วารสารแก่นเกษตร

Khon Kaen Agriculture Journal SUPPL.
Agricultural Conference
Journal Home Page : https://ag2.kku.ac.th/kaj

JOURNAL KAJ

การระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำและโรคเน่าแดงในอ้อยโดยลักษณะสัณฐานวิทยาและวิธีอณูชีววิทยาและการพัฒนาการประเมินการเกิดโรคที่รวดเร็ว

Identification of *Sporisorium scitamineum* and *Colletotrichum falcatum* in sugarcane by morphology and molecular technique and rapid evaluation of pathogenicity test

วีรกรณ์ แสงไสย์[1]*, เบญจวรรณ รัตวัตร์[1] และ รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์[2]

Weerakorn Saengsai[1]*, Benjawan Ruttawat[1] and Raweewan Chuekittisak[2]

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
[1] Khon Kaen Field Crop Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Muang, Khon Kaen
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานีสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี
[2] Ubon Ratchathani Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Sawangweerawong, Ubon Ratchathani

บทคัดย่อ: โรคแส้ดำและโรคเน่าแดง ทั้งสองโรคมีการระบาดรุนแรงในระบบการผลิตอ้อยของประเทศไทย วัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อสำรวจจำแนกชนิดเชื้อ พร้อมใช้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยโรคและวิธีการทดสอบการเกิดโรคที่รวดเร็วและแม่นยำ ผลการทดลองพบว่าโรคแส้ดำแยกเชื้อได้ จำนวน 8 ไอโซเลต ผลการบ่งชี้ด้วยเทคนิค PCR เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Sporisorium scitamineum* ดีเอ็นเอขนาด 459 bp การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับข้อมูล KU991107.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 98 % โรคเหี่ยวเน่าแดงแยกเชื้อได้ จำนวน 5 ไอโซเลต ผลการบ่งชี้ด้วยเทคนิค PCR เชื้อรา *Colletotrichum falcatum* ดีเอ็นเอขนาด 590 bp มีความคล้ายคลึงกับข้อมูล FJ907431 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 99 % ซึ่งผลสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยา ผลการเกิดโรคแส้ดำอ้อยสายพันธุ์ Marcos และ LK92-11 พบเชื้อไอโซเลต 1 มีความรุนแรง โดยอ้อยพันธุ์ Marcos มีการเกิดโรคมากที่สุดถึง 100 % โดยอ้อยสายพันธุ์ LK92-11 มีอาการแส้ดำที่ 30 วันหลังงอกที่ยอดมีการเกิดโรค 58 % ผลการเกิดโรคเหี่ยวเน่าแดงด้วยวิธี detached leaf เชื้อไอโซเลต 2 ที่มีความรุนแรงมากที่สุด โดยอ้อยพันธุ์อีเหี่ยวมีการเกิดโรคมากที่สุดมีขนาดแผลเฉลี่ย 15.51 cm โดยอ้อยสายพันธุ์ KK12R-076 มีการเกิดโรคขนาดแผลเฉลี่ย 3.27 cm ที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ

คำสำคัญ: โรคแส้ดำ; เหี่ยวเน่าแดง; เชื้อรา; สัณฐานวิทยา; อนูชีววิทยา

ABSTRACT: Smut disease and red rot disease in sugarcane caused by *Sporisorium scitamineum* and *Colletotrichum falcatum* are severely infested sugarcane production in Thailand. The aim of this study to survey and identify the severe smut and red rot disease by techniques that are effective in pathogenicity test that are rapid and accurate. The collected samples of sugarcane disease from various locations smut disease was found to be caused by fungi in sugarcane plantation isolated 8 isolates. The results of the PCR identification of DNA fragments of *S. scitamineum* showing a 459 bp. The nucleotide sequence analysis was 98 % similar to the KU991107.1 data in the NCBI database. The red rot showed DNA fragments of *C. falcatum* showing a 590 bp. The nucleotide sequence analysis was 99 % similar to the FJ907431 data in the NCBI database. The results of the smut disease incidence test with Marcos and LK92-11, *S. scitamineum* isolate 1 was virulent. Marcos showed the most disease incidence up to 100 %, LK92-11 had black whips at 30 days after germination, with 58 % of the disease incidence. The results of the red rot disease in KK12R-076 and E-Hieo, *C. falcatum* isolate 2 is the most virulent, E-Hieo at 7 dai the most incidence of disease had an average lesion size of 15.51 cm and KK12R-076 was 3.27 cm.

