

การก่อโรคของเชื้อราที่สัมพันธ์กับโรคเน่ามันสำปะหลังและความผันแปร
ทางพันธุกรรมของเชื้อรา

**Pathogenicity of Cassava Rot Associated-Fungi and
Genetic Variation of Fungi**

ณัฐติยา พงษ์สุทัศน์^{1/} นภาพร พันธุ์กมลศิลป์^{2/} ภาณุวัฒน์ มุลจันทร์^{3/} สุวลักษณ์ อะมะวัลย์^{3/}
วรรณวิไล อินทนู^{1/} จินตนา อันอาดมิ่งงาม^{1/*}

Nuttiya Phongsuthat^{1/} Napaporn Phankamolsil^{2/} Phanuwat Moonjuntha^{3/}

Suwaluk Amawan^{3/} Wanwilai Intanoo^{1/} Jintana Unartngam^{1/*}

Received 23 Feb .2022/Revised 14 Jun. 2022/Accepted 4 Jul. 2022

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the important economic crops of Thailand. The root rot, tuber rot and stem rot diseases caused by fungal pathogens are the main problems of cassava production. The purposes of this research were to study the pathogenicity of rot diseases fungi and to evaluate their genetic variability. Cassava diseases survey was conducted, infected roots, tubers and stems were collected. Soils around diseased plants were sampled at 3 depth levels i.e. 0-20, 20-40 and 40-60 centimeters. Morphological characteristics-based identification was done and pathogenicity test was observed in Rayong 9 variety by inoculating with 12 isolates of *Fusarium* spp., *Pythium* spp., and *Neoscytalidium* sp. Results revealed that *Fusarium* spp. and *Neoscytalidium* sp. were related to disease occurrence on Rayong 9 variety after 5 months of inoculation. When the isolates of *Fusarium* spp. and *Neoscytalidium* sp. were analysed at ITS rDNA region and nucleotide sequences of *RPB2* and *Tef -10X* genes for *Fusarium* species identification, results indicated that the isolates were identified as *N. dimidiatum*, *F. incarnatum* and *F. solani*. Moreover, the genetic variability was observed by ISSR markers in *N. dimidiatum* (20 isolates), *F. incarnatum* (16 isolates), and *F. solani* (13 isolates). Results showed that there were variations both within fungal population and among populations from different cassava fields.

Keywords: cassava, root rot, tuber rot, stem rot, ISSR

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140

^{2/} ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{2/} Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140

^{3/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 320 ต. ห้วยโป่ง อ. เมือง จ. ระยอง 21150

^{3/} Rayong Field Crops Research Center 320 Huaipong, Muang, Rayong 21150

*Corresponding author : agrjne@ku.ac.th

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โรครากเน่า หัวเน่า และลำต้นเน่า เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราและเป็นปัญหาหลักต่อการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการก่อโรคเน่าของเชื้อราและประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีอาการรากเน่า หัวเน่า ลำต้นเน่า และเก็บดินบริเวณที่มีการเพาะปลูกมันสำปะหลังที่เป็นโรคที่ระดับความลึก 3 ระดับ ได้แก่ 0-20, 20-40 และ 40-60 ซม. จำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบการก่อโรคในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ด้วยเชื้อราสกุล *Fusarium* spp., *Pythium* spp. และ *Neoscytalidium* sp. จำนวน 12 ไอโซเลท พบว่าเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *Neoscytalidium* sp. มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคกับมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 หลังการปลูกเชื้อ 5 เดือน เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา ทั้ง 2 สกุลนี้ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RPB2 และ Tef-1 α สำหรับการจำแนกเชื้อรา *Fusarium* species โดยจำแนกเป็นเชื้อรา *N. dimidiatum*, *F. incarnatum* และ *F. solani* สำหรับการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่า เชื้อรา *N. dimidiatum* (20 ไอโซเลท) *F. incarnatum* (16 ไอโซเลท) และ *F. solani* (13 ไอโซเลท) มีความผันแปรทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากรของเชื้อราจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังแหล่งต่าง ๆ

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง, รากเน่า, หัวเน่า, ลำต้นเน่า, ISSR

บทนำ

มันสำปะหลัง เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและเป็นแหล่งวัตถุดิบทางด้านอุตสาหกรรมที่สำคัญในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มันเส้น และมันอัดเม็ด ทำให้การปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยมีความต้องการทางด้านการตลาดเพิ่มมากขึ้น แต่สถานการณ์การผลิตมันสำปะหลังของไทยในปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณพื้นที่เก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้นจาก 8.66 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2562 เป็น 8.91 ล้านไร่ (พ.ศ. 2563) แต่กลับพบว่า ส่วนต่างของผลผลิตมันสำปะหลังที่ได้นั้นลดลง 3 % (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) เนื่องจากพื้นที่ที่มีการปลูกพืชชนิดเดียวเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้ดินเกิดการสูญเสียโครงสร้าง ปริมาณธาตุอาหารพืชลดลง และเป็นแหล่งสะสมเชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างต่อเนื่อง โรคของมันสำปะหลังในประเทศไทยที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ โรคพุ่มแจ้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบไหม้ และโรคใบด่าง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต รวมถึงโรคหัวเน่า รากเน่า และลำต้นเน่ามันสำปะหลัง โดยเฉพาะในแหล่งพื้นที่ที่ดินมีการระบายน้ำได้ยาก และบริเวณที่ฝนตกชุกเป็นประจำ โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะต้นกล้าและระยะที่ลงหัวแล้ว สามารถเกิดจากเชื้อราสาเหตุหลากหลายชนิด ในต่างประเทศมีรายงานเชื้อราสาเหตุโรค ได้แก่ *Phytophthora nicotianae* *P. cryptogea* *P. drechleri* และ *P. erythrosetpica* (Boas et al., 2017) *Lasiodiplodia theobromae* *Nattrassia mangiferae* และ *Fusarium* spp. เป็นเชื้อที่สำคัญในประเทศแอฟริกา (Msikita et al., 1998; Onyeka et al., 2004)

