การจำแนกชนิดของราสกุล *Botryosphaeria* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

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

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 62 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด จากจังหวัดกำแพงเพชร กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงใหม่ ชลบุรี นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และ สุโขทัย ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมดจำนวน 53 ไอโซเลท จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้ราทั้งหมด 4 genera 5 species ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae. L. pseudotheobromae* , *Dothiorella mangiferae, Botryosphaeria* และ *Fusicoccum* และจากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* และพบว่ารา *L. pseudotheobromae* และรา *L. Theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Malt Extract Agar รา *Fusicoccum* เจริญได้ดีบนอาหาร Malt Extract Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Oat Meal Agar Agar และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-04-54

คำนำ

ราสกุล *Botryosphaeria* Ces. And De Npt พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไป มักพบเป็นสาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง ราเข้าทำลายพืชทางแผลจากการตัดแต่งกิ่งและทางเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย แต่ราก็สามารถเข้าทำลายพืชโดยตรงทางกลุ่มเซลล์ของพืชและพักตัวอยู่ที่ส่วนของตา บางครั้งมักพบว่ารามีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์โดยไม่แสดงอาการบนเนื้อเยื่อพืช (Smith *et al.,* 1996) รากลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด ได้แก่ พืชวงศ์แอปเปิ้ล ไม้ผลชนิดเมล็ดแข็งสาเหตุโรคผลสาเหตุโรคผลเน่า ใบจุดตากบ โรคแคงเคอร์บนลำต้นและกิ่ง เปลือกแตกยางไหล ยืนต้นตาย และบางชนิดทำให้ต้นไม้ตาย (Weaver, 1974; Brown and Britton, 1986; Britton *et al*., 1990; Pusey, 1993; Parker and Sutton, 1993)

ในด้านการจำแนกชนิดของรากลุ่มนี้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Botryosphaeria* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (teleomorphic stage) นั้นจะแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละ species แต่ลักษณะทางสัณฐานของราในระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (anamorphic stage) จะมีความแตกต่างกันมาก รา *Botryosphaeria* มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ประมาณ 18 ชนิด จัดอยู่ใน Class Coelomycetes ได้แก่ *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophomina* (Sacc.) Berl. & Voglino และ *Sphaeropsis* Sacc. ลักษณะของราในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันแต่ลักษณะบางชนิดก็จะมีลักษณะคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมากเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ในปัจจุบันนี้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งก็ทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

งานวิจัยนี้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อการจำแนกชนิดของรา *Botryosphaeria* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ในการแบ่งแยกในระดับ genus และ species

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. เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria*

เก็บตัวอย่างโรคพืชจากส่วนของใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และรากของพืช จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ บันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บรรจุห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ และจัดเก็บตัวอย่างแห้งของพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การศึกษารา *Botryosphaeria* จากส่วนที่เป็นโรค

2.1 การศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation)

ศึกษาลักษณะอาการของราสาเหตุโรคและสังเกตลักษณะของโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ของราที่เกิดบนใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่าง ๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรา ได้แก่ สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ หยดน้ำหรือสีย้อม และปิดทับด้วยแผ่น cover slip และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

ถ้าไม่พบสปอร์ของราบนชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคหลังจากตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และเมื่อเขี่ยเชื้อดูแล้ว ไม่พบราบนชิ้นส่วนพืชให้ทำ moist chamber โดยนำตัวอย่างพืชมาบ่มไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไว้บนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหยดน้ำนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษกรองเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting)

ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืช โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) ต้องทำภายใต้ aseptic condition บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของราต่อไป เก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2.3 ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Botryosphaeria* 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)

3. การจำแนกชนิดรา *Botryosphaeria*

- 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)

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

5. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

6. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Botryosphaeria*

6.1 <u>การเตรียมรา *Botryosphaeria*</u>

เลี้ยงรา *Botryosphaeria* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว 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

6.2 <u>การสกัด DNA จากรา</u>

นำรา *Botryosphaeria* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 4 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous (Crous *et al.*, 2000)

6.3 <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		

6.4 <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)

6.5 <u>การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด</u>

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

เวลาและสถานที่

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria*

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 62 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด จากจังหวัดกำแพงเพชร กรุงเทพฯ

จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงใหม่ ชลบุรี นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และ สุโขทัย (ตารางที่ 1) ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค

ตารางที่ 1 เก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นโรคบนพืชอาศัย จากแหล่งต่างๆ

