ที่ย้อมติดสี ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 1 วัน (ก) sporidia พัฒนาเป็นเส้นใยหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน (ข) และเส้นใยของเชื้อที่เจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของอ้อย หลังทำการปลูกเชื้อ 28 วัน (ค)

4. การศึกษาเชื้อรา *U. scitaminea*

4.1 การเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุของโรค

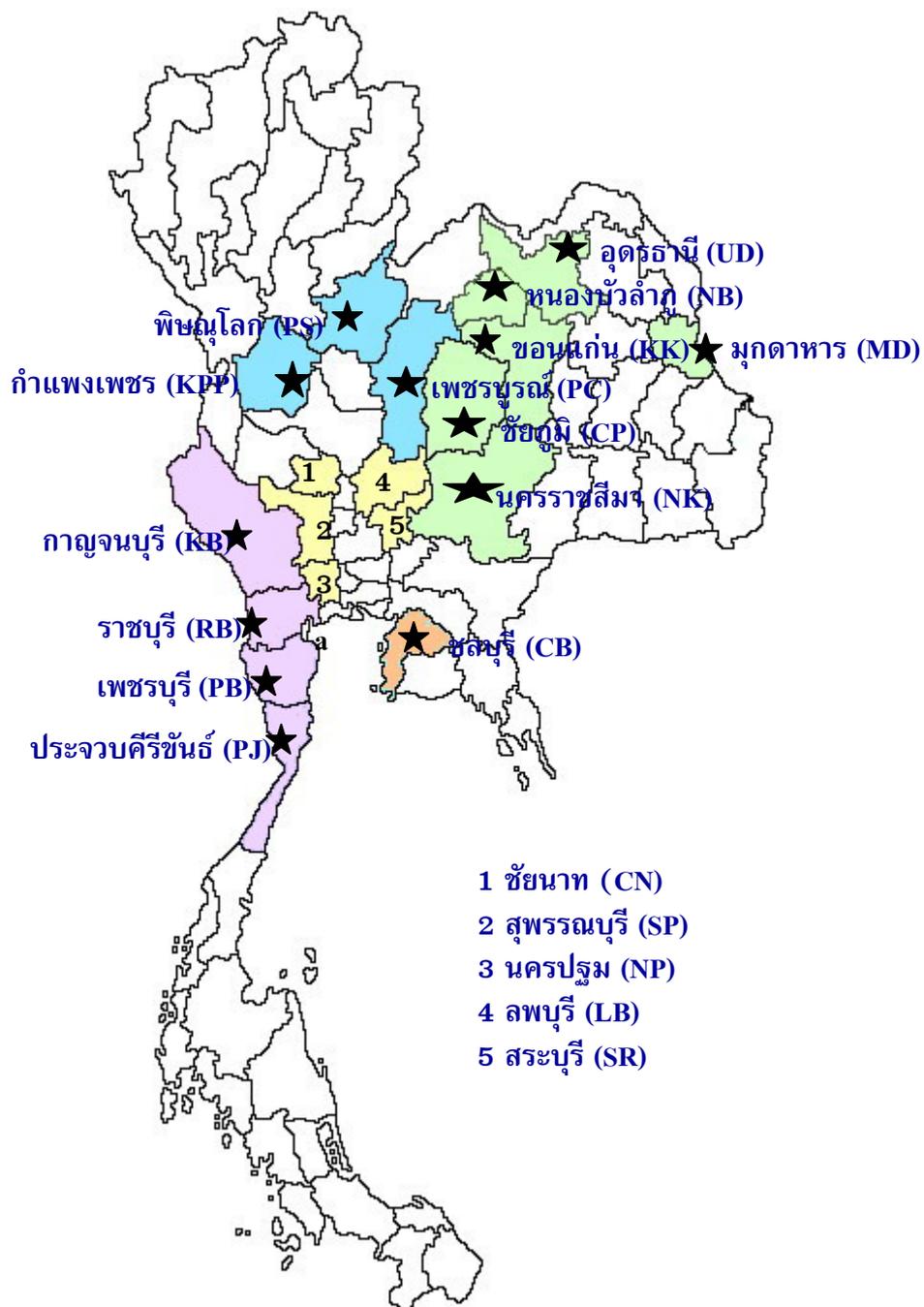
เก็บรวบรวมเชื้อรา *U. scitaminea* ในส่วนของ teliospore โดยตัดส่วนของโรคที่มีลักษณะเป็นเส้นสีดำในแปลงปลูกอ้อยพื้นที่ต่าง ๆ (ภาพที่ 9) ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาค ตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือได้ทั้งสิ้นจำนวน 43 ไอโซเลท (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* จากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทยที่นำมาใช้ในการศึกษา

หมายเลขไอโซเลท	แหล่งที่มา	รหัสไอโซเลท
1	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	KK-M1
2	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	KK-SS2
3	อ.มัญจาคีรี จ.ขอนแก่น	KK-MJ3
4	อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น	KK-KS4
5	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	KK-M5
6	อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น	KK-NP6
7	อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น	KK-NP7
8	กิ่ง อ.โนนศิลา จ.ขอนแก่น	KK-NS8
9	อ.หนองบัวลำภู จ.หนองบัวลำภู	NB-NB9
10	อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ	CP-KS10
11	อ. ไทรงาม จ. กำแพงเพชร	KPP-SN11
12	อ. เมือง จ. กำแพงเพชร	KPP-M12
13	อ.สรรคบุรี จ. ชัยนาท	CN-SB13
14	อ.บางระกำ จ. พิษณุโลก	PS-BR14
15	อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น	KK-CP15
16	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	KK-SS16
17	อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี	KB-TMK17

