วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2562 : 37 (2) : 239-249

การจำแนกชนิดและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง

Identification and Pathogenicity Test of Fungi Causing Cassava Tuber and Stem Rot Disease

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

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

บทคัดย่อ

โรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลังเป็นโรคที่สำคัญต่อการปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย เกิดจากเชื้อราสาเหตุหลายชนิด ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *P. melonis*, *P. meadii, Pythium* spp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* และ *Neoscytalidium hyalinum* อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อราสาเหตุและการก่อให้เกิดโรคในพื้นที่ปลูกที่สำคัญของประเทศไทยยังมีอยู่จำกัดการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างดินและมันสำปะหลังที่เป็นโรคหัวและลำต้นเน่าจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญในจังหวัดนครราชสีมา ระยอง และตากและนำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting method และ Baiting technique ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 3 สกุล จาก 16 ไอโซเลท และผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA สามารถจำแนกเชื้อรา *Pythium* spp. (*P. acanthicum* และ *P. graminicola*) เชื้อรา *F. solani* และเชื้อรา *N. hyalinum* เมื่อนำเชื้อราทั้ง 3 สกุลนี้ไปทดสอบโรคกับมันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์ พบว่าเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* ก่อให้เกิดโรคและทำให้ต้นมันสำปะหลังตาย ในขณะที่เชื้อรา *Pythium* spp. ที่แยกจากดินไม่ก่อให้เกิดโรค ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการจัดการโรคและการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรค

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง หัวเน่า ลำต้นเน่า *Neoscytalidium hyalinum*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp.

Abstract

In Thailand, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is considered as one of the most economically important crops. Tuber and stem rots are caused by several fungal species such as *Phytophthora palmivora*, *P. melonis*, *P. meadii, Pythium* spp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *Neoscytalidium hyalinum*. However, information on the biology and epidemiology of these fungal pathogens in production areas is still limited. Therefore, this study was conducted to collect samples of soil, tuber rot and stem rot of cassava from disease outbreaks in Nakhon Ratchasima, Rayong and Tak. Pathogen isolation from these samples was carried out by the tissue transplanting method and baiting technique. The fungal isolates were observed for morphological characteristics under a compound microscope. Three fungal genera, *Pythium*, *Fusarium* and *Neoscytalidium* were identified based on morphology. Sixteen isolates were identified as *Pythium* spp. (*P. acanthicum* and *P. graminicola*) *F. solani* and *N. hyalinum* based on ITS rDNA sequence analysis. Moreover, the pathogenicity of these three fungal genera was tested on eight cassava varieties. The results revealed that *F. solani* and *N. hyalinum* caused disease and cassava mortality. While all *Pythium* spp. isolates were nonpathogenic.These results were usable for disease management planning and disease resistant variety improvement.

Keyword: Cassava, Tuber rot, Stem rot, *Neoscytalidium hyalinum*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp.

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2]ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 320 ตำบลห้วยโป่ง อ.เมือง จ.ระยอง 21150

*Corresponding author, Email: agrjne@ku.ac.th

บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูกกันมากเพราะทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีและใช้ปัจจัยในการผลิตน้อย สามารถผลิตได้แม้ในที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปจากการปลูกเพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์เป็นการปลูกเพื่ออุตสาหกรรม ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เอทานอล และไบโอพลาสติก (ศานิต สวัสดิกาญจน์, 2557) เนื่องจากความต้องการของตลาดมันสำปะหลังสูงขึ้น ดังนั้นเกษตรกรปลูกติดต่อกันตลอดทั้งปี ส่งผลให้มีการสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งโรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบไหม้ (bacterial blight) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf spot) โรคใบจุดไหม้ (blight leaf spot) โรคต้นและรากเน่า (stem and root rot disease) (สุทธิสา ดัชนีย์, 2558)

ปัจจุบันโรคหัวและลำต้นเน่าสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตมันสำปะหลังโดยตรง ถ้าเชื้อเข้าทำลายต้นเล็กจะทำให้รากเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่า เหี่ยวเฉา ถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็น ใบเหี่ยวและร่วง ถ้าเกิดรุนแรงทำให้ต้นตาย ซึ่งสาเหตุของโรคหัวและลำต้นเน่า ในต่างประเทศและประเทศไทยนั้นมีการรายงานเชื้อราสาเหตุไว้หลายชนิด ได้แก่ *Phytophthora palmivora,P.melonis*, *P.crytogea*, *P.drechsleri*, *P. erythoseptica*, *Pythium* spp., *F. solani, F. oxysporum* และ *Neoscytalidium hyalinum* (Charaensatapon *et al*., 2014; Guo *et al*., 2012; Machado *et al*., 2014) อย่างไรก็ตามข้อมูลเชื้อราสาเหตุโรคในแหล่งปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทยและการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรายังมีอยู่อย่างจำกัดดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่าของมันสำปะหลังในแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดระยอง และจังหวัดตาก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ และการทดสอบโรค เพื่อให้เป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนการควบคุมและป้องกันโรค หรือการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคหัวและลำต้นเน่า