Keywords: Smut; red rot; fungi; morphology; molecular

* Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

บทนำ

โรคแส้ดำของอ้อยเกิดจากเชื้อรา *Sporisorium scitamineum* เป็นโรคที่พบทั่วไปในทุกแหล่งปลูกอ้อย ลักษณะอาการของโรคที่ยอดอ้อยจะเปลี่ยนเป็นแส้ยาวสีดำ ทำให้หยุดการเจริญและแตกตาข้างมาก มีอาการรุนแรงอ้อยจะแคระแกรน แตกกอฝอย และตายในที่สุด ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงโดยตรงและยังทำให้ความสามารถในการไว้ตอ ความเสียหายผลผลิตเนื่องจากโรคนี้จะผันแปรไปตามระดับความต้านทานโรค ของพันธุ์อ้อย ซึ่งจะท้าให้ความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไป โรคแส้ดำสามารถแพร่ไปกับท่อนพันธุ์อ้อย และสปอร์สาเหตุยังสามารถปลิวไปตามลมได้ (สุนี และคณะ 2558) พันธุ์อ้อยที่อ่อนแอต่อโรคจะสูญเสียผลผลิตได้ถึง 24.64 เปอร์เซ็นต์ (Rajesh et al., 2003) Yan et al. (2015) ได้ทดสอบการเกิดโรคแส้ดำจากเชื้อ *S. scitamineum* โดยฉีดสปอร์ที่เป็น mating-type Locus b ในต้นกล้าอ้อยพันธุ์ ROC22 ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า ต้นอ้อยแสดงอาการแส้ดำหลังปลูกเชื้อ 90 วัน หลังได้รับเชื้อไอโซเลต MAT-1 and MAT-2 Su et al. (2016) ได้คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคแส้ดำในสภาพห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 สายพันธุ์อ้อย ทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคและการต้านทานต่อโรคแส้ดำ ปลูกเชื้อโรควิธีการจุ่มข้ออ้อยในสารแขวนลอยสปอร์ นาน 10 นาที แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เมื่อต้นอ้อยงอกได้ขนาด 2 เซนติเมตร นำมาบ่มในห้องปฏิบัติการโดยให้แสง 16 ชั่วโมง พบว่า ที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ พบปริมาณเชื้อมากที่สุดในพันธุ์ที่อ่อนแอ โรคเหี่ยวเน่าแดงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* ที่สามารถเข้าทำลายอ้อยทางรอยแผล และทางรอยเปิดตามธรรมชาติของ อ้อย และเชื้อ *Fusarium moniliforme* ซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน และเข้าทำลายอ้อยทางรากและโคนต้นของอ้อย ทำให้อ้อยมีอาการเหลือง และยืนต้นตายในที่สุด โรคเหี่ยวเน่าแดงสามารถแพร่ระบาดทางท่อนพันธุ์ ทำให้มีการแพร่กระจายสู่พื้นที่อื่นได้ง่าย เนื่องจากการเคลื่อนย้ายพันธุ์ข้ามพื้นที่ (อัปสร และคณะ, 2536) กนกวรรณและคณะ 2561 ทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานของอ้อยต่อโรคเหี่ยวเน่าแดงในต้นกล้าอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย 20 สายพันธุ์ นำอ้อยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะออกราก มาแยกปลูกในถาดหลุมเพาะ เป็นเวลา 1 เดือน ปลูกเชื้อด้วยวิธีการทำแผลที่ใบที่ 1 และ 2 ของอ้อยโดยใช้ผง Carborandum ทำการปลูกเชื้อ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่มีลักษณะเป็น Spores suspension ที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิว (tween80 ความเข้มข้น 1%) จำนวน 500 ไมโครลิตร หยดลงบนใบอ้อยที่เป็นแผล หลังจากปลูกเชื้อ 1 เดือน ประเมินการเกิดโรควัดความยาวแผล ความกว้างแผล สีที่เกิดขึ้นบริเวณแผล และอาการของอ้อยอย่างละเอียด ทำการประเมินความรุนแรงของโรคจากอาการของอ้อยโดยใช้จำนวนวันที่อ้อยเริ่มมีอาการ จนกระทั่งอ้อยตายครบทั้งหมดในแต่ละพันธุ์ Wang et al. (2017) ได้คิดค้นวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพกกระบอกและคัดเลือกอ้อยพันธุ์ต้านทานต่อโรคในอ้อย 88 สายพันธุ์ ได้ประเมินการปลูกเชื้อ 4 วิธีการที่แตกต่างกัน ได้แก่ Syringe Inoculation การฉีดสารแขวนลอยสปอร์เข้าในลำต้นกล้า Spindle Inoculation การหยอดสารแขวนลอยสปอร์ในใบอ่อน Sett Dip Inoculation การจุมลำต้นกล้าในสารแขวนลอยสปอร์ และ Detached Leaf Assay Inoculation การทำแผลบนใบและปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ จากการทดลองพบว่า การปลูกเชื้อด้วยวิธี Spindle Inoculation เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสามารถบ่งชี้ความอ่อนแอและความต้านทานของพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้ ปัญหาการระบาดของโรคอ้อยนับเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการผลิตอ้อยของเกษตรกรชาวไร่อ้อยในประเทศไทย มีโรคและแมลงศัตรูพืชหลายชนิดที่เข้าทำลายอ้อย บางชนิดสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงต่ออุตสาหกรรมอ้อยไทย โรคบางชนิดสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ ทำให้เกิดปัญหาการระบาดอย่างกว้างขวาง รวดเร็ว ซึ่งความรุนแรงขึ้นกับชนิดของโรค สภาพแวดล้อม และสภาพภูมิอากาศ การลดความสูญเสียจากการระบาดของศัตรูพืชเหล่านั้น ในประเทศไทยดำเนินการตามประเด็นหลัก 3 ประการ ได้แก่ 1) ควบคุมการแพร่ระบาดโดยการป้องกันและกำจัด 2) ใช้พันธุ์สะอาด และ 3) ใช้พันธุ์ทนทาน ซึ่งบางชนิดมีพันธุ์ทนโรคที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น โรคแส้ดำ และเหี่ยวเน่าแดง การทดสอบการทนโรคสำคัญในอ้อยเป็นข้อกำหนดหนึ่งของกรมวิชาการเกษตรในการรับรองพันธุ์พืช แต่ในการทดสอบนี้มีปัญหาด้านการปฏิบัติที่ขาดประสิทธิภาพ ที่เกิดจากวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งมักเกิดปัญหาความแปรปรวนของผลการทดลอง ความจำกัดของพื้นที่ทดลอง ความสม่ำเสมอของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ฤดูกาลที่ส่งผลต่อการทดสอบ ระยะเวลาในการทดสอบที่ค่อนข้างนานหลายเดือน และที่สำคัญคือเกิดปัญหาการสะสมของเชื้อในสภาพแวดล้อมจากการที่นักวิจัยขาดการดูแลใส่ใจด้านสุขอนามัยในแปลงทดสอบ ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้พันธุ์อ้อยเพียง 2 พันธุ์ได้แก่ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ซึ่งมีความทนทานต่อโรคในระดับปานกลางจึงมีความเสี่ยงต่อการเข้าทำลายของโรคนี้หากสภาพแวดล้อมชักนำให้พืชเกิดการอ่อนแอและติดโรคง่ายขึ้น การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคนั้นมักจะมีหลายขั้นตอนและค่อนข้าง