พืชอาศัย	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	แหล่งที่เก็บ
แก้วมังกร	กิ่ง (ลำต้นจุด)	จันทบุรี (6) ราชบุรี (2) สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ระยอง (3) สมุทรปราการ กรุงเทพฯ นครราชสีมา เชียงใหม่ นครปฐม ปทุมธานี (2)
แก้วมังกร	ผล (ผลเน่า)	จันทบุรี (5) ราชบุรี สมุทรสาคร ปทุมธานี ระยอง สมุทรสาคร
มังคุด	ผล (ผลเน่า)	จันทบุรี
องุ่น	ลำต้น (ต้นเหี่ยว)	ประจวบคีรีขันธ์ นครราชสีมา
มะม่วง	ลำต้น (อาการยางไหล)	นครราชสีมา (2) จันทบุรี (2) ชลบุรี ฉะเชิงเทรา (2)
มะม่วง	ผล (ขั้วผลเน่า)	ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ระยอง ฉะเชิงเทรา
กล้วย	ผล (ขั้วผลเน่า)	สุโขทัย (2) กำแพงเพชร (2) เพชรบุรี (8) ปทุมธานี จันทบุรี (2)
มะเม่า	ลำต้น (อาการยางไหล)	สกลนคร กรุงเทพฯ
สน	เปลือกแตกยางไหล	กรุงเทพฯ

2. การศึกษารา *Botryosphaeria* จากส่วนที่เป็นโรค และการจำแนกชนิด

ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลท และจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้รา *Lasiodiplodia theobromae* จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะม่วง (2 ไอโซเลท) จากโรคผลเน่าของมะม่วง (6 ไอโซเลท) จากมังคุด (2 ไอโซเลท) จากสน (1 ไอโซเลท) จากกล้วยน้ำว้า (4 ไอโซเลท) จากกล้วยหอม (12 ไอโซเลท) องุ่น (2 ไอโซเลท) *L. pseudotheobromae* จากมะเม่า (2 ไอโซเลท) *Botryosphaeria* จากกิ่งแก้วมังกร (15 ไอโซเลท) และผลแก้วมังกร (5 ไอโซเลท) *Dothiorella mangiferae* จาก มะม่วง (1 ไอโซเลท) และ *Fusicoccum* จากผลเน่ามะม่วง (1 ไอโซเลท) และ (ตารางที่ 2) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อต่อไป และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อสาเหตุโรคบนพืชอาศัยต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2556

ชนิดของเชื้อสาเหตุ	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	พืช	สถานที่
Lasiodiplodia theobromae	ลำต้น เปลือกแตก ยางไหล	มะม่วง	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (1 ไอโซเลท) จ. ชลบุรี (1 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ผล	มะม่วง	อ.แปลงนายาว จ.ฉะเชิงเทรา (2 ไอโซเลท) อ.บางคล้า จ.ฉะเชิงเทรา อ. โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี (3 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ผล	มังคุด	จ.จันทบุรี (2 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ลำต้น	สน	กรุงเทพฯ (1 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ผลเน่า	กล้วยน้ำว้า	อ.พลิ้ว จ.จันทบุรี (1 ไอโซเลท) จ.กำแพงเพชร (2 ไอโซเลท) จ.สุโขทัย (1 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ผลเน่า	กล้วยหอม	จ.เพชรบุรี (12 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia theobromae	ลำต้น	องุ่น	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (2 ไอโซเลท)
Lasiodiplodia pseudotheobromae	ลำต้น	มะเม่า	อ.ภูพาน จ.สกลนคร(1 ไอโซเลท) กรุงเทพฯ (1 ไอโซเลท)
Botryosphaeria 15isolates	ลำต้น ผล	แก้วมังกร	จันทบุรี ระยอง สมุทรสาคร ปทุมธานี
Dothiorella mangiferae	ผล	มะม่วง	จ.นครราชสีมา (1 ไอโซเลท)
Fusicoccum	ผล	มะม่วง	อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี (1 ไอโซเลท)

3. การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา

จากการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของราทั้ง 3 ชนิด คือ รา *Lasiodiplodia pseudotheobromae, L. theobromae* และ *Fusicocum* พบว่ารา *L. pseudotheobromae* และรา *L. Theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose

Agar และ Malt Extract Agar รา *Fusicoccum* เจริญได้ดีบนอาหาร Malt Extract Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Oat Meal Agar Agar (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* และ *L. theobromae*

ชนิดของเชื้อสาเหตุ	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	พืช/สถานที่	อาหารสังเคราะห์ที่เหมะสม
Lasiodiplodia pseudotheobromae	ลำต้น เปลือกแตกยางไหล	มะเม่า สกลนคร	Oat Meal Agar Potato Dextrose Agar Malt Extract Agar
Lasiodiplodia theobromae	ผลเน่า	มะม่วง / ฉะเชิงเทรา	Oat Meal Agar Potato Dextrose Agar Malt Extract Agar
Fusicoccum	ผลเน่า	มะม่วง / ฉะเชิงเทรา	Malt Extract Agar Potato Dextrose Agar Oat Meal Agar

4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Botryosphaeria*

การสกัด ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ PCR การทำดี เอ็น เอ ให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ พบว่าราที่แยกได้จากอาการลำต้นเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราจำแนกชนิดเป็นรา *Lasiodiplodia theobromae* เมื่อศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ พบว่าเป็นรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae*

การศึกษาและจำแนกชนิดสาเหตุของโรคโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

จากการตรวจเชื้อตัวอย่างโรคเปลือกแตกยางไหล ผลของการจำแนกชนิดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา จำแนกได้เชื้อ ดังนี้

สาเหตุ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A.Alves & Crous

ลักษณะของรา มีรายละเอียดดังนี้

Lasiodiplodia pseudotheobromae

ลักษณะอาการ โคนต้นมีน้ำยางสีน้ำตาลไหลออกมา บริเวณกิ่งก้าน และ ลำต้นมียางไหลออกมา เริ่มแรกจะเป็นแผลสีดำเป็นรอยช้ำและขยายขึ้น จากนั้นเปลือกจะปริแตกออก ทำให้กิ่งแห้งตาย เมื่อแกะเปลือกบริเวณยางไหลจะมีลักษณะเป็นแอ่งบุ๋ม

โคโลนีบนอาหาร PDA สีเทาดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซ็นติเมตร อายุ 21 วัน สร้างกลุ่มเส้นใยหนาหนาแน่น เจริญช้า รา *L. pseudotheobromae* และรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Malt Extract Agar

Pynidium สีน้ำตาลดำ เกิดอยู่ในเนื้อเยื่อพืช และเมื่อแก่ pynidium จะแตกออกมามีลักษณะปากเปิด

Paraphyses ใส รูปร่างคล้ายทรงกระบอก ส่วนใหญ่ไม่มีผนังกั้นเซลล์ บางครั้งมีการแตกกิ่ง ตรงส่วนปลายกลม ขนาดกว้าง 45-55 ไมครอน ยาว 3-5 ไมครอน paraphysis เกิดอยู่ระหว่าง conidiogenous cells

Conidiogenous cell ใส ผนังเรียบ รูปร่างทรงกระบอก ตรงส่วนฐานกว้างเล็กน้อย

Conidia ใส รูปร่างรีตรงกลางกว้าง ส่วนฐานและส่วนปลายกลมมน ไม่มีผนังกั้น เซลล์เดียว เมื่อแก่สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม และมีผนังกั้นเซลล์ 1 เส้น มี 2 เซลล์ ขนาด 25.5-33.0 x 11.0- 17.0 ไมครอน

รา *Lasiodiplodia theobromae* และ รา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* เป็นราที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกและมีพืชอาศัยกว้างมาก

จากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *L. theobromae* แต่เมื่อศึกษาในระดับพันธุกรรมของเชื้อพบว่าราสาเหตุโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่าจำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *L. theobromae* มาก แต่มีขนาดใหญ่กว่า (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะของรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* และรา *Lasiodiplodia theobromae*

ชนิดของรา	จำนวนเซลล์	ขนาดสปอร์ (ไมครอน)	เอกสารอ้างอิง
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	23.5-32.0 × 14.0-18.0	Alves *et al.*, 2008
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	21.7-26.3.0 x 13.4- 14.8	Abdollahzadeh *et al.*, 2010
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	25.5-33.0 x 11.0- 17.0	การศึกษาครั้งนี้
Lasiodiplodia theobromae	1	26.2-27.0 × 14.0-14.4	*Alves et al.*, 2008

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 62 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมดจำนวน 53 ไอโซเลท จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้ราทั้งหมด 4 genera 5 species

ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae*. *L. pseudotheobromae* , *Dothiorella mangiferae, Botryosphaeria* และ *Fusicoccum* และจากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* และพบว่ารา *L. pseudotheobromae* และรา *L. Theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Malt Extract Agar รา *Fusicoccum* เจริญได้ดีบนอาหาร Malt Extract Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Oat Meal Agar Agar และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Abdollahzadeh, J., A. Javadi, E. Mohammadi Goltaoeh, R. Zare, and A.J.L. Phillips. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. Persoonia 25:1-10.

Alves. A., P.W. Crous, A. Correia, and A.J.L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in Lasiodiplodia theobromae. Fungal Diversity 28: 1–13.

Britton, KO., FF. Hendrik, PL. Pusey, Okie WR., Reilly, and JW. Daniell. 1990. Evaluating the reaction of peach cultivars to infection by three *Botrysphaeria* species. HortScience 25, 468-470.

Brown, EA. and KO. Britton. 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United State, Plant Disease 70, 480-484.

Chandrasrikul, A. 1962. A preliminary host list of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14p.

Denman, S., P.W. Crous, J.Z. (E) Groenewald, B. Slippers, B. D. Wingfield, M.J. Winfield. 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. Mycologia 95 (2): 294-307.

Parker, KC. And TB. Sutton. 1993. Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. Plant Disease 77, 385-389.

Puckdeedindan, P. 1996. A supplementary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No. 7, Dept. of Agr., Bangkok. 24 p.

Pusey, PL. 1993. Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. Plant Disease 77, 170-174.

Schreiber, L.R. 1964. Stem canker and die-back of Rhododendron caused by *Botryosphaeria ribis* Gross. & Dugg. Plant Dis. Rep. 48: 207-210.

Smith, C.O. 1934. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. J. Agric. Res. (Washington, D.C.) 49: 467-476.

Themis, J.M. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of*Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. Phytopathology 81 (5): 566-573.

Weaver, D.J., 1974. A gummosis dsisease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea*. Phytopathology 64: 1429-1432.