การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการก่อให้เกิดโรคเน่าแห้ง-เน่าดำมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Neoscytalidium hyalinum*

DNA Fingerprint Analysis and Pathogenicity of Cassava Dry Rot and Black Rot Caused by *Fusarium solani* and *Neoscytalidium hyalinum*

พรปวีณ์ ธิวัฒน์วรานิกุล[1], ภาณุวัฒน์ มูลจันทะ[2], วรรณวิไล อินทนู[1] และจินตนา อันอาตม์งาม[1*]

Pornpawee Tiwatwaranikul[1], Phanuwat Moonjuntha[2], Wanwilai Intanoo[1] and Jintana Unartgam[1*]

ABSTRACT: Dry rot and black rot diseases are the main problem of cassava production in Thailand. Dry rot and black rot diseases caused by 2 fungal genera such as *Fusarium* sp. and *Neosytalidium* sp., respectively. This study, the disease sample collection was conducted from Rayong province and Tak province, then the samples were isolated by Tissue transplanting method. Based on morphological characteristics, 2 species were identified including *F. solani* and *N. hyainum.* DNA fingerprint analysis of *F. solani* and *N. hyalinum* isolates were done by using 7 primers including P3: GTG$(CGA)_5$, P4: GCG$(CGA)_5$, P5: AAT$(CGA)_5$,P6: ATC$(CGA)_5$, $(GTG)_5$, $(CGA)_5$ and $(CAG)_5$. The results revealed that these fungal isolates were genetic diversity in each locality. However, some isolates of these species were similar although collected from different geographical ares. Moreover, the pathogenicity of 2 fungal species with 4 isolates including RYG2, TAK14, RYG5, TAK19 were evaluated on 13 cultivars of cassava. The pathogenicity test indicated Rayong 72 was low percentage of disease index after inoculation with 4 fungal isolates. Moreover, the disease virulence was different on cultivars when inoculated by fungal isolates. These results revealed that there was difference or genetic diversity in fungi.

Keyword: Dry rot, Black rot, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum* ,ISSR

บทคัดย่อ: โรคเน่าแห้งและเน่าดำเป็นเป็นปัญหาหลักต่อการผลิตมันสำปะหลังของประเทศไทย โรคนี้เกิดจากเชื้อราสาเหตุ 2 สกุล ได้แก่ *Fusarium* sp.และ *Neoscytalidium* sp. ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคเน่าแห้งและเน่าดำจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญในจังหวัดระยองและจังหวัดตากนำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting method จากการศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกเชื้อราได้ 2 ชนิด ได้แก่ *F. solani* และ *N. hyalinum* การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา F. *solani* และ N. *hyalinum* ด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus ,Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 320 ถนน สุขุมวิท ตำบล ห้วยโป่ง อำเภอ เมือง จังหวัด ระยอง 21150

Rayong Field Crop Research Center, 320 Sukhumvit Rd, Tambon Huai Pong, Amphoe Mueang Rayong, Rayong 21150, Thailand

* Corresponding author: agrjne@ku.ac.th

P_3: GTG$(CGA)_5$, P_4: GCG$(CGA)_5$, P_5: AAT$(CGA)_5$,P_6: ATC$(CGA)_5$, $(GTG)_5$, $(CGA)_5$ และ $(CAG)_5$ พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละแหล่งของเชื้อรา อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความเหมือนกันแม้จะเป็นตัวอย่างที่มาจากพื้นที่ที่มีภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ RYG2, TAK14, RYG5, TAK19 ไปทดสอบการก่อเกิดโรคกับพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 13 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ระยอง72 มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคต่ำสุดเมื่อปลูกเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต และพบว่ามีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันเมื่อปลูกเชื้อราไอโซเลตต่างๆ บนพันธุ์ทดสอบโรค ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในเชื้อรา

คำสำคัญ: โรคเน่าแห้ง, โรคเน่าดำ, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum*, ISSR

คำนำ

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเป็นพืชที่ปลูกง่ายทนทานต่อสภาพแล้งเป็นพืชพลังงานที่สำคัญในการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญในการผลิตน้ำมันสำหรับรถยนต์ นอกจากนี้ยังเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประชากรในหลายประเทศและมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าพืชชนิดอื่นในปี 2561 ผลผลิตมันสำปะหลังมีพื้นที่เก็บเกี่ยว 8.07 ล้านไร่ ผลผลิต 28.57 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.54 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจ ที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และ มันฝรั่ง ในประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 3 รองจากข้าวและยางพารา (ไพบูลย์, 2551) ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปจากเป็นการปลูกเพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์ไปเป็นปลูกเพื่ออุตสาหกรรม โดยในปัจจุบันมีการใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เอทานอล และไบโอพลาสติก (ศานิต, 2557) ทำให้การปลูกมันสำปะหลังมีความต้องการของตลาดเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการปลูกมันสำปะหลังติดต่อกันตลอดทั้งปี ส่งผลให้มีการสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นทุกปี