สำหรับประเทศไทย ที่ผ่านมามีรายงานว่าโรคหัวเน่ารากเน่า และลำต้นเน่ามันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ฐิตินา, 2542; ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2554) และในปัจจุบัน พบการระบาดของโรคนี้อย่างรุนแรงในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพบ

เชื้อราสาเหตุคือ *P. parasitica* (อมรรัตน์, 2556) *P. meadii* (ชาติชาย, 2557) *P. melonis* (Charaensatapon et al., 2014) ที่ จ.จันทบุรี และนครศรีธรรมราช พบเชื้อรา *Neoscytalidium hyalium* (*N. dimidiatum*) ที่ จ.นครราชสีมา ระยอง และตาก (พรปวีณ์ และคณะ, 2562) ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช วิวัฒนาการของเชื้อราสาเหตุโรค และการจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ มากขึ้น ในปี พ.ศ. 2561 พรปวีณ์ และคณะ (2561) ได้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และทดสอบการก่อโรคเน่าแห้งและเน่าดำของมันสำปะหลังในพื้นที่ จ.ระยอง และตาก โดยประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* ด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราจากแหล่งต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า มีการเคลื่อนย้ายของเชื้อราจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (genotype flow) จากการนำท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกยังแหล่งปลูกต่าง ๆ ซึ่งสามารถตรวจสอบและติดตามได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเชื้อราก่อโรคที่สัมพันธ์กับโรคเน่ามันสำปะหลัง และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย ด้วยเครื่องหมาย ISSR (inter simple sequence repeat) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการโรคพืช และการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรค โดยสังเกตจากลักษณะอาการ

ที่ผิดปกติ ได้แก่ ต้นเหี่ยว ลำต้นบวมแตก ยืนต้นตาย และลักษณะอาการที่ผิดปกติบริเวณโคนต้นใต้ดิน มีอาการเน่า และเก็บดินบริเวณที่เป็นโรค ที่ระดับความลึก 0-20, 20-40 และ 40-60 ซม. ด้วยสว่านเจาะดิน (auger) จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญ 19 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา กาญจนบุรี ชัยภูมิ กำแพงเพชร สระแก้ว ระยอง นครสวรรค์ ลพบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี เลย อุดรธานี อุบลราชธานี ขอนแก่น อุทัยธานี พิษณุโลก กาฬสินธุ์ ชัยนาท และราชบุรี บันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรคที่พบในแปลง

1.2 การแยกเชื้อรา (Fungal isolation)

แยกเชื้อราจากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการโรคด้วยวิธี (tissue transplanting) โดยตัดบริเวณชิ้นมันสำปะหลังให้มีส่วนที่แสดงอาการกับส่วนปกติอย่างละครึ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปแช่ใน 10% clorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชแช่ให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืน เชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชม. สลับกับความมืด 12 ชม. เป็นเวลา 3-7 วัน

สำหรับการแยกเชื้อราจากดินรอบ ๆ รากและดินที่ระดับความลึกต่าง ๆ จะใช้วิธี dilution plate โดยนำดินตัวอย่างละ 10 ก. ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. นำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเจือจางเป็น 10^{-1} - 10^{-4} เท่า นำดินแขวนลอยในน้ำที่เจือจางแล้วเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-7 วัน ขณะที่การแยกเชื้อราในสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จะใช้เมล็ดแตงกวาเป็นเหยื่อล่อ (baiting technique) โดยนำเมล็ดแตงกวา 10 เมล็ดวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของดินที่บดละเอียด 1 ก. ในน้ำ 10 มล. นำจานไปวางในที่ที่มีแสง 3-7 วัน จากนั้นนำเมล็ดแตงกวามาล้างด้วยน้ำกลั่นและแช่ให้แห้ง แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) 4 จุด/จานเลี้ยงเชื้อ

ในที่ที่มีแสงสลัวมืด 12 ซม. ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญจึงย้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมสาร BNPR (ampicillin)

1.3 การจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกเชื้อราจากข้อ 1.2 ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยการแยกปลายเส้นใยเชื้อรา (hyphal tip isolation) เตรียมสปอร์แขวนลอย ด้วยการเติมน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ และดูดสปอร์แขวนลอย 50 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร WA บ่มไว้ 24 ชม. จึงนำมาตัดปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และย้ายปลายเส้นใยเดี่ยวไปเกลี่ยบนอาหาร PDA จนเชื้อเจริญเต็มจานและสร้างสปอร์ จึงนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแต่ละชนิด ได้แก่ oogonium, oospore, sporangium, macroconidia, microconidia, conidia และ arthroconidia ทำการบันทึกข้อมูลลักษณะต่าง ๆ ได้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา

นำเชื้อรา จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกและจำแนกชนิดได้จากข้อ 1 ได้แก่ เชื้อรา *Neoscytalidium* sp. 4 ไอโซเลท (RYG23, KNI33, RBR49, NMR33) *Fusarium* spp. 6 ไอโซเลท (KNI40, RYG13.1, KNI45.1, RBR26.3, RBR50.2, NMR15.3) และ *Pythium* sp. 2 ไอโซเลท (RYG6.1, RYG10.2)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นพืชแต่ละระดับอาการ X คะแนนของระดับอาการ)}}{\text{จำนวนต้นพืชทดสอบทั้งหมด x คะแนนสูงสุดของระดับอาการ}} \times 100$$

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.1 การเตรียมเส้นใยเชื้อราและการสกัดดีเอ็นเอ

มาทดสอบการก่อโรคกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ระยอง 9 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จ.ระยอง ด้วยการปลูกเชื้อลงบนมันสำปะหลังอายุ 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 12 กรรมวิธี (เชื้อรา 12 ไอโซเลท) จำนวน 7 ซ้ำ/กรรมวิธี โดยใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล. ปริมาตร 20 มล. เทราดลงในดิน ประเมินความรุนแรงของโรค (disease severity) และดัชนีการเกิดโรค (disease index) หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14, 21, 28 และ 45 วัน บันทึกลักษณะความผิดปกติบนใบ และหลังจากปลูกเชื้อที่ 3, 4, 5 และ 6 เดือน บันทึกลักษณะอาการของโรคที่ลำต้น โดยการผ่าต้นตามความยาว ประเมินระดับความรุนแรงของโรคที่ต้น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ

ระดับ 1 ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มระหว่าง 1-25% ของเส้นรอบขอบแผล

ระดับ 2 ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มระหว่าง 26-50% ของเส้นรอบขอบแผลและหัวมันสำปะหลังเริ่มเน่า

ระดับ 3 ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มระหว่าง 51-75% ของเส้นรอบขอบแผลและหัวมันสำปะหลังเน่า

ระดับ 4 ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มระหว่าง 76-100% ของเส้นรอบขอบแผลและต้นมันสำปะหลังเหี่ยวและตาย จากนั้นนำผลการประเมินมาคำนวณดัชนีการเกิดโรค (ดัดแปลงวิธีจาก อมรรรัตน์, 2556) วิเคราะห์ข้อมูลความรุนแรงด้วยโปรแกรม R 4.2.0 (R - language and environment for statistical computing and graphics)

เตรียมสปอร์แขวนลอย โดยเติมน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ขูดผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล แล้วดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา 1 มล. ใส่ในอาหารเหลว

potato dextrose broth (PDB) ในขวดรูปชมพู่ ที่มีปริมาณอาหารเหลวอยู่ 50 มล. แล้วนำไป บ่มพร้อมเขย่า ด้วยเครื่อง rotary shaker เป็น เวลา 14-18 ชม. ทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่อง vacuum pump และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง ฆ่าเชื้อปริมาตร 300 มล. เก็บเส้นใยที่กรองได้ใน แผ่นกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำไปทำให้ แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็น เวลา 6-8 ชม. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ. จากนั้นนำ เส้นใยเชื้อรามาบดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ปริมาตร 0.05 ก. เติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol และ chloroform: isoamyl alcohol ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 95% ethanol แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °ซ. (จินตนา, 2562)

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA, *Tef-1 α* และ *RPB2*

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่ทดสอบโรคแล้ว มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA (ITS rDNA) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White *et al.*, 1990) ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 95 °ซ. เป็น เวลา 3 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยา ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที ต่อจากนั้นที่ 55 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที และสุดท้ายที่ 68 °ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ

เนื่องจากเชื้อราในบางสายพันธุ์เป็น species complex การใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์แค่ส่วนเดียว ไม่เพียงพอต่อการจำแนก จึงได้ทำการวิเคราะห์ ยีนร่วมด้วย โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อรามาเพิ่ม ปริมาณในส่วนของ ยีน *translation elongation factor 1- α* (*Tef-1 α*) ใช้ไพรเมอร์ ef1 (5'-ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC-3') และ ef2 (5'-GGA(G/A) GTA CCA GT(G/C) ATC ATG TT-3') (Geiser *et al.*, 2004)

ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยา ที่ 94 °ซ. เป็น เวลา 45 วินาที ต่อจากนั้นที่ 59 °ซ. เป็นเวลา 45 วินาที และสุดท้ายที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 32 รอบ

เนื่องจากเชื้อรา *Fusarium spp.* เป็น เชื้อราที่มีความผันแปรสูง และมีการตอบสนอง ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม จากฐาน ข้อมูล *Fusarium* (*Fusarium* ID) จึงใช้ยีน RNA polymerase II (*RPB2*) สำหรับวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5fc (5'-GGG GWG AYC AGA AGA AGG C-3') และ 7cR (5'-CCC ATR GCT TGY TTG YTT RCC AT-3') (Hofstetter *et al.*, 2007) ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที 1 รอบ จากนั้น ทำปฏิกิริยา ที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที และ ที่ 55 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาทีสุดท้าย ที่ 68 °ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 32 รอบ

ทำการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR Product) ด้วยเทคนิค electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% โดยใช้ 100 base pair (ExcelBand TM) เป็นดีเอ็นเอ มาตรฐาน (standard marker) และเติม gel star 0.1% ผสมกับ PCR product และ loading dye หยอดลงบนเจลที่แข็งตัว แล้วนำมาตรวจสอบ ใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate 2 mM EDTA) ใช้กระแสไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ คงที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่งวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Solgent sequencing service ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำข้อมูลมา เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ ITS, *Tef-1 α* และ *RPB2* กับฐานข้อมูล GenBank (NCBI) โดยใช้โปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA-11 (Tamura *et al.*, 2021) นำข้อมูลมาจัดทำชุดข้อมูล (multiple alignment) ด้วยวิธี ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) แล้วจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted

pair arithmetic mean method (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) และวิธี p-distance (Nei and Kumar, 2000) และหาค่า bootstrap ด้วยโปรแกรมเดียวกัน จำนวน 1,000 ซ้ำ (Felsenstein, 1985)

4. การประเมินความผันแปรด้วยเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคและจำแนกชนิดแล้ว มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่อยู่ระหว่างส่วนที่ซ้ำกัน (simple sequence repeat) โดยทำปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ GTG(CGA)₅, (CGA)₅, (CAG)₅, P₄: GCG(CGA)₅ และ P₅: AAT(CGA)₅ ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา จำนวน 37 รอบที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่ 54 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PCR max รุ่น: PCRmax Alpha Cyclor) จากนั้นนำ PCR product มาทำการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis และใช้ 100 base pair (ExcelBand™) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard Marker) เติม gel star 0.1% (SMOBIO) ผสมกับ PCR product และ loading dye หยดลงบนเจลที่แข็งตัว แล้วนำมาตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ และจัดกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจและจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 การสำรวจโรคมันสำปะหลัง