ตารางที่ 3 (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	แหล่งที่มา	รหัสไอโซเลท
18	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	KB-TM18
19	อ. พนมทวน จ.กาญจนบุรี	KB-PT19
20	อ. บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	KB-BP20
21	อ. หนองเรือ จ. กาญจนบุรี	KB-NR21
22	อ. เลาชวีญ จ. กาญจนบุรี	KB-LK22
23	อ. ห้วยกระเจา จ. กาญจนบุรี	KB-HK23
24	อ. เมือง จ. มุกดาหาร	MD-M24
25	อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี	SP-SP25
26	อ. โพธาราม จ. ราชบุรี	RB-PTR26
27	อ. หนองเรือ จ. ขอนแก่น	KK-NR27
28	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	SP-UT28
29	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	KB-TM29
30	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	NP-KPS30
31	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	NP-KPS31
32	อ. กุมภวาปี จ. อุดรธานี	UD-KP32
33	อ. ห้วยแถลง จ. นครราชสีมา	NR-HT33
34	อ. บ่อทราย จ. ชลบุรี	CB-BT34
35	อ. ศรีเทพ จ. เพชรบูรณ์	PC-ST35
36	อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี	SP-SPN36
37	อ. โคกตูม จ. ลพบุรี	LB-KT37
38	อ. พัฒนานิคม จ. ลพบุรี	LB-PT38
39	อ. พัฒนานิคม จ. ลพบุรี	LB-PT39
40	อ. วังม่วง จ. สระบุรี	SR-WM40
41	อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	PJ-HH41
42	อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี	PB-CA42
43	อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี	PB-CA43

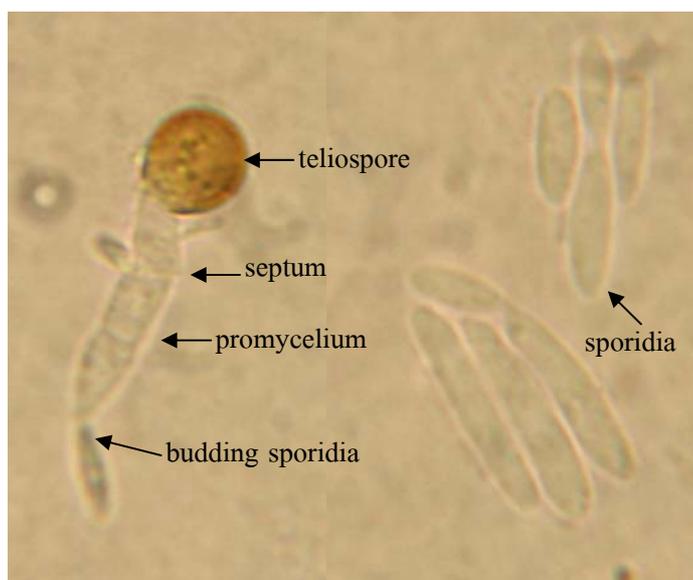


ภาพที่ 9 แหล่งที่มาของเชื้อ *Ustilago scitaminea* จากจังหวัดต่าง ๆ ที่มีการเก็บตัวอย่างอ้อย ที่แสดงอาการโรคแสดำ โดยสีน้ำเงิน = พื้นที่ภาคเหนือ สีเหลือง = พื้นที่ภาคกลาง สีเขียว = พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สีส้ม = พื้นที่ภาคตะวันออก สีชมพู = พื้นที่ภาคตะวันตก

4.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อรา *U. scitaminea*

4.2.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของ teliospore

การศึกษาลักษณะ teliospore ของเชื้อจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 43 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ลักษณะของ teliospore จากแต่ละแหล่งที่เก็บมีสีของสปอร์สีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม รูปร่างกลมหรือกลมรี ผิวขรุขระมีหนามแหลมที่ผิวของสปอร์โดยรอบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4) และมีค่าเฉลี่ยประมาณ 7.5 ไมโครเมตร สามารถนำมาวิเคราะห์และจัดกลุ่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยวิธีทางสถิติ สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งสิ้น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore เท่ากับ 7.81-8.02 ไมโครเมตร โดยมีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ NR-HT33, PS-BR14, PJ-HH41, CP-KS10 และ NP-KPS31 และกลุ่มที่ 2 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore เท่ากับ 6.35-7.40 ไมโครเมตร โดยเชื้อไอโซเลทที่เหลือทั้งหมด 38 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มนี้ (ตารางที่ 4) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA teliospore จะงอกส่วนที่เรียกว่า promycelium มี 4 septum แบ่งเซลล์โดยการ budding ให้ sporidia ที่มีลักษณะเป็นท่อนยาวรี ไม่มีสี มีความกว้างประมาณ 2-3 ไมโครเมตร โดยแต่ละสปอร์จะมีความยาวแตกต่างกันไป (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การงอกของ teliospore เกิดเป็น promycelium และแตกหน่อเป็น sporidia

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่มของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย
ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore

เลขที่ ไอ โซเลข	ไอโซเลข	เส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore (μm) ^{1/}	กลุ่ม ^{2/}
31	NP-KPS31	8.02 a	1
10	CP-KS10	7.83 a	1
41	PJ-HH41	7.83 a	1
14	PS-BR14	7.83 a	1
33	NK-HT33	7.81 a	1
37	LB-KT37	7.40 b	2
23	KB-HK23	7.37 bc	2
1	KK-M1	7.34 bc	2
19	KB-PT19	7.28 bcd	2
11	KP-SK11	7.25 bcde	2
15	KK-SP15	7.25 bcde	2
42	PB-CA42	7.21 bcdef	2
18	KB-TM18	7.20 bcdef	2
17	KB-TMK17	7.20 bcdef	2
7	KK-NP7	7.20 bcdef	2
39	LB-PT39	7.19 bcdefg	2
4	KK-KS4	7.18 bcdefg	2
21	KB-NR21	7.18 bcdefg	2
22	KB-LK22	7.16 bcdefg	2
43	PB-CA43	7.16 bcdefg	2
2	KK-SC2	7.13 cdefgh	2
38	LB-PT38	7.05 defgh	2
36	SP-SPN36	7.04 defghi	2
6	KK-NP6	7.03 defghi	2
25	SP-SP25	6.99 efghi	2