ยุ่งยากในการเตรียมพืชสำหรับวิธีการเดิมคือการแช่ท่อนพันธุ์ต้องทดสอบในต้นอ้อยอายุ 6 เดือน และเช็คผลการเกิดโรค 2 เดือนหลังปลูกเชื้อรวมระยะเวลากว่า 8 เดือน ค่อนข้างนานดังนั้น การศึกษาในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำและโรคเน่าแดง พร้อมใช้เทคนิคและนวัตกรรมที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรค และวิธีการทดสอบการก่อโรคที่สำคัญในอ้อยมุ่งประเด็นการแก้ปัญหาในด้านวิธีการตรวจและวิธีทดสอบการเกิดโรคที่ขาดประสิทธิภาพของโรคแส้ดำและโรคเน่าแดง โดยการประยุกต์วิธีการใหม่ที่ทำให้การตรวจ และทดสอบมีความแม่นยำมากขึ้น สามารถดำเนินการทดสอบได้โดยไม่มีข้อจำกัด และไม่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อม การจำแนกเชื้อและทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคที่รวดเร็วของเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำและโรคเน่าแดงของอ้อยในสภาพควบคุม มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ และศึกษาปฏิกิริยาการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยวิธีการปลูกเชื้อที่รวดเร็วเพื่อลดระยะเวลาและพัฒนาให้วิธีที่ง่ายขึ้น

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อและจำแนกชนิดเชื้อราด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคเหี่ยวเน่าแดงจากการสำรวจจากแปลงปลูกของเกษตรกรในแหล่งปลูกต่างๆ ใน จ.ขอนแก่น นครราชสีมา อุดรธานี สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี สำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อย โรคแส้ดำที่แสดงอาการอ้อยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะสร้างส่วนของ sorus ที่มีลักษณะคล้ายแส้สีดำซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งจากยอดหรือตาข้างของลำต้น และโรคเหี่ยวเน่าแดงที่มีอาการเหี่ยวฉับพลัน ใบกาบใบ และลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง จากแปลงปลูกของเกษตรกรในแหล่งปลูกต่างๆ แยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องและตรวจสอบลักษณะสัณฐาน เช่น ลักษณะโคโลนี เส้นใย และสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ระบุชนิดเชื้อราด้วยอนูชีววิทยา

สกัดดีเอ็นเอ: โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Dnaeasy plant mini kit (Qiagen) ซึ่งประกอบด้วย การบดส่วนต่าง ๆ ของเชื้อราด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายส่วนที่ได้ไปยัง microtube 1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ AP1 400 ไมโครลิตร และ RNase A 4 ไมโครลิตร ปั่นและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AP2 130 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน QIAshredder Mini Spin Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm/นาทีนาน 2 นาทีย้ายส่วนใสใส่ใน microtube ใหม่ จากนั้นเติม 1.5 เท่าบัฟเฟอร์ AP3/E ผสมเบา ๆ ด้วยปิเปต ใส่ใน DNeasy Mini Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm/นาทีนาน 1 นาที ย้าย DNeasy Mini Spin Column ไปใส่ใน Collection tube ใหม่และเติมบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm/นาทีนาน 1 นาทีจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร ใน DNeasy Mini Spin Column อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm/นาทีนาน 2 นาที ย้ายส่วนของ DNeasy Mini Spin Column ใส่ใน microtube ใหม่ เติม บัฟเฟอร์ AE (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm/นาที นาน 1 นาที ทำซ้ำโดยการเตรียมบัฟเฟอร์ AE (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm/นาที นาน 1 นาที ได้ดีเอ็นเอ เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI

การตรวจเชื้อราด้วยเทคนิคพีซีอาร์: ปฏิกิริยา PCR ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำ มีส่วนประกอบดังนี้ DNA (เจือจาง 50 นาโนกรัม) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร 10X Taq reaction buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 10 µM forward primer ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 10µM reverse primer ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร (Smut-Forward 5’CGC TCT GGT TCA TCA ACG 3’ / Smut- Reverse 5’TGC TGT CGA TGG AAG GTG T3’) 2.5 mM dNTP ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.9 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Fermentas) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.7 ไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมจำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 58 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ปฏิกิริยา PCR ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดงมีส่วนประกอบดังนี้ DNA (เจือจาง 50 นาโนกรัม) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร 10X Taq reaction buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 10 µM forward primer ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 10µM reverse primer ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร (Coll-Forward 5’GCC GTA GGT GAA

CCT GCG G3'/ Coll- Reverse 5'GCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') 2.5 mM dNTP ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Fermentas) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.1 ไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมจำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 58 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ย้อมดูผลด้วยสี SYBR Gold และบันทึกผลภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพดีเอ็นเอ (Gel Documentation) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดำเนินการโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น สกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยสกัดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป GF-1 AmpbiClean Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI จัดเรียงและสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Molecular Evolutionary Genetics Analysis; MEGA ver. 5.0 software ในรูปแบบ neighbor-joining method

ทดสอบการเกิดโรค

โรคแส้ดำ: ทดสอบการเกิดโรคในใบอ้อยโดยนำสปอร์เชื้อรา *S. scitamineum* ในระยะ Teleospore ทดสอบกับอ้อย 2 สายพันธุ์ประกอบด้วยอ้อยพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Marcos และ พันธุ์ LK92-11 โดยอ้อยพันธุ์ Marcos สำหรับตรวจสอบความอ่อนแอ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี ๆ 20 ซ้ำ ดังนี้ 1) อ้อยพันธุ์ Marcos ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 1 2) อ้อยพันธุ์ Marcos ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 2 3) อ้อยพันธุ์ Marcos ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 3 4) อ้อยพันธุ์ Marcos mock inoculation เป็นกรรมวิธีควบคุม 5) อ้อยพันธุ์ LK92-11 ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 1 6) อ้อยพันธุ์ LK92-11 ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 2 7) อ้อยพันธุ์ LK92-11 ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 3 8) อ้อยพันธุ์ LK92-11 mock inoculation เป็นกรรมวิธีควบคุม ปลูกเชื้อสาเหตุโรควิธีการแช่สารแขวนสปอร์ ความเข้มข้น $1x10^6$ spore/ml แช่ในข้อตาขนาด 5-8 เซนติเมตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเพาะปลูกในถาดหลุมที่มีดินผ่านการอบฆ่าเชื้อ กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแส้ดำที่ 30 วันหลังงอก

โรคเหี่ยวเน่าแดง: ทดสอบการเกิดโรคในใบอ้อยโดยนำเชื้อรา *C. falcatum* ที่เจริญบนอาหาร PDA ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำมาทดสอบกับอ้อย 2 สายพันธุ์ประกอบด้วยอ้อยพันธุ์ ได้แก่ KK12R-076 และอีเหี่ยว โดยใช้พันธุ์อีเหี่ยวตรวจสอบความอ่อนแอ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี ๆ 20 ซ้ำ ดังนี้ 1) อ้อยพันธุ์ KK12R-076 ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 2 2) อ้อยพันธุ์ KK12R-076 ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 3 4) อ้อยพันธุ์ KK12R-076 mock inoculation เป็นกรรมวิธีควบคุม 5)อ้อยพันธุ์อีเหี่ยว ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 2 6)อ้อยพันธุ์อีเหี่ยว ปลูกเชื้อไอโซเลตที่ 3 7) อ้อยพันธุ์อีเหี่ยว mock inoculation เป็นกรรมวิธีควบคุม ปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้ corkborer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญเติบโต แปะบนเส้นกลางใบที่ตำแหน่งกลางใบ กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ตัวอย่างบรรจุในกล่องพลาสติกใส บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความชื้น 85 เปอร์เซ็นต์ บันทึกอาการของโรคที่ 7 วัน วัดความยาวของแผลที่เกิดบนเส้นกลางใบ