จากการสำรวจโรคของมันสำปะหลัง 199 แปลงปลูก ในพื้นที่ 19 จังหวัด พบเปอร์เซ็นต์

การเกิดโรคตั้งแต่ 0-100 % จังหวัดที่พบการเกิดโรคสูง ได้แก่ กาญจนบุรี อุบลราชธานี กาฬสินธุ์ ลพบุรี และฉะเชิงเทรา มีความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 80-100 % ซึ่งต้นมันสำปะหลังที่มีขนาดเล็กบริเวณรากมีรอยช้ำสีน้ำตาล ส่วนมันสำปะหลังที่ลงหัวแล้วต้นจะเหี่ยวเฉา ใบร่วง หัวเน่าและมียากลิ่นเหม็น ถ้าอาการรุนแรงมันสำปะหลังจะยืนต้นตาย และจังหวัดที่ไม่พบการเกิดโรค ได้แก่ ชัยนาท ขอนแก่น ชัยภูมิ นครสวรรค์ กำแพงเพชร และชลบุรี

1.2 การแยกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การแยกเชื้อราจากส่วนของหัว ลำต้น และรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรค ได้เชื้อรา จำนวน 49 ไอโซเลท การแยกจากดินในระดับความลึก 0-20 ซม. (29 ตัวอย่าง) ได้เชื้อรา จำนวน 110 ไอโซเลท ซึ่งสามารถจำแนกได้เชื้อราหลากหลายประเภท (genus) ได้แก่ *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Humicola* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Nigrospora* sp., *Exerohilum* sp. สำหรับดินที่ระดับ 40-60 ซม. (26 ตัวอย่าง) จำแนกได้เชื้อรา *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Pleiochaeta* sp., *Nigrospora* sp., *Cladosporium* sp., *Robillarda* sp. และเชื้อราที่ไม่สามารถจำแนกได้ (unknown) รวมทั้งหมด 132 ไอโซเลท อย่างไรก็ตาม ในจำนวนนี้มีเชื้อราที่ไม่ใช่เชื้อราในดินปนมาด้วย ซึ่งอาจจะเป็นเชื้อราปนเปื้อนในขณะการแยกเชื้อ สำหรับลักษณะของเชื้อรากลุ่มเป้าหมายที่จะนำไปทดสอบการก่อโรคและจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

เชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีลักษณะโคโลนีเป็นเส้นใยมีสีขาวฟูเล็กน้อยในระยะแรก เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำและมีการสร้าง arthroconidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ มีสีเข้ม conidia มีเซลล์เดียวใสไม่มีสีในระยะแรก แต่ต่อมาจะมีการสร้างผนังกัน โดยเซลล์ตรงกลางทึบสีน้ำตาล หัวท้ายใส (Figure 1A)

เชื้อรา *Fusarium* spp. แบ่งตามลักษณะได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยฟูในระยะแรกโคโลนีมีสีชาคริมแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่ออายุมากขึ้นพบการสร้างรงควัตถุเป็นสีน้ำตาล macroconidia มีลักษณะค่อนข้างเรียวยาว มี 3-5 septum ส่วน microconidia มีลักษณะรูปกระสวย มี 1 septum 2) เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยฟู สร้าง aerial mycelium ในระยะแรกโคโลนีมีสีชาคริมแล้วเปลี่ยนเป็นสีขาวเหลืองเมื่ออายุมากขึ้น ไม่พบการสร้างรงควัตถุ macroconidia มีลักษณะค่อนข้างสั้นโค้งโผล่มี 3-4 septum ส่วน microconidia มีลักษณะรูปไข่มี 0-1 septum (Figure 1B)

เชื้อรา *Pythium* sp. มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างหลากหลายคล้ายรูปดอกไม้ม้วน เส้นใยสีขาวคล้ายผงแป้ง oospore มีผนังกลมบาง (wall thin และ globose) oogonium มีผนังคล้ายหนาม (ornamented) ลักษณะการจับของ antheridium แบบ typically monoclinal และ sporangium มีรูปร่างแบบ subglobose (Figure 1C-D)

ในการจำแนกเชื้อราไอโซเลทต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุโรค มีเชื้อราบางไอโซเลทที่เป็นสกุลเดียวกับการรายงานของ สุทธิสา (2558) ซึ่งได้ระบุว่า เป็นเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลัง ได้แก่ *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* sp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium* sp. ซึ่งเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. ทำให้มันสำปะหลังมีลักษณะอาการแผลสีดำร่วมกับอาการเน่าเปื่อยเน่าละ และเน่าแห้งในบริเวณโคนต้น และท่อนพันธุ์พบเม็ด pycnidia สีดำ และท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีดำในทุกส่วนของมันสำปะหลัง และสอดคล้องกับรายงานของ พรพิมล และคณะ (2562) ที่จำแนกเชื้อราจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคและดินบริเวณที่ปลูกได้ 4 ชนิด ได้แก่ *P. melonis*, *S. rolfsii*, *N. dimidiatum* และ *Fusarium* sp. การสำรวจครั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อรา *Phytophthora* sp. จากตัวอย่างพืชและดิน อาจเนื่องมาจากวิธีการแยกยังไม่เหมาะสมกับเชื้อราชนิดนี้

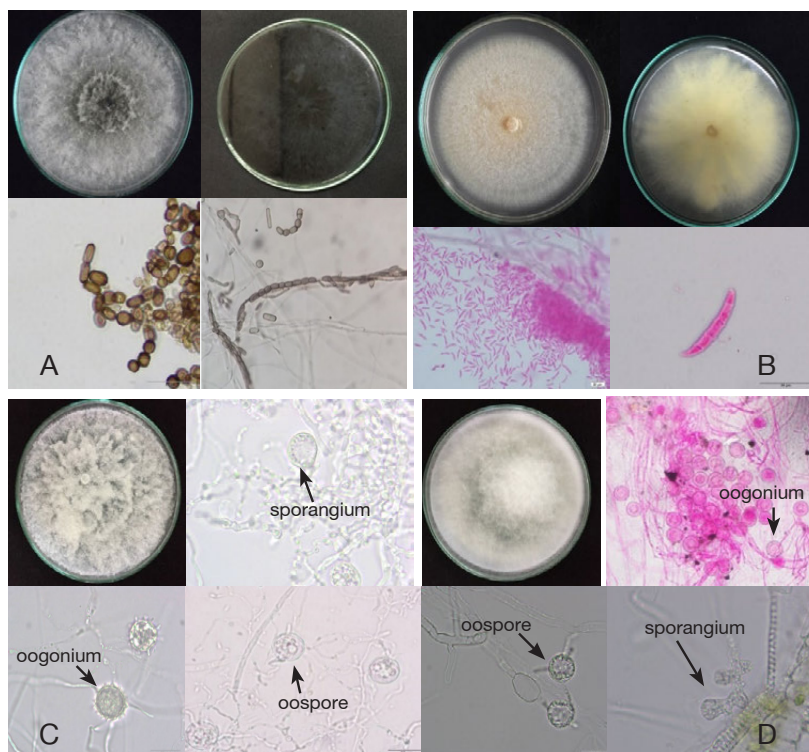


Figure 1 Morphological characteristics of colony and conidia of A: *Neoscytalidium* sp., B: *Fusarium* sp. and C-D: *Pythium* sp.

2. ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา

เชื้อราทั้ง 12 ไอโซเลท มีความสามารถในการก่อโรคบนมันสำปะหลังแตกต่างกัน โดยอาการของโรคจะปรากฏหลังจากปลูกเชื้อ 6 เดือน พบว่า มันสำปะหลังที่ปลูกเชื้อด้วย *Neoscytalidium* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท แสดงอาการเน่าดำ และในเดือนที่ 6 ลำต้นที่ติดกับรากเริ่มมีสีน้ำตาล พบอาการเนื่อเยื่อตาย หัวมันสำปะหลังมีลักษณะเน่าและมีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 2.9-3.1 และมีดัชนีการเกิดโรคระหว่าง 67.9-75.0 % สำหรับต้นที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Fusarium* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท พบอาการลำต้นที่ติดกับรากมีสีน้ำตาล เริ่มมีอาการเซลล์ตาย รากมีสีน้ำตาลดำ มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 2.4-2.9 และค่าดัชนีการเกิดโรคระหว่าง 60.2-71.4% ขณะที่ต้นมันสำปะหลังที่ปลูกเชื้อ *Pythium* sp. 2 ไอโซเลท พบว่า บริเวณลำต้นที่ติดกับรากมีอาการลำต้นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 1.3 และ 2.0 และค่าดัชนีการเกิดโรค 32.1 และ 50 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีระดับความรุนแรงของโรคเพียง 0.1 และค่าดัชนีการเกิดโรค 3.6 % (Table 1, Figure 2-3) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ พรปวิณ และคณะ (2561) ที่พบว่าเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* ก่อให้เกิดโรคและทำให้ต้นมันสำปะหลังตาย ในขณะที่เชื้อรา *Pythium* sp. ไม่ก่อให้เกิดโรคกับต้นมันสำปะหลัง และสอดคล้องกับ สุทธิสา (2558) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. จำนวน 33 ไอโซเลท มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคได้ทั้งบนหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ CMR43-08-89 อายุ 8 เดือน พบลักษณะอาการหัวมันเน่า เนื้อเยื่อยุบตัวลงเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองถึงสีน้ำตาล เนื้อเยื่อแตก บริเวณเปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกออกจากกัน

Table 1 Disease severity level and disease index on cassava plant after inoculation with fungal isolates

Fungal isolates	Disease severity level	Disease index (%)
<i>Neoscytalidium</i> sp. (RYG23)	3.1 a	71.4
<i>Neoscytalidium</i> sp. (KNI33)	2.9 ab	67.9
<i>Neoscytalidium</i> sp. (RBR49)	3.0 a	75.0
<i>Neoscytalidium</i> sp. (NMR33)	2.9 ab	71.4
<i>Fusarium</i> sp. (RYG13.1)	2.9 ab	71.4
<i>Fusarium</i> sp. (KNI45.1)	2.9 ab	71.4
<i>Fusarium</i> sp. (RBR26.3)	2.9 ab	71.4
<i>Fusarium</i> sp. (RBR50.2)	2.4 ab	60.7
<i>Fusarium</i> sp. (KNI40)	2.6 ab	64.3
<i>Fusarium</i> sp. (NMR15.3)	2.7 ab	67.9
<i>Pythium</i> sp. (RYG6.1)	1.3 c	32.1
<i>Pythium</i> sp. (RYG10.2)	2.0 bc	50.0
Control (No inoculation)	0.1 d	3.6
CV (%)	32.4	

Means in the same column follow by a common letter are not significantly different at the 1% level by DMRT

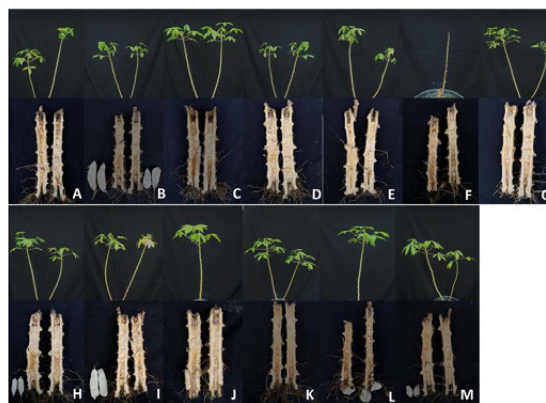


Figure 2 Disease symptoms on leave, stem and root of cassava, tuber and stem at 6 months post-inoculation A-B: *Neoscytalidium* sp. (RYG23, KNI33, RBR49, NMR33), E-J: *Fusarium* spp. (KNI40, RYG13.1, KNI45.1, RBR26.3, RBR50.2, NMR15.3) K-L: *Pythium* sp. (RYG6.1, RYG10.2) and M: control

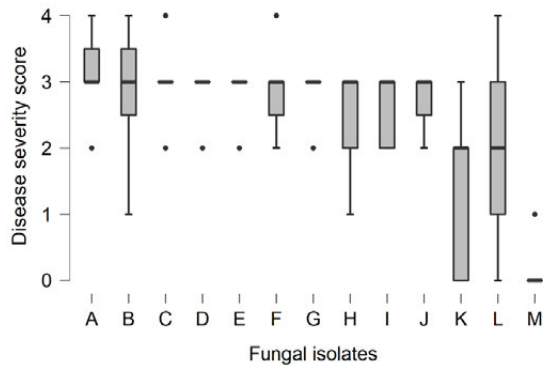


Figure 3 Distribution of disease severity score in each fungal isolate after inoculation on cassava variety Rayong 9 at 6 months. A-D: *Neoscytalidium* sp. (RYG23, KNI33, RBR49, NMR33), E-J: *Fusarium* spp. (KNI40, RYG13.1, KNI45.1, RBR26.3, RBR50.2, NMR15.3) K-L: *Pythium* sp., M: control