ตารางที่ 4 (ต่อ)

เลขที่ไอโซเลท	ไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore (μm) ^{1/}	กลุ่ม ^{2/}
27	KK-NR27	6.98 fghij	2
32	UD-KP32	6.92 ghij	2
34	CB-BT34	6.88 hijk	2
40	SR-WM40	6.79 ijkl	2
24	MD-M24	6.73 jklm	2
26	RB-PTR26	6.64 klmn	2
20	KB-BP20	6.62 lmn	2
8	KK-NS8	6.62 lmn	2
5	KK-M5	6.55 lmno	2
35	PC-ST35	6.52 mno	2
13	CN-SB13	6.51 mno	2
9	NB-NB9	6.51 mno	2
30	NP-KPS30	6.48 mno	2
29	KB-TM29	6.48 mno	2
3	KK-MJ3	6.48 mno	2
28	SP-JT28	6.40 no	2
12	KP-M12	6.35 o	2
16	KK-SS16	6.35 o	2

หมายเหตุ CV. = 11.29 %

^{1/} ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางจาก teliospore จำนวน 100 สปอร์

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ
นัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี DMRT

4.2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะโคโลนี

หลังจากทำการแยกโดยวิธีการ spread plate บนอาหาร PDA ให้ teliospore งาม เป็นโคโลนี และย้ายโคโลนีเดี่ยว ๆ หลังจากสปอร์งอกเป็นเวลา 3 วัน ลงบนอาหาร PDA พบว่าโคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลม สีขาวฟู เมื่อโคโลนีเจริญมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ สีของโคโลนีจะเปลี่ยน โดยเริ่มมีสีเข้มขึ้นเป็นสีขาวครีมถึงสีน้ำตาลอ่อน ตรงกลางโคโลนีมีลักษณะนูน สีครีม เส้นใยยวบตัวลง ไม่ฟู เส้นใยสานกันแน่น (ภาพที่ 11) เมื่อนำลักษณะของโคโลนี มาแยกจัดกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งลักษณะของโคโลนีได้เป็น 3 แบบคือ แบบที่ 1 โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยไม่ฟู ขอบโคโลนีมีความชัดเจน (ภาพที่ 12ก) แบบที่ 2 โคโลนีมีสีน้ำตาลครีม มีส่วนของเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อยบนโคโลนี และขอบของโคโลนีไม่ชัดเจน (ภาพที่ 12ข) และแบบที่ 3 โคโลนีมีสีน้ำตาล ขอบโคโลนีไม่กลมและมีขอบชัดเจน (ภาพที่ 12ค) โดยพบว่า โคโลนีแบบที่ 1 มี 26 ไอโซเลท ได้แก่ KK-M1, KK-M2, KK-MJ3, KK-NP6, KK-NP7, KK-NS8, KK-CP15, KK-SS16, MD-M24, KK-NR27, UD-KP32, NK-HT33, KPP-SN11, KPP-M12, CB-BT34, CN-SB13, SP-SP25, SP-UT28, NP-KPS30, NP-KPS31, KB-TM18, KB-NR21, KB-LK22, KB-HK23, RB-PTR26 และ KB-TM29 โคโลนีแบบที่ 2 พบจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ KK-KS4, KK-M5, PS-BR14, PB-ST35, SP-SPN36, LB-KT37, LB-PT38, LB-PT39, SR-WM40, KB-TMK17, KB-PT19, KB-BP20, PJ-HH41, PB-CA42 และ PB-CA43 โคโลนีแบบที่ 3 พบจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ NB-NB9 และ CP-KS10 เมื่อนำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อที่อายุ 28 วัน (ภาพที่ 13, 14 และภาพที่ 15) มาจัดกลุ่ม สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งสิ้น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 4.71-7.11 เซนติเมตร โดยเชื้อเกือบทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 42 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 มีอยู่ 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CP-KS10 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 4.12 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย
ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี เมื่อเชื้อมีอายุ 28 วัน บนอาหาร Potato Dextrose
Agar

เลขที่ไอโซเลท	ไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.) ^{1/}	กลุ่ม ^{2/}
36	SP-SPN36	7.11 a	1
42	PB-CA42	7.05 a	1
41	PJ-HH41	6.89 ab	1
39	LB-PT39	6.89 ab	1
17	KB-TMK17	6.83 ab	1
4	KK-KS4	6.64 bc	1
14	PS-BR14	6.63 bc	1
37	LB-KT37	6.44 cd	1
2	KK-SS2	6.40 cde	1
35	PC-ST35	6.38 cdef	1
43	PB-CA43	6.35 cdef	1
38	LB-PT38	6.28 cdef	1
28	SP-UT28	6.28 cdef	1
5	KK-M5	6.23 def	1
6	KK-NP6	6.19 def	1
1	KK-M1	6.18 defg	1
8	KK-NS8	6.07 defg	1
34	CB-BT34	6.07 efg	1
24	MD-M24	6.04 fg	1
40	SR-WM40	6.01 gh	1
32	UD-KP32	5.82 gh	1
27	KK-NR27	5.81 gh	1
12	KP-M12	5.80 gh	1
3	KK-MJ3	5.75 gh	1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เลขที่ไอโซเลท	ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ^{1/}	กลุ่ม ^{2/}
26	RB-PTR26	5.75 hi	1
19	KB-PT19	5.63 hi	1
7	KK-NP7	5.60 hij	1
20	KB-BP20	5.60 hij	1
28	SP-UT28	5.52 hijk	1
30	K NP-PS30	5.50 hijk	1
15	KK-SP15	5.50 hijk	1
11	KP-SN11	5.47 hijkl	1
22	KB-LK22	5.37 ijklm	1
29	KB-TM29	5.26 jklm	1
13	CN-SB13	5.24 jklm	1
33	NK -HT33	5.22 klm	1
18	KB-TM18	5.22 klm	1
31	KP-KPS31	5.11 lm	1
9	NB-NB9	5.06 mn	1
16	KK-SS16	4.75 no	1
25	SP-SP25	4.75 no	1
21	KB-NR21	4.71o	1
10	CP-KS10	4.12 p	2