วิธีการศึกษา

การแยกและทำเส้นใยเดี่ยวเชื้อราก่อโรค

รวมรวบตัวอย่างโรคหัวเน่าและลำต้นเน่าจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังใน 3 แหล่งปลูก ได้แก่ จ. นครราชสีมา (อ. เสิงสาง) จ. ระยอง (ศูนย์วิจัยพืชไร่ จ. ระยอง) และ จ. ตาก (อ. เมืองตาก) นำมาแยกเชื้อราด้วยวิธี Tissue transplanting method (เบญจพล ศรีทองคำ, 2558) บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยตัดมันสำปะหลังบริเวณหัว และลำต้นที่เป็นโรค เป็นชิ้นขนาดเล็ก ล้างด้วย 10% Clorox จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำชิ้นพืชซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นมันสำปะหลังวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำหรับการแยกเชื้อราจากดินใช้วิธี Baiting technique (Watanabe *et al*., 2008) โดยนำดินมาผึ่งให้แห้ง บดให้ละเอียดเทใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นนำเหยื่อล่อ คือ ชิ้นพืชอาศัยของเชื้อวางลงในจานเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น นำชิ้นพืชล้างผ่านน้ำนำดินออก ซับให้แห้งด้วยทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชเลี้ยงบนอาหาร WA ทั้งสองวิธีนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-7 วัน จึงนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นแยกเส้นใยเดี่ยวโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าอาหาร ดูดสปอร์แขวนลอย 100 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร water agar (WA) บ่มไว้ 12-24 ชั่วโมง จึงนำมาตัดปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo และย้ายปลายเส้นใยเดี่ยวไปเลี้ยงบน อาหาร PDA (เบญจพล ศรีทองคำ, 2558)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราที่ได้จากการแยกปลายเส้นใย มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนี และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 200 เท่า และ 400 เท่า โดยการทำสไลด์กึ่งถาวร ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแต่ละชนิด ได้แก่ oogonium, oospore, sporangium, macroconidia, microconidia, conidia และ arthoconidia ลักษณะเหล่านี้มีลักษณะจำเพาะของแต่ละสกุลและชนิด บันทึกข้อมูลลักษณะต่างๆ สำหรับการจำแนก

จำแนกชนิดของเชื้อราด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) จากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขูดผิวหน้าอาหารและดูดสปอร์แขวนลอยใส่ลงไปในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มไว้พร้อมเขย่าเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง กรองเส้นใย และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วนำเส้นใยแห้งมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่บดแล้ว ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.5 กรัม เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) 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 Rnase A (© 2017 Thermo Fisher Scientific, USA) 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 50-100 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ดัดแปลงวิธีจาก เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข, 2560)

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบบน 1% agarose gel electrophoresis ที่เติม 0.1% Gel star (SMOBIO®, DS1000, Taiwan) ใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยใช้ DNA Ladder 100s (SMOBIO®, DM2100, Taiwan) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader®, Transilluminator DR-45M, USA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS)

นำดีเอ็นเอของเชื้อรามาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990) ไพร์เมอร์ละ 10 pmole และมีส่วนผสมอื่นๆ ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ 10X Taq buffer, 2.5mM $MgCl_2$, 1 Unit Taq DNA polymerase และ 0.2 mM dNTP โดยทำปฏิกิริยาที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR product มาทำการตรวจสอบบน 1% agarose gel ใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2mM EDTA) และใช้กระแส

ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DNA Ladder 100s (SMOBIO®, DM2100, Taiwan) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่งให้บริษัท Solgent Sequencing Service, ประเทศเกาหลี วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ ITS กับลำดับเบสที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI) โดยการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ในโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA7 จากนั้นนำข้อมูล alignment (M7:ClustaW Parameters) มาสร้าง Phylogenetic tree โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี Neighbor-joining ทำการวิเคราะห์หาค่า bootstrap ด้วยโปรแกรมเดียวกันจำนวน 1,000 ซ้ำ

