บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

โรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โรคแอนแทรคโนสสามารถเกิดได้ในพืชตระกูลถั่ว หญ้า ผัก ธัญพืช ไม้ผล และไม้ประดับ (Bailey and Jeger, 1992) และสามารถเข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของพืชตั้งแต่ต้นกล้าจนถึงผล (Sutton, 1980) โรคแอนแทรคโนสพบได้ทั้งในช่วงการเจริญของผลและผลสุก (Bailey *et al.*, 1992) โดยความรุนแรงของโรคมี 2 ลักษณะ คือหากเกิดโรคขึ้นในแปลงจะส่งผลต่อการเจริญของผล (ระยะก่อนเก็บเกี่ยว) แต่หากเกิดโรคขึ้นในช่วงการเก็บรักษา โรคจะเข้าทำลายผลโดยตรง (ระยะหลังการเก็บเกี่ยว) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญมากของช่วงนี้ ส่วนใหญ่การเกิดโรคมักเกิดกับส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งส่วนที่อยู่ใต้ดิน เช่น ราก หรือหัว ก็มีโอกาสได้รับผลกระทบจากโรคนี้เช่นกัน (Freeman *et al.*, 1998) โรคนี้พบกระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน และในประเทศไทยยังพบความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มากกว่าในประเทศแถบอื่นๆ ของโลกอีกด้วย (นิพนธ์, 2535) อาการโดยทั่วไปของโรคแอนแทรคโนส จะเกิดเป็นแผลฉ่ำน้ำ สีน้ำตาลเข้ม และมีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียเป็นหยดสีส้มที่ในบริเวณแผล (Freeman *et al.*, 1998)

โรคแอนแทรคโนสในต่างประเทศ

มีรายงานหลายฉบับในต่างประเทศที่กล่าวถึงการเกิดโรคแอนแทรคโนสกับพืชอาศัยหลายๆ ชนิด และบางแห่งมีความสูญเสียมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Freeman *et al.*, 1998) พืชที่พบโรคแอนแทรคโนสเข้าทำลาย เช่น

อะโวกาโด (Avocado) มีรายงานการเกิดโรคในหลายๆ ประเทศ เช่น ประเทศออสเตรเลีย (Fitzell, 1987) อิสราเอล (Binyamini and Schiffmann-Nadel, 1972) แอฟริกาใต้ (Darvas and Kotze, 1987) ศรีลังกา (Sivanathan and Adikaram, 1989) กัวเตมาลา ทรินิแดด ฟิลิปปินส์ (Cook, 1975) เป็นต้น ทำให้เกิดความเสียหายทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว อาการจะเริ่มเกิดที่ขอบใบ เป็นแผลสีน้ำตาล อาการจะลุกลามจนทำให้เกิดใบร่วง จากนั้นเชื้อจะเข้าทำลายต้น เกิดเป็นแผลสีน้ำตาลหรือม่วงบนกิ่ง เป็นเหตุให้เกิดอาการต้นยืนตาย (dieback) ดอกที่ถูกเข้าทำลายจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนเป็นสีแดงน้ำตาล จนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หลังจากนั้นจะร่วง อาการเริ่มจากผลอ่อน เป็นจุดสีน้ำตาลขนาดไม่เท่ากัน แผลนี้จะขยายใหญ่ขึ้น จนเป็นแผลฉ่ำน้ำคลุมทั่วผล เป็นเหตุของการเน่าก่อนกำหนด (Fitzell, 1987) กลุ่มของโคนิเดียจะเกิดขึ้นบนแผลและแพร่กระจายไปกับฝน เมื่อสภาพอากาศเย็นและมีความชื้นสูง จะกระตุ้นให้เกิดโรคขึ้น

กล้วย (Banana) โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคสำคัญชนิดหนึ่งที่เกิดกับผลกล้วย (Jones, 2000) ในช่วงระยะก่อนเก็บเกี่ยว พบในหลายๆ ประเทศ เช่น ออสเตรเลีย อินเดีย ฟิจิ และฟิลิปปินส์ เป็นต้น แต่ไม่พบในเขตหนาวหรือแอฟริกา (Cook, 1975) โดยอาการเกิดขึ้นที่บริเวณเปลือกและขั้วผล แต่สามารถพบได้เช่นกันในผลที่ยังไม่สุกที่มีแผล อาการจะเริ่มจากเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆ บนเปลือก และขยายใหญ่ขึ้นจนเป็นสีดำไปทั่วทั้งผล ทำให้ผลเน่า บางครั้งอาจเกิดอาการเน่าแห้งได้ มีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีส้มบนแผล แต่ภายในผลจะเกิดอาการขึ้นเมื่อเปลือกเน่าทั่วทั้งหมดเสียก่อน (Ploetz, 2003) ส่วนอาการบนผลที่ยังไม่สุก จะเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลถึงดำ รูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด ขนาดประมาณ 3x8 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อยุบลงไป ขอบสีชัด และสร้างกลุ่มของโคนิเดียบนแผล การแพร่กระจายของ conidia โดยฝน อาการของโรคจะลุกลามได้เร็วเมื่อมีอากาศอบอุ่นและความชื้นสูง (Cook, 1975) มีรายงานว่าหากมีฝนตกก่อนออกดอก 35 วัน อาการของโรคจะรุนแรงมากขึ้น (Ploetz, 2003) และยังพบว่าส่วนของดอกเป็นแหล่งเพาะเชื้อที่สำคัญมากอีกด้วย (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2000)

มะเฟือง (Carambola) อาการของโรคจะเกิดขึ้นบนผล ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับของเชื้อที่เข้าทำลาย โรคนี้เกิดขึ้นในทุกประเทศที่มีการปลูก เช่น ประเทศออสเตรเลีย เกาะคานารี รัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา อินเดีย เอเชียใต้ และไต้หวัน เป็นต้น (Srivastava and Tandon, 1968; Watson *et al.*, 1988; Campbell, 1989; Duan *et al.*, 1991; Galan-Sauco and Menini, 1991; Singh, 1992; Crane, 1993; Persley, 1993) โรคนี้สร้างความเสียหายให้กับมะเฟืองในช่วงหลังเก็บเกี่ยวโดยส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามก็พบความเสียหายที่เกิดในช่วงก่อนระยะเก็บเกี่ยวเช่นกัน มีรายงานการเกิดโรคในประเทศมาเลเซีย สร้างความเสียหายมากให้กับผลผลิต การเกิดโรคจะอยู่ในช่วงที่ผลกำลังเจริญ โดยเฉพาะในช่วงหน้าฝนการสูญเสียยิ่งเพิ่มมากขึ้น อาการเริ่มพบที่ผล เป็นจุดสีดำเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วผล แล้วขยายใหญ่ขึ้นมาเชื่อมกัน ลักษณะแผลไม่สม่ำเสมอ และมีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียเป็นสีส้มบริเวณแผล อาการที่ใบเป็นแผลรูปไข่หรือรูปร่างไม่สม่ำเสมอ แล้วขยายใหญ่ขึ้น เมื่อมีความชื้นสูง โดยใบอ่อนจะอ่อนแอกว่าใบแก่ (Ploetz, 2003)

มะม่วงหิมพานต์ (Cashew) โรคแอนแทรคโนสเกิดขึ้นตั้งแต่ปี 1960 แต่มีรายงานครั้งแรกเมื่อปี 1967 ในอินเดีย ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียกับผลผลิตและเป็นโรคที่สำคัญของมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หิมพานต์ในอินเดีย อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีแดงน้ำตาล ฉ่ำน้ำบนใบ ลำต้น ดอก และฝัก ต่อมาดอกจะเปลี่ยนเป็นสีดำและร่วง ฝักจะเหี่ยวย่นและเปราะ หากเป็นโรครุนแรงขึ้นอาจทำให้เกิดอาการ dieback ทั่วทั้งต้นได้ เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในเศษซากพืชได้ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยลมและน้ำ เมื่อมีความชื้นสูง เชื้อจะเจริญและเข้าทำลายพืชต่อไป (Singh *et al.*, 1967)