หมายเหตุ CV. = 6.01 %

^{1/} ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี จากจำนวน 10 โคโลนี

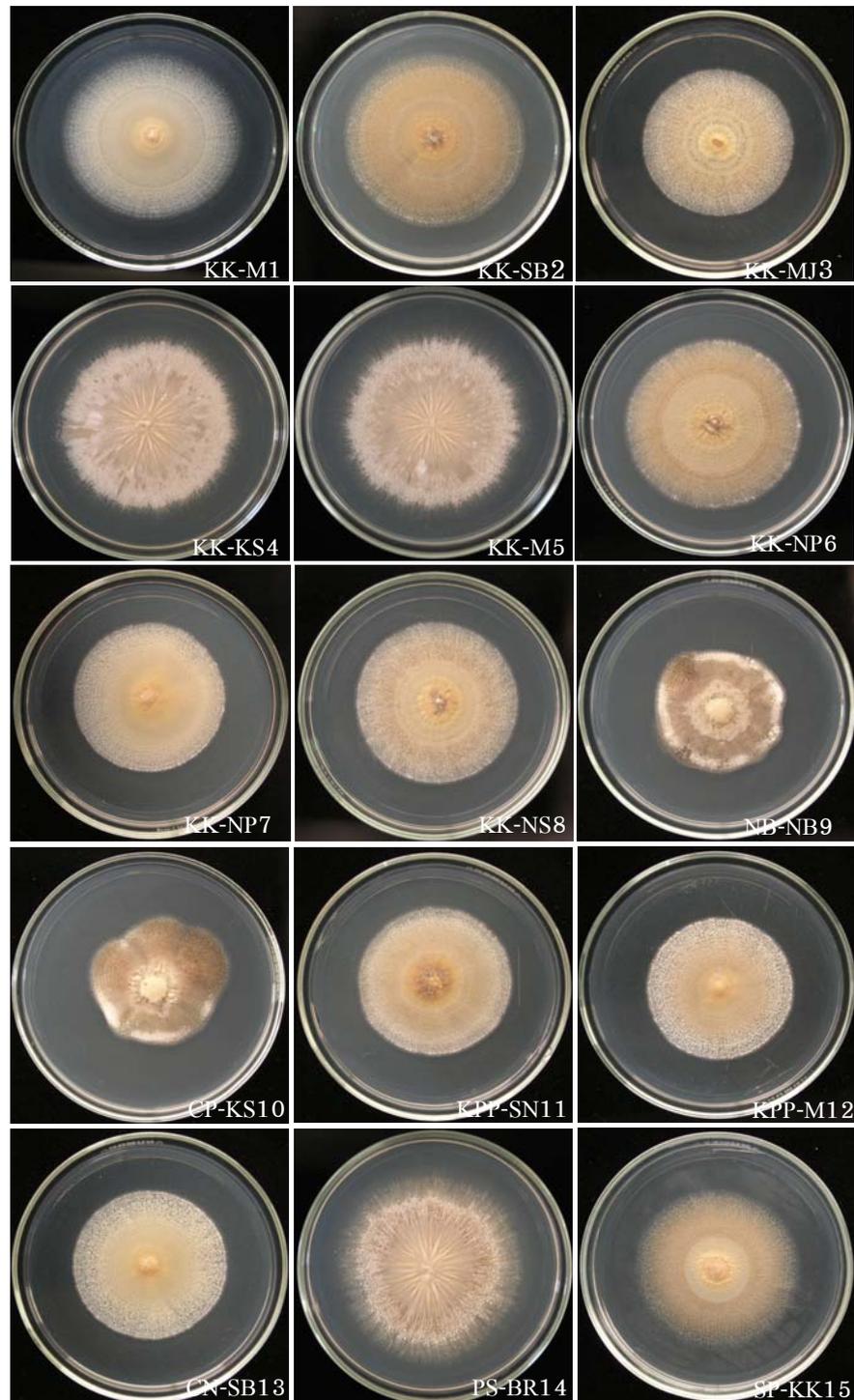
^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี DMRT



