การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

Identification of *Colletotrichum* Plant Pathogenic Fungi Using Morphological and Molecular Characteristics

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 111 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 19 ชนิด ในจังหวัดกำแพงเพชร กาญจนบุรี กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงใหม่ เชียงราย นครปฐม นครนายก นครราชสีมา ตราด บุรีรัมย์ ปทุมธานี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี พะเยา แม่ฮ่องสอน ระยอง ราชบุรี ลำพูน ศรีสะเกศ สระบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุโขทัย สุราษฎร์ธานี อุบลราชธานี และ อุตรดิตถ์ ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum, C. capsici, C. circinans, C. falcatum, C. gloeosporioides*, *C. musae* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 7 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้าย ๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพบว่า *C. musae* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Oat Meal agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar จากการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และสกัด DNA ของรา *Colletotrichum* จำนวน 15 ไอโซเลท เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-12-54

คำนำ

ราสกุล *Colletotrichum* พบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ดำรงชีวิตแบบ saprophyte และ parasite จัดเป็นราที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นสาเหตุของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ตั้งแต่ระยะออกดอกจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพลดลง ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการส่งออกไม้ผลไปต่างประเทศ

แต่เดิมจัดราที่คล้าย *Colletotrichum* แต่ไม่มี setae ไว้ใน genus *Gloeosporium* แต่ในปัจจุบัน *Gloeosporium* ได้จัดรวมอยู่ใน *Marssonina* ปัจจุบันพบว่ารา *Colletotrichum* มีจำนวนมากกว่า 20 species บนพืชอาศัยต่าง ๆ กัน ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคใบจุดหรือโรคแอนแทรคโนส Domsch *et al.* (1993 a, b) ได้รายงาน 2 species ซึ่งในบางครั้งเป็นราดิน (soil-borne) ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorph เป็นรา *Glomerella cingulata* สร้าง conidia รูปทรงกระบอก หัวท้ายมนไม่มี setae และ *Colletotrichum dematium* สร้าง conidia รูปพระจันทร์เสี้ยว และมี setae

ลักษณะสำคัญของรา Coelomycetes genus นี้คือการสร้าง acervuli อยู่ใต้ epidermis ของพืช บนวุ้นอาหารจะพบลักษณะคล้าย sporodochia ราสร้าง phialides ไม่มีสี เกิดรวมเป็นกลุ่มหนาแน่น บาง species จะพบ setae สีดำ ปลายแหลม เกิดจากฐานของ stroma conidia รูปทรงกระบอก หรือพระจันทร์เสี้ยว มี 1 เซล ไม่มีสี ผนังเรียบ มักเกิดอยู่ในกลุ่มสารเมือกเหลวสีครีม ส้ม แดง หรือน้ำตาล ลักษณะสำคัญอีกอย่างหนึ่งของรา genus นี้คือการสร้าง appressoria เกิดจากการงอกของ conidia มีสีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือมีส่วนที่โป่งหรือยื่นออก (lobed) การจัดจำแนกของราในกลุ่มนี้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่นลักษณะของสปอร์ การมีหรือไม่มี setae การสร้าง sclerotia ลักษณะของโคโลนีบนอาหารต่าง ๆ ในปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลกันมากขึ้น โดยเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าลักษณะของราในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันแต่ลักษณะบางชนิดก็จะมีลักษณะคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมากเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ในปัจจุบันนี้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งก็ทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol , lactic acid, shear's sulution
5. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6 อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. <u>สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช</u>

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. <u>การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช</u>

- <u>ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช</u>

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- <u>แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant</u>

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. <u>ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ</u>

นำรา *Colleotrichum* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. <u>การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช</u>

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear’s solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี

ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. <u>เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง</u>

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. <u>การพิสูจน์การเกิดโรค</u>

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

การเตรียม DNA จากเส้นใยของรา

7. <u>การเตรียมเส้นใยขอรา</u>

เลี้ยงรา *Colletotrichum* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจาก

นั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

8. <u>การสกัด DNA จากรา</u>

นำรา *Colletotrichum* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 5 isolates ที่เก็บรักษาไว้

ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

9. <u>การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR</u>

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5’TTTCCGTAGGTGAACCTGC3’) และ ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA
- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.*, 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

13.2.4 <u>การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA</u>

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

13.2.6 <u>การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด</u>

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Colletotrichum* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558
สถานที่	- แหล่งพืชธรรมชาติ - แปลงปลูกพืชของเกษตรกร - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 111 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 19 ชนิด ในจังหวัดกำแพงเพชร กาญจนบุรี กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงใหม่ เชียงราย นครปฐม นครนายก นครราชสีมา ตราดบุรีรัมย์ ปทุมธานี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี พะเยา แม่ฮ่องสอน ระยอง ราชบุรี ลำพูน ศรีสะเกษ สระบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุโขทัย สุราษฎร์ธานี อุบลราชธานี และ อุตรดิตถ์ ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษารา จากเนื้อเยื่อพืช

โดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- <u>ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช</u>

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- <u>แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant</u>