ผลการศึกษา

การสำรวจและจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคอ้อย

ผลการสำรวจโรคอ้อยในแปลงของเกษตรกรในสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างอ้อยในปี 2565 บริเวณจังหวัดขอนแก่น นครราชสีมา อุดรธานี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และกำแพงเพชร **(Table 1)** นำตัวอย่างอ้อยที่มีอาการสาเหตุจากเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำ **(Figure 1)** นำมาแยกเชื้อเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถแยกเชื้อรา *S. scitamineum* ได้จำนวน 8 ไอโซเลต เชื้อรามีโคโลนีมีเส้นใยสีขาวขุ่นขอบผิวเป็นคลื่นเล็กน้อย **(Figure 2)** สปอร์ของเชื้อรามีลักษณะกลมสีน้ำตาล ผิวมีหนามเล็กน้อยอยู่โดยรอบ **(Figure 3)** สปอร์ที่งอกออกมามีลักษณะเป็นแท่งปลายมนจนถึงรูปไข่ สีใส ขนาด 9.9-19.2 x 1.9-3.4 ไมครอน ภายในเซลล์มี 1 นิวเคลียส และสร้าง promycelium เจริญต่อไปเป็นเส้นใย 3-4 เซลล์ **(Figure 3)** teliospore ของเชื้อจะมีลักษณะกลม (globose) จนถึงค้อนข้างกลม (subglobose) สีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ขอบสีน้ำตาล ผิวมีหนามเล็กๆงอกให้ promycelium ลักษณะเป็นแท่งปลายมีผนังแบ่งตามขวาง 2-4 เซลล์ **(Figure 4)** แต่ละเซลล์สามารถงอก basidiospores หรือ sporidia โดยงอกที่ปลายหรือด้านข้างเดี่ยว ๆ

หรือเป็นกลุ่ม sporidia เป็นแท่งปลายมนรูปไข โดย sporidia จะประกอบด้วย 2 mating type คือ mating type + และ – เจริญแบ่งเซลล์โดยการแตกหน่อ sporidia ที่มี mating type จากการสำรวจอาการอาการเหี่ยวฉับพลัน ใบ กาบใบ และลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง อ้อยยืนต้นตาย เมื่อผ่าดูภายในลำต้นพบว่าบริเวณปล้องมีเนื้อเยื่อเน่าสีน้ำตาล ไส้กลวงเป็นจุด ๆ **(Figure 5)** ผลการแยกเชื้อรา *C. falcatum* ได้จำนวน 5 ไอโซเลต เชื้อรามีโคโลนีสีขาวจนถึงสีเทาดำเมื่อพลิกดูลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีใต้อาหาร PDA จะพบการเจริญเติบโตเป็นวงซ้อนกัน **(Figure 6)** เส้นใยมีผนังกั้น conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (fusaroid) มีขนาด 24.3-28.5 x 2.3-3.8 ไมครอน **(Figure 7 and 8)**

Table 1 Sampling locations of smut and red rot diseases from sugarcane plantations

No.	Sampling location	Locality coordinating		Varieties	Diseases	
		Lat. (N)	Lon. (E)		Smut	Red rot
1	Muang, Khon Kaen	16.48290	102.8240	KK3	+	-
2	Kumphawapi, Udon Thani	17.05063	102.9443	KK3	+	-
3	Chakkarat, Nakhon Ratchasima	15.02632	102.5025	KK3	+	+
4	U Thong, Suphan buri	14.30207	99.86111	LK92-11	+	+
5	Tamaka, Kanchanaburi	13.91048	99.80961	LK92-11	+	+

*+ = found, - = not found

Figure 1 Mature smut whip on infected sugarcane.

Figure 2 Mycelium of *S. scitamineum* grow on PDA medium.

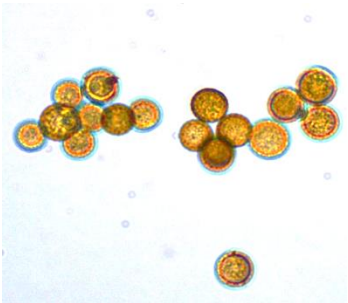

Figure 3 Smut teliospores scraped off from mature smut whip.

Figure 4 Smut haploid sporidia of *S. scitamineum* growth on PDA medium.

Figure 5 Mature symptom of red rot disease sugarcane stalk.

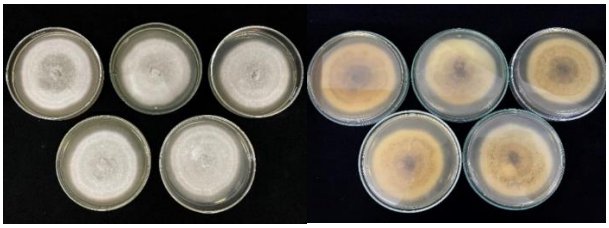

Figure 6 Cultural characters of *C. falcatum*

Figure 7 Morphology of *C. falcatum* Hyphae.

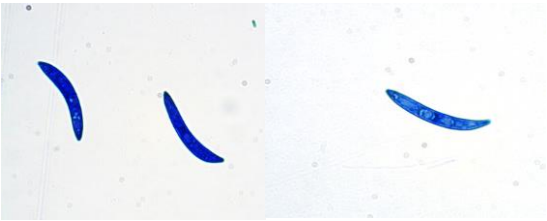

Figure 8 Morphology of *C. falcatum* conidia.