การทดสอบการก่อโรค

ปลูกเชื้อรา 3 สกุล โดยแยกกันปลูกเชื้อคนละการทดลอง ได้แก่ *Fusarium* sp., *Pythium* spp.และ *Neoscytalidium* sp. ลงบนพันธุ์มันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ได้แก่ CMR25-105-47, CMR31-06-103, CM32-99-15, SM937-8, R9, R5, R60 และ 29-77-19 ที่ปลูกในถุงดำ ขนาด 15×30 นิ้ว อายุ 1 เดือน ทุกกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เทราดลงไปในดินปลูกที่อบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกผลทุก 7 วัน โดยวัดความรุนแรงของการเกิดโรค (disease severity) จนมันสำปะหลังมีอายุ 3 เดือน หรือหลังปลูกเชื้อ 3 เดือน แบ่งระดับความรุนแรงของโรคที่แสดงออกที่ใบ แบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับ 1 พืชไม่แสดงอาการเหี่ยว ระดับ 2 พืชแสดงอาการเหี่ยวและระดับ 3 พืชตาย (Dianese *et al*., 1990) และแบ่งระดับความรุนแรงของโรคที่แสดงออกที่ลำต้น แบ่งออกเป็น 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 ดัชนีย์, 2558)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Fusarium* spp. 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 27.7×4.0 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ หรือ กระสวย มี 0-1 septum มีขนาด 8.0×5.0 ไมครอน เชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น *F. solani* (Figure 1) ซึ่งจากการศึกษาของ Zhang *et al*., (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 สำหรับประเทศไทยข้อมูลของเชื้อรา *F. solani* ที่ก่อให้เกิดโรคลำต้นและรากเน่าบนมันสำปะหลังยังไม่มีรายงาน Worapong (2002) รายงานว่าเชื้อรา *F. oxysporum* ทำให้เกิดโรครากเน่าแห้งบนมันสำปะหลัง

เชื้อรา *Neoscytalidium* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17, TAK18, TAK19, TAK20 จาก จ.ระยอง และ จ. ตาก ที่แยกได้จากส่วนของลำต้นและหัว โคโลนีของเชื้อรามีลักษณะ เริ่มแรกเส้นใยมีสีขาวฟูเล็กน้อย เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีดำมีการสร้าง arthoroconidia คือ มีลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นลูกโซ่ มีสีเข้ม conidia ระยะอ่อนเซลล์เดียวใสไม่มีสี แต่ต่อมาจะมีการสร้างผนังกัน แบ่งเป็น 2 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางทึบสีน้ำตาล หัวท้ายใส ผนังจะหนาและเหนียวขึ้น มีขนาด 7.0×3.0 ไมครอน (Figure1) เชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท จึงจำแนกได้เป็นเชื้อรา *N. hyalinum*

ซึ่งจากการศึกษาของ สุทธิสา ดัชนีย์ (2558) ที่แยกเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. จากโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง และได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า conidia ขนาดเล็ก มีลักษณะ 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีสีเข้ม หัวท้าย แหลม ซึ่งเมื่อแยกเชื้อราแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA มีโคโลนีสีดำ สร้างสปอร์เรียงต่อกัน และได้รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้ คือ *N. hyalinum* สาเหตุของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง

สำหรับไอโซเลทของเชื้อราที่เหลือซึ่งแยกจากดินบริเวณต้นมันสำปะหลังมีลักษณะเหมือนเชื้อรา *Pythium* spp. แต่มีความแตกต่างกันซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Pythium type 1 มี 2 ไอโซเลท (RYG8 และ NMR12) และ Pythium type 2 มี 1 ไอโซเลท (RYG10) เชื้อราทั้งสองกลุ่มนี้ เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใน 3 วัน โคโลนีของ Pythium type 1 ลักษณะโคโลนีรูปดอกไม้สีขาวคล้ายผงแป้ง oogonium ผนังกลมบางและผนังคล้ายหนาม ขนาดของ oogonium 14.0×14.0 ไมครอน sporangium รูปร่างแบบ subglobose ส่วน Pythium type 2 ลักษณะโคโลนี มีสีขาว เส้นใยฟู oogonium ผนังเรียบและกลม ขนาดของ oogonium 18.0×22.0 ไมครอน sporangium รูปร่างแบบ irregular complexes (Figure 1) สำหรับประเทศไทย มีรายงานเชื้อราสกุลนี้เป็นสาเหตุของโรคแต่ยังไม่มีการระบุชนิดของเชื้อรา อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกเชื้อราสกุลนี้จากดินบริเวณต้นที่เป็นโรคซึ่งต้องนำไปพิสูจน์การก่อให้เกิดโรคกับต้นมันสำปะหลังต่อไป และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของเชื้อรา

Bandyopadhyay *et al*., 2006 กล่าวว่าโรครากเน่าเป็นโรคที่สำคัญที่สุดในบราซิล แต่ข้อมูลของโรคยังมีน้อยที่จะกล่าวถึงรายละเอียดของโรคที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าและการกระจายตัว อย่างไรก็ตามในประเทศแอฟริกา เชื้อรา *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Nectria mauritiicola*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Neofusicoccum mangiferae* มีความสัมพันธ์กับโรครากเน่ามันสำปะหลัง

Table1 Fungal collection, fungi isolation of diseased cassava tissue and soil from cassava field.