โรคที่สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตของเกษตรกรที่ปลูกมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคต้นและรากเน่า (stem and root rot) ทำให้มันสำปะหลังมีผลผลิตลดลง เพราะเกิดกับท่อนพันธุ์ที่เป็นส่วนขยายพันธุ์และที่รากซึ่งเป็นส่วนของผลผลิตโดยตรง ซึ่งในต่างประเทศแบ่งลักษณะอาการของโรคที่สำคัญออกเป็น 1)โรคต้นเน่า (stem rot) เกิดจาก เชื้อรา *Glomerella cingulate* และ *Lasiodiplodia theobromae* ซึ่งเกิดกับท่อนพันธุ์และลำต้น 2) โรครากเน่า (root rot) มี 4 ลักษณะอาการ ได้แก่ โรคเน่าเละ (soft rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะกล้าและระยะลงหัวแล้ว มีอาการหัวเน่าเละ มีกลิ่นเหม็น ต้นเหี่ยว ใบร่วง 3) โครากเน่าแห้ง (dry rot) เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus* sp., *Armillariella* sp., *Rosella* sp. และ *Fusarium* sp. พบในระยะลงหัว ส่วนรากและหัวมีอาการเน่าแห้ง ฝ่อ มีกลิ่นเหม็นคล้ายไม้เน่า ต้นเหี่ยวเหลืองและ 4) โรคเน่าดำ (black rot) เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp., *Neoscytalidium* sp. พบในทุกระยะ ท่อนพันธุ์ ราก และหัวเน่า มีอาการชิ้นพืชมีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่นเหม็น เนื่องจากโรคที่กล่าวมาข้างต้นเป็นโรคที่สำคัญต่อผลผลิตของมันสำปะหลัง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการก่อให้เกิดโรคเน่าแห้งและเน่าดำบนมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Neoscytalidium hyalinum* ด้วยเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อรา

เก็บตัวอย่างโรคเน่าแห้งและเน่าดำ จากแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จ.ระยอง (ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดระยอง) และ อ. หนองบัวใต้ จ. ตาก นำมาแยกเชื้อราด้วยวิธี Tissue transplanting method (Booth, 1976) บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยตัดชิ้นมันสำปะหลังบริเวณหัวและลำต้นที่เป็นโรค เป็นชิ้นขนาดเล็ก ล้างด้วย 10% Clorox จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นมันสำปะหลังวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-7 วัน จึงนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound จากนั้นแยกปลายเส้นใย โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าอาหาร ดูดสปอร์แขวนลอย 100 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร water agar (WA) บ่มไว้ 6–8 ชั่วโมง จึงนำมาตัดปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo และย้ายปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA (Choi et al., 1999)

2 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาลักษณะโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 200 เท่า และ 400 เท่า โดยการทำสไลด์กึ่งถาวร ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแต่ละชนิด macroconidia, microconidia, conidia และ arthoconidia ลักษณะต่างๆ เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสกุลและชนิด

3. การเตรียมเส้นใยเชื้อราและการสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) จากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขูดผิวหน้าอาหารและดูดสปอร์แขวนลอย ใส่ลงไปในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง จากนั้นล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (Lyophilization) เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วนำเส้นใยแห้งมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเส้นใยที่บดแล้ว ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.5 กรัม เติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol 0.5 เท่า และ chloroform : isoamyl alcohol (IAA) (24:1) 0.5 เท่า นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ เติม RnaseA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม choloform:IAA อัตราส่วน 1 เท่า แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่และเติม ethanol 2 เท่า แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 100 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ดัดแปลงวิธีจาก Zimand et al., 1994)

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา ด้วยเทคนิค Inter simple sequence repeat (ISSR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา *Fusarium* sp. จำนวน 5 ไอโซเลท (RYG1, RYG2, RYG3, RYG4 และ TAK14) และ *Neoscytalidium* sp. (RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17, TAK18, TAK19 และ TAK20) จำนวน 8 ไอโซเลท มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนที่ซ้ำกันโดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer P_3:GTG(CGA)$_5$, P_4: GCG(CGA)$_5$, P_5: AAT(CGA)$_5$, P_6: ATC(CGA)$_5$, (CAG)$_5$, (CGA)$_5$ และ GTG(CGA)$_5$ จากการคัดเลือกมาจาก 13 ไพรเมอร์อย่างละ 10 pmole, 1X buffer 2.5 mM, $MgCl_2$ 0.2 mM, dNTP และ 1 unit *Taq* DNA polymerase (SMOBIO) โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ ปฏิกิริยาจำนวน 37 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PCR max รุ่น: PCRmax Alpha Cycler) นำ PCR product มาทำการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis และใช้ 100 base pair (ExcelBand™) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard Marker) และเติม Gel star 0.1% (SMOBIO) เมื่อเจลแข็งตัวนำมาตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที การวิเคราะห์ข้อมูลโดยนำ แผ่นเจลที่มีแถบดีเอ็นมาเก็บข้อมูลในรูปแบบ binary data (0/1) โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง คือ หนึ่งลักษณะ (character) โดยจะแทนค่าเป็น 1 ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในตำแหน่งนั้นๆ โดยรวบรวมผลและนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTSYS pc.) Version 2.20e (Rohlf, 1993) หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) โดยวิธีของ Jaccard (Jaccard similarity coefficient) และจัดกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) แสดงผลการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ phylogenetic tree และวิเคราะห์หาค่า Bootstrap 1,000 ซ้ำด้วยโปรแกรม Win boot (Yap and Nelson, 1996)