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของเชื้อราที่ได้ทดสอบความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแล้ว จำนวน 8 ไอโซเลท ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลรวมทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (dataset) 630 คู่เบส พบว่า เชื้อราในกลุ่ม *Fusarium* spp. จำนวน 1 ไอโซเลท (KNI40) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อรา *F. solani* และจำนวน 4 ไอโซเลท (RBR50.2, RBR26.3, KNI45.1, RYG13.1) จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *F. incarnatum* และสำหรับเชื้อราสกุล *Neoscytalidium* sp. จำนวน 3 ไอโซเลท (RYG23, KNI33, NMR33) จัดกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *Scytalidium hyalinum* (KF531816) ซึ่งเป็น type species (CBS.145.78) และ *N. hyalinum* (MH872880, MH862880) สายพันธุ์เดียวกัน (CBS.145.78) ซึ่งปัจจุบันได้ใช้ชื่อสปีชีส์ *N. dimidiatum* (current name) (Figure 4)

สำหรับเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มอีก 2 ยีน ได้แก่ *Tef-1 α* และ *RPB2* และนำข้อมูล 2 ส่วนนี้

มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลในบริเวณ ITS rDNA โดยมีความยาว รวม 2,443 คู่เบส พบว่า เชื้อรา *Fusarium* ไอโซเลท KNI45.1 และ RBR50.2 จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *F. incarnatum* และ ไอโซเลท KNI40 จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *F. solani* (Figure 5) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ เบญจพล (2559) ที่ได้ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคพืชที่เก็บรวบรวมจากพืชต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS rDNA และ *Tef-1 α* และวิเคราะห์ข้อมูล พบว่า จำแนกชนิดของเชื้อราได้ 5 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticicillioides*, *F. proliferatum* และ *F. incarnatum* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพืชอาศัย

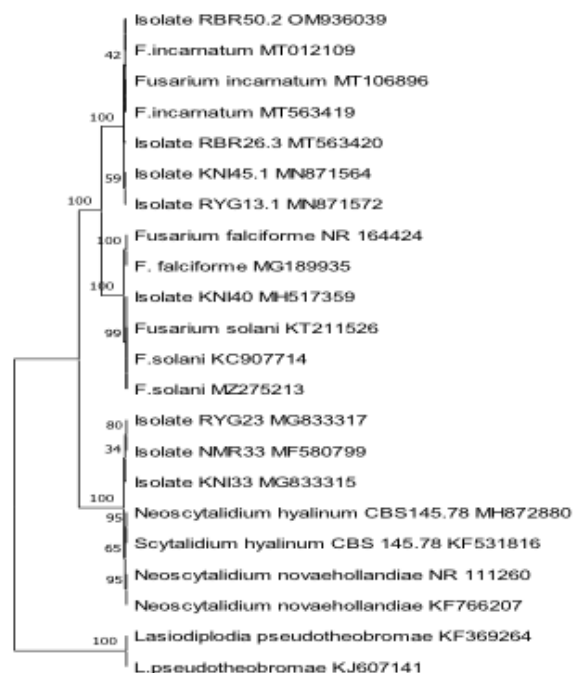


Figure 4 Phylogenetic tree of *Fusarium* spp. and *Neoscytalidium* sp. obtained from ITS rDNA sequence analysis by MEGA11 program. Bootstrap values are indicated on the branches (1,000 replications)

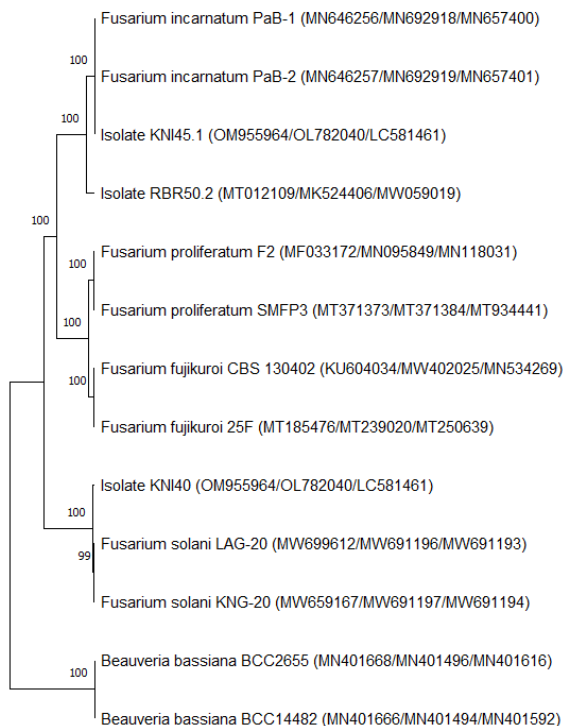


Figure 5 Phylogenetic tree of *Fusarium* spp. obtained from ITS rDNA, elongation factor 1-alpha (*Tef-1 α*) gene and second largest subunit (*RPB2*) gene sequences analysis by MEGA11 program. Bootstrap values are indicated on the branches (1,000 replications)

4. การประเมินความผันแปรด้วยเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR)

จากการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *N. dimidiatum*, *F. incarnatum* และ *F. solani* พบว่า มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดตั้งแต่ 300-1,500 คู่เบส จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อราในแต่ละไพรเมอร์ได้หลากหลายจีโนไทป์ (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราแต่ละชนิดที่มีการแพร่ระบาดในแหล่งต่าง ๆ มีมากกว่า 1 จีโนไทป์ หรือสายพันธุ์ที่จำแนกในระดับดีเอ็นเอ เชื้อรา *N. dimidiatum* ที่แยกมาจาก จ.ระยอง เมื่อใช้ไพรเมอร์ GTG(CGA)₅ สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา ได้ 4 จีโนไทป์ จากตัวอย่าง 10 ไอโซเลท และเชื้อรา *N. dimidiatum* ที่แยกจาก จ.นครราชสีมา และ กาญจนบุรี สามารถจำแนกได้ 3 และ 4 จีโนไทป์ จากแหล่งละ 5 ไอโซเลท