Isolate No.	Fungal pathogen	Locality	Tuber	Soil	Stem	Accession number*
RYG1	*F. solani*	ระยอง			✓	LC332026
RYG2	*F. solani*	ระยอง			✓	LC332025
RYG3	*F. solani*	ระยอง			✓	LC332023
RYG4	*F. solani*	ระยอง			✓	LC332024
TAK14	*F. solani*	ตาก			✓	LC335885
RYG5	*N. hyalium*	ระยอง	✓			LC332033
RYG6	*N. hyalium*	ระยอง	✓			LC332031
RYG7	*N. hyalium*	ระยอง	✓			LC332032
TAK16	*N. hyalium*	ตาก	✓			LC335886
TAK17	*N. hyalium*	ตาก			✓	LC335887
TAK18	*N. hyalium*	ตาก			✓	LC335888
TAK19	*N. hyalium*	ตาก			✓	LC335889
TAK20	*N. hyalium*	ตาก			✓	LC355890
RYG8	*Pythium* spp.	ระยอง			✓	LC332027
RYG10	*Pythium* spp.	ระยอง		✓		LC332031
NMR12	*Pythium* spp.	นครราชสีมา		✓		LC332028

*Accession number of fungal nucleotide sequence in Genbank database.

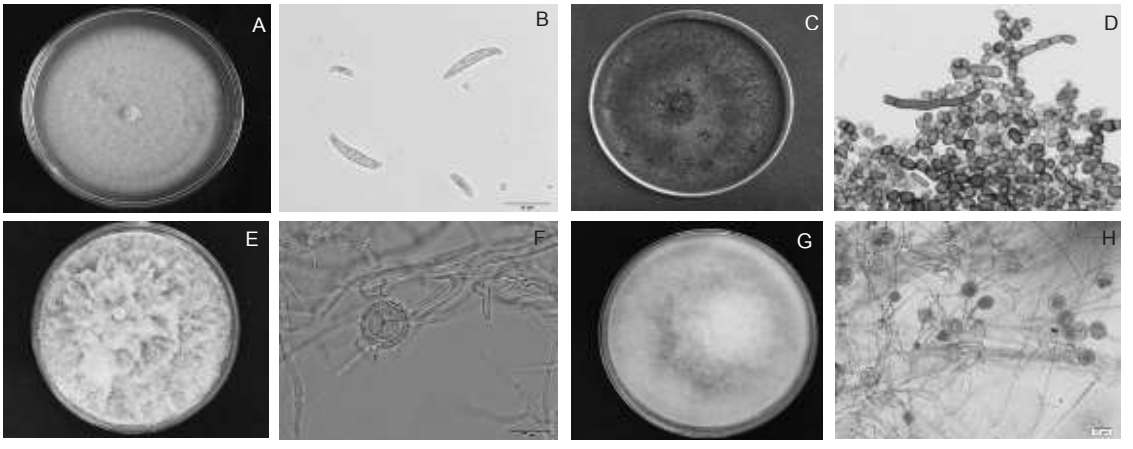

Figure 1 Morphology of colony and conidia of *F. solani* (A, B), *N. hyalinum* (C, D) and Pythium type 1 E, F) and Pythium type 2 (G, H).

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อรามาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าเชื้อรา *Pythium* spp. ทั้ง 2 กลุ่ม มีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 800 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสมาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของเชื้อรา *Pythium* จากฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ *P.graminicola* (AY598625 และ KU569294), *P. acanthicum* (KU209726 และ KU208874) และเชื้อรา *Phytophthora crytogea* (KP288372 และ KP288378) เชื้อรา *Pythium* spp. แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไอโซเลท RYG10 ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *P. graminicola* (AY598625 และ KU569294) ซึ่ง *Pythium* กลุ่มที่ 1 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ Pythium type 1 สำหรับกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ไอโซเลท RYG8 และ NMR12 ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *P. acanthicum* (KU209726 และ KU208874) ซึ่ง *Pythium* กลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ *Pythium* type 2 โดยแต่ละกลุ่มมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่ม 100% (Figure 2) สำหรับการจำแนกชนิดเชื้อรา *P. graminicola* ที่แยกได้จากโรครากเน่าของสัปปะรด โดย Pornsuriya (2008) มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA โดยใช้ บริเวณ ITS1 และ ITS2 ซึ่ง Matsumoto *et al.,* (1999) มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ด้วยวิธี Maximum parsimony โปรแกรม heuristic search algorithm PAUP 3.1.1 ที่ bootstrap 1,000 ซ้ำ พบว่า *P. graminicola* มีความเหมือนกับ *P. arrhenomanes* ถึง 94%

สำหรับลำดับนิวคีโอไทด์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. (RYG1, RYG2, RYG3, RYG4 และ TAK14) มีขนาดชิ้นส่วนประมาณ 600 คู่เบส โดยวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อรา *F. solani* (EU982942, KP784419, DQ094641), *F. oxysporum* (GQ922565 และ GQ922563) และ *Cylindrocladium quinqueseptatum* (JQ347290 และ JQ347291) เชื้อรา *Fusarium* ทั้ง 5 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *F. solani* โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่ม 100% (Figure 3) สำหรับการรายงานชนิดของเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่แยกได้จากโรคเน่าของมันสำปะหลังในต่างประเทศ ได้แก่ บราซิล โดย Vilas Boas *et al*., (2016) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA พบว่าเชื้อราสาเหตุหลักคือ *Fusarium* spp. และลำดับรองลงมาคือ *Lasiodiplodia*, *Neocytalidium* และ *Diaporthe*/*Phomopsis* complex, *Phytophthora* และ *Corallomycetella* สำหรับเชื้อราในสกุล *Fusarium* spp. ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าแห้งมันสำปะหลังนั้นสามารถแบ่งกลุ่มได้ 6 กลุ่ม โดยไอโซเลทส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *F. solani* (FSSC) และอีกกลุ่มคือ *F. oxysporum* (FOSC) โดย *F. solani* เป็นเชื้อราสาเหตุที่พบว่าเป็นสาเหตุ