ส้ม (Citrus) โรคแอนแทรคโนสของส้มมีมาตั้งแต่ก่อนปี 1900 อาจพบในทุกประเทศที่มีการปลูกและสภาพแวดล้อมเหมาะกับการเจริญของเชื้อ เช่น ประเทศออสเตรเลีย รัฐแคลิฟอร์เนีย และฟลอริดา ประเทศอเมริกา เป็นต้น (Cook, 1975) และมีรายงานความเสียหายของผลผลิตในเบลิซ (Fagan, 1979) อาร์เจนตินา และบราซิล (Denham and Waller, 1981) ความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสกับพืชพวกส้มมีอยู่ด้วยกัน 3 ลักษณะอาการ อาการผลร่วง (Postbloom fruit drop; PFD) และ lime anthracnose เป็นอาการที่สำคัญในระยะการปลูก ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากกับผลผลิต ส่วนโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest anthracnose) ถือว่าส่งผลกระทบเพียงเล็กน้อย (Timmer and Brown, 1999) อาการ PFD เกิดได้กับพืชตระกูลส้มทุกชนิด โดยเฉพาะพื้นที่ปลูกที่มีความชื้นสูง ในเขตร้อน ส่วน lime anthracnose มีผลกับส้มพันธุ์ Maxican เท่านั้น อาการของโรคจะเกิดขึ้นที่ใบหลังจากถูกเชื้อเข้าทำลาย 4-7 วัน เป็นแผลฉ่ำน้ำ จะขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขอบมีสีเข้ม มีการสร้าง acervulus ตรงกลางแผล นอกจากนี้กิ่งอ่อนก็สามารถถูกเชื้อเข้าทำลายได้เช่นกัน หากเกิดโรคนี้อย่างรุนแรงจะทำให้เกิดอาการ wither-tip ได้ (Ploetz, 2003) การแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยลม ฝน และแมลง (Fagan, 1984)

โกโก้ (Cocoa) โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายให้กับโกโก้ในอินเดียตอนใต้ (Mohanan, 1978) เชื้อสามารถเข้าทำลายภายใน 72 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นสูง 89 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิอยู่ที่ 24 องศาเซลเซียส (Mohanan *et al.*, 1987) และมีบันทึกการเกิดโรคสูงสุดบนใบ เกิดในระหว่างเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน (Mohanan *et al.*, 1989)

น้อยหน่า (Custard apple) โรคแอนแทรคโนสสามารถพบได้มากและทำให้เกิดการสูญเสียกับพืชในตระกูลเดียวกับน้อยหน่า โรคนี้ทำให้การติดผลลดลง มีรายงานในหลายๆ ประเทศ เช่น ประเทศออสเตรเลีย บังกลาเทศ บราซิล จีน สาธารณรัฐโดมินิกัน อียิปต์ โมแซมบิค ฟิลิปปินส์ โปรโตริโก อูกันดา และสหรัฐอเมริกาในรัฐฟลอริดา และฮาวาย (Snowden, 1921; Li, 1936; Aruda, 1940; de Carvalho, 1948; Alvarez-García, 1949; Batista, 1953; Abo-El-Dahab and El-Goorani, 1971; Cook, 1975; Raabe *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1988; Snowdon, 1990; Alfieri *et al.*, 1994) และมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดโรคนี้กับทุกพื้นที่ปลูกซึ่งมีอากาศอบอุ่น และความชื้นสูง (Ploetz, 2003) อาการที่พบบนกลีบดอก เป็นแผลสีน้ำตาลและขยายใหญ่จนเป็นสีดำ ทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ลดการติดผล (Cook, 1975) หากผลอ่อนถูกเข้าทำลายจะทำให้เน่าและแข็งแห้งตาย ผลสุกหรือผลที่อยู่ในระยะเก็บเกี่ยวที่ถูกเชื้อเข้าทำลายก็สามารถเปลี่ยนเป็นสีดำและเน่าแห้งได้เช่นกัน อาการที่พบบนใบ เริ่มแรกจะเห็นเป็นจุดสีเขียว แล้วจุดจะขยายเชื่อมกันกลายเป็น วงใหญ่ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ (Cook, 1975) จนทำให้ในบางครั้งใบร่วงก่อนกำหนด อาการที่เกิดกับต้นกล้าจะเข้าทำลายที่บริเวณลำต้นและเกิด damping-off ขึ้นได้ หากเชื้อเข้าทำลายบริเวณยอดของต้น อาการจะลุกลามเรื่อยลงมา อาจทำให้เกิด witches' broom และแคงเกอร์ ส่วนของพืชบริเวณนั้นจะไม่สามารถผลิตยางขึ้นได้ การแพร่กระจายของ conidia โดยลมและฝน เมื่อสภาพแวดล้อมอบอุ่นและมีความชื้น เชื้อก็สามารถเจริญได้ บ่อยครั้งที่พบว่าเชื้อจะแฝงอยู่ในผลจนผลเริ่มเน่าจึงจะแสดงอาการ เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในเศษซากพืช ดังนั้นใบ ผล และดอกที่ร่วงจึงเป็นแหล่งเพาะเชื้อได้เป็นอย่างดี (Ploetz, 2003)

ฝรั่ง (Guava) โรคแอนแทรคโนสนี้สามารถเกิดขึ้นกับผลทั้งก่อนและหลังระยะการเก็บเกี่ยว และในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกฝรั่ง สร้างความสูญเสียแก่ผลผลิตโดยเฉพาะในระยะหลังการเก็บเกี่ยว อาการของโรคเริ่มแรกเกิดขึ้นบนผลสุกบนต้น เป็นแผลฉ่ำน้ำ สีคล้ำ และมีการสร้างกลุ่มของ conidia ขึ้นในเวลาต่อมา ภายในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง แผลอาจจะขยายใหญ่มาเชื่อมกันและทำลายเนื้อเยื่อภายในผลทั้งหมด (Ploetz, 2003) และในช่วงหน้าฝนจะมีอาการยอดไหม้เกิดขึ้นอีกด้วย (Quimio and Quimio, 1975)

ลูกพลัม (Kaki) โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่เกิดขึ้นเสมอๆ บนลูกพลัม และมีรายงานการเกิดโรคในประเทศบราซิล อิตาลี และญี่ปุ่นมาตั้งแต่ปี 1915 (Cook, 1975) อาการเริ่มแรกบนพบเป็นแผลขนาดเล็กประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่ส่วนใหญ่จะเห็น แผลขนาดใหญ่ประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อของจุดขนาดเล็ก ทำให้การผลิตไฟเบอร์ของผลลดลง และผลจะร่วงก่อนสุก มีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีชมพูในแผลเรียงกันเป็นรูปวงแหวนซ้อนกัน อาการเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้ที่กิ่งด้วย conidia สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำ เมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการงอกของ conidia อยู่ที่ 10, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญและเข้าทำลายพืชอาศัยต่อไป (Cook, 1975)

ลำไย ลิ้นจี่ และเงาะ (Longan, Lychee and Rambutan) พืชในตระกูล *Sapindaceae* โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นในระยะหลังการเก็บเกี่ยวของลิ้นจี่ทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตที่มีฝนตกมาก โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่จำกัดการผลิตลิ้นจี่ในรัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา (McMillan, 1994b) และการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจในออสเตรเลีย (Johnson, 1989) นอกจากนี้โรคแอนแทรคโนสยังเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับเงาะในเขตที่มีฝนตกมากทั้งระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยอาการของโรคเกิดขึ้นที่ดอก และผล และโรคแอนแทรคโนสยัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้าทำลายใบของลำไยอีกด้วย ในลิ้นจี่ อาการของโรคจะเกิดบนผลอ่อนและทำให้ผิวเปราะ (Nakasone and Paull, 1998) และเกิดความเสียหายบนผลสุกเช่นกัน (McMillan, 1994a) อาการที่พบเป็นแผลค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ หากในช่วงเก็บรักษามีความชื้นสูง จะเกิดเป็นเส้นใยสีขาวและมีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีส้มชมพูบริเวณแผล อาการที่พบบนเงาะก็เป็นเช่นเดียวกันกับลิ้นจี่ โดยเกิดกับผลที่ใกล้สุกหรือสุกแล้ว บนใบจะเกิดเป็นจุดแผลกลม สีน้ำตาล สามารถพบได้ทั้งบนต้นกล้าและต้นที่โตเต็มที่ของเงาะ (Alahakoon *et al.*, 1994) การแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยน้ำ เชื้อจะเข้าอาศัยอยู่ในพืช แต่จะแสดงอาการของโรคเมื่อผลเริ่มสุกหรือในระยะเก็บเกี่ยว (Visarathanonth and Ilag, 1987)