5. การทดสอบการก่อโรค

ปลูกเชื้อรา 2 สกุล ได้แก่ *Fusarium* sp. (RYG1, RYG2, RYG3, RYG4 และ TAK14 และ *Neoscytalidium* sp. (RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17, TAK18, TAK19 และ TAK20) ลงบนพันธุ์มันสำปะหลัง 13 พันธุ์ ได้แก่ CM125-22, CM407-30, CM32-99-22, CM40490J, CM6125-117, CMH22-04-1, CMR23-107-4, SMH22-03-1, Sriracha1, ระยอง 86-13, KU50, ระยอง 7 และระยอง 72 โดยทำการตัดท่อนพันธุ์มันสำปะหลังความยาว 10 เซนติเมตร ปลูกลงบนดินที่นึ่งฆ่าเชื้อทุกกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ จากนั้นน้ำเชื้อราทั้ง 2 สกุล ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา วางลงบนบริเวณแผลที่ทำการเจาะไว้ 1 ชิ้นวุ้นต่อท่อน นำพาราฟินพันรอบแผล จากนั้นนำไปปลูกในแก้วน้ำพลาสติกขนาด 4 นิ้วที่บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อครบ 15 วันหลังจากปลูกเชื้อนำพาราฟินออก (ดัดแปลงจาก Machado, 2012) ทำการตรวจผลหลังจากการปลูกเชื้อ 45 วัน ใช้มีดผ่าตามแนวยาวบริเวณกลางชิ้นวุ้นที่ทำการปลูกเชื้อ วัดขนาดแผลตามแนวยาวของท่อน (ดัดแปลงจาก Chen et al., 2016) โดยวัดระดับความรุนแรงของโรคที่แสดงออกที่ลำต้นแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 1 = ไม่แสดงอาการ, ระดับ 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้น, ระดับ 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้น, ระดับ 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้นและระดับ 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้น (สุทธิสา, 2558)

คำนวณดัชนีการเกิดโรค (disease index) โดยใช้สูตรดังนี้ (Friedmann et al., 1998)

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค(Disease index, DI)} = \frac{\text{ผลรวมของ(จำนวนต้นพืชแต่ละระดับอาการ X คะแนนของระดับอาการ}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด X คะแนนสูงสุดของระดับอาการ}} \text{ X 100}$$

ผลการศึกษา

1.การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Fusarium* sp. จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ RYG1, RYG2, RYG3, RYG4, TAK14 จาก จ.ระยอง และ จ.ตาก ที่แยกได้จากลำต้น โคโลนีของเชื้อมีลักษณะฟูสีขาวครีม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเมื่อตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่า และ 400 เท่า พบว่า macroconidia มีลักษณะ ค่อนข้างสั้น โค้ง โดยมี 3-4 septa มีขนาด 20-33.3 × 2.8-5.7 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่หรือ กระสวย มี 0-1 septum มีขนาด 7.2 -11.4 × 2.4-4.6 ไมครอน เชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น *F. solani* (Figure 1) ซึ่งจากการศึกษาของ (Zhang, 2014) ที่แยกเชื้อรา *F. solani* จากโรคเน่าแห้งของแครอทในประเทศจีน และได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า macroconidia มีลักษณะ ค่อนข้างสั้น โค้ง มีขนาด 16.4-34.4 × 4.0-6.1 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ มีขนาด 6.7-10.7 × 3.0-4.9 ไมครอน