ทั่วพื้นที่การผลิตมันสำปะหลัง นอกจากในประเทศบราซิลแล้วมีประเทศอื่นๆที่พบว่าเชื้อราชนิดนี้ระบาด ได้แก่ โคลัมเบีย อินเดีย มาเลเซีย ไนจีเรีย และ ปาปัวนิวกินี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในทวีปแอฟริกา พบว่าเชื้อรา *F.oxysporum* เป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรครากเน่ามันสำปะหลังและทำให้เกิดความเสียหายจำนวนมากกับผลผลิต สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานที่ระบุเชื้อรา *Fusarium* ในระดับสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าหัวเน่าและลำต้นเน่า จากผลการวิเคราะห์นี้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ได้เป็น *F. solani* โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA

เชื้อรา *N. hyalinum* มีขนาดชิ้นส่วนบริเวณ ITS rDNA ประมาณ 550 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อรา *N.hyalinum* (KX098314 และ AT211564), *N. novaehollandiae* (MF511047 และ EF585540) และ *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* (KJ607141 และ KF369264) เชื้อรา *Neoscytalidium* ทั้ง 8 ไอโซเลท (RYG5, RYG6, RYG7, TAK16, TAK17, TAK18, TAK19 และ TAK20) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *N. hyalinum* (KX098314 และ KT211564) ค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่ม 70% (Figure 4) จากการศึกษามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ สุทธิสา ดัชนีย์ (2558) จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเบริเวณ ITS rDNA ด้วยไพร์เมอร์ ITS1/ITS4 มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส และจำแนกได้เป็นเชื้อรา *N. hyalinum* จากการศึกษาของ Vilas Boas *et al*., (2016) ได้แยกเชื้อราจากอาการรากเน่าดำทั้งหมด 15 ไอโซเลทที่จัดอยู่ใน Botrospaeriaceae 9 ไอโซเลทแยกเป็นกลุ่ม *Lasiodiplodia theobromae* และ 6 ไอโซเลทแยกเป็นกลุ่ม *Neoscytalidium hyalinum* ซึ่งมีต้นกำเนิดจากรัฐ Bahia Maranhão Paraiba และ Tocantins

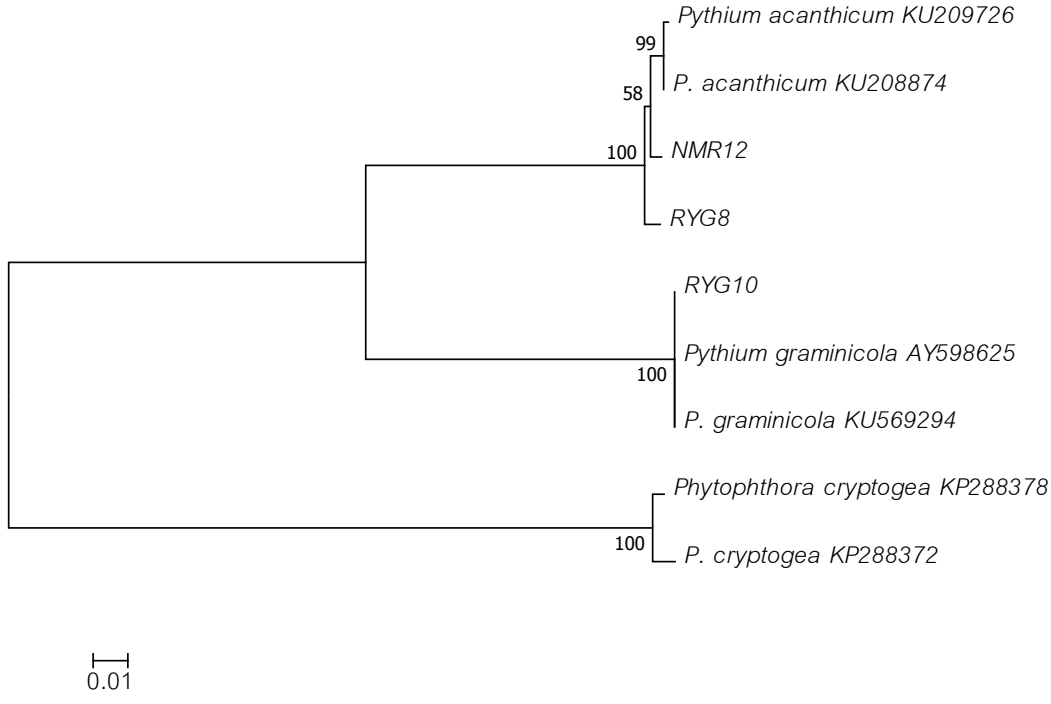

Figure 2 The neighbor-joining tree based on rDNA-ITS nucleotide sequence of *Pythium* spp. comparing with those of *Phythopthora cryptogea* from NCBI databases via MEGA program 7.0 (bootstrap 1000 replicates).