สำหรับเชื้อรา *F. incarnatum* ซึ่งพบว่ามีความผันแปรภายในประชากรค่อนข้างสูงแต่ละประชากรสามารถจำแนกเชื้อราได้หลายจีโนไทป์เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ GTG(CGA)₅ เชื้อราที่แยกจาก จ.ระยองจำนวน 3 ไอโซเลทสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้ง 3 ไอโซเลท ส่วนเชื้อรา *F. solani* พบว่า มีความผันแปรภายในประชากร และมีความเหมือนกันระหว่างประชากรของเชื้อรา เช่น เชื้อราที่แยกได้จาก จ.นครราชสีมา จำนวน 6 ไอโซเลทสามารถจำแนกได้เป็น 4 จีโนไทป์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ P4:GCG (CGA)₅ ขณะที่การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ (CGA)₅ พบว่า ไอโซเลทของเชื้อรา *F. solani* ที่แยกได้จาก จ.กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี ระยอง นครราชสีมา และกาญจนบุรีสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (Figure 6) ซึ่งสอดคล้องกับ พรปวีณ์ และคณะ (2561) ที่รวบรวมตัวอย่างดินและลำต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรคเน่าแห้งและเน่าดำจาก จ.นครราชสีมา ระยอง และตาก มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย ISSR ของเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* พบว่า *F. solani* แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม และเชื้อรา *N. hyalinum* แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม และจากรายงานของ ชนม์นิภา และคณะ (2564) ที่ศึกษาเชื้อรา *S. oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าของข้าวที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยนำเชื้อรา จำนวน 40 ไอโซเลท มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR และจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ พบว่า มีความผันแปรทางพันธุกรรมในบางพื้นที่พบมากกว่า 1 จีโนไทป์ และมีบางจีโนไทป์พบเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อรา *S. oryzae* จากแหล่งเพาะปลูกข้าวในภูมิภาคที่แตกต่างกันของประเทศไทยเกิดความหลากหลายภายในประชากร แต่มีเชื้อราบางสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อพื้นที่เพาะปลูก

Table 2 DNA fingerprinting pattern of *Neoscytalidium dimidiatum*, *Fusarium incarnatum* and *F. solani* generated by ISSR markers

Fungal species	DNA fingerprinting pattern*					
	GTG (CGA)5	P5:AAT (CGA)5	P6:ATC (CGA)5	P4:GCG (CGA)5	(CAG)5	(CGA)5
<i>N. dimidiatum</i> (21 isolates)	A1-A10	-	B1-B9	C1-C11	D1-D11	E1-E12
<i>F. incarnatum</i> (17 isolates)	A1-A13	B1-B9	-	C1-C10	D1-D13	E1-E9
<i>F. solani</i> (14 isolates)	A1-A8	B1-B9	-	C1-C10	D1-D10	E1-E7

*DNA fingerprint developed with primer represented by alphabet A-E, and the number is band number in each fungal species

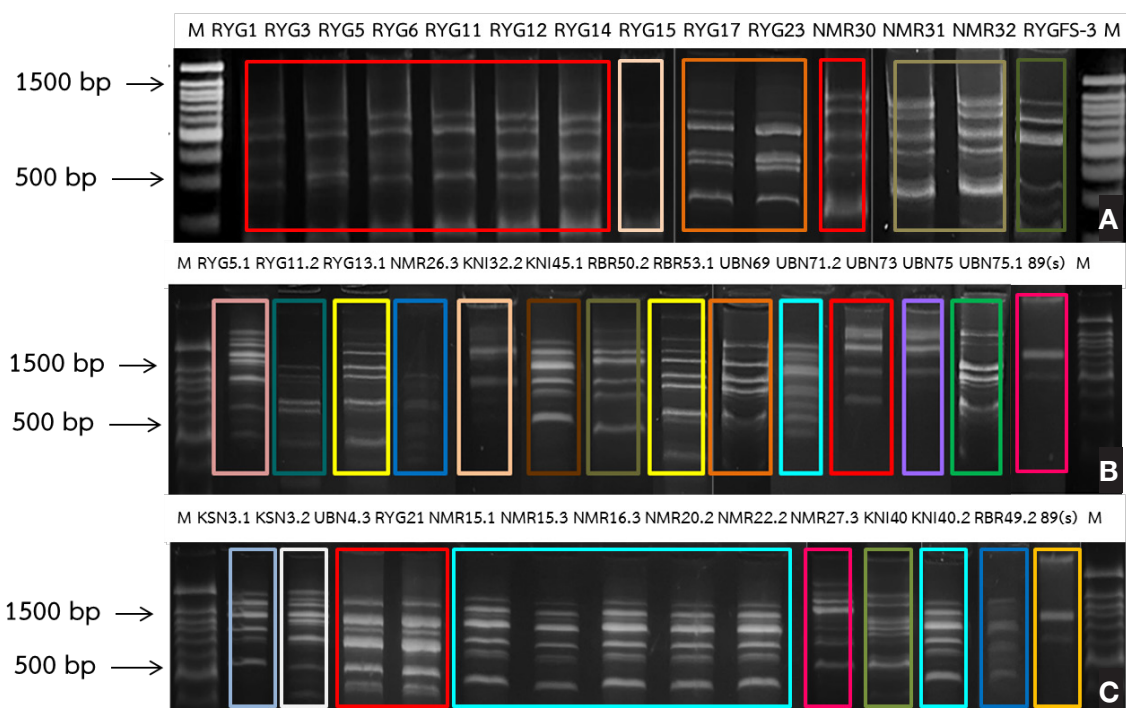


Figure 6 DNA fingerprint patterns of *Neoscytalidium dimidiatum* (A) *Fusarium incarnatum* (B) *F. solani* (C) isolated from cassava rot disease from various plantation in Thailand using ISSR markers with primers GTG (CGA)5 on agarose gel electrophoresis