เชื้อรา *Neoscytalidium* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17,TAK18, TAK19, TAK20 จาก จ.ระยอง และ จ. ตาก ที่แยกได้จากส่วนของลำต้นและหัว โคโลนีของเชื้อรามีลักษณะ เริ่มแรกเส้นใยมีสีขาวฟูเล็กน้อย เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีดำมีการสร้าง arthoroconidia ที่มีลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นลูกโซ่ มีสีเข้ม conidia ระยะอ่อนเซลล์เดียวใสไม่มีสี แต่ต่อมาจะมีการสร้างผนังกันแบ่งเป็น 2 เซลล์โดยเซลล์ตรงกลางทึบสีน้ำตาล หัวท้ายใส ผนังจะหนาและเหนียวขึ้น มีขนาด 5.4-10.7 × 2.25-4.75 ไมครอน ซึ่งจากการศึกษาของ (Machado, 2014) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า condidia มีขนาด 8-12 × 4-5 ไมครอน เชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท จำแนกได้เป็นเชื้อรา *N. hyalinum* (Figure 1) ซึ่งจากการศึกษาของ (สุทธิสา, 2558) ที่แยกเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. จากโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังและได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า conidia ขนาดเล็ก มีลักษณะ 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีสีเข้ม หัวท้าย แหลม ซึ่งเมื่อแยกเชื้อราแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบโคโลนีสีดำ สร้าง สปอร์เรียงต่อกัน และได้รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้ คือ *N. hyalinum* สาเหตุของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง

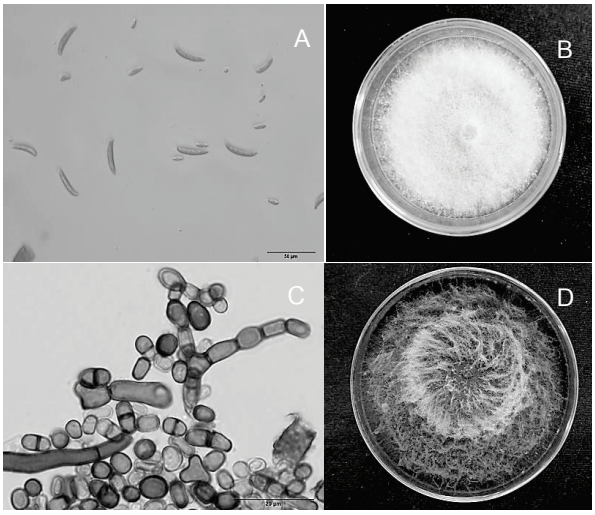

Figure 1 Morphological characteristics of colony and conidia of *F.solani* (A, B), *N. hyalinum* (C, D)

2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา ด้วยเทคนิค ISSR

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR ของเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* โดยจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) ของเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* จีนัสละ 4 ไอโซเลท ที่นำมาคัดเลือกไพรเมอร์จากทั้งหมด 13 ไพรเมอร์ ได้จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ P_4: GCG(CGA), P_5: AAT$(CGA)_5$, P_6: ATC$(CGA)_5$, GTG$(CGA)_5$, และ $(CGA)_5$ ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์เชื้อราทั้งสองชนิด และมีไพรเมอร์ที่ต่างกันจำนวน 1 ไพรเมอร์คือ $(CAG)_5$ สำหรับเชื้อรา *F. solani* และ P_3: GTG(CGA) สำหรับเชื้อรา *N. hyalinum* จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าเชื้อรา *N. hyalinum* จำนวน 8 ไอโซเลท (RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17,TAK18, TAK19, TAK20) ขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 400-1,500 คู่เบสในแต่ละไพรเมอร์ ในขณะที่เชื้อรา F. *solani* จำนวน 5 ไอโซเลท (RYG1, RYG2, RYG3, RYG4, TAK14) มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-1,500 คู่เบส และมีเชื้อรา *Fusarium* spp.จำนวน 2 ไอโซเลต เป็น out group ได้แก่เชื้อรา *F. solani* จำนวน 1 ไอโซเลท (F21) และ *F. incarnatum* จำนวน 2 ไอโซเลท (F6 และ F7) และมีเชื้อราต่างจีนัสคือ C. *lunata* จำนวน 2 ไอโซเลท มาเป็น outgroup ด้วย เมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree (UPGMA) ขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 400-1,500 คู่เบสในแต่ละไพรเมอร์ในขณะที่เชื้อรา *F. solani* จำนวน 5 ไอโซเลทต (RYG1, RYG2, RYG3, RYG4, TAK14) มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-1,500 คู่เบส และมีเชื้อรา Fusarium spp.จำนวน 2 ไอโซเลท เป็น out group ได้แก่เชื้อรา *F. solani* จำนวน 1 ไอโซเลต (F21) และ *F. incarnatum* จำนวน 2 ไอโซเลท (F6 และ F7) และมีเชื้อราต่างจีนัสคือ *C. lunata* จำนวน 2 ไอโซเลท มาเป็น outgroup ด้วย เมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree (UPGMA)