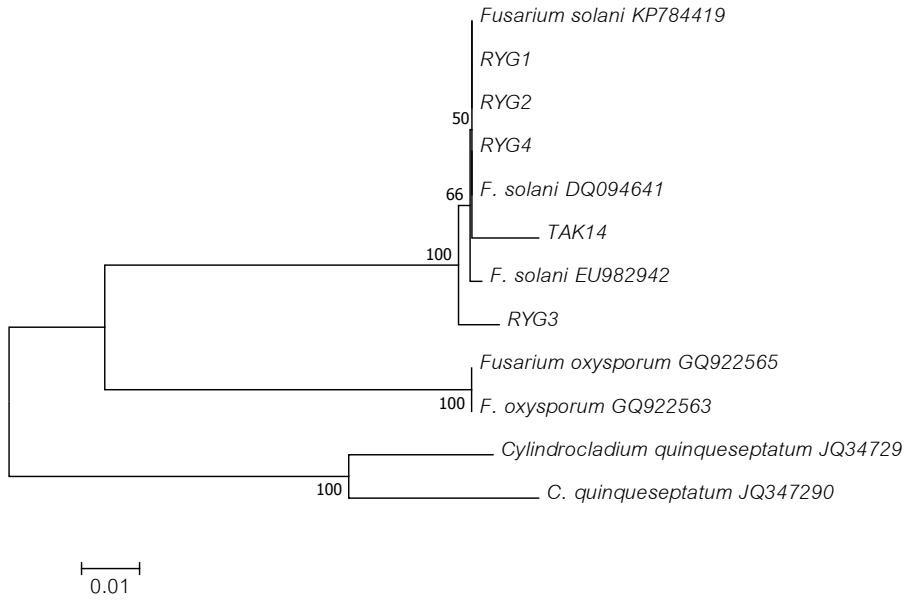

Figure 3 The neighbor-joining tree based on rDNA-ITS nucleotide sequence of *Fusarium solani* comparing with those of *F. oxysporum* and *Cylindrocladium quinqueseptatum* from NCBI databases via MEGA program 7.0 (bootstrap 1000 replicates).

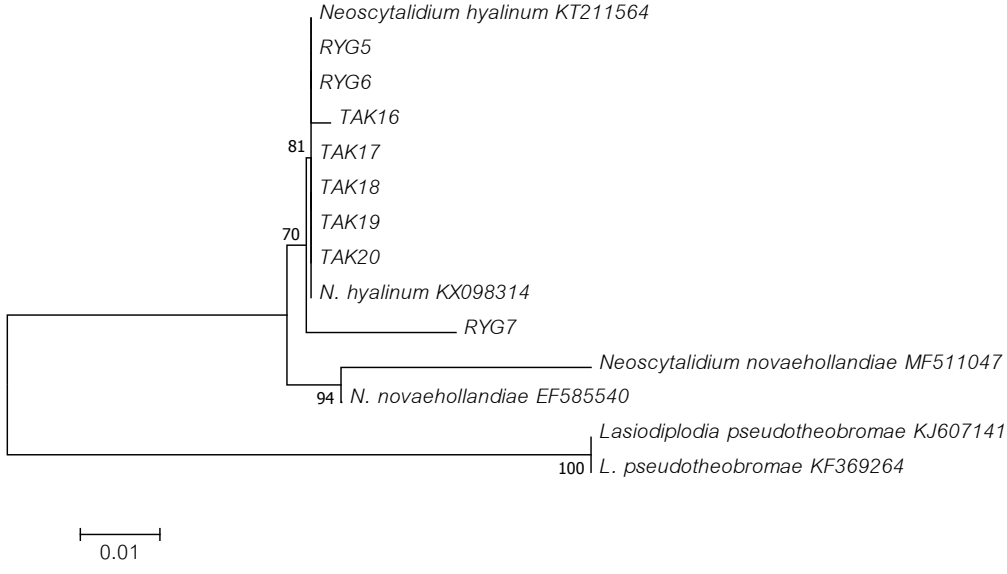

Figure 4 The neighbor-joining tree based on rDNA-ITS nucleotide sequence of *Neoscytalidium hyalinum* comparing with those of *N. novaehollandiae* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from NCBI databases via MEGA program 7.0 (bootstrap 1000 replicates).