มะม่วง (Mango) โรคแอนแทรคโนสตรวจพบตั้งแต่ปี 1893 ที่รัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา และมีต่อมามีรายงานการเกิดที่ประเทศคิวบา ฮาวาย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เปอร์โตริโก และทรินิแดด (Cook, 1975) โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญมากของมะม่วงในทุกที่ที่มีการปลูก ยกเว้นแต่ในพื้นที่ที่ไม่มีความชื้น หรือแห้งแล้ง (Cook, 1975; Lim and Khoo, 1985; Dodd *et al.*, 1997; Ploetz and Prakash, 1997) ซึ่งเป็นปัญหาหลักทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเป็นโรคที่เกิดบนผล และโรคแอนแทรคโนสยังสามารถเข้าทำลายใบได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีความชื้น จึงส่งผลกระทบต่อการเพาะต้นกล้าในเนิสเซอรีอีกด้วย (Bose *et al.*, 1973) อาการที่พบบนใบอ่อนจะพบในช่วงหน้าฝน เป็นช่วงที่พืชอ่อนแอมาก (Fitzell and Peak, 1984; Jeffries *et al.*, 1990) แผลบนใบจะเริ่มจากเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มเล็กๆ ขอบสีเข้ม และแผลจะขยายไปตามเส้นเวน เนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลจะแตกและหลุดร่วงไป เกิดเป็นรูตรงกลางแผล นอกจากนี้โรคแอนแทรคโนสยังสามารถเข้าทำลายกิ่งเกิดอาการ dieback ได้ แต่ยังถือว่าอัตราการเกิดโรคที่กิ่งยังน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อราชนิดอื่น (Lim and Khoo, 1985; Ploetz *et al.*, 1996) และในบางครั้งพบว่าการแสดงอาการเริ่มมาจากปลายกิ่ง อาการที่พบบนผล เป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก และขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็นแผลสีน้ำตาลถึงดำ เนื้อเยื่อบริเวณแผลจะแห้ง แผลสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วทั้งผล โดยเฉพาะบริเวณปลายผลทั้งสองข้าง อาการของโรคจะเห็นชัดในช่วงที่ผลเริ่มสุก เมื่อมีความชื้นสูง จะพบการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีส้มที่แผล และเนื้อเยื่อภายในถูกทำลายไปลึกกว่า 5 มิลลิเมตร (Ploetz, 2003) การแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยฝน conidia จะงอกภายใน 6-8 ชั่วโมงเมื่ออยู่ในน้ำ และจากนั้น 10-12 ชั่วโมงจะสร้าง appressoria Dodd *et al.* (1991) พบว่าในฟิลิปปินส์ใบที่งอกออกมาใหม่สามารถถูกเชื้อเข้าทำลายได้ง่ายที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ conidia จะอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส

มะกอก (Olive) โรคแอนแทรคโนสตรวจพบตั้งแต่ปี 1899 ในโปรตุเกส หลังจากนั้นมีรายงานการเกิดในประเทศอาร์เจนตินา ออสเตรเลีย ฝรั่งเศส กรีซ อิตาลี ญี่ปุ่น รัสเซีย ซาร์ดิเนีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สเปน และอุรุกวัย (Cook, 1975) หากมีการเกิดโรคขึ้นจะส่งผลกระทบต่อการอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะกอกและการดองมะกอก อาการที่พบบนใบ เป็นแผลแห้งสีน้ำตาล มีการสร้าง acervulus และกลุ่มของโคนิเดียเป็นสีชมพูในแผล และแผลนี้สามารถพบบนผลและกิ่งด้วย ในช่วงกำลังออกดอก พืชจะอ่อนแอต่อโรค อาการเริ่มจากเป็นแผลเล็กสีน้ำตาลที่กลีบดอก และทำลายเนื้อเยื่อภายในดอก จากนั้นจึงเข้าทำลายดอกที่อยู่ถัดไปจนเกิดเป็นอาการ dieback ไปทั้งช่อดอก อาการบนผลจะเห็นเป็นแผลขนาดเล็กสีน้ำตาลค่อนข้างกลม แผลจะขยายขนาดอย่างรวดเร็วจนคลุมทั่วทั้งผล ภายในแผลจะเห็นกลุ่มของโคนิเดียสีชมพูเกิดขึ้นเรียงกันเป็นรูปวงแหวนซ้อนกัน อาการที่เกิดขึ้นบนกิ่งอ่อนมีตั้งแต่อาการแคงเกอร์จนถึง dieback conidia สามารถเจริญได้ในที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิ 0-30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามพบว่าการสร้าง acervulus จะไม่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การแพร่กระจายของเชื้ออาศัยฝนและการชลประทาน (Cook, 1975)

มะละกอ (Papaya) โรคแอนแทรคโนสสำคัญมากสำหรับมะละกอในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะระหว่างการขนส่งไปยังตลาด (Alvarez and Nishijima, 1987) โรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกมะละกอ มีรายงานการเกิดบนใบในฮาวายและอินเดีย (Cook, 1975) อาการเริ่มจากเป็นจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก จากนั้นแผลจะขยายใหญ่ขึ้น รูปร่างกลม และขอบแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Alvarez and Nishijima, 1987) จะพบเห็นกลุ่มของโคนิเดียเป็นสีส้มถึงชมพูอยู่ในแผล อาจมีการเรียงตัวกันเป็นรูปวงแหวนซ้อนกันได้บ่อยครั้ง (Dickman, 1994) เนื้อเยื่อภายในผลจะถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีเทาและสีน้ำตาลตามลำดับ (Alvarez and Nishijima, 1987) เชื้อจะอาศัยอยู่บนกลีบดอกและใบ เมื่อมีฝนหรือลม เชื้อสามารถแพร่กระจายออกไปได้ และเข้าส่วนต่างๆ ของพืชทั้งส่วนที่ไม่มีแผลหรือผลอ่อน โดยอาศัยความดัน และการทำงานของเอนไซม์ (Dickman and Alvarez, 1983; Latunde-Dada, 2001) เชื้อจะอาศัยอยู่ภายในจนกระทั่งผลสุกจึงจะแสดงอาการ ยิ่งสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิและความชื้นสูง การเกิดโรคยิ่งรุนแรงมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อราจะไม่เจริญในสภาพที่แห้งแล้ง (Dickman, 1994)

เสาวรส (Passion fruit) โรคแอนแทรคโนสสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกซึ่งมีความชื้นสูง (Cedeno *et al.*, 1993; Lutchmeah, 1993; de Goes, 1998; Wolcan and Larran, 2000) ส่งผลให้ผลผลิตมีปริมาณลดลงและราคาขายต่ำ เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืช (Persley, 1993; de Goes, 1998) อาการที่พบบนใบเป็นจุดขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แผลจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตรงกลางแผลแตก อาการบนกิ่งพบเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มขนาดประมาณ 4-6 มิลลิเมตร ขยายใหญ่ขึ้นจนแสดงอาการแคงเกอร์ ดอกและผลที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย จะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาล ต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงน้ำตาลเข้ม และแฉะ หากแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นจะเกิดเป็นหยดน้ำผึ้งบนผิวผล มีการสร้าง acervulus ที่แผล เมื่อความชื้นสูงขึ้น กลุ่มของโคนิเดีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สีส้มจะถูกสร้างขึ้นใน acervulus ในประเทศที่มีฝนตกชุก เช่น ประเทศบราซิล จะพบอาการ dieback ซึ่งทำให้ยอดไม่เจริญ เกิดการเน่าและตายในที่สุด และยังพบว่ามีการเข้าทำลายของแบคทีเรียร่วมด้วย (de Goes, 1998) การแพร่กระจายของเชื้ออาศัยฝนหรือการชลประทานไปยังเมล็ดและต้นกล้า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของ conidia อยู่ที่ระหว่าง 30-33 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน และ 22-25 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน (Francisco Neto *et al.*, 1994)