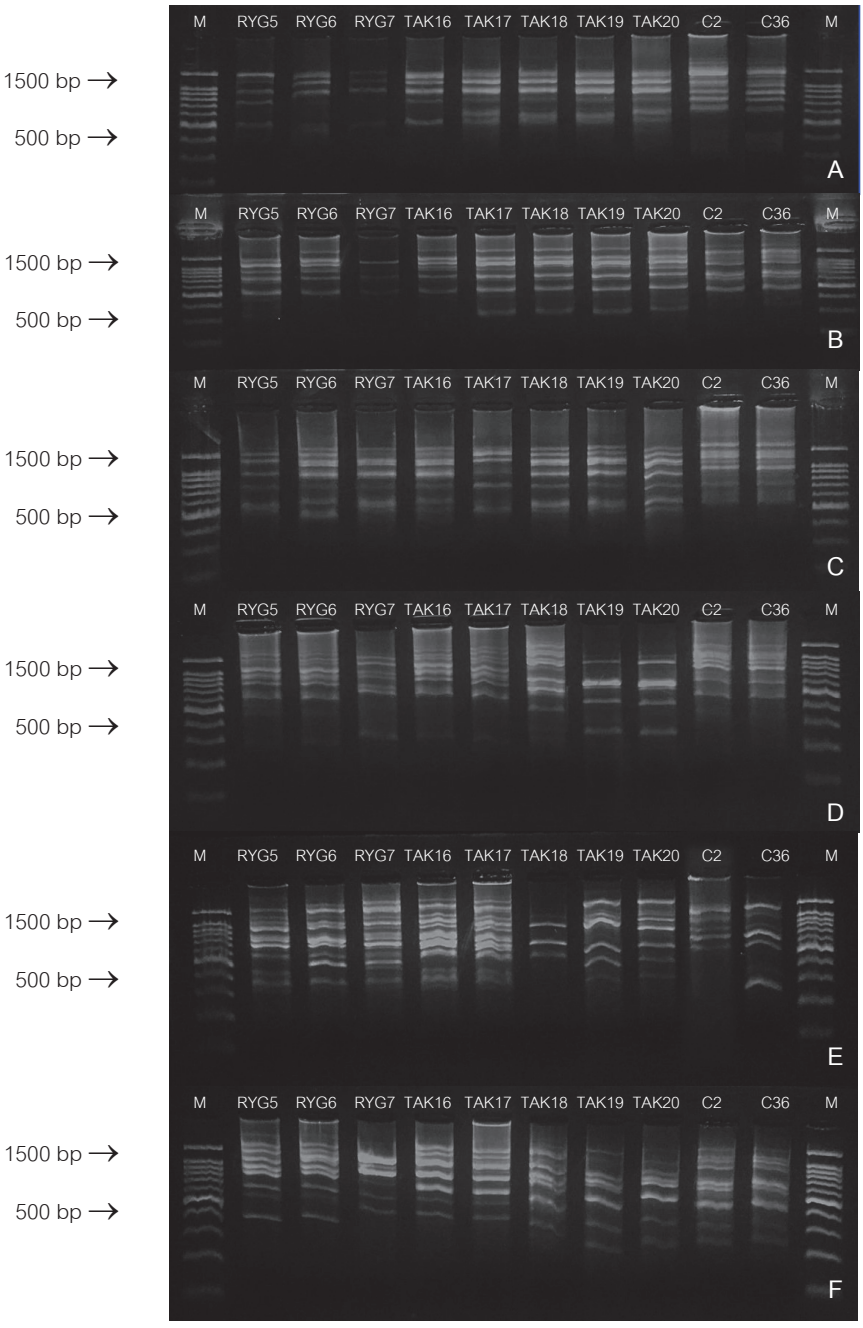

Figure 2 ISSR fingerprinting profile of *N. hyalinum* (A-C) and *F. solani* (D-F) generated by using primer (A): P_5: AAT$(CGA)_5$, (B): GTG$(CGA)_5$, (C): $(CAG)_5$, (D): $(CAG)_5$, (E): P_6: ATC$(CGA)_5$, (F): GTG$(CGA)_5$ and M:Marker(100bp DNA ladder)

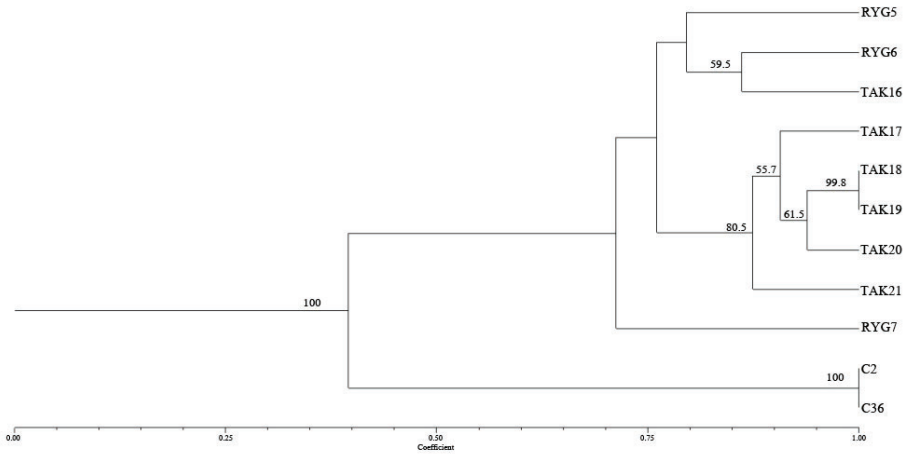

Figure 3 UPGMA tree obtained from ISSR fingerprint analysis of *N. hyalinum* using Jaccard similarity and UPGMA clustering method in NTsys program. The numbers on branch indicated the bootstrap value (1,000 replications) : RYG (Rayong province), TAK (Tak province)