การทดสอบการก่อโรค

จากการทดสอบโรคบนมันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์ ด้วยเชื้อราทั้ง 3 สกุล ได้แก่ *Fusarium* sp. *Neoscytalidium* sp. และ *Pythium* spp. พบว่า เกิดอาการของโรคลำต้นเน่ากับมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ คือ CM32-99-15 และ CMR25-105-47 เมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *F. solani* (Figure 5) และ CM32-99-15 และ R9 เมื่อปลูกเชื้อ *N. hyalinum* โดยพบอาการหลังจากปลูกเชื้อได้ 7 วัน ลำต้นหยุดการเจริญเติบโต ใบเริ่มเหี่ยวและยืนต้นตาย เมื่อนำมาผ่าตรวจสอบเนื้อเยื่อภายในของท่อนพันธุ์ พบว่า ลักษณะภายนอกเปลือกมีสีดำและส่วนเนื้อเยื่อภายในมีสีน้ำตาลไม่มีกลิ่นเหม็น รากเน่ามีสีน้ำตาล ต้นตายในขณะที่ยังไม่สร้างหัว (Figure 6) ส่วนต้นที่ยังไม่แสดงอาการดูผลถึงอายุ 3 เดือน พบว่าต้นมันสำปะหลังไม่มีความผิดปกติและไม่เกิดโรค เมื่อนำท่อนมันสำปะหลังที่แสดงอาการมาแยกเชื้อบนอาหาร PDA พบ เชื้อ *F. solani* และ *N. hyalinum* และเชื้อราสาเหตุชนิดอื่นปนเปื้อนด้วย สำหรับการประเมินโรคบนใบของมันสำปะหลังทั้ง 3 พันธุ์ที่เกิดโรค อาการอยู่ในระดับ 3 คือ ต้นตาย ส่วนการประเมินโรคบนท่อนมันสำปะหลัง CM32-99-15 และ CMR25-105-47 เมื่อปลูกเชื้อ *F. solani* และ *N. hyalinum* อาการอยู่ระดับ 3 พบอาการและมีแผล 25-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้น ส่วนพันธุ์ R9 เมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *N. hyalinum* อาการอยู่ระดับ 2 แสดงอาการและมีแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ลำต้น สำหรับการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Pythium* spp.ต้นมันสำปะหลังไม่มีความผิดปกติและไม่เกิดโรค เช่นเดียวกับกรรมวิธีควบคุม โดยเชื้อรา *Pythium* spp. ทุกไอโซเลทได้แยกมาจากดินซึ่งอาจเป็นเชื้อราทั่วไปในดินไม่ได้เป็นสาเหตุโรคเนื่องจากมีรายงานเชื้อ *Pythium* spp. เป็นพวกเกิดและอาศัยอยู่ในดิน (soil borne) ซึ่งมีความสามารถที่อยู่รอดด้วยการเป็นพวกแซปโพไฟท์ (saprophyte) (ทวี เก่าศิริ, 2549)

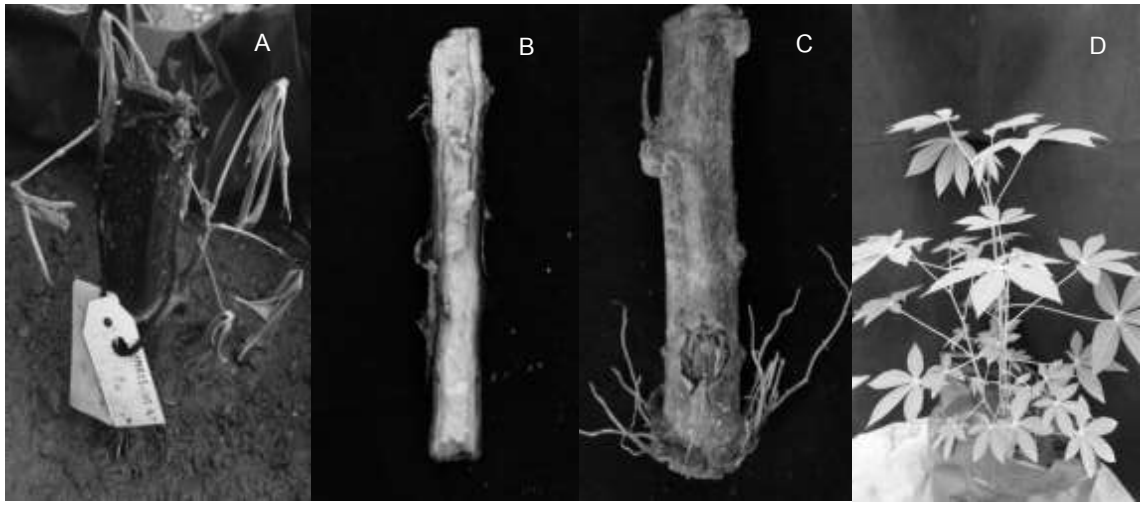

Figure 5 Symptoms of cassava at 7 days after inoculation with *F. solani*, A: Leaves wilting and sudden death B: Brown in central tissue C: Bloated at stem base and brown bruising D: Control