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี PCR

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเป้าหมายจำเพาะเจาะจง (Smut-Forward/Smut- Reverse) จากดีเอ็นเอเชื้อราด้วยวิธี PCR พบว่าเพิ่มปริมาณที่ขนาดนิวคลีโอไทด์ 459 คู่เบส (Figure 9) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการของเชื้อเชื้อ *S. scitamineum* ที่ตรวจพบในแต่ละจังหวัดมีความใกล้ชิดกันเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ KU991107.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ **(Figure 10)** ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเป้าหมายจำเพาะเจาะจง (Coll-F/Coll- R) จากดีเอ็นเอเชื้อราด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ (Coll-Forward / Coll- Reverse) พบว่า เชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ขนาดชิ้นยีน 590 คู่เบส **(Figure 11)** เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการของเชื้อ *Colletotrichum falcatum* ที่ตรวจพบในแต่ละจังหวัดมีความใกล้ชิดกันเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ FJ907431 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ **(Figure 12)**

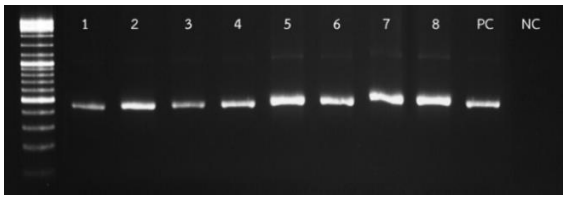

Figure 9 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction products from DNA of *Colletotrichum falcatum* isolates from sugarcane using specific primers: Lanes 1= 1000 bp molecular weight marker.

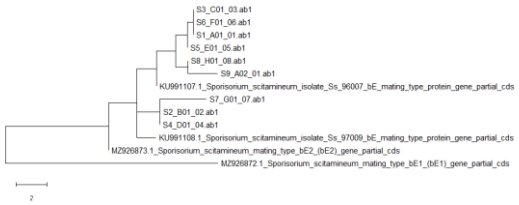

Figure 10 Neighbour-joining tree depicting relationships among *Sporisorium scitamineum* nodes are the frequency with which a cluster appears in a bootstrap test of 1,000 runs.

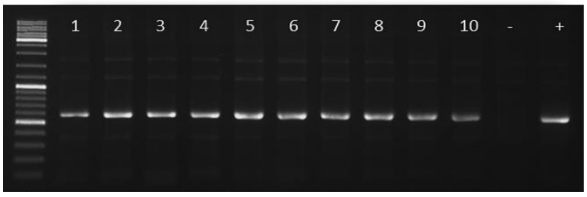

Figure 11 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction products from DNA of *C. falcatum* isolates from sugarcane using specific.

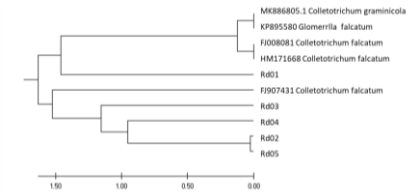

Figure 12 Neighbour-joining tree depicting relationships among *C. falcatum* nodes are the frequency with which a cluster appears in a bootstrap test of 1,000 runs.

การทดสอบการเกิดโรคในอ้อย

ผลทดสอบการเกิดโรคแส้ดำอ้อยโดยทดสอบโดยวิธีแช่ข้อตาอ้อยด้วยสารแขวนลอยสปอร์เชื้อ *S. scitamineum* ทดสอบในอ้อยสายพันธุ์ Marcos และ LK92-11 โดยนำเชื้อรา *S. scitamineum* ไอโซเลต 1 ไอโซเลต 2 และ ไอโซเลต 3 เพาะในถาดเพาะแล้วเช็คขนาดแผลจากการเกิดโรคที่ 30 วันหลังงอก พบว่า เชื้อ *S. scitamineum* ไอโซเลต 1 มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากที่สุดจากการปลูกเชื้อ เกิดแส้ดำส่วนยอดโดยอ้อยพันธุ์ Marcos แสดงอาการที่ 15 วันหลังปลูกเชื้อและมีการเกิดโรคมากที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอ้อยสายพันธุ์ LK92-11 แสดงอาการที่ 30 วัน มีลักษณะใบเหลืองและมีแส้ดำที่ 45 วันหลังงอก มีการเกิดโรค 58 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการทดสอบการเกิดโรคเหี่ยวเน่าแดงบนเส้นกลางใบอ้อยโดยทดสอบโดยวิธี detached leaf ทดสอบเบื้องต้นในอ้อย สายพันธุ์ KK12R-076 และอีเหี่ยว โดยนำเชื้อรา *C. falcatum* ไอโซเลต 2 และ ไอโซเลต 3 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ corkborer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญ แปะบนเส้นกลางใบที่ตำแหน่งโคนใบ กลางใบและปลายใบ แล้วเช็คขนาดแผลจากการเกิดโรคที่หนึ่งสัปดาห์ พบว่า เชื้อ *C. falcatum* ไอโซเลต 2 มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากที่สุดจากการปลูกเชื้อ เกิดแผลเป็นแผลสีน้ำตาลแดงบนเส้นกลางใบอ้อย โดยอ้อยพันธุ์อีเหี่ยว ที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อมีการเกิดโรคมากที่สุดมีขนาดแผลเฉลี่ย 15.51 เซนติเมตร โดยอ้อยสายพันธุ์ KK12R-076 มีการเกิดโรคขนาดแผลเฉลี่ย 3.27 เซนติเมตร **(Table 2) (Figure 13)** จากการทดสอบดังกล่าวจะนำไปทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคในอ้อยเพื่อหาพันธุ์ต้านทานหรือทนทานต่อไป

Table 2 Red rot lesion lengths at 7 days post inoculation of difference isolate of fungi and sugarcane variety in sugarcane leaves in detached leaf

Treatment/Varieties	7 days post inoculation (cm)	
	Isolate 2	Isolate 3
Mock inoculation		
KK12R-076	0.0c	0.0c
E-Hieo	0.0c	0.0c
Disease inoculation		
KK12R-076	3.27b	2.12b
E-Hieo	15.51a	12.06a
F-test	*	*
C.V. (%)	5.4	8.7

Means in the same column followed by common letters are not significant different at P=0.05 by DMRT.