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจโรครากเน่า หัวเน่าและ ลำต้นเน่ามันสำปะหลัง ในแหล่งปลูกสำคัญของ ประเทศไทยและการเก็บตัวอย่างจากดินในความลึก ระดับ 0-20, 20-40 และ 40-60 ซม. สามารถแยก เชื้อราได้ 242 ไอโซเลท และจำแนกด้วยลักษณะ

สัณฐานวิทยาได้เชื้อราสกุล *Neoscytalidium* sp, *Fusarium* spp., และ *Pythium* spp. เมื่อนำมา ทดสอบการเกิดโรคบนมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 พบว่า มีเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *Neoscytalidium* sp. ที่ทำให้มันสำปะหลังแสดงอาการโรคที่ ค่อนข้างรุนแรงถึงรุนแรง ในขณะที่ *Pythium* spp. ทำให้มันสำปะหลังแสดงอาการรุนแรงปานกลางถึง

ไม่รุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จากผลการทดสอบโรคจึงสรุปได้ว่า เชื้อราทั้ง 3 สกุลนี้สัมพันธ์กับการเกิดโรครากเน่า หัวเน่าและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่บริเวณ ITS rDNA และการวิเคราะห์ยีน *Tef-1 α* และ *RPB2* เพิ่ม สำหรับการจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราได้เป็น *F. solani*, *F. incarnatum* และ *N. dimidiatum* นอกจากนี้ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา มีความหลากหลายและมีความผันแปรทั้งภายในประชากร และระหว่างประชากรของเชื้อราแต่ละชนิดที่มีการระบาดในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย (เลขที่โครงการ P-17-50122) ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ในการสนับสนุนทุนพันธุ์มันสำปะหลังและพื้นที่ในการทดลอง และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ที่อนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่สำหรับการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2562. เทคนิควิจัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช. สำนักพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 166 หน้า.

ชนมัญญา ดิวงษ์. วนิดา ธรรมธะสาร และจินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2564. การประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Sarocladium oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย ด้วยเครื่องหมาย ISSR. ว.วิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ. 4(1): 13-20.

ชาติชาย ศิริพัฒน์. 2557. รากเน่าหัวเน่าระบาดหนักในไร่มันสำปะหลัง. แหล่งข้อมูล: <http://www.thairath.co.th/content/442798>. สืบค้น: 19 มีนาคม 2564.

จิตติมา วีระศิลป์. 2542. โรคมันสำปะหลังพืชทองคำใต้แผ่นดินมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 121 หน้า.

เบญจพล ศรีทองคำ. 2559. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* species ที่แยกจากพืชเป็นโรค. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม. 126 หน้า.

พรวิทย์ ธิวัฒน์วานิชกุล ภาณุวัฒน์ มูลจันทร์ วรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2561. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการก่อให้เกิดโรคเน่าแห้ง-เน่าดำมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Neoscytalidium hyalinum*. ว.วิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ. 1(2): 22-34.

พรวิทย์ ธิวัฒน์วานิชกุล ภาณุวัฒน์ มูลจันทร์ วรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2562. การจำแนกชนิดและการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวเน่ารากเน่าและต้นเน่าของมันสำปะหลัง. ว. เกษตรพระจอมเกล้า. 37(2): 239-249.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณิรัตน์ สิมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด และอมรรักษ์ คัดใจเดียว. 2562. การศึกษาเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและรากเน่าของมันสำปะหลังโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางชีวโมเลกุล. ว.วิชาการเกษตร. 37(3): 307-319.

ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. 2554. ระวัง...การระบาดของโรคในมันสำปะหลัง. แหล่งข้อมูล: <http://nsfrc-news.blogspot.com/2011/06/blog-post.html>. สืบค้น : 23 กุมภาพันธ์ 2564.

สุทธิสา ดัชนี. 2558. การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 130 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. มันสำปะหลังโรงงาน : ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร ปี 2564. แหล่งข้อมูล: <https://www.oae.go.th>. สืบค้น 10 มีนาคม 2565

- อมรรัตน์ ภูโพนบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 189 หน้า.
- Boas, S.A.V., S.A.S.D. Oliveira., C.A.D. Braganca., J.B. Ramos and E.J.D. Oliveira. 2017. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Sci. Agric.* 74(1): 60-67.
- Charaensatapon, R., T. Saelee, U. Chulkod and S. Cheadchoo. 2014. *Phytophthora* Root and Tuber of cassava in Thailand. Field and renewable energy crops research institute. Department of Agriculture, Thailand. In: Proceedings of 5th Asian Conference on Plant Pathology. Chiang Mai, Thailand. 3-6 November.
- Felsenstein, J. 1985. Condence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783-791.
- Geiser, D.M., M. del Mar Jimenez Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T.J. Ward, N. Zhang, G.A. Kuldau and K.O' donnell. 2004. *Fusarium*-ID v. 1.0: DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110 (5-6): 473-479.
- Hofstetter, V., M. Jolanta, K. Frank and L. Francois. 2007. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Mol. Phylogenet Evol.* 44(1). 412-426.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Msikita, W., B. James, M. Ahounou, H. Baimey, B.G. Facho and R. Fagbemissi. 1998. Discovery of new diseases of cassava in West Africa. *Tropical Agriculture*. 75 (1/2): 58-63.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 348 p.
- Onyeka, T.J., E.J.A. Ekpo and A.G.O. Dixon. 2004. Cassava root rot disease in West Africa: Review of recent literature and the field situation in Nigeria. In Root crops in the 21st century, pp. 584-588. In: Proceedings of the 7th Triennial Symposium of the International Society of the Tropical Root Crops Africa Branch (ISTRAC-AB). ISTRAC-AB/IITA. Ibadan, Nigeria.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. The Principles and Practice of Numerical Classification. WF Freeman & Co., San Francisco. 573 p.
- Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38(7): 3022-3027.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. page 315-322. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York,