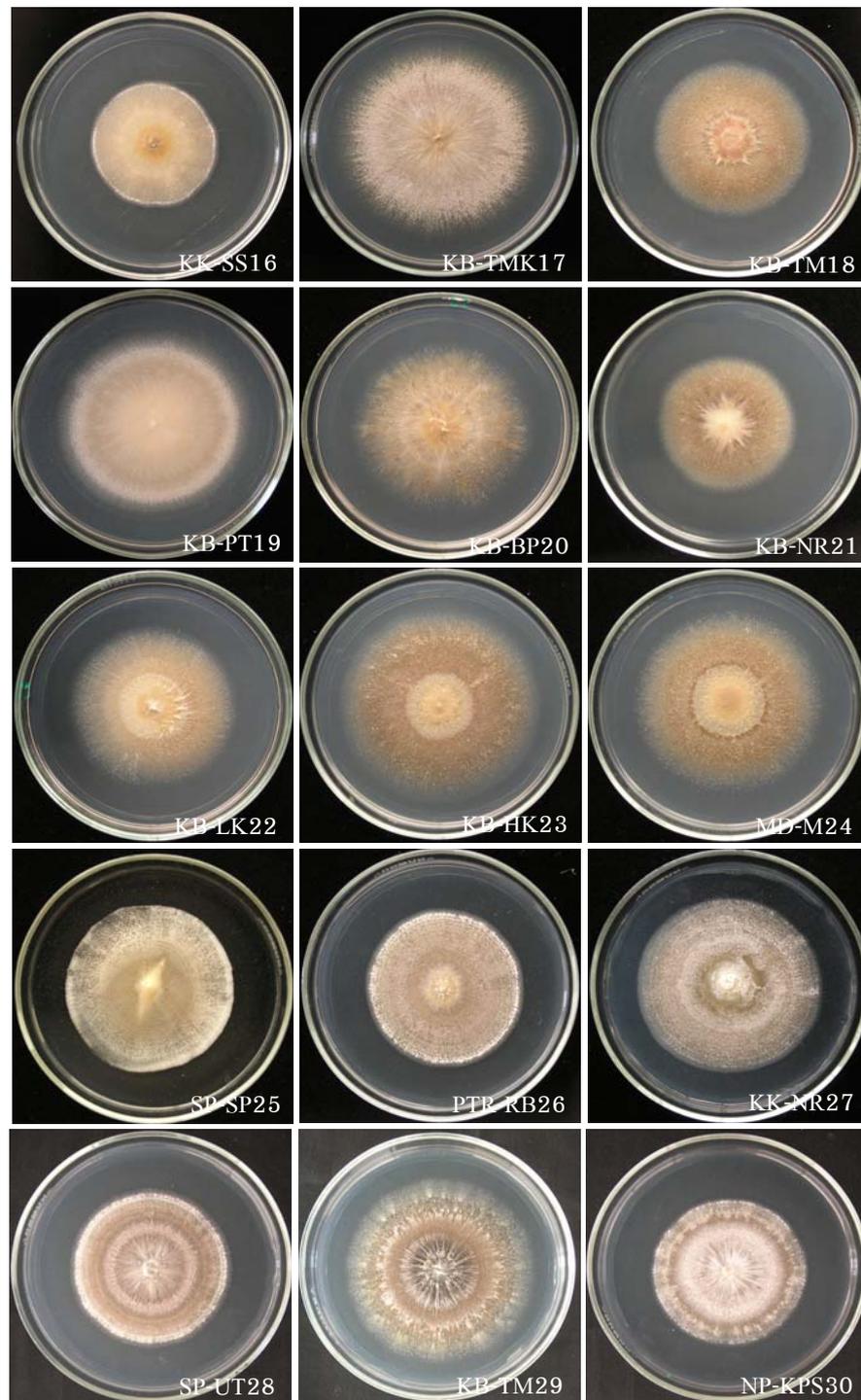
ภาพที่ 11 ลักษณะสีของโคโลนีของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* บนอาหาร Potato Dextrose Agar เมื่อเชื้อ มีอายุ 3 วัน (ก) 7 วัน (ข) 14 วัน (ค) และ 21 วัน (ง)



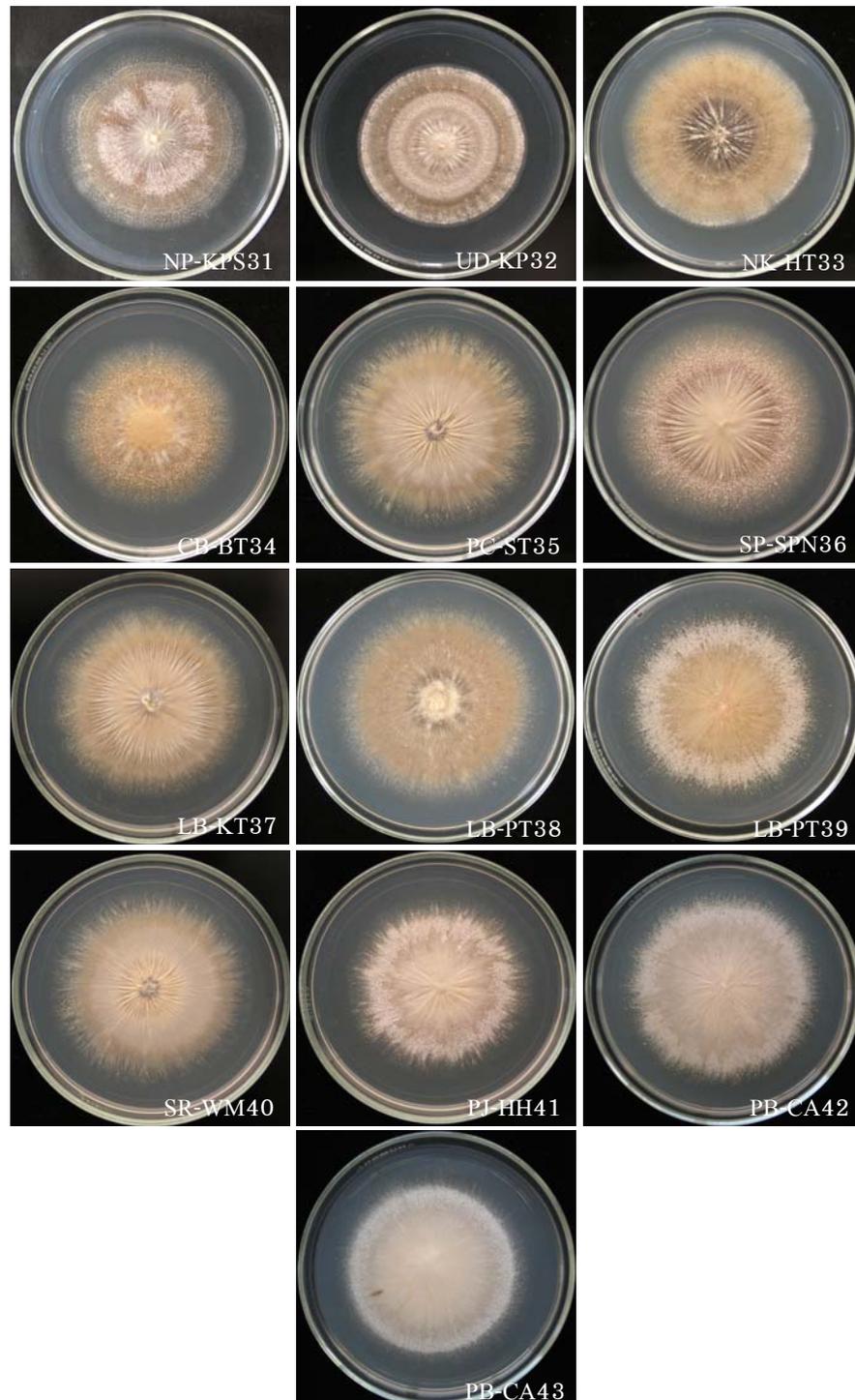
ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* 3 แบบ ที่นำมาใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อ แบบที่ 1 (ก) แบบที่ 2 (ข) และแบบที่ 3 (ค)



ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนีของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* บนอาหาร Potato Dextrose Agar ไอโซเลท 1-15 เมื่อเชื้อมีอายุ 28 วัน



ภาพที่ 14 ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนีของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* บนอาหาร Potato Dextrose Agar ไอโซเลท 16-30 เมื่อเชื้อมีอายุ 28 วัน



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนีของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* บนอาหาร Potato Dextrose Agar ไอโซเลท 31-43 เมื่อเชื้อมีอายุ 28 วัน

4.3 การจัดกลุ่มของเชื้อรา *U. scitaminea* ด้วยเทคนิค RAPD และ electrophoresis

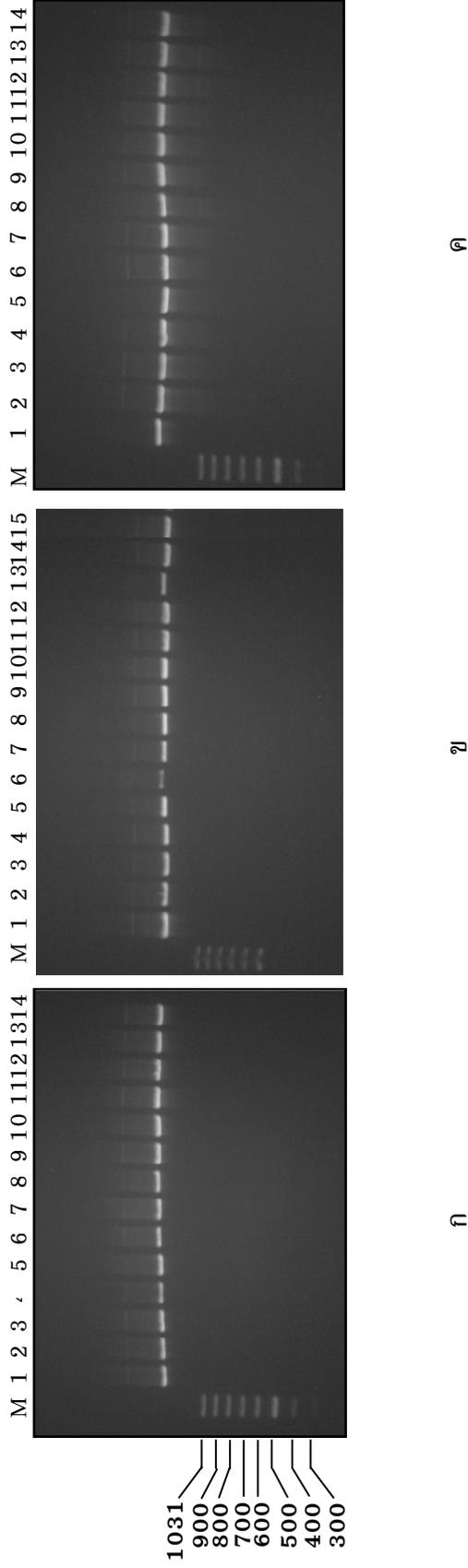
การศึกษากการจัดกลุ่มเชื้อรา *U. scitaminea* ไอโซเลตต่าง ๆ จำนวน 43 ไอโซเลต จากแหล่งปลูกในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ VNTR และ ITS ตรวจสอบอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลจากปฏิกิริยาไพรเมอร์ VNTR และ ITS ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ VNTR ให้จำนวนแถบ DNA ไม่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต (ภาพที่ 16) ไพรเมอร์ ITS ให้ผลจากปฏิกิริยาเป็น 3 แบบ คือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ, พบ 1 แถบดีเอ็นเอ และ 2 แถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 17) โดยไอโซเลตที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ มี 16 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลต KK-MJ3, KK-NS8, NB-NB9, CP-KS10, PS-BR14, KB-PT19, KB-NR21, KB-HK23, MD-M24, RB-PTR26, UD-KP32, CB-BT34, LB-PT38, LB-PT39, PB-CA42 และ PB-CA43 ไอโซเลตที่พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มี 13 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลต KK-M1, KK-KS4, KK-NP7, KPP-SN11, KPP-M12, KB-BP20, KB-LK22, SP-SP25, SP-UT28, KB-TM29, NP-KPS30, NP-KPS31 และ SP-SPN36 และไอโซเลตที่พบจำนวนแถบดีเอ็นเอ 2 แถบดีเอ็นเอ มี 14 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลต KK-SS2, KK-M5, KK-NP6, CN-SB13, KK-CP15, KK-SS16, KB-TMK17, KB-TM18, KK-NR27, NK-HT33, PC-ST35, LB-KT37, SR-WM40 และ PJ-HH41 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 6 การศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* สาเหตุโรคเส้ดำอ้อย ในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทยจำนวน 43 ไอโซเลท