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Colleotrichum musae* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar พบว่าราเจริญได้ดีที่สุด Oat Meal agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

การศึกษารา *Colletotrichum* จากส่วนที่เป็นโรค และการจำแนกชนิด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Colletotrichum*

ผลจากการศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici, C. falcatum, C. gloeosporioides*, *C. musae* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 10 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้าย ๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อบนพืชอาศัยต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2556

เชื้อสาเหตุ	พืช	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	แหล่งเก็บ
Colletotrichum acutatum	พริก	ลำต้น ผล	จันทบุรี ชุมพร เชียงใหม่ นครราชสีมา ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี ตราด สมุทรสาคร
C. capsici	พริก	ดอก ผล	กาญจนบุรี พิจิตร แพร่ เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ อุบลราชธานี
Colletotrichum circinans	หอมหัวใหญ่	ใบ	เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน
C. falcatum	อ้อย	ลำต้น ใบ	กาญจนบุรี ชัยภูมิ ระยอง ราชบุรี เพชรบูรณ์ ลพบุรี
C. gloeosporioides	แก้วมังกร	ลำต้น ผล	กรุงเทพฯ จันทบุรี ชุมพร เชียงใหม่ นครราชสีมา ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี ตราด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม
C. gloeosporioides	มะม่วง	ใบ และผล	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ ฉะเชิงเทรา นครราชสีมา จันทบุรี สระบุรี เชียงใหม่ ลำพูน
C. gloeosporioides	มะละกอ	ผล	สระบุรี ชุมพร ปทุมธานี
C. gloeosporioides	กล้วยไข่	ผล	กำแพงเพชร จันทบุรี สุโขทัย
C. gloeosporioides	กล้วยหอม	ผล	ปทุมธานี เพชรบุรี
C. gloeosporioides	หอมหัวใหญ่	ใบ หัว	เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน
C. gloeosporioides,	หอมแดง	ใบ และ หัว	เชียงใหม่ เชียงราย ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี อุตรดิตถ์ ลำพูน แม่ฮ่องสอน
C. gloeosporioides	พริก	ลำต้น (แอนแทรคโนส) ผล (ผลเน่าแอนแทรคโนส)	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ จันทบุรี ชุมพร เชียงใหม่ นครราชสีมา ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี ตราด แพร่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี อุบลราชธานี
Colletotrichum capsici	พริก	ใบ ผล (แอนแทรคโนส)	กาญจนบุรี พิจิตร แพร่ เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์

ตารางที่ 1 (ต่อ) ชนิดของเชื้อบนพืชอาศัยต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2556

เชื้อสาเหตุ	พืช	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	สถานที่เก็บ
C. gloeosporioides	ชมพู่	ผล (แอนแทรคโนส)	กาญจนบุรี เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ อุบลราชธานี
C. gloeosporioides	มังคุด	ผล (แอนแทรคโนส)	จันทบุรี
C. gloeosporioides	ไผ่กวนอิม	ใบ	พะเยา ปทุมธานี
C. gloeosporioides	หน่อไม้ฝรั่ง	ลำต้น	กาญจนบุรี
C. gloeosporioides	กระเทียม	ใบ	เชียงใหม่
C. musae	กล้วยไข่	ผล (แอนแทรคโนส)	กำแพงเพชร สุโขทัย
Colletotrichum sp.	เล็บครุฑ	ใบ (ใบจุด)	กรุงเทพฯ เชียงใหม่ เชียงราย
Colletotrichum sp.	ชะพลู	ใบ (ใบจุด)	จันทบุรี
Colletotrichum sp.	มะปราง	ใบ (ใบจุด)	นครนายก
Colletotrichum sp.	กล้วยไข่	ผล (แอนแทรคโนส)	กำแพงเพชร สุโขทัย
Colletotrichum sp.	ว่านเศรษฐี	ใบจุด	กรุงเทพฯ
Colletotrichum sp.	พริกไทย	.ใบ	กรุงเทพฯ

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การสกัด DNA จากเส้นใยของรา

จากการนำเส้นใยของรา *Colletotrichum* จำนวน 15 ไอโซเลท มาสกัด DNA โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Crous *et al.* (2000) เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis พบว่าทุกไอโซเลทของราปรากฏแถบ DNA ชัดเจน โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 111 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 19 ชนิด จากการศึกษาจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดได้รา *Colletotrichum* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum, C. capsici, C. circinans, C. falcatum, C. gloeosporioides*, *C. musae* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 7 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้าย ๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพบว่า *C. musae* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Oat

Meal agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar จากการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และสกัด DNA ของรา *Colletotrichum* จำนวน 15 ไอโซเลท เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2535. โรคผลเน่าของมะม่วงและวิธีการควบคุมโรค. เคหการเกษตร. 16: 72-75’

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Kew. 380P.

Sutton,B.C. 1980. The Coelomycetes Fungi Impefect with Pynidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Agricultural Bureaux, England. 696 p.

Sutton,B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotichum,* pp. 1-23. *In Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Bailey, J.A. and M.J. Jeger (eds.) CAB International, Kew.