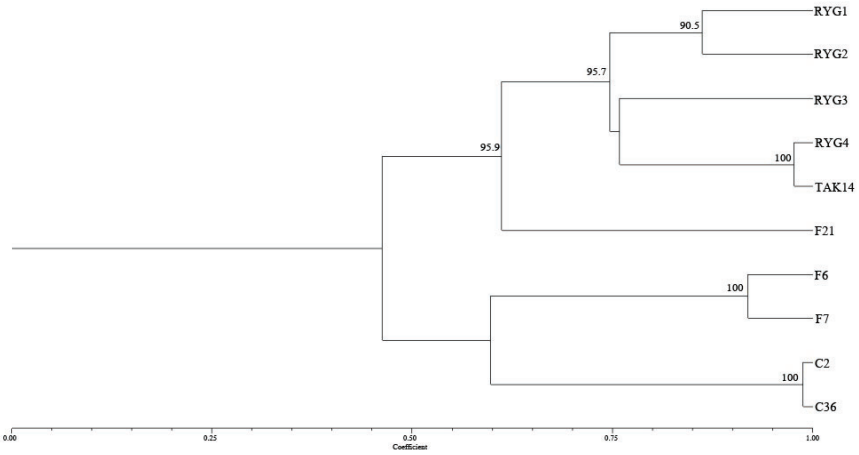

Figure 4 UPGMA tree obtained from ISSR fingerprint analysis of *F. solani* using Jaccard similarity and UPGMA clustering method in NTsys program. The numbers on branch indicated the bootstrap value (1,000 replications): RYG (Rayong province), TAK (Tak province)

3. การทดสอบการก่อโรค

จากการทดสอบโรคบนท่อนมันสำปะหลังจำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ CM125-22, CM407-30, CM32-99-22, CM40490J, CM6125-117, CMH22-04-1, CMR23-107-4, SMH22-03-1, Sriracha1, ระยอง 86-13, KU50, ระยอง 7 และ ระยอง 72 โดยการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา 2 ชนิด ๆ ละ 2 ไอโซเลต ได้แก่ F. *solani* (RYG2,TAK14) และ *N. hyalinum* (RYG5, TAK19) หลังจากปลูกเชื้อลงบนท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง 45 วัน ผ่าตามแนวยาวบริเวณกลางชิ้นวุ้นที่ทำการปลูกเชื้อ พบว่า ลักษณะอาการของโรคบนท่อนพันธุ์ที่ปลูกเชื้อ *F. solani* บนท่อนพันธุ์เมื่อผ่าดูภายในบริเวณที่ปลูกเชื้อเนื่อเยื่อตายแห้ง แผลมีสีน้ำตาลและมีสีดำปนอยู่ด้วย กลิ่นเหมือนไม้แห้ง ส่วนลักษณะอาการของเชื้อ *N. hyalinum* บนท่อนพันธุ์เมื่อผ่าดูภายในบริเวณที่ปลูกเชื้อเป็นแผลสีดำตามเนื้อไม้ (Figure 5) เมื่อประเมินโรคและวิเคราะห์ดัชนีการเกิดโรคบนท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง 13 พันธุ์ พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลททำให้เกิดความรุนแรงหรือมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคที่แตกต่างกัน โดยเชื้อราเชื้อ *F. solani* มีดัชนีการเกิดโรคสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์บนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR23-117-4 เมื่อปลูกเชื้อด้วย ไอโซเลต RYG2 และพันธุ์ที่มีดัชนีการเกิดโรคต่ำสุดคือ KU50 และ ระยอง 72 มีดัชนีการเกิดโรค 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกเชื้อราด้วยไอโซเลท RYG2 และ TAK14 สำหรับการทดสอบโรคด้วยเชื้อรา *N. hyalinum* มีดัชนีการเกิดโรคสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์บนมันสำปะหลังพันธุ์ CM125-22 และ CM4049UJ เมื่อปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท TAK19 ในขณะที่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 มีดัชนีการเกิดโรคต่ำสุด 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท RYG5 และ TAK19 ดังนั้นพันธุ์ระยอง 72 มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิดที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 4 ไอโซเลท ในขณะที่พันธุ์ KU50 ที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *F.solani* แต่ค่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อรา *N.hyalinum* เมื่อเปรียบเทียบการประเมินโรคและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราที่ศึกษาทั้ง 2 ชนิดรวม 4 ไอโซเลตนี้ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อราทั้งทางด้านการก่อให้เกิดโรคและทางพันธุกรรม สำหรับการศึกษาการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำและเน่าแห้งที่เกิดจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นการคัดเลือกพันธุ์เบื้องต้นและทราบพันธุ์มันสำปะหลังที่จะนำมาใช้เป็นพันธุ์เทียบที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอสำหรับการคัดเลือกพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้