โรคแอนแทรคโนสในประเทศไทย

โรคแอนแทรคโนสก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจสำคัญๆ ของไทยหลายชนิด เช่น เงาะ มะม่วง มะละกอ ขนุน กล้วย องุ่น สตรอเบอรี และฝรั่ง เป็นต้น ส่งผลให้ปริมาณ และคุณภาพลดลง และไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศ และต่างประเทศ จัดเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งในการส่งออกของผลไม้ไทย (วิชัย, 2540; อ้างโดย ศรัญญา, 2544) และมีรายงานการเกิดโรคอยู่หลายฉบับเช่น

Dhirabhava *et al.* (1980) และ Sangchote and Pongpisuta (1995) รายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสของมังคุดในไทยไว้ว่า แผลที่พบบนผลจะเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ แห้งแข็ง มีการสร้าง acervulus เรียงเป็นรูปวงแหวนซ้อนกัน จากนั้น conidia จะถูกสร้างภายใน acervulus แล้วแพร่กระจายไปกับฝน conidia สามารถอยู่บนผลได้นานเป็นเดือน ก่อนที่พืชจะแสดงอาการ (Sangchote and Pongpisuta, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ 3 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคบนมังคุดสามารถเข้าทำลายทุเรียน ฝรั่ง มะม่วง และเงาะได้อีกด้วย (Alahakoon *et al.*, 1994)

วิรัชและคณะ (2528) พบการเกิดโรคแอนแทรคโนสในผักกวางตุ้ง ถั่วเขียวเมล็ดดำ มะเขือเทศ อ้อย ข้าวฟ่าง พริกไทย ถั่วเหลือง กุยช่าย หน่อไม้ฝรั่ง มะม่วงหิมพานต์ และส้มโอ

พัฒนาและคณะ (2534a, 2534b) รายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสในไม้ประดับจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ดีปลี เบญจมาศ บุกคางคก เล็บครุฑด่าง คริสต์มาส หญ้าคา ปทุมา ผักโขมหัด ผักหนาบ และวาสนา

พัฒนาและคณะ (2537) รายงานการพบพืชอาศัยที่เป็นโรคแอนแทรคโนสทั้งหมด 111 ชนิด มีทั้งไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ พืชสมุนไพร และอื่นๆ

สมศิริและคณะ (2539) สมศิริและรัติยา (2539) รายงานว่าโรคแอนแทรคโนสเข้าทำลายผลในส่วนเปลือกของทุเรียน ก้านผล กลีบเลี้ยง และปลายผลของมังคุด ทำให้ผลเน่าเสีย อายุการเก็บรักษาสั้น และไม่สามารถขนส่งในระยะไกลได้

จุมพลและคณะ (2537) รายงานอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก พบว่าเริ่มเป็นจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ แผลบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายขนาดออกในลักษณะวงรี หรือวงกลม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดเป็นวงดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางครั้งจะเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอ่อนในบริเวณแผล นอกจากนี้อรพรรณและคณะ (2535) ได้ทดสอบความรุนแรงของโรคบนผลพริก 9 พันธุ์ โดยแบ่งตามขนาดของผลพริก พบว่าพริกทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคค่อนข้างสูง และผลพริกที่มีขนาดใหญ่จะมีการเกิดโรคสูงที่สุด

ชะลอ (2539) รายงานว่าโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่เกิดได้กับมะละกอเกือบทุกพันธุ์และทุกระยะการเจริญเติบโต โดยจะแสดงอาการที่ใบและผล โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลสุกจะได้รับความเสียหายจากโรคนี้เป็นอย่างมาก และเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการส่งออกของมะละกอสุกไปยังต่างประเทศด้วย

ธารทิพย์และคณะ (2547) รายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสในสตรอเบอรี โดยอาการของโรคเริ่มจากแผลขนาดเล็กรูปรี บนไหล (stolon) ขอบแผลสีม่วงแดง ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน แล้วขยายยาวไปตามไหล ต่อมาแผลจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม ขอบสีเหลืองอมชมพู แผลจะแห้งทำให้เกิดรอยคอดของไหลบริเวณแผล เมื่อสภาพอากาศเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา สตรอเบอรีจะแสดงอาการใบเฉาและเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้งสีน้ำตาลแดง ที่ผลจะเกิดแผลรูปรี สีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อบุ๋มลึกลงไปในผิวผล ขอบแผลไม่เด่นชัด เมื่อความชื้นสูง เห็นกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้มเกิดขึ้นบริเวณแผล และยังพบเชื้อที่เกิดขึ้นกับพืชอาศัยอีกจำนวน 25 ชนิด เช่น หอม กาแฟ มะม่วง ส้ม หน่อไม้ฝรั่ง องุ่น อะโวกาโด กล้วยไม้ และดาหลา เป็นต้น

นิตยา (2545) รายงานเกี่ยวกับโรคหอมเลื้อยว่าเป็นโรคที่สำคัญ ระบาดทำความเสียหายมากในฤดูฝน เกิดโรครุนแรงกับหอมหัวใหญ่ เกิดโรคปานกลางกับหอมแดงและหอมแบ่งที่ปลูกเพื่อทำหัวพันธุ์ เป็นโรคเดียวกับโรคใบเน่าแอนแทรคโนส เชื้อรานี้ทำให้เกิดอาการใบเน่าและอาการเลื้อยไม่ลงหัวด้วย สำหรับกุยช่ายจะเป็นโรคใบเน่าแอนแทรคโนสแต่ไม่แสดงอาการเลื้อย (ธารทิพย์และคณะ, 2547)

จากรายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสหลายๆ ฉบับทั้งในและต่างประเทศ ทำให้ทราบว่าโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญที่ควรมีการศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดโรคให้ละเอียดมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อราจีนัส *Colletotrichum*

โรคแอนแทรคโนส มีเชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โดยการเข้าทำลายของเชื้อ อาจเป็นได้ทั้งแบบมีเชื้อหลายสปีชีส์เข้าทำลายพืชชนิดเดียว หรือเชื้อสปีชีส์เดียวสามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ (Freeman *et al.*, 1998)

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. (ธารทิพย์และคณะ, 2547)

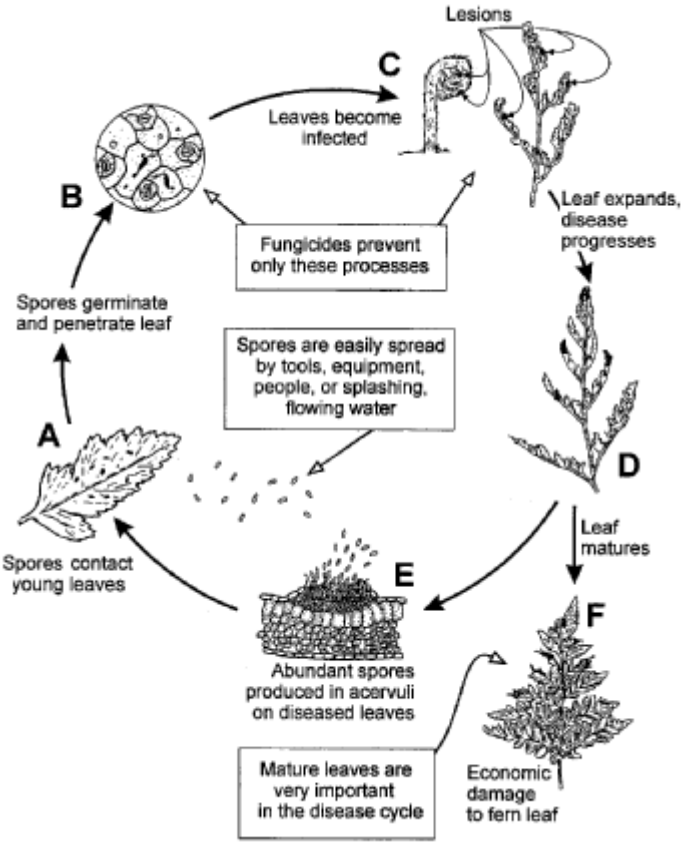
เชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นราที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina, form-class Coelomycetes, form-order Melanconiales, form-family Melanconiaceae (Ainswort, 1973) ลักษณะทั่วไปของเชื้อราคือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน จนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น conidia เกิดบน conidiophore ซึ่งมีกำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า acervulus ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก conidia จะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือของเหลวข้น สีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจะสร้าง conidia เป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium การสังเกตลักษณะของ acervulus จึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ หรือบนพืชอาศัย บางครั้งพบการสร้าง sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อ conidia เดี่ยวๆ ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังบางเรียบ ลักษณะรูปร่างรูปไข่ หรือยาวรี ตรงหรือโค้ง อาจมี guttule ลักษณะคล้ายฟองอากาศอยู่ภายใน มีการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาล ผนังหนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนามเรียกว่า setae เกิดบริเวณขอบของ acervulus หรือปะปนอยู่กับ conidiophore ลักษณะการสร้าง setae ของเชื้อรานี้เป็นลักษณะที่ไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ appressoria สีน้ำตาล ผนังสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี คล้ายกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งผนังมีรอยหยัก (lobe) สร้างเดี่ยวๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม teleomorph state ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* (Sutton, 1980; วิจัย, 2546)

วงจรชีวิตและการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* (Swart, 1999)

การเข้าทำลายของเชื้ออาศัยการพาของน้ำในช่วงที่ฝนตก และเกิดขึ้นตั้งแต่กำลังติดผลจนถึงการเก็บรักษา แหล่งเพาะเชื้อที่สำคัญคือเศษซากพืชที่เป็นโรคแล้วหล่นอยู่ในบริเวณแปลง (Dodd *et al.*, 1992) conidia จะกระจายไปทั่วทั้งแปลงปลูกเมื่อมีการทดน้ำเข้าแปลง หรือมีฝนตกหนัก และหากมีอากาศชื้น (ภาพ 1) จะส่งเสริมให้การเจริญของเชื้อดียิ่งขึ้น (Prusky, 1994) เมื่อ conidia ตกลงบนผิวพืช จะเริ่มงอกเส้นใยภายใน 12-48 ชั่วโมง (Jeffries *et al.*, 1990) โดยอาศัยเมือกเหนียวที่อยู่รอบ conidia ในการยึดเกาะกับผิวพืช (Jeffries and Koomen, 1992) การงอกเส้นใยเกิดขึ้นเป็นสายสั้นๆ หลังจากนั้นจะเริ่มสร้าง appressoria (Jeffries *et al.*, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

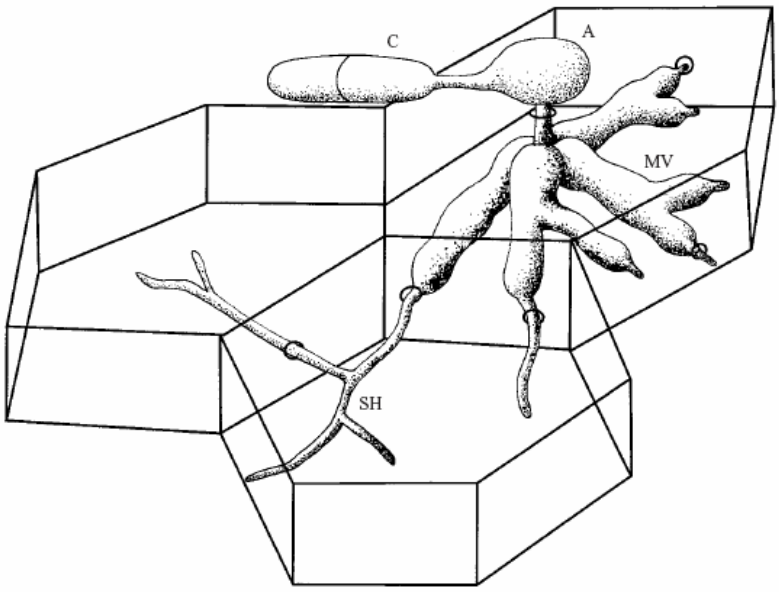
appressoria ที่ยังอ่อนอยู่นี้จะยังมีสีใสหรือไม่มีสี แต่เมื่อเวลาผ่านไปความเหนียวและสีจะเพิ่มมากขึ้น (Jeffries *et al.*, 1990) และมีการสร้าง peg เพื่อแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช แต่การสร้าง peg ต้องขึ้นอยู่กับช่วงการพัฒนาของผลด้วย (Coates *et al.*, 1993) นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่อยู่ที่เปลือกของผล ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่ง ที่มีผลต่อความยาวของ peg ที่เชื้อสร้างขึ้น (Prusky *et al.*, 1991) ช่วงก่อนที่เชื้อจะสร้างเส้นใยเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช จะมีการพักตัว ดังนั้นช่วงนี้จึงเป็นช่วงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ด้วยการเคลือบ wax ที่เปลือกของผล (Prusky and Plumbley, 1992) เมื่อผลสุก การสร้างสารต่อต้านเชื้อรา หรือกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจะลดลง เชื้อจะเข้าไปทำลายภายในเซลล์พืช และลุกลามไปยังเซลล์ที่อยู่ถัดไปอย่างรวดเร็ว (ภาพ 2) ทำให้ผลเน่าเป็นลำดับ จึงเป็นเหตุผลที่ว่าทำไมเชื้อราต้องรอให้มีการติดผลหรือผลสุกก่อนจึงจะเข้าทำลายพืช



ภาพ 1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Colletotrichum acutatum*

(ที่มา; mrec.ifas.ufl.edu/edu/jos/section_3.htm)

ลิขสิทธิ์ ใหม่
Copyright ersity
All r ed



ภาพ 2 แผนภาพการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ในยาสูบ โดย conidia (C) สร้าง appressorium (A) แทงเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช เกิดเป็น multi-lobed vesicle (MV) และสร้าง thin secondary hyphae (SH) ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง (ที่มา; Shen *et al.*, 2001)

การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum*

การจัดจำแนกมีความสำคัญมากต่อการวินิจฉัยโรค เนื่องจากปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคจะขึ้นอยู่กับการส่งเสริมกันของสปีชีส์ของเชื้อและชนิดของพืชอาศัยเป็นสำคัญ ดังนั้นการกำจัดโรคจึงต้องมุ่งเน้นไปที่การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* เป็นอันดับแรก จะทำให้รู้ถึงคุณลักษณะของเชื้อในสปีชีส์นั้นๆ ยิ่งหากทราบถึงความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* มากเท่าใด ยิ่งทำให้ผลการควบคุมโรคดีมากขึ้นเท่านั้น ความแตกต่างระหว่างสปีชีส์นั้น จะทำให้ทราบถึงการแพร่กระจายของเชื้อ ดังนั้นจึงควรมีข้อมูลของการแสดงอาการของโรคบนเนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *C. acutatum* เป็นเชื้อที่เข้าทำลายส้ม ทำให้เกิดโรคผลร่วง (postbloom drop) ในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว แต่เชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยว เป็นต้น สำหรับการควบคุมโรคนั้น ในบางครั้งเชื้อชนิดเดียวกันอาจทำให้เกิดความเสียหายในแหล่งปลูกอื่นที่มีอยู่ทั่วโลกก็เป็นได้ โดยเฉพาะการผสมพันธุ์เพื่อให้เกิดพืชต้านทานโรค ยิ่งจำเป็นต้องทราบสปีชีส์ที่แน่นอนของเชื้อสาเหตุนั้นๆ ก่อน (Freeman *et al.*, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Colletotrichum* มีรายงานการพบครั้งแรกในปี 1790 โดย Tode และจัดจำแนกไว้ในสกุล *Vermicularia* ต่อมามีการเปลี่ยนชื่ออยู่หลายครั้ง จนในที่สุดจึงแยกออกมาเป็นสกุล *Colletotrichum* โดย Fries ในปี 1821 ในระยะแรกการจัดจำแนกใช้พืชอาศัยเป็นเกณฑ์ พบว่ามีเชื้อรา *Colletotrichum* มากถึง 900 สปีชีส์ จึงมีการหาหลักเกณฑ์ใหม่ เพื่อนำมาจัดจำแนก เช่น ในปี 1957 von Arx ได้จัดจำแนกเชื้อเป็น 23 สปีชีส์ จากนั้นในปี 1989 Farr และคณะ ทำการจัดจำแนกใหม่ได้ 49 สปีชีส์ แต่มีข้อจำกัดหลายประการ จึงทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับ และในปี 1992 มีการจัดจำแนกใหม่โดย Sutton เป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้เป็น 39 สปีชีส์ และหลักเกณฑ์นี้เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน (Sutton, 1992)