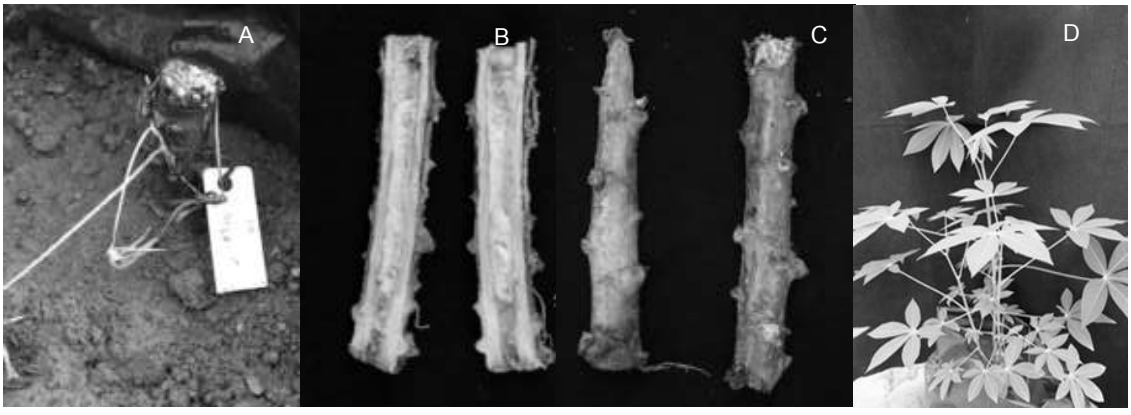

Figure 6 Symptoms of cassava at 7 days after inoculation with *N. hyalinum,* A: Leave wilting and sudden death B: Brown and dark in central tissue C: Rotted root and not germination D: Control

สรุปผลการศึกษา

จากการแยกตัวอย่างเชื้อราจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคหัวและลำต้นเน่า และจากดินสามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุทั้งหมดได้ 3 สกุล ได้แก่ *Pythium* spp., *Neoscytalidium hyalinum* และ *Fusarium solani* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานและเปรียบเทียบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS rDNA การทดสอบการก่อโรคและการประเมินโรคในเบื้องต้น พบว่า เชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* เป็นสาเหตุของโรคเน่าแห้งและเน่าดำของมันสำปะหลัง ในขณะที่เชื้อรา *Pythium* spp. ที่แยกจากดินไม่เป็นสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่า

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี ๒๕๖๑ และขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ทวี เก่าศิริ. 2549. หน่วยที่ 10 ตอนที่ 10.1.1 ราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ. เอกสารประกอบการเรียนการสอนชุดวิชา ศัตรูพืชเบื้องต้น (Introduction to crop pests). หน่วยที่ 8-15. 10-8 - 10-22 น.

เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข. 2560. การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมและการแปรปรวนของเชื้อราก่อโรคเมล็ดด่างข้าวในประเทศไทวิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 175 น.

เบญจพล ศรีทองคำ. 2558. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium* species โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลอณูชีวโมเลกุล. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 134 น.

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

สุทธิสา ดัชนีย์. 2558. การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยลัยเทคโนโลยสุรนารี. 129 น.

Bandyopadhyay, R., M. Mwangi, S.O. Aigbe and J.F. Leslie. 2006. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. *Phytopathology*. 96: 673–676 p.

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.

Dianese, J. C., M. C. G. Dristig, and A. P. Cruzc. 1990. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of Eucalyptus growing in equatorial Brazil. *Australasian Plant Pathology*. 19(3): 71-76 p.

Guo, H., C.P. Li., T.C. Shi, J. Fan and G.X. Huang. 2012. First report of *Phytophthora palmivora* causing root rot of cassava in China. *The American Phytopathological Society*. v.96. n.7. 1072 p.

Machado, A.R., D.B. Pinho, S.A.S. Oliveira and O.L. Pereira. 2014. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 39(6): 464-470 p.

Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi. 1999. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience*. 40(4): 321-331 p.

Pornsuriya, C., H.K. Wang, F.C. Lin, and K. Soytong. 2008. First report of pineapple root rot caused by *Pythium graminicola*. *Journal of Agricultural Technology*. 4(1): 139-150 p.

Vilas Boas, A.S., S.A.S. Oliveira, C.A.D. Braganca, J.B. Ramos and J. Oliveira Eder. 2016. Survey of fungi associated with the cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*. 74: 60–67 p.

Watanabe, H., K. Kageyama, Y. Taguchi, H. Horinouchi and M. Hyakumachi. 2008. Bait method to detect *Pythium* speciesthat grow at high temperatures in hydroponic solutions. *Journal of General Plant Pathology*. 74(6): 417-424 p.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J. L. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1): 315-322.

Worapong, J. 2002. Isolation and Characterization of Root Rot Pathogens on Cassava (*Manihot esculenta*) in Nakorn Rachasima and Rayong. *The 3rd Conference on Starch Technology*. 435 p.

Zhang, X. Y., J. Hu, H. Y. Zhou, J. J. Hao, Y. F. Xue, H. Chen and B. G. Wang. 2014. First report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* causing *Fusarium* dry rot of carrot in China. *Plant Disease*. 98(9): 1273-1273 p.

วันรับบทความ (Received date) : 16 ม.ค. 61
วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 25 มิ.ย. 61
วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 22 ส.ค. 61