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	การจัดกลุ่ม ขนาด teliospore (μm)	การจัดกลุ่มตาม ลักษณะโคโลนี		จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ RAPD (ITS)
			ขนาด	ลักษณะ	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	KK-M1	2	1	1	1
	KK-SS2	2	1	1	2
	KK-MJ3	2	1	1	0
	KK-KS4	2	1	2	1
	KK-M5	2	1	2	2
	KK-NP6	2	1	1	2
	KK-NP7	2	1	1	1
	KK-NS8	2	1	1	0
	NB-NB9	2	1	3	0
	CP-KS10	1	2	3	0
	KK-CP15	2	1	1	2
	KK-SS16	2	1	1	2
	MD-M24	2	1	1	0
	KK-NR27	2	1	1	2
	UD-KP32	2	1	1	0
	NK-HT33	1	1	1	2
	ภาคเหนือ	KPP-SN11	2	1	1
KPP-M12		2	1	1	1
PS-BR14		1	1	2	0
PB-ST35		2	1	2	2
ภาคตะวันออก	CB-BT34	2	1	1	0

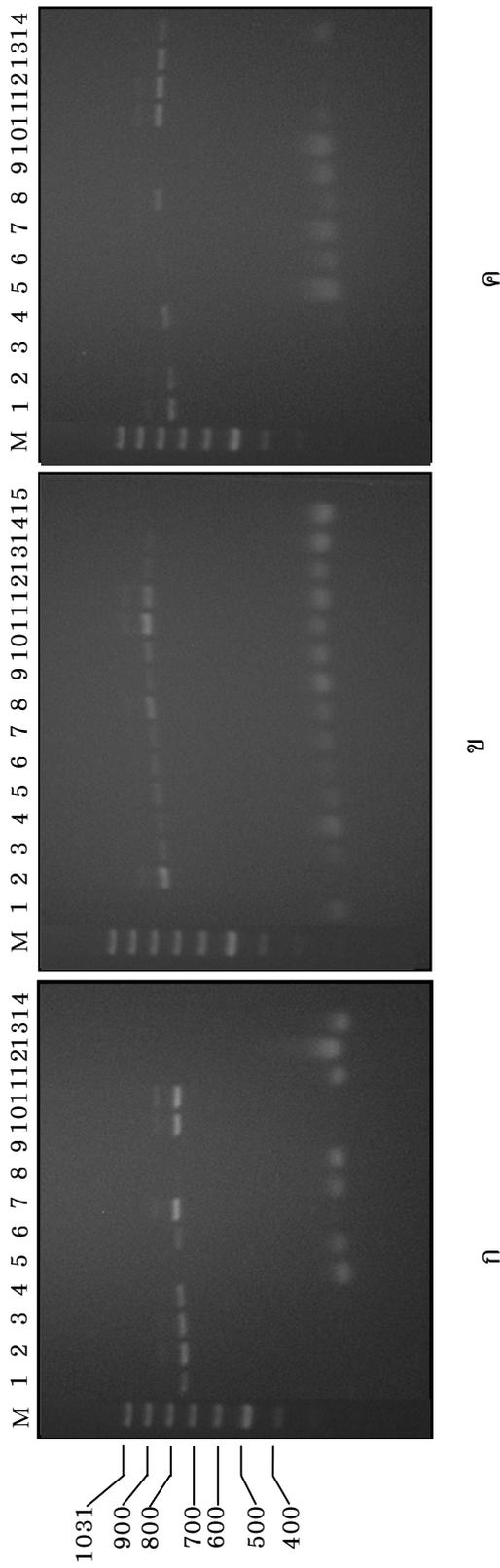
ตารางที่ 6 (ต่อ)

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	การจัดกลุ่ม ขนาด teliospore (μm)	การจัดกลุ่มตาม ลักษณะโคโลนี		จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ RAPD (ITS)
			ขนาด	ลักษณะ	
ภาคกลาง	CN-SB13	2	1	1	2
	SP-SP25	2	1	1	1
	SP-UT28	2	1	1	1
	NP-KPS30	2	1	1	1
	NP-KPS31	1	1	1	1
	SP-SPN36	2	1	2	1
	LB-KT37	2	1	2	2
	LB-PT38	2	1	2	0
	LB-PT39	2	1	2	0
	SR-WM40	2	1	2	2
ภาคตะวันตก	KB-TMK17	2	1	2	2
	KB-TM18	2	1	1	2
	KB-PT19	2	1	2	0
	KB-BP20	2	1	2	1
	KB-NR21	2	1	1	0
	KB-LK22	2	1	1	1
	KB-HK23	2	1	1	0
	RB-PTR26	2	1	1	0
	KB-TM29	2	1	1	1
	PJ-HH41	1	1	2	2
	PB-CA42	2	1	2	0
	PB-CA43	2	1	2	0