Table 2 Disease index of dry rot and black rot diseases caused by F. solani และ N. hyalinum on 13 cultivars of cassava

Cultivars / Isolates	*F. solani* (RYG2)	*F. solani* (TAK14)	*N. hyalinum* (RYG5)	*N. hyalinum* (TAK19)	Control
KU 50	20	20	40	60	33
Rayong 89-13	73	20	93	93	46
Rayong 72	20	20	20	20	20
Rayong 7	40	93	40	40	40
CM4049UJ	86	80	73	100	73
CM32-99-22	46	66	66	66	46
CM125-22	20	80	40	100	20
CM407-30	20	46	40	46	33
CM6125-117	86	20	73	40	20
SMH22-03-1	26	40	53	80	46
CMH22-04-1Q	66	20	80	53	80
CMR23-117-4	93	73	60	86	80
Sriracha1	66	40	66	40	80

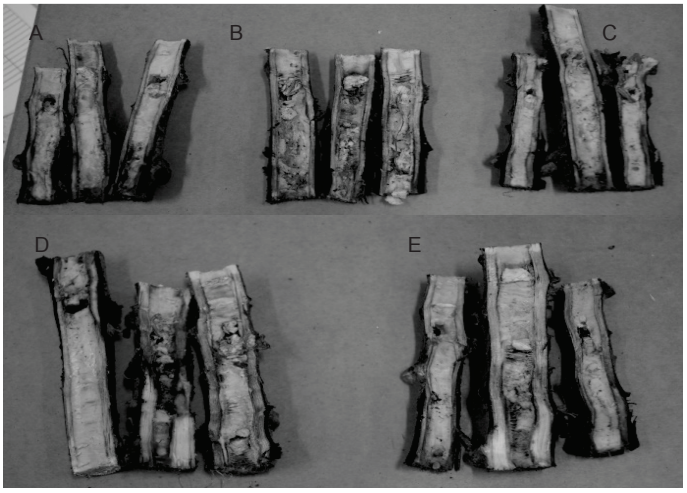

Figure 4 Symptoms of cassava after 45 days inoculation (A, B): Symptoms of black rot disease caused by *N. hyalinum*, (C, D): Symptoms of dry rot disease caused by *F. solani and* (E): Control

วิจารณ์

จากการศึกษาโรคเน่าแห้งและเน่าดำจากแหล่งปลูกที่สำคัญสามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุได้ 2 ชนิด ได้แก่ *N. hyalinum* และ *F. solani* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้เกิดอาการที่แตกต่างกัน การทดสอบการก่อโรคและการประเมินโรคพบว่าพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคน้อยที่สุดคือพันธุ์ระยอง 72 เมื่อปลูกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีรายงานของ วารีย์และคณะ (2016) ได้ทดสอบการก่อโรคบนพันธุ์มันสำปะหลัง 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 72 และ ห้วยบง 60 พบว่าพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การก่อโรคน้อยที่สุดและรองลงมาคือ พันธุ์ระยอง 72 จากการศึกษาของ Banito และคณะ (2010) รายงานว่า ความสามารถในการก่อโรครากและลำต้นเน่ามันสำปะหลังในประเทศโตโกเชื้อราที่เข้าทำลายบริเวณท่อนพันธุ์และหัวมันสำปะหลังที่รุนแรงที่สุด คือ เชื้อรา *L. theobromaec* และ *Fusarium* spp. ตามลำดับ ซึ่งเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* เป็นสาเหตุของโรคเน่าแห้งและเน่าดำของมันสำปะหลังสอดคล้องกับรายงานของต่างประเทศที่พบว่าโรคนี้มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศและมีเชื้อราสาเหตุโรคมากกว่าหนึ่งชนิด Msikita et al., (2005) รายงานว่าโรคหัวและต้นเน่าของมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อ *N. hyalinum* ซึ่งพบมากที่สุดในฤดูร้อนและฤดูฝน ส่วนเชื้อรา *Fusarium* spp. พบเข้าทำลายมากสุดในฤดูฝน สำหรับในประเทศไทย ณัฐธิญา (2555) รายงานว่าโรคต้นและรากเน่าของมันสำปะหลังมีเชื้อราสาเหตุหลายชนิดประกอบด้วย *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp., *Fusarium* spp. สำหรับการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR ของเชื้อราทั้งสองชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นความหลากหลายของเชื้อรากล่าวคือเชื้อราจากพื้นที่เดียวกันมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ขณะเดียวกันเชื้อราที่มาจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์มีความเหมือนกัน สำหรับการใช้เครื่องหมาย ISSR นั้นมีรายงานการใช้วิเคราะห์เชื้อราในกลุ่มนี้มาแล้ว เช่น Zhou และ คณะ (2001) ได้ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการจัดกลุ่มเชื้อในจีนัส Botryosphaeriaceae พบว่า เชื้อรา *B. dothidea* แยกออกจากเชื้อรา *N. ribis* ได้อย่างชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างของ *N. luteum*, *N. parvum* และ *N. ribis* สำหรับการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมาย ISSR เปรียบเทียบกับฟีโนไทป์ที่เป็นลักษณะการก่อให้เกิดโรค (pathogenicity) บนมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีความหลากหลายของการเกิดโรคหรือดัชนีการเกิดโรคที่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยจีโนไทป์ ไอโซเลทที่มีความแตกต่างของจีโนไทป์ มีการก่อให้เกิดโรคที่แตกต่าง