Figure 13 Red rot lesion lengths on two sugarcane varieties leaves after 3 and 7days Inoculation.

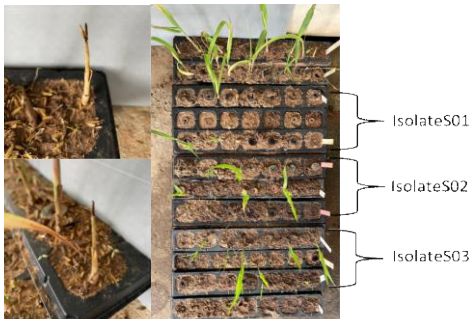

Figure 14 Smut whip on infected sugarcane at 30 days post inoculation of difference isolates of fungi and sugarcane varety.

Table 2 Percent smut whip at 30 days post inoculation of difference isolate of *S. scitamineum* and sugarcane variety in sugarcane bud

Treatment/Varieties	Percent smut whip at 30 dpi		
	Isolate 1	Isolate 2	Isolate 3
Mock inoculation			
Marcos	0.0c	0.0c	0.0c
LK92-11	0.0c	0.0c	0.0c
Disease inoculation			
Marcos	100a	75a	82a
LK92-11	58b	52b	55b
F- test	*	*	*
C.V. (%)	14.2	15.4	18.7

Means in the same column followed by common letters are not significant different at P=0.05 by DMRT.

วิจารณ์

ผลที่ได้จากการศึกษาในการทดลองจะนำมาใช้ในการแก้ปัญหาด้านประสิทธิภาพในตรวจเชื้อและการทดสอบการก่อโรคของเชื้อ ส่วนผลที่ได้จากการทดลอง ช่วยให้สามารถจัดการบริหารไร่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะได้วิธีการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจคัดกรองและประเมินการเกิดโรคให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งส่งผลต่อการจัดการเพื่อผลิตท่อนพันธุ์แข็งแรงในการขยายพันธุ์ การประเมินการติดเชื้อในสภาพไร่ และการพยากรณ์ผลที่ได้จากการสุ่มตรวจการติดเชื้อโรคในแปลงสำหรับใช้ในการบริหารจัดการแปลงที่ถูกต้อง ลดการแพร่กระจายโรคและลดความรุนแรงของโรคแส้ดำและโรคเหี่ยวเน่าแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทันการณ์ การทดสอบการทนโรคสำคัญในอ้อยเป็นข้อกำหนดหนึ่งของกรมวิชาการเกษตรในการรับรองพันธุ์พืช แต่ในการทดสอบนี้มีปัญหาด้านการปฏิบัติที่ขาดประสิทธิภาพ ที่เกิดจากวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งมักเกิดปัญหาความแปรปรวนของผลการทดลอง ความจำกัดของพื้นที่ทดลอง ฤดูกาล ความสม่ำเสมอของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบและที่สำคัญคือเกิดปัญหาการสะสมของเชื้อในสภาพแวดล้อมจากการที่นักวิจัยขาดการดูแลใส่ใจด้านสุขอนามัยในแปลงทดสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค ในส่วนของเชื้อรา ส่วนใหญ่ปัจจุบันในประเทศไทยยังนิยมใช้การจำแนกตามอาการ และเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อจากลักษณะสัณฐานหรือใช้การตรวจทางชีวเคมีบางชนิด และอาจมีการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อโดยการปลูกเชื้อและสังเกตอาการ แต่การจำแนกด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ขาดประสิทธิภาพในการดำเนินงาน ต้องใช้ข้อมูลจากขบวนการตรวจวินิจฉัยหลายวิธีมาประกอบกันเพื่อให้เกิดความแม่นยำ อีกทั้งมีระยะเวลาในการดำเนินการนานหลายเดือน และต้องใช้ผู้มีประสบการณ์ด้านโรคพืช การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค โดยการใช้วิธีทดสอบโรคแบบใหม่ ที่ย่นระยะเวลา เพิ่มความแม่นยำ ลดขั้นตอนและขบวนการในการตรวจ สามารถกระทำได้

ทุกฤดูกาลโดยทำการทดสอบในสภาพควบคุม ประกอบกับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีการพัฒนาให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรค โดยปัจจุบันได้มีรายงานการพัฒนาวิธีในการตรวจวินิจฉัยโรคหลายชนิดด้วยเทคนิคด้านนี้แล้ว ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีการดังกล่าวมาวิจัยและพัฒนาปรับประยุกต์ให้เหมาะสมกับโรคที่สำคัญของไทยได้