การจัดจำแนกสปีชีส์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น เป็นการจำแนกตามความแตกต่างของเชื้อที่เกิดขึ้น เช่น สีของโคโลนี ขนาดและรูปร่างของ conidia อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต อัตราการเจริญ การสร้างหรือไม่สร้าง setae และการเกิดเชื้อรา *Glomerella* (Gunnell and Gubler, 1992; Smith and Black, 1990; Sutton, 1992; von Arx, 1957) เช่น

Smith and Black (1990) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. 24 ไอโซเลท ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในสตรอเบอรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่ารูปร่างของ conidia ของเชื้อรา *C. acutatum* เป็นแบบ fusiform ซึ่งมีลักษณะหัวท้ายแหลม ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนกับ conidia ของเชื้อรา *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ที่เป็นแบบ cylindrical ซึ่งมีลักษณะหัวท้ายมน ส่วนการแยกความแตกต่างของเชื้อรา *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ใช้อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเกณฑ์ โดยในวันที่ 5 เชื้อรา *C. fragariae* จะเจริญได้ 69 มิลลิเมตร และ *C. gloeosporioides* จะเจริญได้ 63 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *C. fragariae* จะทำให้เกิดโรคบนสตรอเบอรีได้ ต้องมีการทำให้เกิดแผลก่อน แต่ในขณะที่เชื้อรา *C. acutatum* สามารถทำให้ผลเน่าได้โดยไม่ต้องมีการทำให้เกิดแผล

Agostini *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 3 strains ที่เข้าทำลายพืชตระกูลส้ม คือ strain ที่โตไวสีเทา (FGG), strain ที่โตช้าสีส้ม (SGO) และ strain ที่เข้าทำลายพวกมะนาว (KLA) พบว่า strain FGG มีขนาด conidia ใหญ่ และปลายมนทั้งสองข้าง ในขณะที่ strain SGO และ KLA จะมี conidia ขนาดเล็กและปลายข้างหนึ่งแหลม และ strain FGG เจริญได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับ strain SGO และ KLA การแสดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อาการของโรคบนมะนาวสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง SGO และ KLA ได้ ซึ่งพบว่า KLA จะทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส แต่ SGO จะทำให้ใบมะนาวเปลี่ยนสีเล็กน้อยเท่านั้น

วีระณีย์และเกษม (2543) ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสปีชีส์ *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด ทั้งหมด 20 ไอโซเลท พบว่าสามารถจำแนกได้ 4 สปีชีส์ คือเชื้อรา *C. dematium* จำนวน 2 ไอโซเลท จากโหระพา เชื้อรา *C. gloeosporiodes* จำนวน 16 ไอโซเลท จากวาสนา หนวดปลาหมึก อมรเบิกฟ้า ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน ปาล์มหางหมาป่า มะม่วงเขียวเสวย มะม่วงอกร่อง มะละกอ พริกไทย ชมพู่ และสตรอเบอรี่ เชื้อรา *C. lindemuthianum* จำนวน 1 ไอโซเลท จากถั่วลิสง และเชื้อรา *C. musae* จำนวน 1 ไอโซเลท จากกล้วยน้ำหว้า และยังพบอีกว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจากมะม่วง สามารถเจริญเติบโตและสร้าง conidia ได้ดีบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 6 ซึ่งเชื้อราดังกล่าวยังทำให้เกิดโรคพืชอาศัยชนิดอื่นๆ อีกเช่น ส้มเขียวหวาน ละมุด ฝรั่ง มะกอกน้ำ ขนุน มะเขือเทศ พริกหยวก และถั่วลิสงได้ด้วย

ธารทิพย์และคณะ (2547) ได้ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากพืชอาศัยหลายชนิด จำนวน 110 ไอโซเลท และจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ออกได้เป็น 5 ชนิด คือเชื้อรา *C. gloeosporioides, C. capsici*, *C. circinans*, *C. acutatum* และ *C. truncatum* และยังพบว่าในพืชชนิดเดียวกัน มีเชื้อ 2 สปีชีส์ที่เข้าทำลาย ได้แก่ สตรอเบอรี ที่พบทั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* เช่นเดียวกับหอมแบ่งที่พบเชื้อ 2 สปีชีส์เข้าทำลาย คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. circinans* แต่ในพริกนั้น พบเชื้อถึง 3 ชนิดที่เข้าทำลายได้แก่ เชื้อรา *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และ *C. acutatum*

แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีความผันแปรสูง สามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่ายตามสภาพแวดล้อม จึงนำวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกันมาใช้ (Vegetative compatibility; VCG) เพื่อศึกษาความเกี่ยวพันธ์ระหว่างเชื้อ มีการนำไปใช้ในการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ เช่น เชื้อรา *C. dematium* ที่แยกได้จากผักโขม (Correll *et al.*, 1993) เชื้อรา *C. orbiculare* ที่แยกได้จากแตง (Wasilwa, 1993) เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากอัลมอนด์ (Katan and Shabi, 1996) เชื้อรา *C. graminicola* ที่แยกได้จากข้าวโพด (Vaillancourt and Hanau, 1994) และเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากสตรอเบอรี (Freeman and Katan, 1997) นอกจากนี้การทนสาร benomyl ยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อได้ เช่น เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไม่ทนต่อสาร benomyl แต่เชื้อรา *C. acutatum* สามารถทนได้ (Bernstein *et al.*, 1995; Brown *et a*l, 1996; Liyanage *et al.*, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในปัจจุบันมีการพบเชื้อรา *Colletotrichum* เพิ่มมากขึ้น แต่หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกยังคงจำแนกตามพืชอาศัยอยู่ แม้แต่การจำแนกของ Sutton (1992) ซึ่งจำแนกได้เป็น 39 สปีชีส์ และเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป แต่ยังคงมีเชื้อรา *Colletotrichum* อีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ หรือจัดจำแนกได้แต่ไม่ชัดเจน (Cano *et al.*, 2004) จึงควรหาวิธีอื่นมาช่วยในการจัดจำแนกร่วมกับการจัดจำแนกโดยทางสัณฐานวิทยา วิธีที่น่าสนใจและมีผู้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายอีกวิธีการหนึ่งคือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายเทคนิคมีข้อดีข้อด้อยต่างกันไป แต่ทุกเทคนิคนั้นประยุกต์จากเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เหมือนกัน

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (อังสนา, 2546)

เทคนิค PCR ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1985 เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น เทคนิคนี้เลียนแบบจากการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอสามารถจับคู่กันได้เพราะมีเบสคู่สม (complementary) ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับได้กับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลิโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบเดิม ดังนั้นก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น

ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้น ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95-96 องศาเซลเซียส

2. Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-70 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะตรงบริเวณลำดับเบสคู่สมได้ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของ primer และดีเอ็นเอต้นแบบ

3. Primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการนำเอาเบสมาเรียงต่อจาก primer ในทิศทางจาก 5’-3’ โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติอุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ และในทุกๆ รอบที่ทำ PCR จะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2 เท่า หากทำจำนวน n รอบ จะได้สายดีเอ็นเอประมาณ 2^{n+1}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธี PCR ยังมีการประยุกต์หลายวิธี ได้แก่ hot start PCR (การควบคุมให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มขึ้นหลังจากดีเอ็นเอเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แล้วเท่านั้น) nested PCR (การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งคู่ที่ 2 มีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรก) booster PCR (การทำ PCR โดยใส่ไพรเมอร์ปริมาณน้อยๆ ในช่วงแรก และเพิ่มความเข้มข้นให้เท่ากับปกติในการทำปฏิกิริยาช่วงหลัง) และ touch down PCR (การทำ PCR โดยใช้สภาวะที่เข้มงวดมากในรอบแรก และค่อยๆ ลดลงในรอบต่อมาตามลำดับ) (สุรินทร์, 2545) และวิธี touch down PCR นี้เป็นวิธีที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ด้วย