สรุป

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางจีโนไทป์ของเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมและพบว่ามีสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกันมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามแม้การศึกษาครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างเชื้อราหรือพื้นที่ของการเก็บตัวอย่างน้อย แต่เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณาเลือกแหล่งพันธุกรรมของเชื้อราสำหรับการประเมินโรค ซึ่งจากผลการประเมินโรคเน่าแห้งและเน่าดำบนมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 13 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ระยอง 72 มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิด 4 ไอโซเลต ในขณะที่พันธุ์ KU50 ที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *F. solani* แต่ค่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อรา *N. hyalinum* นอกจากนี้ผลการปลูกเชื้อราทดสอบโรคบนพันธุ์ต่าง ๆ แสดงให้เห็นความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันเมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อราไอโซเลตต่างๆ ซึ่งเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา และพันธุ์มันสำปะหลัง

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 และขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ. 2555. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังด้วยเทคนิค IR. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. เนื้อที่ปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ปี 2560-2561. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=25667&filename=news.

ศานิต สวัสดิกาญจน์. 2557. มันสำปะหลังในพืชอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. 1-162 หน้า

สุทธิสา ดัชนีย์. 2558. การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยสุรนารี. 45-47 หน้า

ไพบูลย์ ฟูวัฒน์ศิลป์. 2551. การเพาะปลูกมันสำปะหลังไทยในปี 2552. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.ktb.co.th/ktb/Download/economyresources/EconomyResources

วารีย์ ทองมี เมธาพร พุฒขาว ธรรมรัตน์ ทองมี รังษี เจริญสถาพร เสาวลักษณ์ บันเทิงสุข อรทัย วรสุทธิ์พิศาล วัลลีย์ อมรพล และภานุวัฒน์ มูลจันทะ. 2559. การทดสอบพันธุ์มันสำปะหลังในแปลงเกษตรกรที่มีการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหา โรคโคนเน่าหัวเน่า อำเภอ อรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว. Thai Agricultural Research Journal 34(2) : 125-133.

Banito, A., K. E. Kpemoua, B. Bissang, and K. Wydra. 2010. Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of Togo and evalution of the pathogen virulence. Pak. J. Bot. 42(3): 2059-2068.

Choi, Y.W., K. D. Hyde, and W. H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Divers.3: 29-38.

Dolar, F. and H. Bayrktar. 2010. Molecular identification and genetic diversity of fusarium species associated with onion fields in turkey. Journal of Plant Pathology 28-34.

Friedmann, M., M. Lepidot., S. Cohen, and M. Pilowsky. 1998. A novel source of resistance to tomato yellow leaf cure virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. J. Am. Soc. Hortic. Sci.123 : 1004-1007.

Machado, A.R. 2012. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of Lasiodiplodia. M.S. thesis. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa.

Machado, A.R., D.B. Pinho, O.L. Pereira. 2014. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant Jatropha curcas in Barzil, with a description of new species of Lasiodiplodia. Fungal Diversity 67:231-247.

Msikita, W., B. Bissang, B.D. James, H. Baimey, H.T. Wilkinson, M. Ahounou and R. Fagbemissi. 2005. Prevalence and severity of *Nattrassia mangiferae* root and stem rot pathogen of cassava In Bénin. Plant Disease Journal. 89: 12-16.

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS–pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York, USA

Yap, I. and R.J. Nelson. 1996. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPG MA-based dendrograms. IRRI discussion paper series 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Zhou. S., D.R. Smith and G.R. Stanosz. 2001. Differentiation of Botryosphaeria species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence repeat (ISSR) fingerprinting. Mycological Research 105:919–926.

Zhang.X.Y. 2014. First Report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* Causing Fusarium Dry Rot of Carrot in China. APS Journals. 1273 p.

Zimand. G, L. Valinsky. and Y. Elad .1994. Use of the RAPD procedure for the identification of Trichoderma strains. Mycology Research 98:531-534.