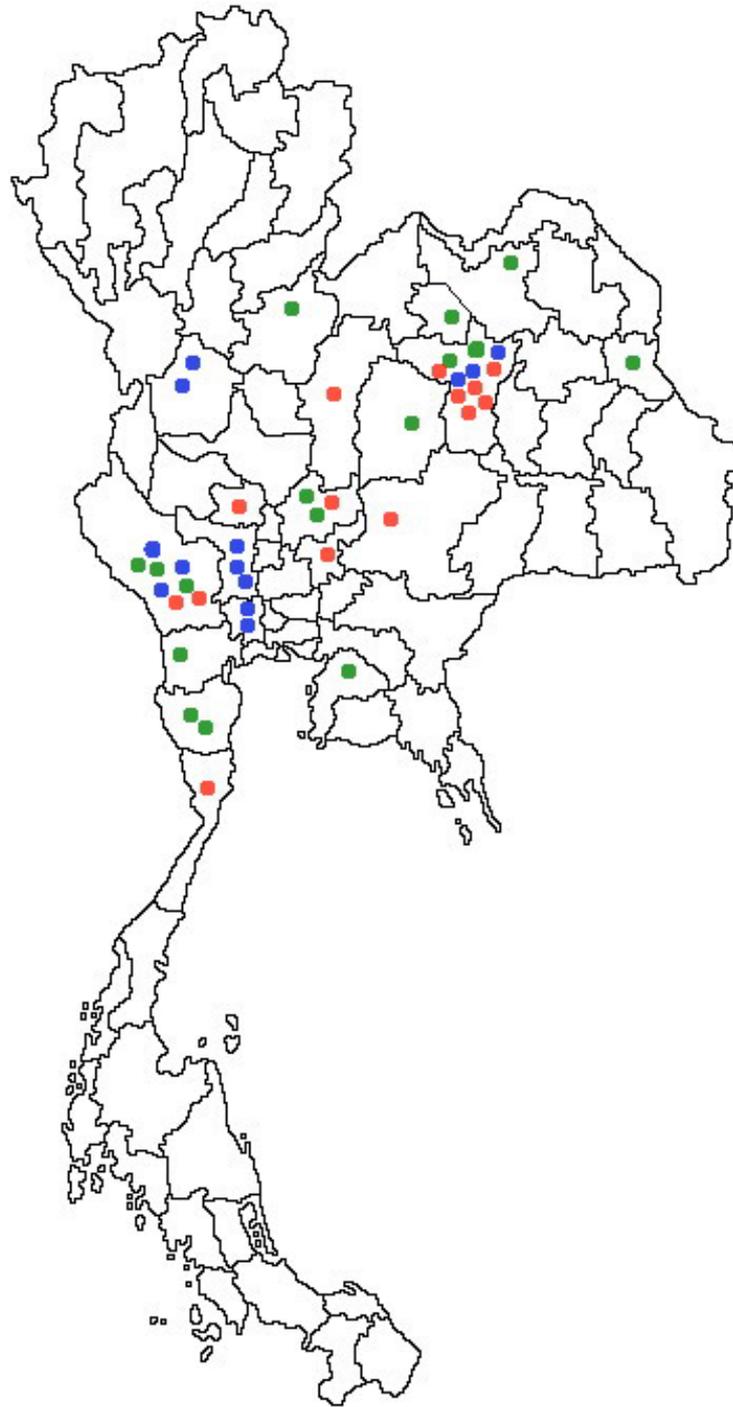
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ustilago scitaminea* จากไฟรเมอร์ variable number of tandem repeats (VNTR)

- ก. รหัสสายพันธุ์เชื้อ lane 2-14 = KK-M1; KK-M5; KK-SS2; KK-SS16; KK-MJ3; KK-KS4; KK-NP6; KK-NP7; KK-NS8; KK-CP15; KK-NR27; NB-NB9; CP-KS10; MD-M24
- ข. รหัสสายพันธุ์เชื้อ Lane 2-15 = UD- KP32; NK-HT33; NP-KPS30; NP-KPS31; SP-UT28; SP-SP25; SP-SPN36; LB-KT37; LB-PT38; LB-PT39; SR-WM40; CN-SB13; KPP-SN11; KPP-M12; PS-BR14
- ค. รหัสสายพันธุ์เชื้อ lane 2-14 = KB-TMK17; KB-TM18; KB-PT19; KB-BP20; KB-NR21; KB-LK22; KB-HK23; KB-TM29; RB-PTR26; CB-BS34; PB-ST35; PJ-HH41; PB-CA42; PB-CA43; M1 = Marker (100 bp ladder)



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ustilago scitaminea* จากไฟรเมอร์ internal transcribed spacer (ITS)

- ก. รหัสสายพันธุ์เชื้อ lane 2-14 = KK-M1; KK-M5; KK-SS2; KK-SS16; KK-MJ3; KK-KS4; KK-NP6; KK-NP7; KK-NS8; KK-CP15; KK-NR27; NB-NB9; CP-KS10; MD-M24
- ข. รหัสสายพันธุ์เชื้อ Lane 2-15 = UD- KP32; NK-HT33; NP-KPS30; NP-KPS31; SP-UT28; SP-SP25; SP-SPN36; LB-KT37; LB-PT38; LB-PT39; SR-WM40; CN-SB13; KPP-SN11; KPP-M12; PS-BR14
- ค. รหัสสายพันธุ์เชื้อ lane 2-14 = KB-TMK17; KB-TM18; KB-PT19; KB-BP20; KB-NR21; KB-LK22; KB-HK23; KB-TM29; RB-PTR26; CB-BS34; PB-ST35; PJ-HH41; PB-CA42; PB-CA43; M1 = Marker (100 bp ladder)



ภาพที่ 18 ลักษณะการกระจายตัวของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่จัดกลุ่มได้จากการทำ RAPD แถบดีเอ็นเอของเชื้อ เมื่อใช้ไพรเมอร์ internal transcribed spacer (ITS) โดย สีเขียวคือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ สีส้มพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ และสีแดง พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