วิธีการ Touch down PCR

เป็นวิธีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณน้อยและมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย การปฏิบัติใช้วิธีปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้สูงในรอบแรกและค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงทีละน้อยในรอบต่อๆ มาจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการทำปฏิกิริยาจริงๆ ในรอบแรกๆ ไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ยากเนื่องจากอุณหภูมิสูงกว่าค่า Tm มาก จึงจับตัวได้เฉพาะตำแหน่งที่ถูกต้องจริงๆ เท่านั้น ในรอบต่อๆ มาแม้ว่าจะลดอุณหภูมิลง แต่ผลผลิตที่ถูกต้องจะเพิ่มากขึ้นเป็นหลายเท่าและมีมากกว่าดีเอ็นเออื่นมาก จึงไม่ต้องกลัวว่าไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเออื่นที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอีกต่อไป (สุรินทร์, 2545)

การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* โดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโมเลกุล หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และมีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ (อภิชาต, 2543) ถือเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้หาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ และชัดเจน เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างถึงระดับพันธุกรรม จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในชื่อที่รู้จักกันว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA fingerprint) โดยเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้อย่างมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) การปรับปรุงพันธุ์ (breeding) ตลอดจนการระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืชและเชื้อรา (Weising *et al.*, 1995)

มีเทคนิคทางอณูวิทยาหลายเทคนิคที่ถูกนำมาใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

คือการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์กันย่อมมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไม่มากก็น้อย ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (อภิชาต, 2543)

Beynon *et al.* (1995) ใช้เทคนิค RFLP เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อรา *C. kahawae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟในแอฟริกา พบว่าเชื้อมีความแตกต่างอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* แต่อย่างไรก็ตามไม่พบแถบ polymorphism ที่จะแยกความแตกต่างของเชื้อ 25 ไอโซเลทภายในกลุ่มได้

Freeman *et al.* (1996) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* จำนวน 120 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอะโวกาโด จำนวน 63 ไอโซเลท และอัลมอนด์ จำนวน 57 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค RFLP พบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ *Hea*III ทำให้แยกระหว่างเชื้อจากอัลมอนด์และอะโวกาโดได้ และยังพบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ไม่ทำให้เกิด polymorphic กับเชื้อจากอัลมอนด์

Martinez-Culebras *et al.* (2000) ใช้วิธี RFLP เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุของสตรอเบอรี พบว่าเอนไซม์ *Mvn*I, *Pvu*II และ *Scr*FI สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ออกจากกันได้

Freeman *et al.* (2001b) ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *C. acutatum* ที่แยกได้จากพืชหลายชนิด โดยใช้วิธี RFLP ร่วมกับ RAPD พบว่าเชื้อมีความหลากหลายสูง สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะของพืชอาศัย

Abang *et al.* (2002) จำแนกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมันเทศในประเทศไนจีเรีย โดยวิธี PCR-RFLP จากเชื้อ 4 strain ได้แก่ slow-growing grey (SGG), moderately virulent fart-growing salmon (FGS), weakly virulent fast-growing grey (FGG) และ moderately virulent fast-growing olive (FGO) พบว่าเชื้อทุก strain เป็นเชื้อรา *C. acutatum*

Guerher *et al.* (2003) ทำการศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากโรคผลเน่าและโรคที่ใบของพืชหลายชนิด โดยวิธี RFLP และการหาลำดับเบสบริเวณ 900-bp intron ของยีน glutamine synthetase และ 200-bp intron ของยีน glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase พบว่าจากทั้งสองวิธีการสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่มเหมือนกัน

DaXing *et al.* (2004) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่มี conidia แบบโค้ง (falcate) จำนวน 38 strain โดยใช้วิธี RFLP บนบริเวณ ITS พบว่าเอนไซม์ *Alu*I,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

*Bsu*RI, *Hin*6, *Hpa*II และ*Taq*I สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ แต่ความแตกต่างภายในสปีชีส์ไม่สามารถบอกได้ และเมื่อทำการจัดกลุ่ม สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม 3 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อรา *C. truncatum*, *C. circinans* และ *C. capsici* ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง

2. เทคนิค RAPD (Randomly Amplied Polymorphic DNAs)

คือการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR แบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นประมาณ 10 เบส และเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด จึงไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูจำลองตัว

Kuramae-Izioka *et al.* (1997) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรค postbloom fruit drop ของส้มในบราซิล โดยใช้วิธี RAPD ร่วมกับการทดสอบสีของโคโลนี การเจริญของเส้นใย การทนสาร benomyl และความสามารถในการเกิดโรค พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นไอโซเลทที่โตเร็วบนอาหาร PDA และไม่ทนต่อสาร benomyl ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เป็นไอโซเลทที่โตช้าบนอาหาร PDA และทนสาร benomyl นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อในกลุ่มที่ 2 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* และกลุ่มที่ 2 คือเชื้อรา *C. acutatum*

Denoyes-Rothan *et al.* (2002) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกเชื้อ *C. acutatum* ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มหนึ่งเป็นเชื้อที่มาจากสตรอเบอรีพันธุ์ปลูก ส่วนอีกกลุ่มเป็นเชื้อที่มาจากสตรอเบอรีพันธุ์อื่นๆ อีกทั้งยังพบว่าเชื้อที่มาจากสตรอเบอรีเหล่านี้ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากกับเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในสตรอเบอรี และคาดว่าอาจเป็นไปได้ที่เชื้อจะพัฒนากลายเป็นเชื้อสาเหตุต่อไป

Mohanrai *et al.* (2002) ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *C. falcatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค red rot ในอ้อย โดยใช้วิธี RAPD พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 80 ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มของเชื้อได้เป็น 7 กลุ่มใหญ่

Weed *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เข้าทำลายถั่วสไตโลในประเทศบราซิล โคลัมเบีย ออสเตรเลีย จีน และอินเดีย พบว่าความหลากหลายของเชื้อในบราซิล และอินเดีย มีสูงมากอาจเป็นด้วยพันธุ์พื้นเมืองที่มีการปลูกมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวาง เช่นเดียวกับความหลากหลายของเชื้อที่พบใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จีนและอินเดีย ก็สูงเช่นกัน อาจเกิดจากการนำเข้าพันธุ์พืชจากอเมริกาใต้ แต่ความหลากหลายของเชื้อในออสเตรเลีย ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากประสิทธิภาพในการกักกันพืชเข้าประเทศที่ได้ผลดี

Yi *et al.* (2003) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของถั่วสไตโลในประเทศจีน เปรียบเทียบกับเชื้อ 276 ไอโซเลท จากแหล่งปลูกอื่น โดยใช้วิธี RAPD พบว่ามีไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอออกมา อยู่ระหว่าง 0.3-2.8 kb โดยแบ่งไอโซเลทจากจีนได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งมีความใกล้ชิดกันมาก และยังพบว่าในกลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อจากประเทศอเมริกาใต้อีกด้วย

3. เทคนิค AFLP (Amplified Fragement Length Polymorphism)

คือการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เป็นการรวมหลักการของ RFLP และ RALD เข้าด้วยกัน สารพันธุกรรมจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) 2 ชนิด จากนั้นปฏิกิริยา PCR1 จะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ข้อดีของ AFLP คือมีความแน่นอนของผลการตรวจสูงเหมือน RFLP และสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่งภายในสารพันธุกรรมเหมือน RAPD

Gonzalez *et al.* (1998) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. lindemuthianum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) โดยใช้วิธี AFLP พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามพันธุ์ของพืช และยังพบว่าการแบ่งกลุ่มย่อยนั้นสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บเชื้ออีกด้วย