สรุป

จากการสำรวจโรคอ้อยในแปลงของเกษตรกรในสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างอ้อยในปี 2565 ได้เชื้อ *S. scitamineum* และเชื้อรา *C. falcatum* เชื้อรา *S. scitamineum* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเป้าหมายจำเพาะเจาะจงได้ที่ขนาดนิวคลีโอไทด์ 459 คู่เบส วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการของเชื้อเชื้อ *S. scitamineum* กับข้อมูลของ KU991107.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *C. falcatum* ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ขนาดชิ้นยีน 590 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ FJ907431 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบการเกิดโรคแส้ดำอ้อยโดยทดสอบโดยวิธี แช่ข้อตาอ้อยด้วยสารแขวนลอยสปอร์เชื้อ *S. scitamineum* ทดสอบในอ้อยสายพันธุ์ Marcos และ LK92-11 โดยนำเชื้อรา *S. scitamineum* ไอโซเลต S01 ไอโซเลต S02 และ ไอโซเลต S03 เพาะในถาดเพาะแล้วเช็คขนาดแผลจากการเกิดโรคที่ 30 วันหลังงอก พบว่า เชื้อ *S.scitamineum* ไอโซเลต 1 มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากที่สุดจากการปลูกเชื้อ เกิดแส้ดำส่วนยอดโดยอ้อยพันธุ์ Marcos แสดงอาการที่ 15 วันหลังปลูกเชื้อและมีการเกิดโรคมากที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอ้อยสายพันธุ์ LK92-11 แสดงอาการที่ 30 วัน มีลักษณะใบเหลืองและมีแส้ดำที่ 45 วันหลังงอก มีการเกิดโรค 58 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการทดสอบการเกิดโรคเหี่ยวเน่าแดงบนเส้นกลางใบอ้อยโดยทดสอบโดยวิธี detached leaf ทดสอบเบื้องต้นในอ้อย สายพันธุ์ KK12R-076 และอีเหี่ยว โดยนำเชื้อรา *C. falcatum* ไอโซเลต 2 และ ไอโซเลต 3 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ corkborer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญ แปะบนเส้นกลางใบที่ตำแหน่งโคนใบ กลางใบและปลายใบ แล้วเช็คขนาดแผลจากการเกิดโรคที่หนึ่งสัปดาห์ พบว่าเชื้อ *C. falcatum* ไอโซเลต 2 มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากที่สุดจากการปลูกเชื้อ เกิดแผลเป็นแผลสีน้ำตาลแดงบนเส้นกลางใบอ้อยโดยอ้อยพันธุ์อีเหี่ยว ที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อมีการเกิดโรคมากที่สุดมีขนาดแผลเฉลี่ย 15.51 เซนติเมตร โดยอ้อยสายพันธุ์ KK12R-076 มีการเกิดโรคขนาดแผลเฉลี่ย 3.27 เซนติเมตร จากการศึกษาสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อแต่ละชนิดและสามารถนำวิธีการวิธีการประเมินการเกิดโรคนำไปทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคในอ้อยเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานหรือทนทานได้

เอกสารอ้างอิง

สุนี ศรีสิงห์, ดารารัตน์ มณีจันทร์, วาสนา วันดี และวาสนา ยอดปรางค์. 2558. ศึกษาปฏิกิริยาของอ้อยโคลนดีเด่นต่อโรคแส้ดำ. รายงานผลงานและพัฒนา ปี 2557 กรมวิชาการเกษตร.

อัปสร เปลี่ยนสินไชย, สุนี ศรีสิงห์, จันเพ็ญ ศรีทองชัย , ธนิต โสภโณ, วันทนีย์ อู่วาณิชย์ และ ฐิติกานต์ ธนวรรณ. 2536. การควบคุมโรค เหี่ยวเน่าแดงโดยชีววิธี. รายงานผลงานวิจัย อ้อยประจำปี 2536 ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สถาบันพืชไร่, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 436-452

Rajesh, k., S.R. Misra, A.K. Singh, and L. Ramji. 2003. Yield loss in sugarcane genotypes to smut at different resistance levels. Sugarcane Int. (September/October): 22-24.

Su, Y., W. Zhuqing, X. Liping, P. Qiong, L. Feng, L. Zhu, and Q. Youxiong. 2016. Early Selection for Smut Resistance in Sugarcane Using Pathogen Proliferation and Changes in Physiological and Biochemical Indices. J. Frontiers in Microbiology. 7(1133): 1-10.

Wang, X., Q. Han, G. Chen, W. Zhang, and W. Liu. 2017. A putative type II secretion system is involved in cellulose utilization in *Cytophaga hutchisonii*. Frontiers in Microbiology. 8: 1482.

Yan M., Z. Guining, L. Shanyu, X. Xiaoyong, C. hangqing, X. Pinggen, S. Wankuan, H. Weihua, C. Enping, J. Zide, Z. D. Yi, and i.Z. Lian-H. 2015. The Mating-type Locus b of the Sugarcane Smut *Sporisorium scitamineum* Is Essential for Mating, Filamentous Growth and Pathogenicity. Fungal Genetics and Biology. 2015: doi: http://dx.doi.org/ 10.1016/j.fgb.2015.11.005.