Ansari *et al.* (2002) ใช้วิธี AFLP เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lindemuthianum* จำนวน 73 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากพืช 10 แหล่ง พบว่าเกิดความแตกต่างระหว่างไอโซเลทอย่างมีนัยสำคัญ และสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บเชื้อ

พัชรา (2543) ทำการศึกษาเปรียบเทียบทางด้านสัณฐานวิทยา และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วง ทุเรียน ฝรั่ง ชมพู่ ลิ้นจี่ องุ่น และมะละกอ จำนวนทั้งหมด 45 ไอโซเลท พบว่าเชื้อรามีความผันแปรสูงมาก ไม่มีไอโซเลทใดที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันเลย และสามารถจัดกลุ่มได้ 9 กลุ่ม แต่ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มกับแหล่งที่มาและพืชอาศัยของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอมอร (2544) ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยหลายชนิด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธี AFLP พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทคือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา และสามารถแบ่งได้เป็น 11 กลุ่ม จากผลของการใช้วิธี AFLP

4. เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellite primer PCR (MP-PCR)

คือการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง microsatellite 2 ตำแหน่ง ซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เทคนิค ISSR ปรับปรุงมาจากเทคนิค microsatellite (Bao and Jonathan, 2001) ซึ่งรวมเอาข้อดีของเทคนิค microsatellite, AFLP และ RAPD ไว้ด้วยกัน ไพรเมอร์มีลำดับเบสซ้ำๆ แบบ microsatellite โดยส่วนใหญ่จะมีความยาวประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ มีอยู่ 2 แบบคือแบบ unanchored (Gupta *et al.*, 1994; Myer *et al.*, 1993) เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดของลำดับเบสซ้ำๆ เช่น $(GA)_8$, $(CGT)_4$, $(ATTA)_2$, $(CGTTG)_7$ เป็นต้น (Predeep *et al.*, 2002) อีกแบบคือ anchored เป็นไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วยเบส 1-4 นิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 3’ (เรียกว่า 3’-anchored) เช่น $(CTT)_7GC$, $(AG)_6AT$ หรือที่ปลาย 5’ (เรียกว่า 5’-anchored) เช่น $CA(CGTG)_7$, $GC(ATA)_2$ ซึ่งหากเติมเบสที่ปลาย 5’ ของไพรเมอร์ จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอมากขึ้น และเกิดความแตกต่างมากขึ้นด้วย (highly polymorphic) หากเติมเบสที่ปลาย 3’ ของไพรเมอร์ จะทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความชัดเจนขึ้นเมื่อเทียบกับ 5’-anchored primer (Pradeep *et al.*, 2002) เทคนิค ISSR เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น เป็นเทคนิคที่มีความคล้ายคลึงกับเทคนิค RAPD แต่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า จึงทำให้อุณหภูมิ annealing ที่ใช้สูงกว่าเพราะอุณหภูมิขึ้นกับ GC content ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (Pradeep *et al.*, 2002) จึงมีความหลากหลายมากกว่า และมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่า (Fang and Roose, 1997; Ge and Sun, 1999; Ratnaparke *et al.*, 1998) นอกจากนี้ข้อดีของเทคนิค ISSR คือ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการศึกษาก่อน, ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก (Probe), มีความสามารถในการทำซ้ำสูง เกิดความแตกต่างสูง (Bao and Jonathan, 2001) ใช้เวลาในการตรวจสอบผลสั้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งอะกาโรสเจล และโพลีอะคริลาไมด์เจล และราคาถูก ซึ่งความสามารถของไอเอสเอสอาร์จะขึ้นอยู่กับความหลากหลายและความถี่ของ microsatellite โดยจะแตกต่างกันไปตามแต่ละ สปีชีส์ (Morgan and Olivivieri, 1993; อ้างโดย อรวรรณ, 2547)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค ISSR มาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อศึกษาถึงความหลากหลาย โดยเฉพาะกับพืช เช่น ถั่วลิสง (Raina *et al.*, 2001) ชา (Lai *et al.*, 2001) มันฝรั่ง (Prevost and Vilkinson, 1999; Bornet *et al.*, 2002) หอม (Gang *et al.*, 2002) ต้นสน (Adams *et al.*, 2003) กาแฟ (Paulo *et al.*, 2003) ข้าว (Hari Prasad *et al.*, 2005) เป็นต้น สำหรับการหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ด้วยเทคนิค ISSR มีการใช้ในหลายๆ งานวิจัย แต่ใช้ชื่ออื่นที่ต่างออกไป เช่น ap-PCR หรือ MP-PCR เป็นต้น และใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นด้วยยกตัวอย่างเช่น

Freeman and Shabi (1996) หาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จากอัลมอนด์ แอปเปิล มะม่วง และถั่วพีแคน และเชื้อรา *C. acutatum* จากแอปเปิล ลูกท้อ และถั่วพีแคน โดยใช้เทคนิค ap-PCR, A+T-rich DNA พบว่าสามารถแยก เชื้อรา *Colleotrichum acutatum* ออกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ และในกลุ่มของเชื้อรา *C. acutatum* มีความเหมือน 78-93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความเหมือน 0-38 เปอร์เซ็นต์

Forster and Adaskaveg (1999) ทำการหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. acutatum* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในอัลมอนด์ โดยใช้เทคนิค ap-PCR พบว่าเชื้อจากอิสราเอลมีความเหมือนกันมากกับเชื้อที่แยกมาจากแคลิฟอร์เนีย

Freeman *et al.* (2000) ทำการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของดอก anemone ใช้เทคนิค ap-PCR ร่วมกับการจัดกลุ่มตาม vegetative-compatibility groups (VCGs) พบว่าเมื่อแบ่งกลุ่มตาม VCGs ได้ 3 กลุ่ม แต่เมื่อใช้วิธี ap-PCR เหลือเพียง 2 กลุ่ม

Freeman *et al.* (2002) หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้แก่ *C. acutatum, C. coccodes, C. fragariae, C. lindemuthianum, C. magna, C. orbiculare* และ *C. graminicola* โดยใช้เทคนิค ap-PCR, A+T-rich DNA และการหาลำดับเบส พบว่าค่าความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ที่ระดับ 86-100 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเหมือนระหว่างกลุ่มอยู่ที่ระดับ 0-33 เปอร์เซ็นต์

Talhinhas *et al.* (2002) ทำการหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของ Lupin โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิค ap-PCR และการหาลำดับเบสบน ITS พบว่าเชื้อสาเหตุคือเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง

Urena-Padilla *et al.* (2002) ทำการหาความหลากหลายของเชื้อที่เข้าทำลายผลและลำต้นของสตรอเบอรี โดยใชเทคนิค ap-PCR ร่วมกับ RAPD พบว่ามีความแตกต่างสูงภายในกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในขณะที่ในกลุ่มเชื้อรา *C. acutatum* มีความใกล้ชิดกันสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Afanador-Kufuri *et al.* (2003) ทำการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เข้าทำลาย ส้มโอ มะม่วง และpassiflora ในประเทศโคลัมเบีย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน และเทคนิค ap-PCR ร่วมกับ RAPD และ A+T-rich พบว่าเชื้อที่เข้าทำลายส้มโอคือเชื้อรา *C. acutatum* ส่วนเชื้อที่เข้าทำลายมะม่วงและ passiflora คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งผลตรงกับการใช้ species-specific primer เมื่อใช้เทคนิคทางอณูวิทยา พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความหลากหลายมากกว่า

Talhinhas *et al.* (2004) ทำการหาความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยหลายชนิด โดยใช้เทคนิค ap-PCR และการหาลำดับเบสบนตำแหน่ง β-tubulin พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* เป็นเชื้อสาเหตุหลัก ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อรอง และภายในกลุ่มของเชื้อรา *C. acutatum* สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 5 กลุ่ม

Abang *et al.* (2006) ทำการหาความหลากหลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมันเทศในไนจีเรีย โดยใช้เทคนิค MP-PCR ร่วมกับ DGGE พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม และเชื้อมีความหลากหลายสูงมาก

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้เทคนิค ISSR เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colleotrichum* spp. จากพืชอาศัยหลายๆ ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved