ราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธี

โดย
นายปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธี

โดย
นายปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

FUNGI FOR BIOLOGICAL CONTROL OF TRIDAX DAISY (*TRIDAX PROCUMBENS*)

By

MR. Piyapat TEPBOONRUENG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2020

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	ราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธี
โดย	ปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ดร.อลงกรณ์ อำนวยกาญจนสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญศรี จงเสรีจิตต์)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

59313201 : จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ชีววิธี, ตีนตุ๊กแก, Colletotrichum siamense, Phoma multirostrata

นาย ปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง: ราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์

ปัญหาสำคัญในการปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยคือ มีวัชพืชปนเปื้อนแปลงเกษตร โดยเฉพาะแปลงมันสำปะหลัง ซึ่งวัชพืชใบกว้างที่สำคัญคือ หญ้าตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens*) หรือชื่อสามัญ Tridax daisy วัชพืชชนิดนี้เป็นพืชล้มลุกลักษณะเลื้อยไปตามพื้นดินสร้างปัญหารบกวนการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง วิธีการแก้ปัญหาด้วยการใช้สารเคมีในแปลงมีผลกระทบอันตรายกับผู้บริโภคและสะสมในสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธี โดยแยกราจากวัชพืชใบกว้างด้วยวิธี transplanting ได้รา 7 ไอโซเลต เมื่อศึกษาการเกิดโรคต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก ด้วยการฉีดพ่นสปอร์ 1×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่า *Colletotrichum siamense* Cs1 และ *Phoma multirostrata* Pm1 มีประสิทธิภาพในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแกและการใช้สารแขวนลอยสปอร์ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรค 79.6-93.8% และ 88.6-92% ตามลำดับ ในวันที่ 14-18 หลังการฉีดพ่น เมื่อทำการติดตามระยะการก่อโรคด้วยการแทรกยีนเรืองแสงสีเขียว (green fluoresecent protein; GFP) ในราทั้ง 2 ไอโซเลต ตามด้วยการฉีดพ่นสปอร์ที่มียีน GFP บนวัชพืชตีนตุ๊กแก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ สปอร์ *C. siamense* Cs1 เกิดการงอกและสร้างส่วนแอพเพรสซอเรียม ในขณะที่ *P. multirostrata* Pm1 เกิดการงอกของสปอร์แต่ไม่มีการสร้างแอพเพรสซอเรียม ในวันที่ 7-10 หลังการฉีดพ่น ต่อมาวันที่ 14-18 หลังการฉีดพ่น ราทั้งสองแทงเส้นใยและดูดซึมสารอาหารในวัชพืชจนกระทั่งเข้าสู่ช่วง necrotrophic phase หรือในช่วงที่พืชเริ่มแห้งตาย เมื่อทำการทดลองที่เหมือนกันในมันสำปะหลัง พบว่า รา *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 สร้างความรุนแรงในการก่อโรคเป็น 8.9-23.7% และ 43.8-81.3% ตามลำดับ สำหรับ *C. siamense* Cs1 เกิดผลกระทบในการก่อโรคต่อมันสำปะหลังต่ำ อย่างไรก็ตามราทั้งสองไอโซเลตนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกได้

59313201 : Major (MICROBIOLOGY)
Keyword : Biocontrol, Colletotrichum siamense, Phoma multirostrata, Tridax procumbens

MR. PIYAPAT TEPBOONRUENG : FUNGI FOR BIOLOGICAL CONTROL OF TRIDAX DAISY (*TRIDAX PROCUMBENS*) THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR BOONSRI JONGSAREEJIT, Ph.D.

A major problem on cassava plantation in Thailand are weeds. The main broadleaf weed in cassava plot is tridax daisy (*Tridax procumbens*), a biennial weed that grows on the ground, interfere and reduce the growth of cassava. Past management of weeds in cassava has been the use of chemical herbicides, which have a harmful effect on consumers, and accumulate in the environments. In this study, we demonstrated the use of phytopathogens for biological control of tridax daisy. We isolated plant pathogens from several broadleaf weeds by transplanting method. Seven fungal isolates were selected from the weeds and determined for pathogenicity against tridax daisy using topical application at $1x10^8$ conidia/ml. The isolates of *Colletotrichum siamense* Cs1 and *Phoma multirostrata* Pm1 were the most effective on tridax daisy. Application of the conidial suspension of these fungi on tridax daisy weed led to 79.6-93.8% and 88.6-92% disease severity, respectively, on day 14-18 post inoculation. We taged disease severity by transformation of green fluorescent protein (GFP) gene in two fungi and sprayed GFP conidia on tridax daisy, fluorescence microscopy showed that *C. siamense* Cs1 conidia germinated and formed appressoria, while *P. multirostrata* Pm1 conidia germinated without appressorium formation on days 7-10 post-inoculation. On days 14-18 after inoculattion, the fungi penetrated and absorbed the nutrient from the damaged weed leaves, and then switch to a necrotrophic phase. In a similar application of the fungal suspentions on cassava plants, *C. siamense* Cs1 and *P. multirostrata* Pm1 led to 8.9-23.7% and 43.8-81.3% disease severity, respectively, *C. siamense* Cs1 caused low pathogenicity to cassava. These two fungal isolates are potential bioherbicide agents for controlling tridax daisy.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์ สำหรับคำแนะนำที่ดีในการศึกษา การดำเนินงานวิจัย การแก้ไขปัญหา ตลอดจนการเป็นแบบอย่างที่ดีและการชี้แนะอบรมและเป็นกำลังใจจนข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานวิจัยและวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อลงกรณ์ อำนวยกาญจนสิน สำหรับการให้โอกาสข้าพเจ้าในการร่วมงานวิจัยในสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิชาการรวมถึงการทำวิจัย ชี้แนะ แก้ไขปัญหาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ พลโท พิศาล เทพสิทธา, รองศาตราจารย์ ดร. โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา, ผศ. จิตรีบุล พุ่มศิริ, ดร. อัญชลี ธูปตาก้อง, รองศาตราจารย์ ดร. มยุวา อารีกิจเสรี, ดร. กัมปนาท ธาราภูมิ, ดร. วรัญญู พูลสวัสดิ์, คุณแพงศรี ภารังกูล และคณาจารย์รวมถึงบุคลากรภาควิชาชีววิทยา, จุลชีววิทยา, กองกิจการคณะวิทยาศาสตร์ และกองกิจการนักศึกษา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เป็นแบบอย่างที่ดีและเป็นแรงบันดาลใจให้ข้าพเจ้าจนประสบผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณบาทหลวง ดร. บาร์นาบัส จำเนียร จิตเสรีวงศ์ อธิการบดีโรงเรียนดรุณาราชบุรี วัดนักบุญยอห์น บอสโก ราชบุรี และพระมหาบุญลือ วิชฺชากโร วัดพระปฐมเจดีย์ราชวรมหาวิหาร นครปฐม รวมถึงอาจารย์ เทพชัย ไพบูลย์, อาจารย์สมโภค สุขอนันต์, อาจารย์หาญชัย เทียมสุวรรณ, คุณครู เทวีลดา ศรีทอง, คุณครู ชุติมา โชติชูศรีและคุณครูโรงเรียนดรุณาราชบุรีทุกท่าน ที่ได้ส่งเสริมและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาตลอด รวมถึงอบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าดำเนินชีวิตตามหลักธรรมคำสอนจนประสบความสำเร็จและจะดำเนินตามหลักธรรม ใช้คุณธรรม นำวิชา พัฒนาสุข ให้เกิดแก่สรรพชีวิตและส่วนรวมไม่ว่าจะเป็น ชาติ ศาสนา พระมหากษัตริย์

ขอบพระคุณบุคลากรในสถาบันวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ประกอบไปด้วยนางสาวรัศมี หวะสุวรรณ, ดร. สมสิริ อุดมไพศาล, นางสาววชิราภรณ์ ถูปาอ่าง, นางสาว เชษฐ์ธิดา ศรีสุขสาม, นางสาวเกวรินทร์ กล่ำเชาว์, นางสาวนุชนัดดา วิเชียรติโชติ, นางสาววิลาวัลย์ วัฒนานุกิจและนางสาววรารมย์ แจ่มปัญญา ที่ได้คอยสนับสนุนให้คำชี้แนะในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณร้านอาหารของป้าตุ้ม ลุงเล็ก และพี่แกะ ตึกคณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้เคยช่วยเหลือข้าพเจ้าทั้งอาหารที่ไม่เคยคิดค่าใช้จ่ายและให้กำลังใจที่ดี เพื่อให้ข้าพเจ้าได้มีแรงกายแรงใจตั้งใจเรียนจนประสบผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อไพบูลย์ เทพบุญเรือง, คุณแม่นันทา ทองสุข, คุณอา จรัสศรี ติณกุลกำจร, คุณลุงวสันต์ ทองสุข, พี่เฉลิมพงษ์ เทพบุญเรือง, ด.ช. อภิวัชร เทพบุญเรือง และครอบครัวของข้าพเจ้ารวมถึงญาติพี่น้องทุกฝ่ายที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้ามาตลอดแม้จะลำบาก จนข้าพเจ้าประสบ

ความสำเร็จ

ขอบพระคุณ นางสาว วีรวรรณ แก้วใส, นางสาวปาหนัน สว่างแจ้ง, นาย วรากร ทองกร, นาย ธีรพร ทองศิริ, นายวีรสุทธิ์ จารุพรพิศาล, นายกลางใจ ธรรมนาม และนายภูริวัจน์ ชิตเดชะ นักศึกษามหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิตที่ได้คอยช่วยเหลือแก้ไขปัญหาต่างๆและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี รวมถึงทุนการศึกษาในโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology : TGIST) ที่ให้โอกาสให้ข้าพเจ้าได้รับทุนในการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก “สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ TG-22-16-59-030M” และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ช
สารบัญ ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ฐ
สารบัญรูป ..... ฑ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์การวิจัย 4
ขอบเขตการวิจัย 4
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 6
การแก่งแย่งแข่งขันระหว่างวัชพืชกับพืชปลูก 7
1. การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อปัจจัยสำหรับการเจริญเติบโต (Competition for Growth Factors) 7
2. ชนิดและลักษณะการเจริญเติบโต (Growth form) ของวัชพืชและพืชปลูก 8
3. ความสัมพันธ์ระหว่างมันสำปะหลังและวัชพืชในไร่มันสำปะหลัง 8
4. การแข่งขันระหว่างวัชพืชกับมันสำปะหลัง 9
การใช้สารเคมีในการปราบวัชพืชในแปลงมันสำปะหลัง 9
วิธีวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อรา 10
ตัวอย่างลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อราชนิดต่างๆที่สำคัญของพืชใบกว้าง 11
1. โรคใบจุดพืชคะน้า 11

2. โรคแอนแทรกโนสพืชพริก 12
3. โรคใบไหม้พืชมันฝรั่ง 12
4. โรคเหี่ยวพืชมะเขือเทศ 13
เทคนิค Tissue transplanting method 13
การพิสูจน์โรคตามหลักเกณฑ์ของ Koch 14
ขั้นตอนการวินิจฉัยโรคพืช 14
การระบุสายพันธุ์เชื้อราด้วยการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ส่วน Internal transcribed spacer (ITS) 17
การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี 17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 23
อุปกรณ์ที่ใช้ในการค้นคว้า 23
สารเคมี 23
อุปกรณ์ 24
เครื่องมือ 24
วิธีการดำเนินการวิจัย 26
1. การเก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคและระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง 26
1.1 การคัดแยกราที่มาจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคด้วยเทคนิค Tissue transplanting method 26
1.2 การระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง 27
1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของราแต่ละชนิดที่แยกได้ 27
1.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) 27
1.2.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุสายพันธุ์ของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้าง 29
2. การศึกษาการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก 29

2.1 การเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์โดยใช้อาหารสูตร Oatmeal agar (OMA)..... 29

2.2 การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก..... 29

2.3 การศึกษาติดตามการก่อโรคของราที่คัดเลือกได้ในวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ระยะต่างๆ..... 30

การนำเวคเตอร์ pCT74 ที่มียีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ Transformation..... 31

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*..... 31

ขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์และขั้นตอนนำพลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสต์..... 31

ขั้นตอนการติดตามระยะการก่อโรคของราในวัชพืชตีนตุ๊กแก..... 32

3. การศึกษาผลกระทบของราก่อโรคกับมันสำปะหลัง..... 32

บทที่ 4

ผลการทดลอง..... 34

1. ผลการเก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคและระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง..... 34

1.1 ผลการคัดแยกราที่มาจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคด้วยเทคนิค Tissue transplanting method..... 35

1.2 ผลการระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง..... 37

1.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอของราแต่ละชนิดที่แยกได้..... 37

1.2.2 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR)..... 38

1.2.3 ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุสายพันธุ์ของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้าง..... 40

2. ผลการศึกษาการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก..... 42

2.1 ผลการเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์โดยใช้อาหารสูตร Oatmeal agar (OMA)..... 42

2.2 ผลการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก..... 48

2.3 ผลการศึกษาติดตามการก่อโรคของราที่คัดเลือกได้ในวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ระยะต่างๆ 59

ผลการนำเวคเตอร์ pCT74 ที่มียีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ Transformation 59

ผลขั้นตอนการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* 59

ผลขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์และขั้นตอนนำพลาสมิดเข้าไปในโปรโตพลาสต์ 61

ผลการติดตามระยะการก่อโรคของราในวัชพืชตีนตุ๊กแก 66

3. ผลการศึกษาผลกระทบของราก่อโรคกับมันสำปะหลัง 75

ผลการทดสอบการก่อโรคของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* กับมันสำปะหลัง 75

ผลการศึกษาระยะการก่อโรคของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP ในมันสำปะหลัง 77

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง 80

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง 82

ภาคผนวก 84

รายการอ้างอิง 94

ประวัติผู้เขียน 99

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างทั้ง 10 ตัวอย่าง กับฐานข้อมูล NCBI ได้สายพันธุ์ของเชื้อรา เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) และ ค่า *E*-value 41

ตารางที่ 2 การจำแนกเชื้อราก่อโรคที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เป็นโรค 43

ตารางที่ 3 ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ เส้นใย ของเชื้อรา ในวัชพืชใบกว้าง 7 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oatmeal agar 45

ตารางที่ 4 การตายของวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ฉีดด้วยสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่น 1.0 x 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ในเวลา 25 วัน โดยทำการทดลอง 8 ซ้ำ 48

ตารางที่ 5 ร้อยละการก่อโรคเฉลี่ยของราของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ที่ความหนาแน่นเป็น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก ในวันที่ 7, 14 และ 18-19 ของการฉีดพ่นสปอร์ (ทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 จำนวน 3 ซ้ำ ครั้งที่ 2 และ 3 จำนวน 5 ซ้ำ) 55

ตารางที่ 6 จำนวนการตายของวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ฉีดด้วยสปอร์ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นเป็น 1.0 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก ในวันที่ 18-19 ของการฉีดพ่นสปอร์ (ทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 จำนวน 3 ซ้ำ ครั้งที่ 2 และ 3 จำนวน 5 ซ้ำ) 56

ตารางที่ 7 ผลการก่อโรคของรา *P. multirostrata* และ *C. siamense* ในมันสำปะหลังของการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 76

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของวัชพืชตีนตุ๊กแก (จำลอง และคณะ, 2542)..... 2

รูปที่ 2 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Alternaria* sp. A. อาการโรคใบจุด B. ลักษณะสปอร์..... 11

รูปที่ 3 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. A. อาการโรคแอนแทรกโนส B. ลักษณะสปอร์ 12

รูปที่ 4 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophthora infestan* A. อาการโรคใบไหม้ B. ลักษณะสปอร์ 12

รูปที่ 5 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. A. อาการโรคเหี่ยว B. ลักษณะสปอร์ 13

รูปที่ 6 แผนภูมิขั้นตอนการวินิจฉัยโรค (ชลิดา, 2557) 15

รูปที่ 7 องค์ประกอบของเวคเตอร์ pCT74 (Lorang และคณะ, 2001) 16

รูปที่ 8 ลักษณะรอยโรคบนตัวอย่างวัชพืชใบกว้างในสถานที่โรงเรือน สวทช และสำนักงานเกษตรจังหวัดฉะเชิงเทรา A. ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*) B. ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) C. ไมยราบป่า (*Mimosa pudica*) D. บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides.*) E. หมอน้อย (*Vernonia cinerea*) F. Unknown2 และ G. กะเม็ง (*Eclipta prostrata*) 34

รูปที่ 9 ตัวอย่างลักษณะความแตกต่างโคโลนีของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างชนิด ผักเบี้ยใหญ่ กะเม็ง และ หมอน้อย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน .. 35

รูปที่ 10 ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของรา 7 ไอโซเลต บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โดย A. ราที่แยกได้จาก ผักเบี้ยใหญ่ (C1-2) B. ราที่แยกได้จาก หมอน้อย (C4-7) C. ราที่แยกได้จาก หมอน้อย (C4-8) D. ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า (C1-1) E. ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า (C2-3) F. ราที่แยกได้จาก กะเม็ง (C3-6) และ G. ราที่แยกได้จาก unknown 2 (C4-5)..... 36

รูปที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรารหัส C1-2 A. อับสปอร์ (pycnidia) และ B. สปอร์เสี้ยวพระจันทร์ ที่มีสัณฐานจัดอยู่ในราจำพวก *Collectotrichum* sp. (Bar 50 µm) (กำลังขยาย 400x) 36

รูปที่ 12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์จากเชื้อรา รหัส C3-6 ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับรา *Collectotrichum* sp. (Bar 50 µm) (กำลังขยาย 400x)..... 37

รูปที่ 13 แถบดีเอ็นเอของราที่สกัดได้บนแผ่น agarose gel electrophoresis หลังการทำ gel electrophoresis จากวัชพืชใบกว้าง A. รหัส C1-2, C2-4, C3-6, C4-7 และ C4-8 ที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เก็บตัวอย่างจากอุทยานวิทยาศาสตร์ สวทช และ B. C1-1, C1-2/2, C2-3, C3-4, และ C4-5 ที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เก็บตัวอย่างจาก สำนักพัฒนาเกษตร จังหวัดฉะเชิงเทรา โดย 1kb คือ 1kb plus DNA Ladder (Fermentas) 38

รูปที่ 14 ขนาดของแถบดีเอ็นเอดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ของราทั้ง 10 ตัวอย่างบน agarose gel electrophoresis ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR ด้วย ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาด 500-600 bp โดย ช่องที่ 1 คือ 1kb plus DNA Ladder (Fermentas)... 39

รูปที่ 15 ลักษณะกลุ่มสปอร์ของราโรคพืชที่เจริญบนอาหาร OMA A. กระเปาะสปอร์สีดำ (pycnidia) ของ *C. truncatum* isolate Ct1 และ B. กลุ่มสปอร์สีส้ม (conidial mass) ของ *C. siamense* Cs1 47

รูปที่ 16 ลักษณะสปอร์ของราที่แยกได้จากวัชพืชที่เลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 47

รูปที่ 17 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 25 ของการทดลองครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ) 49

รูปที่ 18 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm) 50

รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีของ *C. siamense* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อส่องดูจุดกึ่งกลางภายใต้กล้อง Leica stereo microscope (กำลังขยาย 350x) 50

รูปที่ 20 ลักษณะเส้นใยที่สร้างสารสีเหลือง (ดังลูกศรสีแดง) และลักษณะสปอร์ของ *P. multirostrata* (ดังวงกลมสีแดง) แยกได้จากตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) 51

รูปที่ 21 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 18 ของการทดลองครั้งที่ 2 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) 52

รูปที่ 22 อาการโรคที่เกิดบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกของ *P. multirostrata* และ *C. siamense* ที่ส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ Leica stereo microscope (กำลังขยาย 200x)..... 53

รูปที่ 23 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm) ในการทดลองที่ 2 ที่ความหนาแน่นสปอร์10^8 สปอร์/มิลลิลิตร 53

รูปที่ 24 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 18 ของการทดลองครั้งที่ 3 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) 54

รูปที่ 25 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm) ในการทดลองที่ 3 ที่ความหนาแน่นสปอร์10^8 สปอร์/มิลลิลิตร..... 55

รูปที่ 26 กราฟเส้นร้อยละการก่อโรคเฉลี่ยของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* ในวัชพืชตีนตุ๊กแกในวันที่ 7,14 และ 18-19 โดยกำหนดให้ control = ชุดควบคุม (สีฟ้า), Pm = *P. multirostrata* (สีส้ม), *Cs* = *C. siamense* (สีเทา) ในการทดลอง A. ครั้งที่ 1 B. ครั้งที่ 2 และ C. ครั้งที่ 3 57

รูปที่ 27 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp จากการสกัดพลาสมิด pCT74 ที่มียีน GFP ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I (โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ U คือ ชุดควบคุมส่วนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ N คือ ส่วนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I)..... 60

รูปที่ 28 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp, 1,200 bp และ 3,600 bp จากการสกัดพลาสมิด pCT74 ที่มียีน GFP ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Eco*RI (โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ U คือ ชุดควบคุมส่วนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ N+E คือ ส่วนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Eco*RI)..... 61

รูปที่ 29 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ใสและปราศจากผนังเซลล์หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ *C. siamense* เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000X).. 62

รูปที่ 30 ลักษณะการเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ของ A. เส้นใย *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar 20 µm) และ สปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar 10 µm)..... 62

รูปที่ 31 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ใสและปราศจากผนังเซลล์หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 130 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ *P. multirostrata* เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400X)..... 63

รูปที่ 32 ลักษณะการเจริญของ *P. multirostrata* ที่แทรกยีน GFP บนอาหาร PDA ที่ประกอบด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร A. การงอกของสปอร์เป็นเส้นใยในเวลา 48 ชั่วโมง (bar 200 µm) B. เส้นใยเจริญในเวลา 5 วัน (bar 200 µm) และ C. เจริญเป็นโคโลนีในเวลา 7 วัน (bar 500 µm)..... 64

รูปที่ 33 ลักษณะ *P. multirostrata* ที่แทรกยีน GFP บนอาหาร OMA ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์A. pycnidia ซึ่งเป็นที่บรรจุสปอร์ของ *P. multirostrata* (bar 200 µm) B. ลักษณะสปอร์ของ *P. multirostrata* (bar 50 µm)..... 64

รูปที่ 34 A. ลักษณะการเจริญของเส้นใยมีการแยกโคโลนีกันอย่างชัดเจนของ *P. multirostrata* (bar 200 µm) B. ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของ *P. multirostrata* ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (bar 2,000 µm) และ C. สปอร์รูปรีที่มีวงกลม 2 วงภายใต้กล้องคอนโฟคอล (bar 10 µm)..... 65

รูปที่ 35 ลักษณะใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ A. จากการฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ในชุดควบคุม และ B. ฉีดพ่นด้วย สปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP..... 66

รูปที่ 36 ลักษณะการงอกเป็นเส้นใยและการเกิดโรค วันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* เมื่อส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์โดย A. ลักษณะการเกิด แอพเพรสซอเรียม (bar 10 µm) B. การเจริญของเส้นใยผ่านระหว่างเซลล์ของวัชพืชในระยะ biotrophic phase (bar 50 µm) C. การเจริญของเส้นใยที่เป็นสาเหตุของการเกิดวงรอยโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก (bar 200 µm) D. การเจริญของเส้นใยที่เป็นสาเหตุของการเกิดวงรอยโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก (รูปประสานด้วยรูปแสงสีแดงกับแสงฟลูออเรสเซนต์) (bar 200 µm)..... 67

รูปที่ 37 ลักษณะเส้นใยเทียม (pseudohyphae) A. เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบ (ภายใต้แสงปกติ) B. เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบ (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์) C. เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบและก่อให้เกิดการเหี่ยวไหม้ (ภายใต้แสงปกติ) D. เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบและก่อให้เกิดการเหี่ยวไหม้ (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์)..... 68

รูปที่ 38 ลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยระหว่างเซลล์พืชช่วง Necrotrophic phase และการเกิดโรควันที่ 14-18 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* A. การเหี่ยวตายของใบและต้นวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง 18 วัน B. ลักษณะรอยไหม้ที่ใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Necrotrophic phase 18 วัน C. การเจริญของเส้นใยที่พันรอบขนใบภายใต้แสงปกติ (bar 100 µm) ใน 14 วัน D. การเจริญของเส้นใยที่พันรอบขนใบภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) ใน 14 วัน E. การเหี่ยวแห้งของใบวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ตายภายใต้แสงปกติ (bar 100 µm) ใน 18 วัน F. การเหี่ยวแห้งของใบวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ตายภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) ใน 18 วัน..... 69

รูปที่ 39 ลักษณะใบวัชพืชตีนตุ๊กแกเมื่อส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ A. ชุดควบคุม ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ไม่พบการเกาะติดของสปอร์ สปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm) B. วันแรกของ

การฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* และพบสปอร์ทั่วบริเวณผิวใบตีนตุ๊กแก (bar 100 µm) C. การงอกเป็นเส้นใยของสปอร์ *P. multirostrata* เมื่อส่องภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ วันที่ 7 (bar 100 µm) D. ตำแหน่งการงอกเป็นเส้นใยช่วง วันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* ในช่วงระยะ Biotrophic phase (bar 100 µm) E. เส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบนใบวัชพืชและสอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืชตีนตุ๊กแกในช่วง Biotrophic phase (bar 50 µm) F. เส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบนใบวัชพืชและสอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืชตีนตุ๊กแกในช่วง Biotrophic phase (bar 10 µm) 71

รูปที่ 40 ลักษณะเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบริเวณขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก A. เส้นใย *P. multirostrata* ที่พันรอบขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) B. เส้นใย *P. multirostrata* ที่พันรอบขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกรูปผสาน (bar 100 µm) C. เส้นใย *P. multirostrata* ที่สอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์ของขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) และ D. เส้นใย *P. multirostrata* ที่สอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์ของขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 50 µm)..... 72

รูปที่ 41 ลักษณะเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญก่อโรควงกว้างบนใบตีนตุ๊กแก A. กลุ่มของเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญเป็นกลุ่มภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) B. กลุ่มของเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญเป็นกลุ่มโดยรูปผสาน (bar 100 µm) C. บริเวณเส้นใยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 50 µm) และ D. บริเวณเส้นใยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคโดยรูปผสาน (bar 50 µm) 72

รูปที่ 42 ลักษณะเส้นใยที่เจริญมากขึ้นบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Biotrophic phase ในวันที่ 12-14 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm)..... 73

รูปที่ 43 ลักษณะเส้นใยที่ก่อโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Necrotrophic phase ในวันที่ 12-14 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm)..... 73

รูปที่ 44 การขดพันของเส้นใยและสปอร์ที่ติดอยู่บริเวณใบที่ถูกก่อโรคจนแห้งตายในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* A. สปอร์ที่ติดอยู่บริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 200 µm) B. เส้นใยที่ขดพันบริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 100 µm) และ C. เส้นใยที่ขดพันบริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 100 µm) 74

รูปที่ 45 ลักษณะต้นมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. siamense* ความเข้มข้น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1 และ Cs2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และ วันที่ 18 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ).... 76

รูปที่ 46 ลักษณะต้นมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *P. multirostrata* ความเข้มข้น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Pm1 และ Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุด

ควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และ วันที่ 18 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) 77

รูปที่ 47 ลักษณะใบมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP ที่ระยะเวลาต่างๆคือ A. วันเริ่มฉีดพ่น (ชุดควบคุม) (bar, 50 μm) B. วันเริ่มฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar, 50 μm) C. วันที่ 4 (bar, 50 μm) D. วันที่ 8 (bar, 50 μm) E. วันที่ 14 (bar, 50 μm) และ F. วันที่ 18 (bar, 50 μm)..... 78

รูปที่ 48 ลักษณะใบมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP ที่ระยะเวลาต่างๆคือ A. วันเริ่มฉีดพ่น (ชุดควบคุม) (bar, 50 μm) B. วันเริ่มฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP (bar, 100 μm) C. วันที่ 7 (bar, 50 μm) D. วันที่ 14 (bar, 50 μm) E. วันที่ 18 (bar, 100 μm) 79

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเกษตรในประเทศไทยมีความสำคัญมาก เนื่องมาจากประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญในระดับโลก ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพืชผลส่งออกทางเศรษฐกิจที่สำคัญแต่ก็เกิดปัญหาที่มาจากวัชพืชซึ่งวัชพืช ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลงอย่างมากมาย โดยเฉพาะมันสำปะหลังซึ่งเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยประเทศไทยส่งออกมันสำปะหลังมูลค่า 1,000-1,800 ล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือ 1-2 ล้านตัน ต่อปี (กรมการค้าต่างประเทศ, 2560-2562)

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่สำคัญ เนื่องจากเป็นประเทศที่มีการปลูกมันสำปะหลังเป็นอันดับที่ 3 ของโลกรองจากประเทศบราซิลและไนจีเรีย มันสำปะหลังเป็นพืชที่นิยมปลูกสำหรับเกษตรกรไทยเนื่องจากเป็นพืชที่สามารถปรับสภาพเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี ทนต่อความแห้งแล้งและมีปัญหาทางศัตรูพืชจำพวกแมลงน้อย แต่ก็ยังมีปัญหาทางด้านวัชพืชซึ่งเป็นปัญหาหลักในแปลงมันสำปะหลัง (ประภาส, 2552) มันสำปะหลังส่วนใหญ่นิยมปลูกด้วยท่อนพันธุ์ ซึ่งการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังระยะแรกช้าโดยใบแรกเริ่มคลี่ให้เห็นได้หลังจากปลูกประมาณ 3-4 เดือน หลังจากปลูกประมาณ 3 สัปดาห์ จึงมีปัญหาวัชพืชรบกวนในระยะ 3-4 เดือนแรก ส่งผลให้การลงหัวไม่ดี ทำให้จำนวนหัวต่อต้นลดลงและน้ำหนักหัวไม่ดีตามไปด้วย (จำลอง และคณะ, 2542)

วัชพืช (weeds) ในทางเกษตรหมายถึง พืชที่ไม่ต้องการที่ขึ้นในแปลงเกษตรกรรมที่มีผลผลิตทางการเกษตร หรือหมายถึงพืชที่ขึ้นทั่วไปในสถานที่ต่างๆซึ่งวัชพืชโดยทั่วไปนั้นมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าพืชเศรษฐกิจทั้งการแพร่พันธุ์ การกระจายพันธุ์ การปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าพืชปลูก วัชพืชบางชนิดสามารถปล่อยสารพิษไปกำจัดหรือยับยั้งพืชที่เจริญเติบโตข้างเคียงได้เพื่อแย่งสารอาหารซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรในแปลงเกษตรกรรมโดยส่งผลให้ได้ผลผลิตที่ต่ำลง (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2560) ซึ่งมูลค่าการนำเข้าสารเคมีฆ่าวัชพืช (chemical herbicides) ที่ประเทศไทยนำเข้ามีมูลค่ากว่า 1,186 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (กรมวิชาการเกษตร, 2562) โดยวัชพืชชนิดที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อพืชผลทางเศรษฐกิจโดยมีวัชพืชชนิดหนึ่งที่พบทั่วไปตามริมทาง ตามแปลงพืชผัก เช่น ในแปลงมันสำปะหลังคือ “ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* L)” หรือที่ ชื่อสามัญ Tridax daisy ซึ่งอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชล้มลุกลักษณะเลื้อยไปตามพื้นดินและมียอดชูเหนือดิน ลำต้นกลมสีเขียวมีลักษณะที่เปราะ มีใบกิ่งแบบตรงข้ามและมีใบเป็นใบลักษณะใบเดี่ยวรูปหอก ขอบเป็นจัก ปลายใบแหลม มีโคนมน (เว็บไซต์เมดไทย, 2557) ดังแสดงลักษณะของตีนตุ๊กแกในรูปที่ 1

รูปที่ 1 ลักษณะของวัชพืชตีนตุ๊กแก (จำลอง และคณะ, 2542)

การควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกหรือวัชพืชอื่นๆในแปลงมันสำปะหลังโดยการใช้สารเคมีมี 2 ประเภทคือ การใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบก่อนงอกและการใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบหลังงอก โดยการใช้สารเคมีคุมวัชพืชแบบก่อนงอก หมายถึงการใช้สารเคมีฉีดพ่นทันทีที่ปลูกมันสำปะหลังเสร็จหรือไม่เกิน 3 วันก่อนที่วัชพืชและมันสำปะหลังจะงอก การใช้สารเคมีแบบนี้สามารถคุมวัชพืชได้นาน 2 เดือนถึง 2 เดือนครึ่ง แต่การใช้ยังไม่แพร่หลายมากนักเนื่องจากมีข้อจำกัดในการใช้มากคือ ชนิดของสารที่ใช้ซึ่งต้องทำการศึกษาก่อนว่ามีผลกระทบต่อมันสำปะหลังหรือไม่อย่างไร ความชื้นในดินต้องมีมากพอที่จะให้สารแพร่กระจายทั่วบริเวณและสารคุมสามารถใช้ได้ผลกับวัชพืชบางประเภทเท่านั้นและการใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบหลังงอก ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทย่อยคือ แบบสัมผัส ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำลายวัชพืชเฉพาะส่วนที่สัมผัสเท่านั้น เช่น พาราขวัท และแบบดูดซึม ซึ่งเมื่อใช้แล้วสารเคมีจะถูกดูดซึมไปที่ระบบยอดและรากของต้นวัชพืชจนส่งผลให้วัชพืชตายทั้งต้น เช่น ไกลโฟเซท แต่ก็มีข้อระวังมากมายในการใช้สารเคมีแบบหลังงอกโดยมีผลทำลายต้นมันสำปะหลังด้วยหากปะปนไปติดที่ต้น กำจัดวัชพืชได้ดีในระยะต้นอ่อนและมีผลต่อเกษตรกรหากสัมผัสโดนที่ผิวหนังรวมถึงเป็นสารตกค้างต่อผู้บริโภคมากมาย ทั้งนี้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ใช้ทางการเกษตรเนื่องจากช่วยลดความเสียหายของผลผลิตอันเนื่องมาจากศัตรูพืชต่างๆไม่ว่าจะเป็นแมลง โรคพืชจากจุลินทรีย์หรือวัชพืชต่างๆ ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีปริมาณสูงขึ้นโดยเฉพาะคุณภาพแต่การใช้สารเคมีในระยะยาวก่อให้เกิดโทษมากมายซึ่งสารเคมีนั้นสามารถเข้าสู่เกษตรกรผู้ใช้ได้ทางระบบหายใจ ทางผิวหนังหรือการกลืนกินทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยและเกิดการสะสมสารพิษในร่างกายจนเมื่อมากพอที่จะแสดงอาการทำให้มีปัญหาด้านสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคได้ (จำลอง และคณะ, 2542) จากงานวิจัยของ Bailey (1997) ได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ราโรคพืช (Plant Pathogens) ในการควบคุมวัชพืชโดยได้นำข้อมูลมาจาก Saskatoon Research Centre ประเทศแคนาดาโดยได้กล่าวว่า องค์กรวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาจุลินทรีย์สำหรับควบคุมวัชพืชที่รุกรานแปลงเกษตรกรรมโดยใช้แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งในอดีตที่ประเทศแคนาดาใช้สารเคมีในการควบคุมวัชพืชเป็นหลักหลังจากการใช้นานอย่างต่อเนื่องซึ่งวัชพืชในแคนาดาส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ หรือเป็นเงิน 984 ล้านดอลลาร์ ซึ่งการใช้สารเคมียับยั้งวัชพืชนั้นช่วยลดความเสียหาย

ที่เกิดต่อพืชผล แต่ก็มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากมายทางรัฐบาลจึงเน้นให้พัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมวัชพืชซึ่งคำว่า การควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control) หมายถึงการใช้สิ่งมีชีวิตเช่น ไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา หรือสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เหล่านี้ ในการควบคุม กำจัด หรือยับยั้งสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชไม่ว่าจะเป็น แมลง สัตว์ และวัชพืชเป็นต้น โดยการควบคุมทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ต้องมีลักษณะดังนี้คือ เชื้อก่อโรคต้องสามารถเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ต้องมีความจำเพาะต่อวัชพืชเจ้าบ้าน สามารถปราบปรามหรือควบคุมสัดส่วนของวัชพืชในสภาพแวดล้อมจริงได้ เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างราที่ค้นพบในการใช้เป็นราควบคุมวัชพืชมีดังนี้ *Phytophthora palmivora* ใช้ควบคุมต้น strangler-vine ในสวนผลไม้โดยการฉีดพ่นที่ใบของวัชพืช ในขณะเดียวกัน *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* หรือในชื่อการค้า Collego ใช้ควบคุมต้น northern jointvetch ในนาข้าวกับถั่วโดยการผลิตสปอร์แห้งแล้วนำมาผสมในน้ำก่อนฉีดพ่นซึ่งลดวัชพืชได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ *Puccinia canaliculata* หรือในชื่อการค้า DR. BIOSEDGE โดยใช้ควบคุมต้น yellow nutsedge หรือหญ้าแห้วหมู โดยการยับยั้งการออกดอก 46% ในขณะที่ *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. malvae ใช้ควบคุมต้น round-leaved mallow และ *Alternaria cassiae* โดยใช้ควบคุมเมล็ด seicklepod ช่วงเป็นเมล็ดซึ่งงานวิจัยเหล่านี้เป็นที่มาของงานวิจัยด้านการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกโดยชีววิธีในลักษณะที่ทำการค้นหาราสายพันธุ์ที่ก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกอย่างมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะทำการหาจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราที่จะใช้เป็นชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกซึ่งเป็นวัชพืชใบกว้างในแปลงมันสำปะหลังและเพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้บริโภคโดยจะทำการหาราที่ก่อโรคสามารถควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อมันสำปะหลังรวมถึงเกษตรกรและผู้บริโภค (Bailey และคณะ, 1997)

ราที่ก่อโรคในพืชมีหลากหลายกลุ่มหลากหลายวงจรชีวิตและมีความแตกต่างกันด้านการก่อโรคในพืชเจ้าบ้าน ซึ่งมีความสัมพันธ์ในรูปแบบที่แตกต่างกันในราแต่ละสายพันธุ์ต่อพืชเจ้าบ้านโดยมีสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้น สำหรับจีนัส *Colletotrichum* เป็นราโรคพืชต้นแบบที่ก่อโรคในพืชหลากหลายประเภททั่วโลกส่วนใหญ่แยกได้จากใบ ต้น ราก และเมล็ดของพืชในแปลง วงจรชีวิตนั้นมีความหลากหลายตามกลุ่มสายพันธุ์โดยหลักๆ จีนัส *Colletotrichum* จะมีช่วง hemibiotrophic phase จนกระทั่ง necrotrophic phase แต่ในพืชเจ้าบ้านบางชนิด พบว่าราจีนัส *Colletotrichum* จะอยู่ในรูปแบบอาศัยและไม่ก่อโรคกับพืชเจ้าบ้านเรียกว่า endophyte และวงจรชีวิตของราจีนัสนี้มีลักษณะแตกต่างกันตามยีนของแต่ละสายพันธุ์รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างรากับพืชเจ้าบ้านด้านการสร้างสารทุติยภูมิหรือเอนไซม์ที่จำเพาะในการก่อโรคต่อเซลล์เจ้าบ้านนั้นๆ (Silva และคณะ, 2017)

การศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของราโดยมี *Colletotrichum* sp. เป็นต้นแบบและผลจากการก่อโรคส่วนใหญ่ในพืชมาจากสารทุติยภูมิที่ราสร้างจำเพาะต่อพืช รวมถึงการใช้ราเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชแบบชีววิธีดังที่กล่าวมาข้างต้นซึ่งเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยจะแก้ไขปัญหาวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังในประเทศไทยและลดการใช้สารเคมีในแปลง ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกโดยชีววิธีมาก่อน ในการศึกษานี้เน้นการแยกราจากวัชพืชใบกว้างหลากหลายชนิดเพื่อหาราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแก โดยไม่ก่อโรคกับมันสำปะหลัง หรือพืชเศรษฐกิจอื่น และทำการศึกษาวงจรการก่อโรคของรา ที่คัดเลือกได้ด้วยการแทรกยีน GFP เพื่อติดตามการเจริญของเส้นใยราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกราจากวัชพืชใบกว้างหลายตัวอย่างที่แสดงอาการโรค จากสถานที่ต่างๆ มาทดสอบเพื่อคัดเลือกราที่จำเพาะในการก่อโรคแก่วัชพืชตีนตุ๊กแก ในแปลงมันสำปะหลัง

2. เพื่อศึกษาอัตราการก่อโรคโดยการใช้สปอร์ราฉีดพ่นวัชพืชตีนตุ๊กแกในห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษากระบวนการก่อโรคของรา ด้วยการแทรกยีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) ในราที่ก่อโรคจำเพาะต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก แล้วศึกษาภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์

4. เพื่อศึกษาผลกระทบของราที่คัดเลือกต่อมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจ แล้วพัฒนาราที่คัดเลือกเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

ทำการคัดเลือกราจากวัชพืชใบกว้างเพื่อควบคุมและศึกษากระบวนการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลัง โดยมีขอบเขตงานวิจัยคือ

1. เริ่มจากการหาวัชพืชใบกว้างจากสถานที่ต่างๆ ที่มีลักษณะอาการเป็นโรคตามใบและลำต้นในแปลงปลูกพืชของสำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และสำนักงานเกษตรจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่หาได้ ต่อมานำใบที่เป็นโรคนั้นมาทำการฟอกกำจัดเชื้อภายนอก (Surface sterilization) แล้วนำชิ้นส่วนใบมาวางบนอาหารแข็งสำหรับราเมื่อราเจริญเติบโตเป็นเส้นใยแล้วจึงทำการแยกราให้บริสุทธิ์

2. นำราที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน Internal transcribed spacer (ITS) และทำการเพิ่มจำนวนยีน สำหรับระบุสายพันธุ์ราแต่ละไอโซเลต

3. ทดสอบการก่อโรคของราแต่ละไอโซเลตด้วยการฉีดพ่นสปอร์ลงบนวัชพืชตีนตุ๊กแก เพื่อคัดเลือกราไอโซเลตที่สามารถควบคุมและจำเพาะกับวัชพืชตีนตุ๊กแก 2 ไอโซเลต

4. ทำการศึกษาติดตามการก่อโรคของรา *Colletotrichum siamense* และ *Phoma multirostrata* โดยการแทรกยีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) ในราไอโซเลตที่ก่อโรคได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด 2 ไอโซเลต แล้วนำราไอโซเลตนั้นก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกอีกครั้งและนำส่วนใบที่เกิดโรคมาศึกษาระยะการก่อโรคด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์

5. ทำการศึกษาผลกระทบของราที่คัดเลือกมาใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกกับมันสำปะหลังเพื่อนำราควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกนี้ไปใช้ในแปลงมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาราที่ควบคุมวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังพบว่ามีวัชพืชที่สำคัญคือวัชพืชตีนตุ๊กแกและสาบม่วงจึงเกิดการแก่งแย่งสารอาหารในแปลงมันสำปะหลัง โดยวิธีการแก้ไขปัญหาส่วนใหญ่ใช้สารเคมี ส่งผลให้เกิดการตกค้างรวมถึงมีผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการศึกษาการควบคุมวัชพืชแบบชีววิธี ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ในระบบนิเวศเกษตร (Agroecosystems) มีองค์ประกอบคือองค์ประกอบทางชีวภาพ (Biological compoment), ทางกายภาพ (Physical compoment) และทางเศรษฐสังคม (Socio-economic componemt) โดยองค์ประกอบทางชีวภาพของระบบนิเวศเกษตรแสดงถึงปฏิกิริยาสัมพันธ์ (Interaction) ซึ่งแสดงออกมาในรูปแบบเชิงแก่งแย่งแข่งขันกัน (Competition) และในเชิงเกื้อกูลกัน (Mutualism/symbiotic หรือ Complementary) ซึ่งวัชพืชในระบบการผลิตทางเกษตรมักแสดงปฏิกิริยาความสัมพันธ์กับพืชปลูกในลักษณะที่เป็นทั้งประโยชน์และโทษ (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2560) ซึ่งวัชพืช (Weeds) ในทางเกษตรหมายถึงพืชที่ขึ้นผิดที่หรือพืชที่ขึ้นในที่ที่ไม่ต้องการให้ขึ้นและทำให้มีผลกระทบต่อระบบการผลิตทางเกษตรในด้านที่เป็นโทษมากกว่าเป็นประโยชน์ (Crafts, 1975) โดยวัชพืชสามารถขึ้นและปรับตัวเข้ากับแปลงเกษตรผลิตผล ซึ่งพบได้ทั่วไปในแปลงเกษตร และมีผลต่อการมีปฏิสัมพันธ์แบบแก่งแย่งกับพืชปลูกซึ่ง แบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นการแบ่งโดยใช้ลักษณะใบเป็นหลัก ซึ่งสามารถแบ่งวัชพืชได้เป็น 2 ประเภทคือ วัชพืชใบกว้าง (Broadleaved weeds) จัดเป็นเป็นวัชพืชที่มีใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledon) ซึ่งมีลักษณะใบแผ่กว้างและจัดเรียงเป็นร่างแห โดยลำต้นมีกิ่งก้านสาขามากมายส่วนใหญ่ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด เช่น สาบเสือและตีนตุ๊กแก บางชนิดมีชื่อเรียกขึ้นต้นว่าผักเช่น ผักโขมหินและผักปราบ เป็นต้น ซึ่งจุดเจริญของวัชพืชใบกว้างอยู่ที่ปลายยอดหรือซอกกิ่ง (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2560) และวัชพืชใบแคบ (Narrowleaved weeds) จัดเป็นวัชพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) มีลักษณะใบแคบ เส้นใบขนานกับก้านใบโดยส่วนใหญ่ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดบางชนิดขยายพันธุ์ โดยส่วนของรากหรือลำต้น วัชพืชใบแคบประกอบด้วย 2 จำพวกคือจำพวกหญ้า (Grasses) จัดเป็นวัชพืชในวงศ์ Gramineae หรือ Poaceae ลำต้นมีลักษณะกลมและมีข้อ (Node) และปล้อง (Internode) มีจุดเจริญอยู่ใต้ดินและตามข้อมักมีชื่อเรียกขึ้นต้นว่าหญ้าเช่น หญ้าคาหญ้า ขนหญ้าตีนกาม หญ้ารักนกและ หญ้าปากควาย เป็นต้น และจำพวกกก (Sedges) จัดอยู่ในวงศ์ Cyperaceae มีลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากจำพวกหญ้าคือลำต้นไม่มีข้อ ปล้องและลำต้นมักเป็นเหลี่ยมมักมีชื่อเรียกขึ้นต้นว่ากกหรือแห้วเช่น กกสามเหลี่ยม กกขนาก แห้วหมู และ แห้วทรงกระเทียม เป็นต้น (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2560) การที่มีวัชพืชในแปลงเกษตรกรรมทำให้เกิดการแก่งแย่งแข่งขันต่างๆระหว่างวัชพืชกับพืชปลูกในด้านต่างๆ โดยมีปัจจัยหลายประการ

ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* (L.) L.) มีชื่อสามัญว่า Tridax daisy จัดอยู่ในวงศ์ทานตะวัน Asteraceae เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่พบในแปลงมันสำปะหลัง (เว็บไซต์เมดไทย, 2557) ซึ่งต้นตีนตุ๊กแกเป็นไม้ล้มลุกที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอเมริกาและจัดเป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่ทนแล้งได้ดี มีอายุได้หลายปีโดยมีลักษณะลำต้นเลื้อยตามพื้นดินและชูส่วนยอดตั้งตรง ต้นมีขนาดเล็กและเรียวสีขาวแกมสีเขียวและจะมีขนยาวสีขาวขึ้นปกคลุมสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงฤดูฝนและขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดและวิธีการปักชำกิ่งพบได้ทั่วไปในประเทศไทยและมีใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามกัน ลักษณะของใบเป็นรูปรีแหลมหรือรูปหอกปลายใบแหลม ด้านบนก้านใบเป็นร่องส่วนของดอกตีนตุ๊กแกออกดอกเป็นช่อชนิดเกิดจากฐานเดียวโดยจะเกิดที่ปลายกิ่งและมีก้านช่อดอกเรียวเล็กยื่นยาวชูเหนือลำโคนช่อดอกมีใบประดับสีเขียวลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายแหลมส่วนโคนมนมีขนขึ้นปกและมีดอกย่อยจะมีอยู่ด้วยกัน 2 แบบ คือ ดอกแบบรอบนอก 1 วง จำนวน 4-6 ดอก โดยมีดอกย่อยชั้นในเป็นกระจุกอัดกันแน่นบนฐานรองดอกและไม่มีก้านดอกย่อยมีโคนที่มีใบประดับสีขาวแกมม่วงรอบนอกเป็นแบบ ligulate type กลีบเลี้ยงเป็นสีขาวมีลักษณะเป็นเส้นขนเล็ก ๆ และมีจำนวนมากและมีกลีบดอก 5 ไม่มีเกสรเพศผู้ มีแต่เกสรเพศเมีย รังไข่เป็นแบบรังไข่ใต้วงกลีบ มีขนปกคลุมก้านเกสรเพศเมียจะยาวกว่าหลอดกลีบดอกเล็กน้อย ส่วนปลายแยกเป็นยอดเกสร 2 แฉก และผลตีนตุ๊กแกเป็นผลแห้งแบบเมล็ดล่อน (achene) ลักษณะของผลเป็นรูปรียาว สีดำ ผลมีขนขึ้นปกคลุมภายในผลมีเมล็ดรูปยาวรี 1 เมล็ด สีน้ำตาล ปลายเป็นเส้นเล็ก ๆ 20 เส้น ช่วยพยุงให้ลอยลมได้ (เว็บไซต์เมดไทย, 2557)

การแก่งแย่งแข่งขันระหว่างวัชพืชกับพืชปลูก

การที่มีวัชพืชในแปลงเกษตรกรรมทำให้เกิดการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างวัชพืชต่างชนิด (Interspceific competition) ซึ่งตรงกันข้ามกับการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างพืชชนิดเดียวกัน (Intraspecific competition) โดยปกติความรุนแรงของการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างพืชต่างชนิดจะน้อยกว่าการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างพืชชนิดเดียวกันแต่ก็มีผลกระทบต่อผลพืชปลูกโดยมีการแข่งขันดังต่อไปนี้

1. การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อปัจจัยสำหรับการเจริญเติบโต (Competition for Growth Factors)

การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อปัจจัยสำหรับการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชประกอบด้วย ธาตุอาหาร (Nutrients) โดยวัชพืชจะดูดธาตุอาหารได้เร็วกว่าและปริมาณมากกว่าพืชปลูกโดยเฉพาะธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช คือไนโตรเจน, ฟอสฟอรัสและโปแตสเซี่ยม นอกจากนั้นความชื้น (Moisture) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ โดย Wiese และ Vandiver (1970) ได้กล่าวว่าความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยมีผลต่อการดูดซึม

เคลื่อนย้ายธาตุอาหาร และการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างพลังงานในพืชการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างวัชพืชกับพืชปลูกในด้านความชื้นจะเป็นการแก่งแย่งแข่งขันในระดับใต้ดินซึ่งความสามารถในการแข่งขันจะขึ้นอยู่กับระดับความชื้นในดิน และชนิดของวัชพืชและพืชปลูกในสังคมนั้นๆในสภาพที่ความชื้นในดินต่ำ วัชพืชและพืชปลูกจะแข่งขันกันดูดน้ำหากวัชพืชสามารถดูดน้ำได้ดีกว่าพืชปลูกเนื่องจากมีระบบรากลึกว่าหรือมีปริมาณรากต่อพื้นที่มากกว่าจะส่งผลให้วัชพืชได้เปรียบและพืชปลูกมีผลผลิตลดลงและในสภาพที่ความชื้นในดินสูงพืชที่ชอบความชื้นหรือเจริญเติบโตในระยะที่ต้องการน้ำจะได้เปรียบหากวัชพืชได้เปรียบพืชปลูก จะก่อให้เกิดผลเสียตามมา (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2560) อีกปัจจัยหนึ่งคือ แสงและคาร์บอนไดออกไซด์ (Light and Carbondioxide) นอกจากธาตุอาหารและน้ำแล้วแสงและคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อผลิตภาพ (Productivity) ของสังคมพืช

2. ชนิดและลักษณะการเจริญเติบโต (Growth form) ของวัชพืชและพืชปลูก

สามารถบ่งชี้ถึงความรุนแรงของการแก่งแย่งแข่งขันพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ดีกว่าจะเป็นพืชที่ได้เปรียบในสังคมที่พืชนั้นขึ้นอยู่ Moolani (1964) พบว่าผลผลิตของถั่วเหลืองจะลดลงมากกว่าข้าวโพดเมื่อพืชปลูกทั้ง 2 ชนิดนี้ขึ้นในสภาพที่แก่งแย่งแข่งขันกับผักโขมเนื่องจากข้าวโพดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สูงกว่าผักโขมทำให้รับแสงได้ดีกว่าในขณะที่ถั่วเหลืองซึ่งมีทรงต้นเตี้ยกว่าผักโขมจะถูกผักโขมบดบังแสงเป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ Cartter และ Harting (1963) ยังพบว่าการบดบังแสงโดยวัชพืชในช่วงที่ถั่วเหลืองกำลังออกดอกทำให้เมล็ดลีบ และพืชปลูกที่แข่งขันเพื่อแย่งแสงแดดกับวัชพืชจะมีกิ่งก้านน้อยปล้องยาวลำต้นสูงซึ่งเป็นสาเหตุของการล้ม (Lodging) ส่งผลให้ผลผลิตตกต่ำ

3. ความสัมพันธ์ระหว่างมันสำปะหลังและวัชพืชในไร่มันสำปะหลัง

การที่แปลงมันสำปะหลังมีวัชพืชขึ้นรบกวนทำให้เกิดผลกระทบในด้านลบโดยมันสำปะหลังส่วนใหญ่นิยมปลูกด้วยท่อนพันธุ์ และมีระยะปลูกค่อนข้างห่างใช้ระยะระหว่างแถว 1 เมตร และระยะระหว่างต้น 1 เมตร เก็บเกี่ยวที่อายุ 8-12 เดือน การเจริญเติบโตของมันสำ ปะหลังระยะแรกช้ามาก ใบแรกเริ่มคลี่ให้เห็นได้หลังจากปลูกประมาณ 3-4 เดือนหลังจากปลูกประมาณ 3 สัปดาห์ และสร้างพุ่มใบให้ชนกันจนคลุมพื้นที่ ใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือนหลังจากปลูก มันสำ ปะหลังเริ่มเอาอาหารไปเก็บที่ราก ที่เรียกว่า “การลงหัว” ประมาณเดือนครึ่งถึงสองเดือนหลังจากปลูกและหลังจาก 4 เดือน ไปแล้วไม่มีการลงหัวเพิ่ม แต่จะขยายขนาดหัวให้ใหญ่ขึ้นจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ฉะนั้นมีวัชพืชรบกวนโดยวัชพืชใบกว้างในไร่มันสำปะหลังที่พบมักเป็นสาบเสือ, สาบม่วง และตีนตุ๊กแก ในระยะ 3-4 เดือนแรก จะทำให้การลงหัวไม่ดีทำให้จำนวนหัวต่อต้นลดลง น้ำหนักหัวไม่ดีตามไปด้วยโดยผลการศึกษาผลการแข่งขันระหว่างวัชพืชกับมันสำปะหลังโดยหาระยะเวลาที่มันสำปะหลังจะยอมให้มีวัชพืชขึ้นแข่งและหาระยะเวลาที่มันสำปะหลังต้องไม่มีวัชพืชขึ้นแข่งโดยไม่ทำให้น้ำหนักหัวลดลง ผลการทดลองพบว่าถ้าปล่อยให้มีวัชพืชขึ้นแข่งกับมันสำปะหลัง ระหว่าง 60 วันแรกหลังจากปลูกจะทำให้ผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 50 ลักษณะการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังการ

แข่งขันของวัชพืชมันสำปะหลังฉะนั้นการทำรุ่นในมันสำปะหลังควรจะเริ่มทำรุ่นครั้งแรกให้เร็วที่สุดถ้าปล่อยให้พวกวัชพืชขึ้นแข่งนานขึ้นก็จะยิ่งทำ ให้ผลผลิตของมันสำปะหลังลดลง ในฤดูฝนควรจะเริ่มกำจัดวัชพืชที่ 15 วัน หลังจากปลูกและจะทำไปจนถึง 4 เดือน หลังจากนั้นพุ่มใบมันสำปะหลังจะชนกันคลุมพื้นที่ได้หมดแต่ถ้าเป็นฤดูแล้งอาจจะยืดเวลาของการทำรุ่นครั้งแรกออกไปอีก เนื่องจากมีวัชพืชขึ้นน้อยจำนวนครั้งในการทำรุ่นขึ้นอยู่กับแรงงานจำนวนหรือความหนาแน่นของวัชพืชและสภาพแวดล้อม เช่น ปริมาณฝน เป็นต้น (จำลอง และคณะ, 2542)

4. การแข่งขันระหว่างวัชพืชกับมันสำปะหลัง

เมื่อในแปลงมันสำปะหลังมีวัชพืชขึ้นจะเกิดการแข่งขันและส่งผลกระทบโดยหาก 60 วันแรกที่ทำการปลูกมันสำปะหลังแล้วไม่มีการควบคุมวัชพืชใดๆจะส่งผลให้ผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 50 โดยไม่ควรให้วัชพืชขึ้นแข่งขันหลังจากการปลูกมันสำปะหลังไปแล้ว 1-4 เดือน (จำลอง และคณะ, 2542)

การใช้สารเคมีในการปราบวัชพืชในแปลงมันสำปะหลัง

ประเทศไทยมีการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยใช้เป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอย่างกว้างขวาง โดยเกษตรกรส่วนใหญ่เห็นว่าสารเคมีนั้นจะทำให้พืชผักสวยงามน่ารับประทานขายได้ราคาดี การใช้สารเคมีจึงเป็นทางเลือกที่เกษตรกรเลือกใช้แทนสารอินทรีย์ (สุธาสินี, 2558) ซึ่งการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกหรือวัชพืชอื่นๆโดยการใช้สารเคมีมี 2 ประเภทคือการใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบก่อนงอกและการใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบหลังงอกโดย การใช้สารเคมีคุมวัชพืชแบบก่อนงอก หมายถึงการใช้สารเคมีฉีดพ่นทันทีที่ปลูกมันสำปะหลังเสร็จหรือไม่เกิน 3 วันก่อนที่วัชพืชและมันสำปะหลังจะงอก การใช้สารเคมีแบบนี้สามารถคุมวัชพืชได้นาน 2 เดือนถึง 2 เดือนครึ่ง แต่การใช้ยังไม่แพร่หลายมากนักเนื่องจากมีข้อจำกัดในการใช้มากคือชนิดของสารที่ใช้ซึ่งต้องทำการศึกษาก่อนว่ามีผลกระทบต่อมันสำปะหลังหรือไม่อย่างไร ความชื้นในดินต้องมีมากพอที่จะให้สารแพร่กระจายทั่วบริเวณและสารคุมสามารถใช้ได้ผลกับวัชพืชบางประเภทเท่านั้นและ การใช้สารเคมีควบคุมวัชพืชแบบหลังงอก ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทย่อยคือ แบบสัมผัส ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำลายวัชพืชเฉพาะส่วนที่สัมผัสเท่านั้น เช่น พาราควอต และแบบดูดซึม ซึ่งเมื่อใช้แล้วสารเคมีจะถูกดูดซึมไปที่ระบบยอดและรากของต้นวัชพืชจนส่งผลให้วัชพืชตายทั้งต้น เช่น ไกลโฟเซท แต่ก็มีข้อระวังมากมายในการใช้สารเคมีแบบหลังงอกโดยมีผลทำลายต้นมันสำปะหลังด้วยหากปะปนไปติดที่ต้นกำจัดวัชพืชได้ดีในระยะต้นอ่อนและมีผลต่อ เกษตรกรหากสัมผัสโดนที่ผิวหนังรวมถึงเป็นสารตกค้างต่อผู้บริโภคมากมาย ทั้งนี้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ใช้ทางการเกษตรเนื่องจากช่วยลดความเสียหายทางผลผลิตอันเนื่องมาจากศัตรูพืชต่างๆไม่ว่าจะเป็นแมลง โรคพืชจากจุลินทรีย์ หรือวัชพืชต่างๆทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีปริมาณสูงขึ้นโดยเฉพาะความสวยงามและคุณภาพแต่การใช้สารเคมีในระยะยาวก่อให้เกิดโทษมากมายซึ่งสารเคมีนั้นสามารถเข้าสู่เกษตรกรผู้ใช้ได้ทางระบบ

หายใจ ทางผิวหนังหรือการกลืนกินทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยและ เกิดการสะสมสารพิษในร่างกายจนเมื่อมากพอที่จะแสดงอาการจึงแสดงอาการทำให้มีปัญหาด้านสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคได้ (จำลอง และคณะ, 2542)

วิธีวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อรา

ก่อนที่จะทำการวินิจฉัยสาเหตุต้องมาจำแนกชนิดของพืชก่อนว่าเป็นพืชอะไรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่าอย่างไรแล้วไปดูในหนังสือ “ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย (Host index) ” เพื่อดูว่ามีโรคอะไรที่สามารถเกิดกับพืชชนิดนี้ได้บ้างแล้วจึงทำการวินิจฉัยต่อไปโดยในขั้นแรกใช้แว่นขยายหรือกล้องจุลทัศน์แบบสเตอริโอส่องดูบริเวณที่เป็นโรคเพื่อตรวจหาส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ (Fruiting body) ในเนื้อเยื่อพืชถ้าไม่พบก็ไม่ได้หมายความว่าจะไม่มีส่วนของเชื้อสาเหตุให้ดำเนินการหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธีต่างๆดังต่อไปนี้

1. ในกรณีที่เห็นส่วนของเชื้อรา (สปอร์หรือเส้นใย) ชัดเจนให้ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยส่วนของเชื้อมาวางในน้ำกลั่นหรือ Lactophenol ที่หยดไว้บนกระจกสไลด์ปิดด้วย Cover glass ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของ Objective 10x 20x และ 40x บันทึกลักษณะของเชื้อที่พบตั้งแต่ก้านชูสปอร์รูปร่างสีการเรียงตัวของสปอร์และโครงสร้างอื่นๆที่เห็นแล้วนาไปตรวจสอบกับเอกสารต่างๆที่ใช้จำแนกเชื้อราเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของรา (นิพนธ์, 2557)

2. ในกรณีที่ไม่เห็นชิ้นส่วนของเชื้อสาเหตุสามารถวินิจฉัยได้โดยใช้วิธีการตัดขวางส่วนที่เป็นโรค (Cross-section, X-section, Freehand section) โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมผืนผ้าให้มีขนาดเล็กกว่าแผ่นกระจกสไลด์แล้วนำมาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดนำแผ่นกระจกสไลด์อีกแผ่นมาวางทับลงบนชิ้นพืชโดยให้ขอบของกระจกสไลด์และขอบของชิ้นพืชเหลื่อมกันเล็กน้อยใช้ใบมีดโกนคมๆตัดตามขอบสไลด์ให้ชิ้นพืชบางที่สุดนำชิ้นพืชที่ได้มาวางบนน้ำกลั่นหรือ Lactophenol ที่หยดไว้บนกระจกสไลด์ปิดด้วย Cover glass ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์บันทึกลักษณะของเชื้อที่พบแล้วเอาไปตรวจสอบกับเอกสารต่างๆที่ใช้จำแนกเชื้อรา โดยการทำให้พืชมีความชื้น (moistchamber) เป็นการตรวจเชื้อที่ยังไม่สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แต่ก่อนที่จะส่องตรวจเชื้อได้ต้องทำให้พืชมีความชื้น เพื่อให้เชื้อราสร้างส่วนขยายพันธุ์ออกมาทางปากใบหรือเนื้อเยื่อแผลที่เปื่อยซึ่งมีวิธีการคือนำกระดาษฟางหรือกระดาษทิชชูวางในถุงพลาสติกหรือกล่องพลาสติกหรือจานเลี้ยงเชื้อฉีดน้าให้วัสดุมีความชื้นนำชิ้นพืชที่ต้องการตรวจวางไว้ด้านบนปิดปากถุงหรือปิดฝาให้สนิททิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน จึงนำชิ้นพืชมาตรวจอีกครั้งหนึ่ง (นิพนธ์, 2557)

3. การใช้เหยื่อล่อซึ่งวิธีนี้จะใช้ในกรณีที่พืชเป็นโรครากเน่าโคนเน่าที่สงสัยว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อราจาพวกราน้ำเช่นเชื้อ *Pythium* sp., *Phytophthora* sp โดยนำส่วนที่เป็นโรคหรือดินบริเวณที่เป็นโรคมาแช่น้ำไว้แล้วใช้ใบส้มหรือใบมะนาวตัดเป็นชิ้นเล็กๆมาลอยไว้เป็นเหยื่อล่อให้เชื้อราว่ายน้ำมาอาศัยเจริญเติบโตซึ่งจะเห็นเป็นเส้นใยสีขาวๆเจริญขึ้นรอบๆเหยื่อล่อนั้นแล้วนำใบส้มหรือใบ

มะนาวที่ที่เป็นเหยื่อล่อมาวางลงบนอาหาร PDA เพื่อให้เชื้อราเจริญสร้างเส้นใยและสปอร์แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (นิพนธ์, 2557)

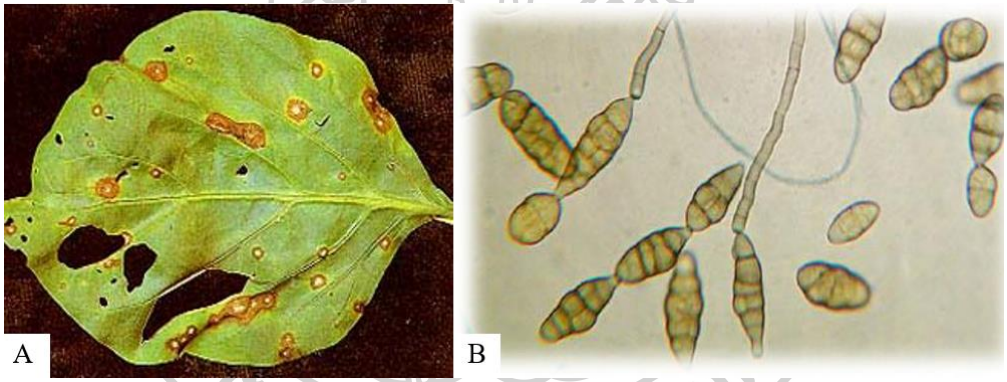
ตัวอย่างลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อราชนิดต่างๆที่สำคัญของพืชใบกว้าง

ในการศึกษาการใช้ราควบคุมวัชพืชแบบชีววิธีจำเป็นต้องทำการสังเกตลักษณะรอยโรคเบื้องต้นบนใบวัชพืชเพื่อให้ทราบว่ารอยโรคลักษณะใดเกิดจากการก่อโรคของราเพื่อทำการนำมาคัดแยกและศึกษาการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกโดยมีตัวอย่างลักษณะรอยโรคทั่วไปของราที่มักพบในพืชดังนี้

1. โรคใบจุดพืชคะน้า

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp.

เกิดแผลวงกลมเป็นจุดช้ำน้ำจนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (นิพนธ์, 2557)



รูปที่ 2 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Alternaria* sp. **A.** อาการโรคใบจุด **B.** ลักษณะสปอร์

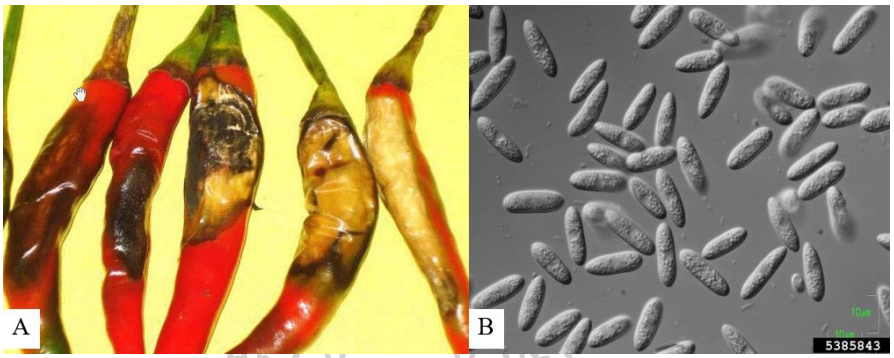
ที่มา : http://www.thaikasetsart.com/โรคใบจุด

http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri05/deu2.htm

2. โรคแอนแทรกโนสพืชพริก

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

เกิดเป็นจุดสีน้ำตาลแดงลุกลามผล มีเมือกสีส้มปกคลุมผิวบริเวณที่เป็นโรค และรามีการสร้างกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลแดงเรียงกันเป็นวงกลม (นิพนธ์, 2557)



รูปที่ 3 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. **A.** อาการโรคแอนแทรกโนส **B.** ลักษณะสปอร์

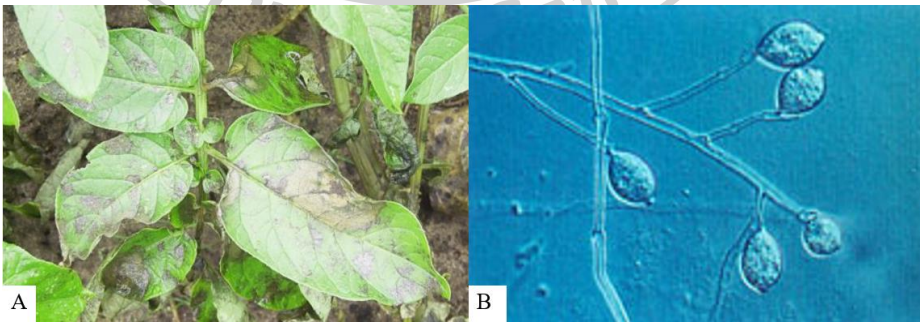
ที่มา : http://kasetnana.blogspot.com/2014/01/anthracnose.htm

https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5385843

3. โรคใบไหม้พืชมันฝรั่ง

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestan*

เกิดอาการใบแก่เป็นจุดแห้งสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอนลุกลามทั่วทั้งใบ (นิพนธ์, 2557)



รูปที่ 4 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophthora infestan* **A.** อาการโรคใบไหม้ **B.** ลักษณะสปอร์

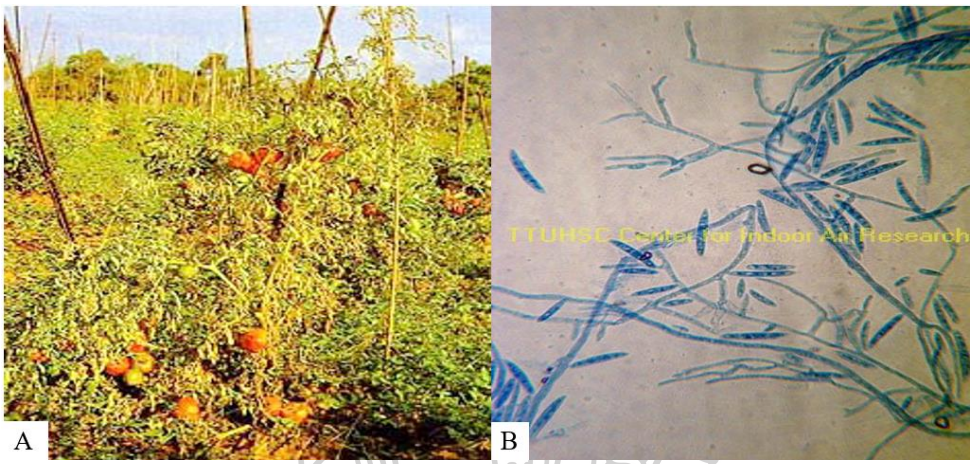
ที่มา : https://www.kasetkaoklai.com/home/2017/11/

https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/LateBlight.aspx

4. โรคเหี่ยวพืชมะเขือเทศ

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp.

อาการเกิดอาการเหี่ยวอย่างช้าๆ ใบโคนต้นเหลืองและร่วงก่อนต่อมาเหี่ยวทั้งต้นรากเน่า ใบเหลืองร่วงกิ่งก้านรวมถึงท่อน้ำและท่ออาหารถูกทำลายเป็นสีน้ำตาล (นิพนธ์, 2557)



รูปที่ 5 ลักษณะการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. **A.** อาการโรคเหี่ยว **B.** ลักษณะสปอร์

ที่มา : http://www.thaikasetsart.com/

http://www.toxipedia.org/pages/viewpage.action?pageId=15761730

เทคนิค Tissue transplanting method

เป็นเทคนิคคัดแยกราจากใบพืชที่มีลักษณะอาการเป็นโรค โดยเริ่มจากตัดใบพืชหรือส่วนของพืชตรงบริเวณแผลให้มีส่วนที่เป็นโรคติดมาประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่พืชที่ตัดขนาดประมาณ 4×4 มิลลิเมตร แบ่งเป็น 3 ตำแหน่งคือ ชิ้นส่วนที่ไม่เป็นโรคเลย ชิ้นส่วนที่มีรอยต่อระหว่างที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ชิ้นส่วนของพืชที่มีลักษณะเป็นโรคต่อมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite 5.25-6%) โดยเตรียมเป็นสารละลายในน้ำอัตราส่วน 1 : 5 และนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้แช่ในสารละลายเป็นเวลานาน 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จึงนำชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางบนผิวหน้าอาหารแข็ง Potatoes Dextrose Agar (PDA) ที่ผสมด้วย Streptomycin (ทำการผสมอาหารสูตร PDA ขณะอุ่นในปริมาตร 400 มิลลิลิตร กับยา Streptomycin (Antibiotic) 2.8 มิลลิลิตร แล้วเทลงจานเพาะเชื้อโดยวาง 3 ตำแหน่งให้แต่ละชิ้นพืชห่างกันเพื่อให้เชื้อที่จะเจริญออกมาจากแต่ละชิ้นแล้วไม่ปะปนกันบ่มเชื้อไว้ในสภาพที่เหมาะสมที่ห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บผลโดยการถ่ายภาพภายใต้กล้อง Leica M205 FA เมื่อเชื้อเจริญออกมาจากชิ้นพืชและมี

ขนาดโคโลนีประมาณ 1.5 ถึง 2 เซนติเมตร หรือก่อนที่เชื้อจากแต่ละชิ้นพืชจะเจริญชนกันให้ทำการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่เพื่อแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ (ชลิดา, 2557)

การพิสูจน์โรคตามหลักเกณฑ์ของ Koch

การพิสูจน์โรคโดยหลักเกณฑ์การพิสูจน์โรคของ Koch (ชลิดา, 2557) มี 4 ข้อดังนี้

1. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคและพืชเพื่ออาศัยส่วนของพืชที่แสดงอาการโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์จะพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคนั้นไม่ว่าจะปลูกพืชชนิดนี้ที่ใดก็ตาม

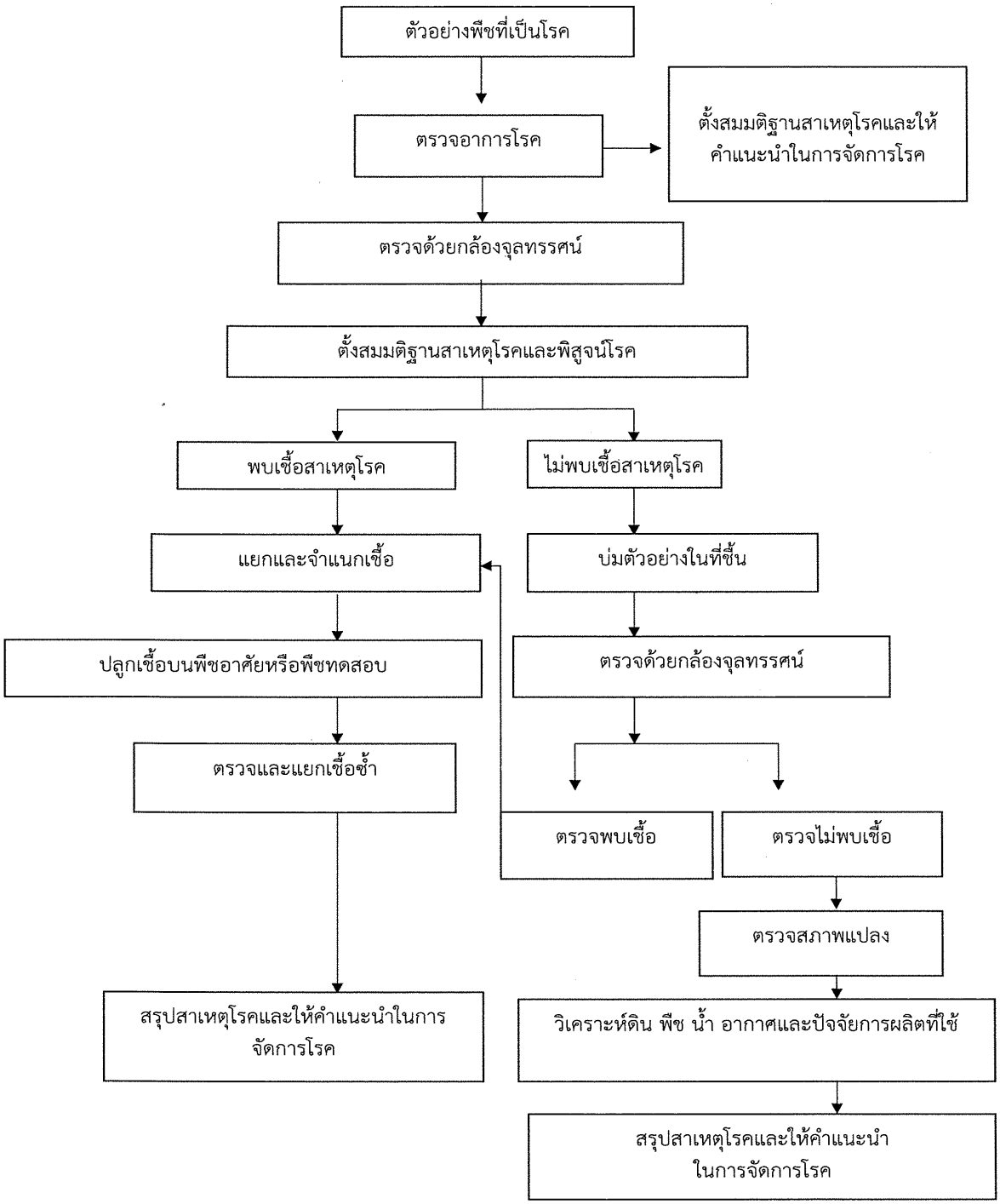
2. การแยกเชื้อสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของพืชที่เป็นรูปให้เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ได้

3. การปลูกเชื้อกลับเข้าสู่พืชอาศัยด้วยเชื้อที่บริสุทธิ์ที่แยกได้แล้วใส่กลับเข้าไปยังพืชอาศัยชนิดเดิมแล้วพืชชนิดเดิมจะแสดงอาการโรคเหมือนกับที่พบครั้งแรก

4. การแยกเชื้อและปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งโดยทำการแยกเชื้อจากพืชที่เป็นโรคในข้อ 3 ให้เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์อีกครั้งแล้วมาปลูกเชื้อกลับเข้าสู่พืชเดิมอีกครั้งเพื่อจะแสดงอาการโรคเช่นเดิมซึ่งการพิสูจน์รูปตามหลักเกณฑ์ของ Koch หลักฐานมาตรฐานทางด้านโรคพืชที่จะต้องเลือกปฏิบัติให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อสาเหตุโรคด้วย

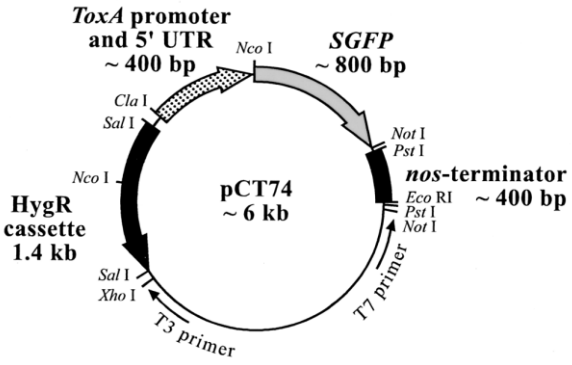
ขั้นตอนการวินิจฉัยโรคพืช

เริ่มจากการตรวจดูอาการโดยทั่วไปและการเปลี่ยนแปลงของพืชเพื่อการตั้งสมมติฐานหรือสรุปสาเหตุโรคซึ่งโรคบางชนิดสามารถวินิจฉัยได้สิ้นสุดในขั้นตอนนี้โดยรายละเอียดที่ตรวจสอบโดยสังเกตส่วนของพืชที่แสดงอาการเช่นใบ กิ่ง ก้าน ลำต้น ดอก ผล เมล็ดและ ราก ตำแหน่งที่แสดงอาการเช่นบริเวณโคนต้นหรือส่วนยอดบริเวณใบแก่หรือใบอ่อนหรือ ลักษณะอาการเช่นเนื้อเยื่อเหลืองซีดเนื้อเยื่อแห้งตายเป็นสีน้ำตาลเป็นด่างเน่าและเหี่ยวหรือเป็นปุ่มปม แล้วนำมาตรวจหาสาเหตุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์โดยนำพืชที่แสดงอาการโรคมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูความผิดปกติบริเวณผิวพืชโดยตรวจดูที่ผิวพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือศึกษาภายในเนื้อเยื่อโดยทำการตัดขวาง (Cross section) ส่วนของเนื้อเยื่อพืชแสดงอาการแล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light microscope) ต่อมาตั้งสมมติฐานสาเหตุโรค อาการโรคโดยตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วทำการเทียบเคียงกับหนังสือทางด้านโรคพืชหรือดัชนีโรคพืชและหนังสือที่มีรูปอาการโรคและโรคกับเชื้อสาเหตุ แล้วจึงแยกเชื้อสาเหตุโรคให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ต่อมาทำการปลูกเชื้อเข้าสู่พืชอาศัยหรือเพื่อทดสอบด้วยการปลูกเชื้อเข้าพืช และจำแนกเชื้อสาเหตุโรคโดยนำเชื้อที่ผ่านการพิสูจน์แล้วมันทำการจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อประโยชน์ในการควบคุมโรคจากการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคโดยสรุปวิธีการได้ตามแผนภูมิดังรูปที่ 6 (ชลิดา, 2557)



รูปที่ 6 แผนภูมิขั้นตอนการวินิจฉัยโรค (ชลิดา, 2557)

จากการศึกษาการก่อโรคของราในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกสามารถทำการติดตามระยะการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกโดยการแทรกเวคเตอร์ pCT74 ที่มีส่วนของยีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) เข้าไปในราและเมื่อทำการฉีดพ่นสปอร์ของราบนใบวัชพืชแล้วนำใบที่มีอาการโรคอันเนื่องมาจากรามาส่องภายใต้แสงสีน้ำเงินของกล้องฟลูออเรสเซนต์จะทำให้เห็นสปอร์ที่มีการเรืองแสงสีเขียวติดบริเวณใบและติดตามการก่อโรคของสปอร์บนใบวัชพืชได้โดยที่มาของเวคเตอร์ pCT74 มาจากองค์ประกอบของเวคเตอร์ pCT74 ที่มีส่วนของยีน GFP ซึ่งได้มาจาก Prof. Lynda Ciufetti, University of Oregon, USA เป็นส่วนที่ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวในเซลล์ราโดยการส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ โดยที่มาของยีนนี้มาจากการที่ Prasher และคณะ(1992) ทำการโคลนชิ้นส่วน cDNA สำหรับ GFP จากแมงกระพรุน (*Aequorea victoria*) แล้วใช้แทรกเข้าไปยีนของแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ เป็นต้น เมื่อนำเซลล์สิ่งมีชีวิตที่มียีน GFP มาส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ด้วยแสงยูวีหรือแสงสีน้ำเงิน จะปรากฏเซลล์สิ่งมีชีวิตที่มียีน GFP เรืองแสงสีเขียวซึ่งมีประโยชน์ในการใช้ศึกษาการก่อโรคของราบนชิ้นส่วนพืชได้ในงานวิจัยนี้โดยเวคเตอร์ pCT74 ที่มีส่วนของยีน GFP จาก Prof. Lynda Ciufetti, University of Oregon, USA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีขนาดรวมทั้งเวคเตอร์ 4,500 เบส โดยมีองค์ประกอบต่างๆ ดังรูปที่ 7 มีส่วนประกอบที่สำคัญคือส่วนยีน GFP และฉลากยา Hygromycin โดยในงานวิจัยจะใช้ Hygromycin B เป็น selection marker ซึ่งผู้วิจัยจะทำการแทรกยีน pCT74 นี้เข้าไปในราโรคพืช เมื่อทำการฉีดพ่นสปอร์หรือเซลล์ราโรคพืชที่มียีน GFP แล้วนั้นมีประโยชน์ในการติดตามระยะการก่อโรคของราโรคพืชเมื่อทำการส่องตัวอย่างใบวัชพืชที่ถูกราเข้าทำลายภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และเพื่อทำการศึกษากระบวนการก่อโรคของราโรคพืชบนวัชพืชตีนตุ๊กแกและผลกระทบต่อมันสำปะหลัง



รูปที่ 7 องค์ประกอบของเวคเตอร์ pCT74 (Lorang และคณะ, 2001)

การระบุสายพันธุ์เชื้อราด้วยการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ส่วน Internal transcribed spacer (ITS)

การศึกษาในส่วนที่เกี่ยวกับการตรวจสอบหรือการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลในระดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นส่วนมากจะทำการศึกษาตรงส่วนของยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอและช่องว่างที่อยู่ระหว่าง ยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า Internal transcribed spacer (ITS) เนื่องจากส่วนของ ยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (rDNA) จะมีลักษณะการเรียงตัวของลำดับเบสเป็นแบบซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeat) และมีจำนวนซ้ำในรหัสพันธุกรรมที่อยู่ในระดับสูงรวมทั้งสามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่สามารถจับกับเบสได้หลายกลุ่มในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนั้น (Universal primer) ที่ออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสที่เป็นส่วนอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณดังกล่าวได้และนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้สะดวก (Henson และ French, 1993)

ยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ของเชื้อราจะพบทั้งในส่วนของนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย ประกอบด้วยส่วนย่อยขนาดเล็ก (Small subunit, SSU) ได้แก่ 5.8s และส่วนย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit, LSU) ได้แก่ 18s และ 28s (Bridge, 1998) ซึ่งส่วนย่อยทั้ง 2 ส่วนจะมีลำดับเบสที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserve sequence) แต่ก็จะมีวิวัฒนาการเป็นไปอย่างช้าทำให้สามารถใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมากได้

Internal transcribed spacer (ITS) เป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีนซึ่งอยู่ระหว่างส่วนย่อยของยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอประกอบด้วย ITS1 อยู่ระหว่าง 18s และ 5.8s ส่วน ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8s และ 28s ลำดับเบส ตรงส่วน ITS จะมีความหลากหลายมาก และมีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็วแต่ในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับเบสตรงบริเวณ ITS ค่อนข้างเหมือนกันแต่จะแตกต่างกันในระหว่างสปีชีส์ทำให้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ได้รวมทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนา Species-specific probe และ ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ (Species-specific primer) เพื่อใช้ในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตได้อย่างเฉพาะเจาะจง (Bridge, 1998)

การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี

วิธีการควบคุมวัชพืชทางการเกษตรจากงานวิจัยของ Ogle และคณะ (2005) กล่าวถึงวิธีควบคุมวัชพืชแบบชีววิธีว่าคือการลดจำนวนวัชพืชหรือพืชแข่งขันในแปลงพืชเศรษฐกิจ ซึ่ง ชีววิธี นี้เป็นวิธีการที่ปลอดภัยและไม่ส่งผลกระทบต่อธรรมชาติ โดย ชีววิธี แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ แบบดั้งเดิม (Classical biocontrol) เป็นการควบคุมทางธรรมชาติจากการใช้ศัตรูทางธรรมชาติของวัชพืชแบบถาวรโดยปราศจากการแทรกแซงของมนุษย์ หรือ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมวัชพืชปล่อยตามสภาพแวดล้อมในแปลงพืชโดยจุลินทรีย์นั้นต้องไม่ก่อโรคและส่งผลกระทบต่อธรรมชาติแต่ต้อง

จำเพาะต่อวัชพืช จุลินทรีย์ที่ควบคุมวัชพืชนั้นจะสามารถเกิดวงจรการเจริญได้ ตัวอย่างในปี 1970 ออสเตรเลีย มีการใช้ *Puccinia chondrillina* ควบคุมวัชพืชในตระกูลเดซี่ (*Chondrilla juncea*) ซึ่งแก่งแย่งสารอาหารจนพืชเศรษฐกิจในพื้นที่ลดลง 50-80 % และยังลดการใช้สารเคมีอีกด้วย ต่อมาเป็นการควบคุมทางชีววิธี แบบ Inundative biocontrol ซึ่งมีลักษณะคล้ายแบบดั้งเดิมแต่มีวิธีการที่มีความจำเพาะกับวัชพืชเป้าหมายที่เป็นเจ้าบ้านของจุลินทรีย์ที่ใช้และไม่ทำลายพืชอื่นๆรอบข้าง ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้หาได้จากธรรมชาติและสามารถกำหนดบริเวณขอบเขตในการใช้จุลินทรีย์ควบคุมวัชพืชได้ เช่น สำหรับรา ใช้การผลิตสปอร์ของราในการฉีดพ่นบนวัชพืชคล้ายการฉีดพ่นสารเคมี เรียกว่า bioherbicides หรือ mycoherbicides และมีการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุม

จากงานวิจัยที่เคยมีรายงานเกี่ยวกับวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังโดย จรรยา และคณะ (2556) ทำการทดลองการจัดการวัชพืชแบบผสมผสานในแปลงมันสำปะหลังโดยการใช้สารเคมี S-metolachlor ร่วมกับ flumioxazin และ alachlor ร่วมกับ diuron พบว่าการใช้สารเคมีร่วมกันสามารถควบคุมวัชพืชประเภทใบกว้างและใบแคบได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้จะพบว่าประสิทธิภาพการควบคุมลดลงเล็กน้อยที่ระยะ 60 วัน แต่ยังพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สาร พาราควอต (Paraquat) ในการกำจัดวัชพืชหลังการงอกของมันสำปะหลัง ซึ่งการใช้สารเคมี พาราควอต ส่งผลกระทบโดยละอองสารเคมีปลิวไปสัมผัสต้นมันสำปะหลัง เกิดเป็นพิษต่อการเจริญเติบโต ต่อมาทำการศึกษาวัชพืชพบว่า เป็นแหล่งอาศัยของแมลงศัตรูพืชสำคัญ เช่น เพลี้ยแป้ง ไรแดง และ แมลงหวี่ขาว หากไม่มีการกำจัดวัชพืช ผลผลิตมันสำปะหลังจะลดลงได้ตั้งแต่ 20-90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัชพืชทั้งการใช้สารกำจัดวัชพืชและแรงงานเพิ่มขึ้นอีก และจากการสำรวจพบวัชพืชต่างๆ เช่น จังหวัดอุบลราชธานีพบวัชพืชจำนวน 138 ต้นต่อตารางเมตร ประเภทวัชพืชในแคบได้แก่ หญ้าตีนนก หญ้าขจรจบดอกเล็ก ประเภทวัชพืชใบกว้างได้แก่ ถั่วเซ็นโต หญ้าท่าพระและไมยราบ เป็นต้นหรือที่จังหวัดฉะเชิงเทราพบวัชพืชจำนวน 162 ต้นต่อตารางเมตร ประเภทวัชพืชในแคบ ได้แก่ หญ้าตีนนก และ หญ้าปากควาย ประเภทวัชพืชใบกว้าง ได้แก่ สาบม่วง ตีนตุ๊กแก และ หญ้ายาง หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธี เป็นต้น รวมถึงงานวิจัยของ Harding และ Raizada (2015) พบว่าวัชพืชเป็นสิ่งที่รบกวนการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจอื่นและเกิดขึ้นหลากหลายพื้นที่ ทำให้มีการใช้สารเคมีฆ่าวัชพืชอย่างแพร่หลายแต่เกิดปัญหาวัชพืชมีความดื้อต่อสารเคมี หรือมีความทนทานต่อสารเคมีมากขึ้น ทำให้เกิดแนวความคิดใหม่ในการใช้สิ่งมีชีวิตควบคุมวัชพืชโดยมี แบคทีเรีย รา และ ไวรัสที่ได้รับการยอมรับ ซึ่งการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชนั้นสามารถลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อวัชพืชได้รวมถึงลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีฆ่าวัชพืช นอกจากนี้ Bailey และคณะ (2014) ได้กล่าวถึงเหตุผลในการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หรือสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในการควบคุมวัชพืช เพื่อลดความเสี่ยงต่อการตกค้างของสารพิษ หรือสารเคมีที่ใช้ฉีดพ่นวัชพืชบนแปลงพืชเศรษฐกิจโดยการคิดค้นและพัฒนาราก่อโรคเพื่อใช้ควบคุมวัชพืชในอนาคตแทนสารเคมีซึ่งเป็นสิ่งที่สร้างผลเสียต่อพืชเศรษฐกิจทั้งด้านเกษตรกรรมรวมถึงมีผลเสียต่อเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม โดย Pacanoski (2012) ได้ทำการรวบรวมการ

ใช้จุลินทรีย์ในการเป็นสิ่งมีชีวิตที่ควบคุมวัชพืชโดย ความหมายของคำว่า Bioherbicides คือจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชหรือสารพิษที่สร้างโดยจุลินทรีย์ที่มีผลในการทำให้วัชพืชเป็นโรค และประโยชน์ของ Bioherbicides คือ มีความจำเพาะต่อวัชพืช ไม่มีผลต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอื่น ไม่มีสารพิษตกค้าง และมีประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรวัชพืช แต่ก็มีข้อจำกัดด้านชีวภาพ เช่น การเจริญเติบโตและการอยู่รอดของรา ด้านสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความชื้นและอุณหภูมิ รวมถึงการทางการค้า โดยการเลือกใช้ราเป็นตัวควบคุมวัชพืชแทนสารเคมียังมีน้อยและการจำกัดความเชี่ยวชาญในการใช้ของเกษตรกร เป็นต้น ราก่อโรคในวัชพืชที่เคยมีรายงานไว้ในงานวิจัยคือ Bioherbicides ที่ประสบความสำเร็จในการค้าภายใต้เครื่องหมายการค้า Collego และ BioMAI ซึ่งมีราก่อโรคพืชที่ใช้ควบคุมวัชพืชถึง 200 สายพันธุ์ เช่น *Plectosporium tabacinum* ใช้ควบคุมวัชพืช *Galium* spp. นอกจากนี้ *Fusarium oxysporum* (PSM 197) ใช้ควบคุมวัชพืช *Striga asiatica* (91.3 เปอร์เซ็นต์) รวมถึง *Striga hermonthica* (94.3 เปอร์เซ็นต์) และ *Striga gesneroides* (81.8 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ *Colletotrichum truncatum* ใช้ควบคุมวัชพืช *Sesbania exaltata* และ *Mycothecium verrucaria* ใช้ควบคุมวัชพืชในวงศ์ที่กว้างเช่น *Chenopodium amaranticolor*, *Sesbania exaltata*, *Senna obtusifolia* และ *Datura stramonium* นอกจากนี้สารพิษของ *Mycothecium verrucaria* คือ Trichothecene ใช้ควบคุมเมล็ดวัชพืช *Orobanche ramosa* seeds ได้อีกด้วย ต่อมาพบว่า *Phomopsis amaranthicola* ใช้ควบคุมวัชพืช บานไม่รู้โรย (*Amaranthus* spp.) นอกจากนี้มีการเสริมฤทธิ์กันโดยใช้รา 2 สายพันธุ์เช่น การใช้ *Microsphaeropsis amaranthi* ร่วมกับ *Phomopsis amaranthicola* ในการควบคุม *Amaranthus* spp. ต่อมามีการใช้ราควบคู่กับสารเคมีเพื่อเสริมความรุนแรงในการก่อโรค เช่น สารเคมี Acifluorfen หรือ bentazon จะส่งเสริมรา *Alternaria cassia* ในการควบคุมวัชพืช *Senna obtusifolia* และมีการใช้รา *Colletotrichum gloesporioides* ในการควบคุมวัชพืช *Aeschynomene virginica* หรือ *Colletotrichum truncatum* ในการควบคุมวัชพืช ดอกโสน (*Sesbania exaltata*) และ *Fusarium lateritium* ในการควบคุมวัชพืช *Desmodium tortuosum* โดยสารเคมี Glyphosate จะส่งเสริมรา *Myrothecium verrucaria* ในการควบคุมวัชพืช *Brunnichia ovata* (88 เปอร์เซ็นต์) และ *Campsis radicans* (90 เปอร์เซ็นต์) แต่มีข้อจำกัดของ Bioherbicides คือ สภาพแวดล้อมมีผลต่อประสิทธิภาพในการก่อโรค เช่น บนใบไม้ต้องมีความชื้นจากหยดน้ำค้างเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของราอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ข้อจำกัดทางชีวภาพ คือ ความหลากหลายในการใช้ยังไม่กว้างขวาง บางสายพันธุ์ราควบคุมวัชพืชอย่างจำเพาะและวงศ์ไม่กว้าง ทำให้เกิดข้อจำกัดทางการค้า รวมถึงอายุการใช้งานในการจำหน่าย จึงต้องมีการศึกษาวิธีการต่อๆไป โดยงานวิจัยที่ส่งเสริมประโยชน์จากการใช้จุลินทรีย์ควบคุมวัชพืชจาก Bailey และคณะ (1997) ได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ราโรคพืช (Plant Pathogens) ในการควบคุมวัชพืช โดยนำข้อมูลมาจาก Saskatoon Research Centre ประเทศแคนาดา ซึ่งองค์กรวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาจุลินทรีย์ สำหรับควบคุมวัชพืชที่รุกรานแปลงเกษตรกรรมโดยใช้แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่ง

วัชพืชในแคนาดาส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตทางการเกษตรมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ หรือเป็นเงิน 984 ล้านดอลลาร์ การใช้สารเคมียับยั้งวัชพืชนั้นช่วยลดความเสียหายที่เกิดต่อพืชผล แต่ก็มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากมาย ทางรัฐบาลจึงเน้นให้พัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมวัชพืช ซึ่งคำว่า การควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control) หมายถึงการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น ไวรัส, แบคทีเรีย และเชื้อรา หรือสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เหล่านี้ ในการควบคุมหรือยับยั้งสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชไม่ว่าจะเป็น แมลง สัตว์ และวัชพืช เป็นต้น โดยการควบคุมทางชีวภาพ ด้วยจุลินทรีย์ต้องมีลักษณะดังนี้คือ เชื้อก่อโรคต้องสามารถเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ มีความจำเพาะต่อวัชพืชเจ้าบ้าน และสามารถปราบปรามหรือควบคุมสัดส่วนของวัชพืชในสภาพแวดล้อมจริงได้ เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างราที่ค้นพบในการใช้ควบคุมวัชพืช มีดังนี้ *Phytophthora palmivora* ใช้ควบคุม ต้น strangler-vine ในสวนผลไม้โดยการฉีดพ่นที่ใบของวัชพืช, *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* หรือในชื่อการค้า Collego ใช้ควบคุม ต้นโสนหางไก่ (northern jointvetch) ในนาข้าวกับถั่วโดยการผลิตสปอร์แห้งแล้วนำมาผสมในน้ำก่อนฉีดพ่นซึ่งลดวัชพืชได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ *Puccinia canaliculata* หรือในชื่อการค้า DR. BIOSEDGE โดยใช้ควบคุมต้น หญ้าแห้วหมู (yellow nutsedge) โดยการยับยั้งการออกดอก 46 เปอร์เซ็นต์ *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. malvae โดยใช้ควบคุมต้น round-leaved mallow และ *Alternaria cassiae* โดยใช้ควบคุมเมล็ด seicklepod ช่วงเป็นเมล็ด และงานวิจัยของ Charudattan และคณะ (2000) ได้ทดลองเกี่ยวกับการควบคุมวัชพืชโดยใช้ราก่อโรคพืช (plant pathogens) ในการควบคุมวัชพืชอย่างเช่นการใช้ *Puccinia chondrillina* ในการควบคุม Rush skeleton weed (*Chondrilla juncea*) ซึ่งเป็นพืชที่สามารถโตเร็วและครอบคลุมพืชในแปลงเกษตรออสเตรเลีย *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* ใช้ควบคุม northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) ซึ่งเป็นวัชพืชตระกูลถั่วฝักที่ขึ้นเป็นวัชพืชแย่งอาหารของข้าวกับถั่วเหลือง และ *Colletotrichum truncatum* ควบคุมวัชพืช ดอกโสน (*Sesbania exaltata*) เป็นต้น แต่ก็มีข้อจำกัดในหลายอย่างคือ ต้องการราควบคุมวัชพืชที่มีความจำเพาะสูงและใช้เป็นชีวภัณฑ์ทางการค้า อีกประการหนึ่งควรมีอายุการใช้งานยาวและมีประสิทธิภาพสูง

จากรายงานงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าราที่ควบคุมและก่อโรคในวัชพืชมีการสร้างสารทุติยภูมิอย่างรายงานของ Graupner และคณะ (2003) ทดลองการสกัดสารชนิดใหม่จากราก่อโรคพืชสายพันธุ์ *Phoma macrostoma* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคทำให้เกิดอาการฟอกสีและการจางของสีในพืช (Bleaching and chlorotic) โดยพบว่าราสายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่เป็นพิษต่อพืชซึ่งนำมาใช้ควบคุมวัชพืชใบกว้างหลากหลายชนิด โดยสารที่สกัดออกมาได้จากรา *Phoma macrostoma* คือ Cyclic Tetramic Acids ซึ่งคาดว่ามีผลต่อการก่อโรคในวัชพืช นอกจากนี้ Maor และคณะ (2004) ทำการศึกษาการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ผ่านสื่อกลาง indole-3-acetamide (IAM) จากราก่อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* โดยได้ศึกษาผลกระทบของ tryptophan, IAA และ IAM บนอาหาร axenic cultures ที่มี tryptophan ที่ประกอบด้วย IAA และ IAM โดยสารเหล่านี้นั้นพบว่าผลิตในพืชแต่ผู้วิจัยต้องการทดสอบว่าราก่อโรคชื่อ

Colletotrichum gloeosporioides f. sp. *aeschynomene* สามารถผลิตสารพวกนี้ได้เช่นกันจากการใช้ส่วนประกอบของสารพวกนี้ในพืชมาผลิตโดยผลการทดลองพบว่าอาหารที่มีการเลี้ยงบนอาหาร axenic culture ที่มี tryptophan ในส่วนที่เป็น IAM พบว่ามีการผลิต tryptophan และ IAM เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่ IAA ไม่มีการเพิ่มขึ้นในขณะที่อาหาร axenic culture ที่มี tryptophan ในส่วนที่เป็น IAA พบว่ามีการผลิต tryptophan และ IAM เพิ่มขึ้นอย่างเล็กน้อยแต่ IAA ไม่มีการเพิ่มขึ้นจึงสรุปผลได้ว่า tryptophan และ IAM ภายนอกเซลล์รามีผลต่อการผลิต tryptophan และ IAM แต่มีผลเล็กน้อยกับการผลิต IAA ส่วน IAA ภายนอกเซลล์รามีผลเล็กน้อยต่อการผลิต tryptophan และ IAM แต่ไม่มีผลต่อการผลิต IAA เลย ต่อมาผู้วิจัยสกัดโปรตีนจากราที่เข้าก่อโรคในพืชคือ *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* แล้วทำการบ่มกับ IAA และ IAM เป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง เพื่อทำการทดสอบการสร้าง IAA และ IAM จากราพบว่าที่ 48 ชั่วโมง มีการผลิต IAA บ้างเล็กน้อยแต่มีการผลิต IAM มากกว่า แต่เมื่อผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิต IAM มากขึ้นเท่าตัวจึงสรุปได้ว่าราเวลาที่ 96 ชั่วโมง มีผลต่อการผลิต IAM ของ *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* ได้ปริมาณมาก สำหรับราก่อโรคที่เป็นตัวแทนชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชที่มีการศึกษาสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) คือ *Phoma* sp. โดยงานวิจัยของ Rai และคณะ (2009) กล่าวถึงสารทุติยภูมิที่สร้างโดยรา *Phoma* sp. ซึ่งเป็นราที่สามารถพบได้จากพืช ดิน สิ่งมีชีวิต โดยสารทุติยภูมิที่หลั่งออกมานั้นมีผลหลากหลายประเภททั้งเป็นสารรักษามะเร็ง สารยับยั้งจุลินทรีย์ รวมถึงสารที่มีผลต่อการก่อโรคในวัชพืชหรือเป็นสารที่เป็นพิษต่อพืช (Phytotoxins) เช่น *Phoma lingam* สร้างสาร Phomamide มีผลต่อพืชโดยก่อให้เกิดอาการไหม้ดำ บริเวณลำต้น และก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งในต้น นอกจากนี้ *Phoma herbarum* สร้างสาร brefeldin A มีผลยับยั้งขั้นตอนการแบ่งเซลล์ ไมโทซิส ของเซลล์พืชเป็นต้น ซึ่งสารทุติยภูมิที่สร้างโดยรานั้นเป็นหนึ่งในสาเหตุการเกิดโรคและใช้ควบคุมวัชพืช

งานวิจัยที่เน้นการใช้สปอร์ของราโดยสปอร์มีผลต่อการเจริญและก่อโรคบนวัชพืช จากงานวิจัยของ Auld และคณะ (1988) ทดลองการใช้ราในการควบคุมวัชพืชสายพันธุ์ *Xanthium spinosum* ซึ่งเป็นปัญหาหลักในออสเตรเลีย ผู้วิจัยจึงทำการแยกเชื้อจากวัชพืชหลากหลายแหล่งในทางตะวันออกเฉียงใต้ของออสเตรเลียและพบว่าราสายพันธุ์ *Colletotrichum orbiculare* สามารถใช้ควบคุมวัชพืชสายพันธุ์นี้ได้โดยการก่อโรคแอนแทรคโนสทำให้เกิดการทำลายที่เมล็ดและลำต้นจากการใช้สปอร์จำนวน 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ในการฉีดพ่นซึ่งสามารถกำจัดวัชพืช *Xanthium spinosum* อายุ 6 สัปดาห์ ในเวลา 14 วัน เสริมด้วยงานวิจัยของ Epstein และคณะ (1997) ได้ทดลองการทำยีนกลายของ *Colletotrichum graminicola* โดยมีชุดควบคุมเป็นพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งมีสปอร์สีส้มอ่อน (สีแซลมอน) ส่วนพันธุ์กลาย M26 แทรกยีนที่ถูกตัดการสร้างเม็ดสีออก (Disrupted gene) ด้วยวิธีการ transformation จะมีสปอร์สีขาว ซึ่งเมื่อทำการส่องรังสี Ultraviolet พบว่า พันธุ์กลาย M26 มีอัตราการงอกของสปอร์ลดลงเมื่อเทียบกับพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเม็ดสีของสปอร์

มีส่วนในการป้องกันสปอร์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและส่งผลในการก่อโรคในพืช ซึ่งงานวิจัยนี้สนับสนุนถึงการใช้สปอร์ในการควบคุมวัชพืช

Colletotrichum sp. เป็นหนึ่งในราไอโซเลตที่ก่อโรคแอนแทรคโนสต่อพืชหลากหลายสายพันธุ์ซึ่งบางสายพันธุ์ก่อโรคในพืชทั่วไป บางสายพันธุ์ก่อโรคในวัชพืชและถูกใช้เป็นชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชดังงานวิจัยที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ วิธีการก่อโรคและวงจรชีวิตของ *Colletotrichum* sp. จากงานวิจัยของ Silva และคณะ (2017) กล่าวถึงวงจรชีวิตของ *Colletotrichum* sp. เริ่มจากการที่สปอร์สัมผัสที่ใบหรือพื้นผิวพืช เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจะเกิดการงอกของสปอร์จนกระทั่งมีการสร้าง แอพเพรสซอเรียม (appressorium) ก่อนที่จะเจริญเป็นเส้นใยแทงลงไปบริเวณผิวเซลล์พืช เรียกว่าช่วง biotrophic phase ต่อมาเมื่อเส้นใยราเข้าไปในเซลล์พืชเกิดการดูดสารอาหารภายในเซลล์พืช โดยช่วงนี้เซลล์พืชยังมีชีวิตอยู่เรียกว่าช่วง hemi biotrophic phase จนกระทั่งเซลล์พืชเริ่มตายและเกิดอาการโรคเช่น ใบไหม้ จุดด่างดำ จนเหี่ยวทั้งใบ เข้าสู่ช่วง necrotrophic phase และ *Colletotrichum* sp. จะสร้างโครงสร้างเซลล์ราที่ประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายเส้นขน setae และสร้างส่วน conidiophores เพื่อกระจายสปอร์ต่อไป แต่ในบางกรณี *Colletotrichum* sp. จะอาศัยอยู่ในพืชในรูปแบบอาศัยโดยไม่ก่อโรคเรียกว่า endophyte

Bailey (2014) ได้รวบรวมบทความวิจัยหลากหลายเกี่ยวกับการค้นหาชีวภัณฑ์ เช่น จากอเมริกาเหนือโดยผู้เขียนได้รวบรวมผลงานวิจัยและพบว่าชีวภัณฑ์ควบคุมอย่างเช่นเชื้อราที่นิยมใช้กันคือ *Colletotrichum*, *Phoma* และ *Sclerotinia* ซึ่งการวิจัยนี้ทำให้ค้นพบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อวัชพืชหลากหลายชนิด เช่น ในสายพันธุ์ *Colletotrichum truncatum* ที่ค้นพบว่าสามารถควบคุมต้นโสน หรือ hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) และ *C. orbiculare* สามารถที่ควบคุมต้น spiny cockleburn (*Xanthium spinosum*) และยังค้นพบ *C. gloeosporioides* และ *C. orbiculare* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ทำงานร่วมกันในการก่อโรคพืชด้วย นอกจากนี้ยังมีรา *Phoma* ที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชอย่างมากหรือเป็นตัวแทนในการใช้คุมวัชพืช เช่น *P. herbarum* เป็นราที่ก่อโรคในพืชที่แยกได้จากต้น dandelion ซึ่งสามารถควบคุมต้น dandelion ในสนามหญ้าได้

สำหรับการติดตามระยะการก่อโรคของรา จากงานวิจัยของ Prasher และคณะ (1992) เกี่ยวกับการแทรกยีน GFP ในรา จะทำให้สามารถติดตามระยะต่างๆจากการสังเกตสีเรืองแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ตามวงจรการเจริญอย่างเช่นวงจรของ *Colletotrichum* sp. ได้ ซึ่งทำให้เข้าใจวงจรและวิธีการก่อโรคของราในวัชพืช

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการค้นคว้า

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potatoes Dextrose Agar (PDA)
2. อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเซลล์ราสูตร Sabouraud Dextrose Yeast Broth (SDY)
3. อาหารแข็งสำหรับผลิตสปอร์สูตร Oatmeal Agar (OMA)
4. Agar Technical Solidifying Agent
5. Yeast Extract (Extract of Autolysed Yeast Cell)
6. Agarose (Molecular Biology Grade)
7. Polyoxyethylene (20) Sorbittan Mono oleate (tween-80)
8. Streptomycin sulfate salt ($C_{21}H_{38}N_7O_{12}.1.5H_2O_4S$)
9. Sodium Hypochlorite (Clorox, NaClO)
10. สารจับใบ All purpose spray adjuvant concentrate (APSA-80)
11. น้ำกลั่น (Distilled water)
12. Lysis buffer
    - 12.1 Ethylene diamine tetraacetic acid (0.25 M EDTA)
    - 12.2 Tris-Hydrochloride buffer (1M Tris-HCl buffer)
    - 12.3 Sodium dodecyl sulfate (20%SDS)
    - 12.4 Lithium chloride (8.0 M LiCl)
13. Phenol : Chloroform : Isoamyl อัตราส่วน 1:24:25
14. Chloroform
15. Isopropanol
16. Ethanol (75%EtoH)
17. Nuclease free water
18. RNase A (10 mg RNase A)
19. Liquid Nitrogen
20. 1kb plus DNA Ladder (Fermentas)
21. Dream Taq Green PCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, USA)
22. Gel Extraction kit (Fermentas)
    - 22.1 Binding Buffer
    - 22.2 Wash Buffer
    - 22.3 Elution Buffer
23. ไพร์มเมอร์สำหรับระบุสายพันธุ์ราส่วน Internal transcribed spacer (ITS4,ITS5)

24. เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ VinoTaste Pro Maturation (6-10 g/hl)
25. สารลดแรงตึงผิว Tween-80 extra pure
26. QIA quick PCR purification kit 137 (QIAGEN, USA)
27. พลาสมิด pCT74 (จาก Prof. Lynda Ciufetti, University of Oregon, USA)
28. Luria-Bertani (LB)
29. ampicillin 100 µg/ml
30. เอนไซม์ *Eco*RI และ *Nco*I

อุปกรณ์

1. Inoculating loop and needle
2. Spreader
3. Petri dish
4. Test tube (eppendorf) 1ml , 15 ml , 50 ml , PCR tube
5. Micropipette 2 ml , 20 ml , 100 ml , 200 ml , 1000 ml
6. Erlenmeyer flask 250 ml
7. Beaker 10 ml , 50 ml , 100 ml , 1000 ml
8. Cylinder 10 ml , 50 ml , 100 ml , 1000 ml
9. Filtering Funnel
10. Pestle & Mortar
11. Laboratory bottle
12. Stirring rod
13. Microscope slide
14. Cover Glass
15. Spray bottle

เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet : BSC)
5. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow clean bench)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าหยาบ (Top-loading Balance)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (Electronic Analytical Balance)
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (PH meter)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

10. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง (Refrigerator and freeze), -20 ℃ , -80 ℃
11. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบหัวกลับ (Leica light microscope)
12. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (Leica stereo microscope)
13. Thermal Cycler (Bio–Rad)
14. DNA Gel Electrophoresis Equipment & Supplies
15. Gel Documentation and analysis
16. Vacuum Freeze Dryer
17. Incubator shaker
18. Laboratory centrifuge
19. Computer model Dell Zeiss AXIO V16
20. กล้องฟลูออเรสเซนต์แบบ Fluorescence Stereo Microscope Axio Zoom. V16 (Zeiss, USA)
21. Computer model Dell Nikon Eclipse Ti2-E
22. กล้องฟลูออเรสเซนต์แบบ Nikon Eclipse Ti-2E เลนส์ Nikon Plan Apo VC 100x
23. กล้องคอนโฟคอลแบบ Confocal Laser Scanning Microscope model Olymous FV1000
24. เครื่อง Spectrophotometer ND-1000 (nano drop)
25. Perkin Elmer PE 9700 or Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, 136 USA)
26. Incubator shaker

มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคและระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง

เก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างที่แสดงอาการโรคทางธรรมชาติ โดยการสุ่มแล้วเก็บตัวอย่างแต่ละพื้นที่ ได้แก่ ทำการสังเกตใบวัชพืชที่มีลักษณะอาการโรค คือ มีรอยไหม้หรือรอยจุดสีน้ำตาลดำบนพื้นผิวใบ บริเวณแปลงพืชหลังอุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี และสำนักงานเกษตร จังหวัดฉะเชิงเทรา

1.1 การคัดแยกราที่มาจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคด้วยเทคนิค Tissue transplanting method

ทำการแยกเชื้อราจากวัชพืชใบกว้างจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโดยการคัดแยกราจากชิ้นส่วนวัชพืชในข้อ 1 ด้วยเทคนิค Tissue transplanting method (ชลิดา, 2557) โดยขั้นตอนคือ เริ่มจากล้างวัชพืชตัวอย่างที่เก็บด้วยน้ำสะอาด และตัดใบพืชหรือส่วนของพืชบริเวณแผลให้มีพื้นที่ส่วนที่เป็นโรคประมาณหนึ่งในสองของพื้นที่พืชให้มีขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร แล้วแบ่งเป็น 3 ตำแหน่งคือ ชิ้นส่วนที่ไม่มีอาการโรค, ชิ้นส่วนที่มีรอยต่อระหว่างส่วนที่เกิดโรคและไม่เกิดโรค และชิ้นส่วนของพืชที่มีลักษณะเป็นโรคทั้งหมดและทำการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวพืช (surface sterilization) โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.6% (sodium hypochlorite 6%) เจือจางน้ำในอัตราส่วน 1 : 10 และนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้แช่ในสารละลายที่เตรียมในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลานาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลานาน 2 นาที รวม 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potatoes Dextrose Agar (PDA, Difco, U.S.A.) ที่ผสมด้วย Streptomycin 2.8 มิลลิลิตร ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในอาหาร PDA ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง Streptomycin นั้นมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แล้วเทสารละลายอาหารเมื่ออาหารแข็งแล้วนำชิ้นส่วนใบวัชพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาวาง 3 ตำแหน่ง ให้แต่ละชิ้นพืชห่างกันเพื่อให้เชื้อที่จะเจริญออกมาจากแต่ละชิ้นไม่ปะปนกัน บ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทำการคัดเลือกราในตำแหน่งที่มีลักษณะเฉพาะและแตกต่างกันเพื่อแยกราให้บริสุทธิ์สำหรับการจำแนกสายพันธุ์แล้วเก็บผลด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาลักษณะสปอร์และเส้นใยเบื้องต้นของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแล้ววงโคโลนีที่แตกต่างกัน

1.2 การระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง

ทำการคัดเลือกราจากโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และนำมาแยกให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์สำหรับการระบุสายพันธุ์ โดยเมื่อเชื้อในข้อ 1.1 เจริญออกมาจากชิ้นพืชและมีขนาดโคโลนีประมาณ 1.5 – 2.0 เซนติเมตร หรือก่อนที่เชื้อจากแต่ละชิ้นพืชจะเจริญชนกัน ให้ทำสัญลักษณ์ตำแหน่งที่มีลักษณะเฉพาะต่างๆกันโดยการใช้ปากกาทำสัญลักษณ์ส่วนของโคโลนีที่มีความแตกต่างแต่ละโคโลนีบนฝาปิดจานเพาะเชื้อ และใช้มีดตัดชิ้นวุ้นส่วนนั้นหรือใช้เข็มเขี่ยโคโลนีของราเพื่อทำการย้ายเชื้อลงอาหารแข็ง Potatoes Dextrose Agar (PDA) ที่ผสมด้วย Streptomycin ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อแยกราให้บริสุทธิ์แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการระบุสายพันธุ์ราแต่ละชนิดต่อไป แล้วบันทึกข้อมูลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราเช่น โคโลนี สี ขนาด รูปร่าง สปอร์ และ เส้นใย

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของราแต่ละชนิดที่แยกได้

ทำการตัดชิ้นส่วนราบนอาหารแข็งที่ได้จากข้อ 1.2 เป็นชิ้นขนาด 2x2 เซนติเมตร แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร 1% Sabouraud Dextrose Yeast extract (SDY) ในฟลาสค์รูปชมพู่นำไปเข้าตู้เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 วัน เมื่อครบเวลาแล้วทำการเก็บเซลล์จากฟลาสค์รูปชมพู่มาใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มที่ตู้ทำความเย็น – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาพแข็ง จากนั้นทำให้เซลล์แห้งโดยเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพแห้งให้นำเซลล์ที่แห้งแล้วมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้สารละลายไนโตรเจนซึ่งการที่ทำการ freeze dry ก่อนจะทำให้น้ำในเซลล์แข็งและแห้งทำให้สามารถบดได้ละเอียดและเพิ่มพื้นที่ผิวเซลล์ในการย่อยด้วยเอนไซม์มากขึ้นและนำผงเซลล์ละเอียดมาทำการสกัดดีเอ็นเอ (Reader และ Broda, 1985) (ภาคผนวกข้อ 5)

1.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของราแต่ละสายพันธุ์ที่สกัดได้จากข้อ 1.2.1 มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ITS 4 (reverse primer) และ ITS 5 (forward primer) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วจำลองส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ออกมาที่ขนาด 500-700 กิโลเบส โดยใช้ Dream Taq Green

PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) เครื่อง Perkin Elmer PE 9700 or Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, 136 USA) และปรับสภาวะดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตรที่ใส่ (ไมโครลิตร)
gDNA (Genomic DNA)	1
R-primer ITS 4	1
F-primer ITS 5	1
Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)	25
น้ำกลั่น	22
ปริมาตรสุทธิ	50

แล้วนำไปเข้ากระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR)

PCR Condition	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบที่เกิดซ้ำ (รอบ)
Initial denature	95	5	
Denature	94	0.5	
Annealing	55	1	35
Initial extension	72	1	
Extension	72	10	

แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR purification kit 137 (QIAGEN, USA) แล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen Inc. (South Korea)(ภาคผนวกข้อ 6)

1.2.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุสายพันธุ์ของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้าง

เมื่อได้ดีเอ็นเอมาแล้วจากข้อที่ 1.2.2 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราแต่ละสายพันธุ์มาเทียบในฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุสายพันธุ์ราต่างๆ

2. การศึกษาการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก

2.1 การเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์โดยใช้อาหารสูตร Oatmeal agar (OMA)

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2 มาทดลองเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร OMA โดยใช้ส่วนประกอบข้าวโอ๊ตเนื่องจากอาหารสูตร Oatmeal นี้มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสปอร์ของราโรคพืชและสปอร์ของราก่อโรคพืชนั้นมีผลต่อการก่อโรคในพืชอย่างมาก (ชลิดา, 2557) ทำการเพิ่มการผลิตสปอร์ซึ่งมีวิธีเตรียม โดยเริ่มจากชั่งเม็ดโอ้ต 12 กรัม บดให้ละเอียดเป็นผงในการเตรียมอาหาร 400 มิลลิลิตร นำเม็ดโอ้ตไปต้ม 15 นาที จนเดือด แล้วเทลงขวดแล้วปรับปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใส่ผงวุ้น 8 กรัม โดยวิธีการเลี้ยงใช้ cork borer ตัดชิ้นราในจานเพาะเชื้อให้เป็นวงกลมแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร Oatmeal เพื่อทำให้ราผลิตสปอร์หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.2 การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก

เมื่อศึกษาการสร้างสปอร์ของราในอาหารแข็งสูตร Oatmeal ในข้อที่ 2.1 แล้วทำการคัดเลือกราที่มีการสร้างสปอร์มาทำการศึกษาการก่อโรคของราโดยเลี้ยงราที่คัดเลือกได้ในอาหารแข็งสูตร Oatmeal ในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการชะสปอร์ที่เจริญบนจานอาหารแข็งสูตร Oatmeal โดยใช้สารละลาย 0.1% Tween-80 เพื่อเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ทำให้สปอร์กระจายไม่เกาะกลุ่มกันหรือตกตะกอน โดยเก็บสารแขวนลอยสปอร์ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อมาทำการนับสปอร์และปรับให้มีความหนาแน่นสปอร์ $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบการก่อโรคเบื้องต้นโดยใช้วัชพืชตีนตุ๊กแกต่อการทดสอบราและชุดควบคุมละ 8 ซ้ำ จากนั้นทำการทดลองการกำจัดวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยการเพิ่มความหนาแน่นสปอร์เป็น $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ในการฉีดพ่น ผสมกับสารจับใบ (APSA-80) หลอดละ 3 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มการจับตัวของสปอร์รากับพื้นผิวใบวัชพืช โดยใช้จำนวนซ้ำของวัชพืชตีนตุ๊กแกอายุ 45 วัน จำนวน 5 ซ้ำ ต่อการฉีดพ่นสปอร์ราวมถึงชุดควบคุม แล้วทำการฉีดพ่นวัชพืชตีนตุ๊กแกปริมาตร 3 มิลลิลิตร/ต้น สำหรับชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% Tween-80 ปริมาตร 3

มิลลิลตร ผสมกับสารจับใบ (APSA-80) หลอดละ 3 ไมโครลิตร นำวัชพืชตีนตุ๊กแกทั้งหมดไปที่โรงเรือนทดลองที่ควบคุมแสง 12 ชั่วโมง และมีเครื่องทำความชื้นเพื่อควบคุมความชื้นให้อยู่ระหว่าง 65-75% วัชพืชตีนตุ๊กแกทุกกระถางให้ห่อด้วยถุงพลาสติกให้คลุมรอบกระถางยาวถึงความสูงต้นและเปิดช่องบนไว้เพื่อรักษาความชื้นภายใน แล้วทำการฉีดซ้ำตามวิธีที่กล่าวมาในรอบที่ 2 และ 3 โดยเว้นระยะเวลาห่างกันทุก 3 วัน แล้วทำการเก็บผล ลักษณะที่เกิดโรคในวันต่างๆ และทำการเก็บผลโดยการนับเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงในการก่อโรคจากการก่อโรคของวัชพืชแต่ละต้น โดยคำนวณจากความเสียหายของจำนวนใบแต่ละใบทั้งหมดของแต่ละต้น โดยใน 1 ใบกำหนดให้มีการเกิดโรคโดยการให้ 1 ใบ มีโรคที่เกิดได้มากที่สุด 100% โดยให้คำนวณเปอร์เซ็นต์จากพื้นที่ใบ เช่น พื้นที่มีการก่อโรค ½ ของ ใบก็จะเป็น 50% หรือใบนั้นเหี่ยวทั้งใบก็จะเป็น 100% เป็นต้น แล้วนำเปอร์เซ็นต์แต่ละใบในต้นเดียวกันมารวมกันและหารด้วยจำนวนใบทั้งหมดใน 1 ต้น ก็จะเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 1 ต้น และนำเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของทุกต้นมาเฉลี่ยกันเป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงในการก่อโรค

$$\text{ความรุนแรงในการก่อโรค (\%)} = \frac{\text{ความรุนแรงการก่อโรคบนพื้นที่ใบที่แสดงอาการ (\%)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}}$$

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลอัตราการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแกทำการเปรียบเทียบชุดข้อมูลอัตราการก่อโรคของราทั้ง 2 ไอโซเลต ด้วย ANOVA ใน SPSS version 11.5 โดย $p < 0.05$ มีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3 การศึกษาติดตามการก่อโรคของราที่คัดเลือกได้ในวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ระยะต่างๆ

จากการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของราแต่ละไอโซเลต จากข้อ 2.2 ทำการคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแก 2 ไอโซเลต เพื่อทำการศึกษาติดตามการก่อโรคของราในระยะต่างๆบนวัชพืชตีนตุ๊กแก โดยการศึกษาภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ซึ่งเริ่มจากการแทรกยีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) ในเซลล์ของรา จากนั้นเลี้ยงราบนอาหาร Oatmeal agar แล้วทำตามขั้นตอนวิธีการฉีดพ่นสปอร์ลงบนวัชพืชตีนตุ๊กแก เมื่อพืชมีอาการโรคให้นำส่วนของใบในระยะเริ่ม ระยะกลาง ระยะสุดท้าย มาศึกษาใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์เพื่อติดตามระยะการก่อโรคโดยใบพืชจะเห็น auto fluorescence เป็นสีแดงส่วนเส้นใยราจะเห็นเป็นสีเขียวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ มีขั้นตอนวิธีการต่างๆดังต่อไปนี้

การนำเวคเตอร์ pCT74 ที่มียีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ Transformation

เริ่มจากการนำเวคเตอร์ pCT74 ที่มียีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) โดยมีส่วนโปรโมเตอร์ *ToxA* ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มจำนวนเวคเตอร์ pCT74 (จาก Prof. Lynda Ciufetti, University of Oregon, USA) ที่มียีน *sGFP* ในหลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมระหว่าง pCT74 กับ พลาสมิด *E. coli* มาปรับอุณหภูมิในอ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที นำไปบ่มในน้ำแข็งอีกครั้ง เป็นเวลา 3-5 นาที ต่อมาใส่อาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker 30-45 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำสารแขวนลอยเซลล์ทั้งหมด เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยา ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดียวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีคุณสมบัติต้านยา ampicillin

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*

เมื่อโคโลนีเจริญแล้วใช้เข็มเขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colonies) จากข้อ 2.3.1 มาเลี้ยงบนอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในเครื่อง Incubator shaker จากนั้นนำ *E. coli* ในอาหาร LB จากการบ่มมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนสารละลายอาหารที่ไม่ต้องการออก ต่อมาตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เมื่อสารละลายอาหารที่เหลือไหลมารวมกันแล้วทำการดูดตะกอนผสมกับสารละลายอาหารส่วนนั้น ดูดใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายที่ไม่ต้องการออกแล้วนำไปสกัดพลาสมิดด้วย Gene JET Plasmid Miniprep Kit (ภาคผนวกข้อ 7)

ขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์และขั้นตอนนำพลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสต์

ทำการ transform พลาสมิด pCT74 ที่มียีน GFP ซึ่งได้มาจาก Prof. Lynda Ciufetti, University of Oregon, USA ในราทั้ง 2 ไอโซเลต จากข้อ 2.2 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมตีนตุ๊กแก โดยเริ่มจากวิธีการทำโปรโตพลาสต์ จากการดัดแปลงวิธีการจากราโรคพืชสายพันธุ์ *Colletotrichum graminicola* (Epstein และคณะ, 1997) และดัดแปลงจากการ transform

Beauveria bassiana ด้วยวิธีการของ Srisuksam และคณะ (2015) ตามวิธีการสร้างโปรโตพลาสต์ของราทั้ง 2 ไอโซเลต เมื่อได้ transformant แล้ว นำไปแยกให้ได้สปอร์เดี่ยวของ เชื้อรา ทั้ง 2 ไอโซเลต (ภาคผนวกข้อ 8)

ขั้นตอนการติดตามระยะการก่อโรคของราในวัชพืชตีนตุ๊กแก

เมื่อได้เซลล์ราที่มียีน GFP จากข้อ 2.3.3 แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Oatmeal เพื่อผลิตสปอร์และจากนั้นนำมาชะสปอร์ ฉีดพ่นบนวัชพืชตีนตุ๊กแกเทียบกับมันสำปะหลัง โดยทำทั้งวัชพืชตีนตุ๊กแกและพืชเศรษฐกิจมันสำปะหลังตามขั้นตอนวิธีการในข้อ 2.2 เพื่อทดสอบการก่อโรคและระยะการก่อโรค ในวัชพืชเมื่อเกิดการก่อโรคจะทำการตัดชิ้นส่วนใบที่มีอาการโรคในระยะต่างๆ มาทำการส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์หรือคอนโฟคอลในบางส่วนโดยทำการเก็บผลทุก 2 วันเพื่อดูลักษณะการเข้าก่อโรคของราและติดตามวัน เวลา ระยะการก่อโรคของราทั้ง 2 ไอโซเลต โดยวิธีการศึกษาระยะและกระบวนการก่อโรคของราในวัชพืชตีนตุ๊กแก โดยเริ่มจากศึกษาการเจริญของเส้นใยและลักษณะการเกิดโรคภายนอกภายใต้กล้อง Fluorescence Stereo Microscope Axio Zoom. V16 (Zeiss, USA) จากนั้นผ่าใบวัชพืชตีนตุ๊กแกที่แสดงอาการโรคให้มีลักษณะที่บางด้วยเทคนิค epidermal peeling (Eisele และคณะ, 2016) วางบนสไลด์และปิดด้วยฝาปิดสไลด์แล้วศึกษาการก่อโรคด้วยกล้อง Nikon Eclipse Ti-2E เลนส์ Nikon Plan Apo VC 100x รวมถึงการบันทึกภาพสปอร์ของราที่มีการเรืองแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จากยีน GFP ภายใต้กล้อง Olympus FV1000 confocal laser scanning

3. การศึกษาผลกระทบของราก่อโรคกับมันสำปะหลัง

เพื่อที่จะนำราที่ก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้มาใช้กำจัดตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังจึงคัดเลือกราที่ก่อโรคและควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกจากข้อ 2.2 มา 2 ไอโซเลต ทำการทดสอบโดยพ่นสปอร์ของราที่คัดเลือกกับต้นมันสำปะหลังเพื่อศึกษาผลกระทบของราที่ก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกต่อการก่อโรคในมันสำปะหลัง โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Oatmeal ในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วันเพื่อผลิตสปอร์ของราแล้วทำการทดลองวิธีเดียวกับวัชพืชตีนตุ๊กแกในข้อ 2.2 ทุกประการ แต่เปลี่ยนจากการทดสอบกับวัชพืชตีนตุ๊กแกเป็นต้นมันสำปะหลัง แล้วทำการศึกษาติดตามระยะการก่อโรคของราบนใบมันสำปะหลังภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ โดยเริ่มการเลี้ยงราในอาหารแข็งสูตร Oatmeal ในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน และทำการชะสปอร์ที่ได้จากอาหารแข็งสูตร Oatmeal โดยใช้สารละลาย 0.1% Tween-80 ในการชะเพื่อเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ทำให้สปอร์กระจายไม่เกาะกลุ่มกันโดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ใส่หลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนับสปอร์และปรับให้มีสารแขวนลอยสปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร นำไปฉีดพ่นต้นมันสำปะหลัง 5 ต้น

รวมถึงชุดควบคุม 5 ต้นต่อการทดสอบรา 1 ชนิด โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ผสมกับสารจับใบ All purpose spray adjuvant concentrate (APSA-80) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มการจับตัวของสปอร์รากับพื้นผิวใบแล้วทำการฉีดพ่นมันสำปะหลัง โดยทำการฉีดพ่นต่อ 1 ต้น ใช้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ใช้สารละลาย 0.1% Tween-80 ปริมาตร 3 มิลลิลตร ผสมกับสารจับใบ All purpose spray adjuvant concentrate (APSA-80) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และมันสำปะหลังทั้งหมดนำไปไว้ที่โรงเรือนทดลองที่ให้แสง 12 ชั่วโมง และมีเครื่องทำความชื้นเพื่อควบคุมความชื้นให้อยู่ระหว่าง 65-75% มันสำปะหลังทุกกระถางให้ห่อด้วยถุงพลาสติกให้คลุมรอบกระถางยาวถึงความสูงต้นและเปิดช่องบนไว้เพื่อรักษาความชื้นภายใน แล้วทำการฉีดซ้ำตามวิธีที่กล่าวมาในรอบที่ 2 และ 3 โดยเว้นระยะเวลาห่างกันทุก 3 วัน แล้วทำการเก็บผลลักษณะที่เกิดโรคในระยะเวลาต่างๆ และทำการเก็บผลโดยการนับเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยความเสียหายจากการก่อโรคของมันสำปะหลังแต่ละต้น คำนวณจากความเสียหายของจำนวนใบแต่ละใบทั้งหมดของแต่ละต้น โดยใน 1 ใบกำหนดให้มีการเกิดโรคโดยใน1 ใบ เกิดโรค มากที่สุด 100% โดยให้คำนวณเปอร์เซ็นต์จากพื้นที่ใบเช่น มีการก่อโรคพื้นที่ ½ ของ ใบก็จะเป็น 50% หรือใบนั้นเหี่ยวทั้งใบก็จะเป็น 100% เป็นต้น แล้วนำเปอร์เซ็นต์แต่ละใบในต้นเดียวกันมารวมกันและหารด้วยจำนวนใบทั้งหมดใน 1 ต้น ก็จะเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 1 ต้น และนำเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของทุกต้นมาเฉลี่ยกันเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย

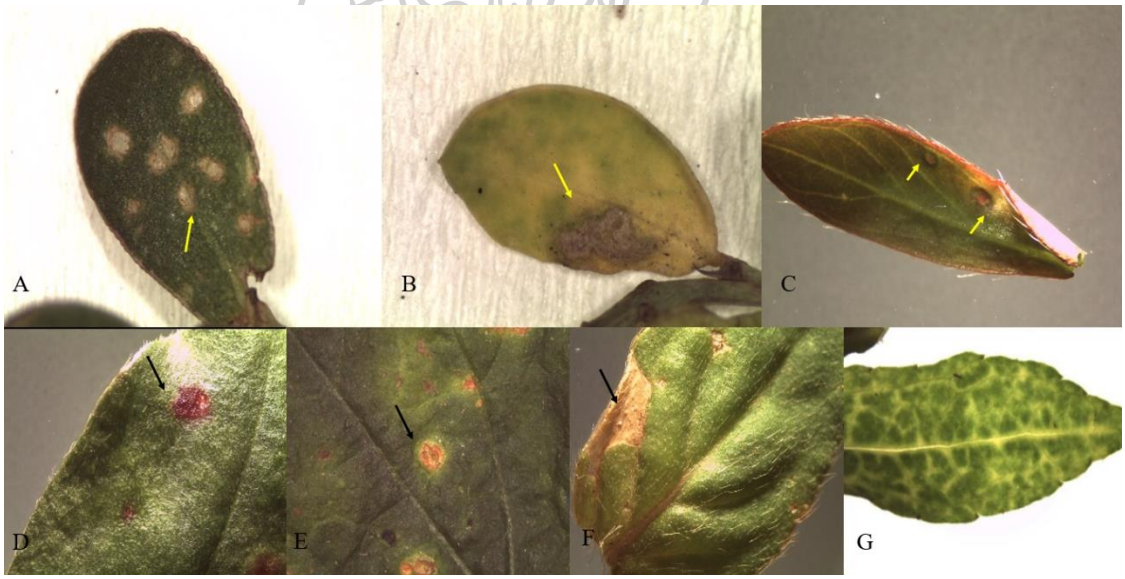
$$\text{ความรุนแรงในการก่อโรค (\%)} = \frac{\text{ความรุนแรงในการก่อโรคบนพื้นที่ใบที่แสดงอาการ (\%)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}}$$

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคและระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง

จากการเก็บตัวอย่างวัชพืชจากสถานที่ต่างๆคือ สถานที่โรงเรือน สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และสำนักงานเกษตรจังหวัดฉะเชิงเทรา พบวัชพืชใบกว้างที่มีลักษณะอาการโรค 6 ตัวอย่างโดยบางตัวอย่างไม่สามารถจำแนกชนิดของวัชพืชได้จะใช้แทนชื่อว่า unknown จากการสังเกตตัวอย่างที่เก็บมาพบวัชพืชจำพวก ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*), ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri.*), หมอน้อย (*Vernonia cinerea*), บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides.*), ไมยราบป่า (*Mimosa pudica*), Unknown2 และ กะเม็ง (*Eclipta prostrata*) มีลักษณะอาการโรคโดยเป็นรอยไหม้บริเวณใบดังรูปที่ 8

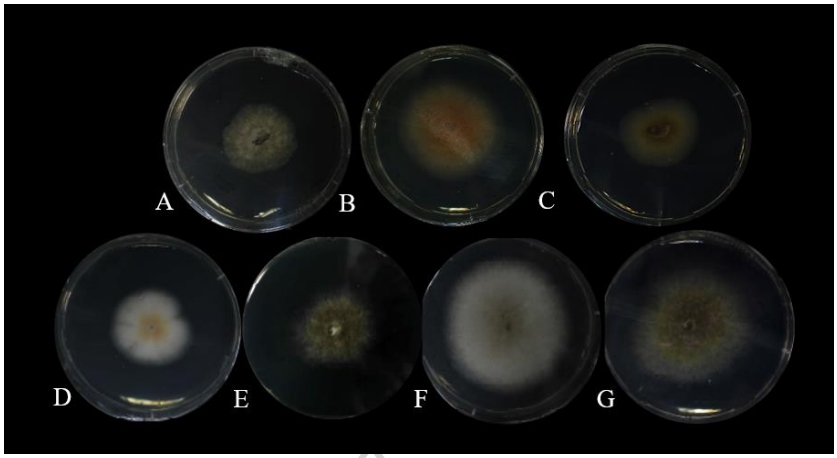


รูปที่ 8 ลักษณะรอยโรคบนตัวอย่างวัชพืชใบกว้างในสถานที่โรงเรือน สวทช และสำนักงานเกษตรจังหวัดฉะเชิงเทรา **A.** ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*) **B.** ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) **C.** ไมยราบป่า (*Mimosa pudica*) **D.** บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides.*) **E.** หมอน้อย (*Vernonia cinerea*) **F.** Unknown2 และ **G.** กะเม็ง (*Eclipta prostrata*)

1.1 ผลการคัดแยกราที่มาจากชิ้นส่วนวัชพืชที่แสดงอาการโรคด้วยเทคนิค Tissue transplanting method

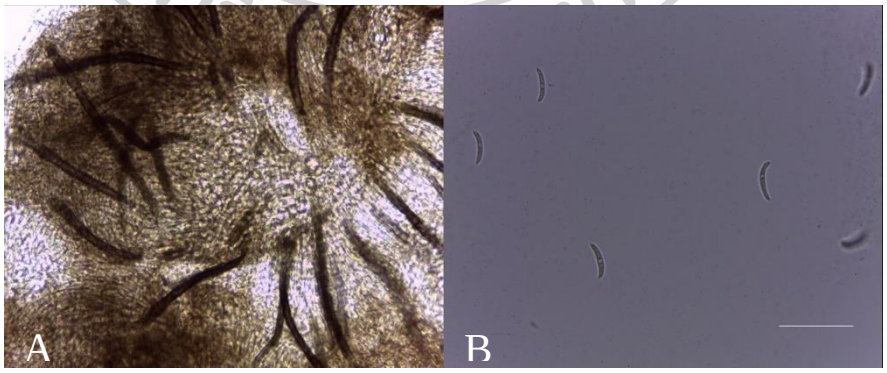
จากการคัดแยกราจากวัชพืชที่มีอาการโรคด้วยวิธี Tissue transplanting (ชลิดา, 2557) เมื่อตัดชิ้นส่วนวัชพืชที่มีอาการโรคแล้วนำมาวางบนอาหารแข็งสูตร PDA หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลา พบราเจริญบนอาหารมากมาย ดังรูปที่ 9 จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เส้นใยราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันแต่ละจุดจากตำแหน่งต่างๆ ลงบนจานอาหาร PDA เพื่อแยกให้ได้ราที่บริสุทธิ์ โดยผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกราจากวัชพืชใบกว้างต่างๆ ออกมารวม 10 ตัวอย่าง และได้ให้ รหัสเชื้อราจากวัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากแปลงทดสอบ สวทช คือ C1-2, C2-4, C3-6, C4-7, C4-8 และเชื้อราจากวัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากสำนักพัฒนาเกษตร จ. ฉะเชิงเทรา คือ C1-1, C1-2/2, C2-3, C3-4, C4-5 ซึ่งมีบางไอโซเลตจากการแยกราทั้งสองสถานที่พบว่ามีโคโลนีที่เหมือนกัน จากนั้นทำการจัดเรียงราที่มีโคโลนีแตกต่างกันชัดเจนได้ 7 ไอโซเลต ซึ่งจะเห็นว่าแต่ละโคโลนีที่บริสุทธิ์นั้นมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันโดย ราที่แยกได้จาก ผักเบี้ยใหญ่ มีลักษณะเส้นใยหนาสีเหลืองแนบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (C1-2) ราที่แยกได้จาก หมอน้อย มีลักษณะเส้นใยบางสีแดง (C4-7) ราที่แยกได้จาก หมอน้อย มีลักษณะเส้นใยหนาสีเหลืองน้ำตาลแนบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (C4-8) ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า มีลักษณะเส้นใยหนาสีขาวแนบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (C1-1) ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า มีลักษณะเส้นใยหนาสีเขียวแนบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (C2-3) ราที่แยกได้จาก กะเม็ง มีลักษณะเส้นใยบางสีขาว (C3-6) และ ราที่แยกได้จาก unknown 2 มีลักษณะเส้นใยหนาสีเขียวน้ำตาลแนบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (C4-5) ดังรูปที่ 10

รูปที่ 9 ตัวอย่างลักษณะความแตกต่างโคโลนีของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างชนิด ผักเบี้ยใหญ่ กะเม็ง และ หมอน้อย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



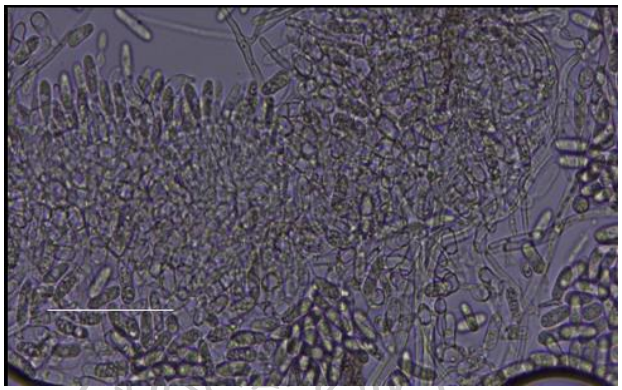
รูปที่ 10 ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของรา 7 ไอโซเลต บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โดย **A.** รา ที่แยกได้จาก ผักเบี้ยใหญ่ (C1-2) **B.** ราที่แยกได้จาก หมอน้อย (C4-7) **C.** ราที่แยกได้จาก หมอน้อย (C4-8) **D.** ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า (C1-1) **E.** ราที่แยกได้จาก ไมยราบป่า (C2-3) **F.** ราที่แยกได้ จาก กะเม็ง (C3-6) และ **G.** ราที่แยกได้จาก unknown 2 (C4-5)

จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยตัดชิ้นส่วนลงบนสไลด์แล้วส่องดูการสร้างสปอร์ราที่มีการสร้างสปอร์ที่เด่นชัดในอาหาร PDA มีอยู่สองไอโซเลตคือ ตัวอย่างที่ C1-2 ที่แยกได้จากผักเบี้ยใหญ่โดยมีลักษณะเส้นขนบนส่วนอับสปอร์ (pycnidia) โดยมีลักษณะเส้นใยและส่วนสีดำของ setae ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะรวมถึงสปอร์รูปเคียวพระจันทร์ซึ่งเป็นลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Collectotrichum* sp. ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรารหัส C1-2 **A.** อับสปอร์ (pycnidia) และ **B.** สปอร์เสี้ยวพระจันทร์ ที่มีสัณฐานจัดอยู่ในราจำพวก *Collectotrichum* sp. (Bar 50 µm) (กำลังขยาย 400x)

ต่อมาพบว่าตัวอย่างที่ C3-6 ที่แยกได้จาก กะเม็ง มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้าย *Collectotrichum* sp. เช่นกันเนื่องจากลักษณะส่วนที่ห่อหุ้มสปอร์มีสีส้มออกชมพูหรือมีลักษณะของการรวมกลุ่มกันของสปอร์ (spore mass) ภายในมีสปอร์ที่มีลักษณะรี ดังรูป 12



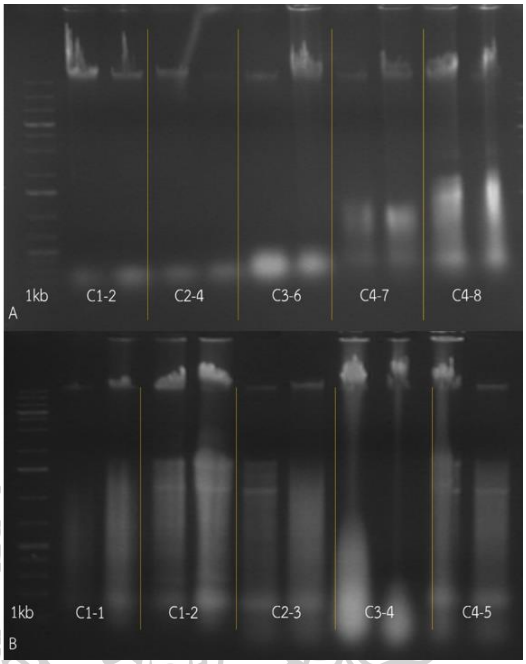
รูปที่ 12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์จากเชื้อรา รหัส C3-6 ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับรา *Collectotrichum* sp. (Bar 50 µm) (กำลังขยาย 400x)

ส่วนราไอโซเลตอื่นๆไม่พบลักษณะสัณฐานวิทยาที่เฉพาะชัดเจนจึงทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการระบุสายพันธุ์ของราแต่ละชนิด

1.2 ผลการระบุสายพันธุ์เชื้อราจากวัชพืชใบกว้าง

1.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอของราแต่ละชนิดที่แยกได้

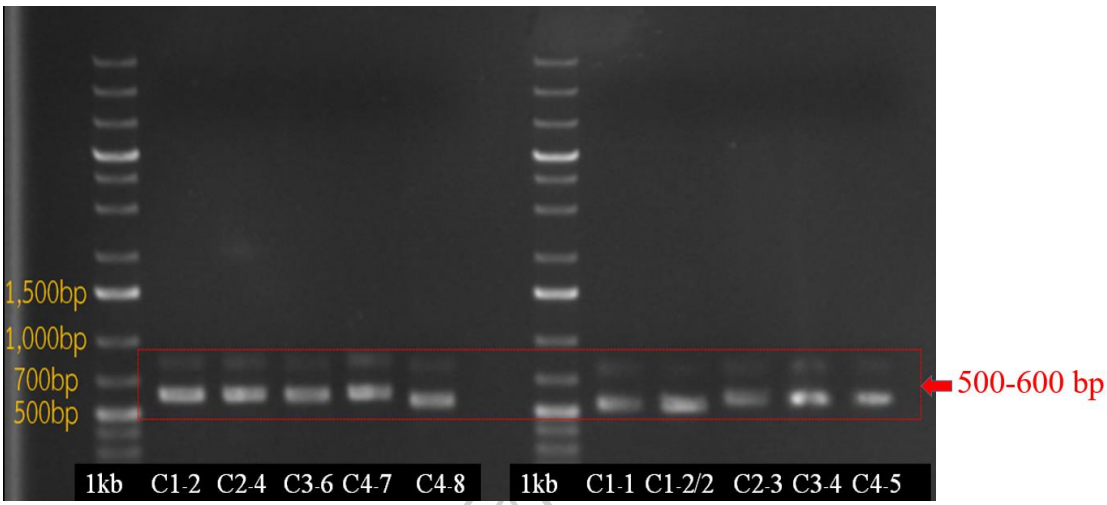
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นยังไม่พบลักษณะเฉพาะที่ระบุราได้ชัดเจนจึงทำการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยการสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนกสายพันธุ์ของราแต่ละชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 เพื่อให้ได้ท่อนดีเอนเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์สำหรับการจำแนกราแล้วนำมาตรวจหาดีเอ็นเอโดยได้ผลการตรวจ gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอของทั้งรา 10 ตัวอย่าง ที่แยกจากราบนวัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากอุทยานวิทยาศาสตร์ สวทช และ สำนักพัฒนาเกษตร จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยมีตัวอย่างจากอุทยานวิทยาศาสตร์ สวทช รหัสที่ C1-2, C3-6, C4-7 และ C4-8 ตัวอย่างจากสำนักพัฒนาเกษตร จังหวัดฉะเชิงเทราตัวอย่างที่ C1-2/2, C3-4 และ C4-5 ดังรูปที่ 13 และ 14



รูปที่ 13 แถบดีเอ็นเอของราที่สกัดได้บนแผ่น agarose gel electrophoresis หลังการทำ gel electrophoresis จากวัชพืชใบกว้าง **A.** รหัส C1-2, C2-4, C3-6, C4-7 และ C4-8 ที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เก็บตัวอย่างจากอุทยานวิทยาศาสตร์ สวทช และ **B.** C1-1, C1-2/2, C2-3, C3-4, และ C4-5 ที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เก็บตัวอย่างจาก สำนักพัฒนาเกษตร จังหวัดฉะเชิงเทรา โดย 1kb คือ 1kb plus DNA Ladder (Fermentas)

1.2.2 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR)

เมื่อนำดีเอนเอที่สกัดได้จากราแต่ละไอโซเลตมาเป็นดีเอนเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับทำ PCR เพิ่มจำนวนท่อนดีเอนเอ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ primer ITS 4 และ ITS 5 แล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยชุด kit ของ Fermentas ได้ขนาด 500-600 bp ดังรูปที่ 14 นำไป จำแนกสายพันธุ์บนฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI)



รูปที่ 14 ขนาดของแถบดีเอ็นเอดีเอ็นเอส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ของราทั้ง 10 ตัวอย่างบน agarose gel electrophoresis ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR ด้วย ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาด 500-600 bp โดย ช่องที่ 1 คือ 1kb plus DNA Ladder (Fermentas)

C1-2 คือ *Colletotrichum truncatum* Ct1

C2-4 คือ *Colletotrichum truncatum* Ct2

C3-6 คือ *Colletotrichum siamense* Cs1

C4-7 คือ *Bartalinia pondoensis* Bp1

C4-8 คือ *Phoma multirostrata* Pm1

C1-1 คือ *Epicoccum sorghinum* Es1

C1-2/2 คือ *Epicoccum sorghinum* Es2

C2-3 คือ *Phomopsis sp* Ps1

C3-4 คือ *Colletotrichum siamense* Cs2

C4-5 คือ *Diaporthe arecae* Da1

1.2.3 ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุสายพันธุ์ของราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้าง

นำท่อนดีเอ็นเอ ITS ของเชื้อรา ทั้ง 10 ตัวอย่าง ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เทียบกับฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) ได้ผลการระบุสายพันธุ์ดังนี้

รา C1-2 ซึ่งแยกได้จาก ผักเบี้ยใหญ่ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Colletotrichum truncatum* strain F213202 จึงใช้ชื่อว่า *Colletotrichum truncatum* Ct1

รา C2-4 ซึ่งแยกได้จาก กะเม็ง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Colletotrichum truncatum* strain F213202 จึงใช้ชื่อว่า *Colletotrichum truncatum* Ct2

รา C3-6 ซึ่งแยกได้จาก กะเม็ง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Colletotrichum siamense* strain bl18 จึงใช้ชื่อว่า *Colletotrichum siamense* Cs1

รา C4-7 ซึ่งแยกได้จาก หมอน้อย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Bartalinia pondoensis* isolate CCTU 459 จึงใช้ชื่อว่า *Bartalinia pondoensis* Bp1

รา C4-8 ซึ่งแยกได้จาก หมอน้อย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Phoma multirostrata* isolate VPCI 438/P/15 จึงใช้ชื่อว่า *Phoma multirostrata* Pm1

รา C1-1 ซึ่งแยกได้จาก ไมยราบป่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Epicoccum sorghinum* isolate P8 จึงใช้ชื่อว่า *Epicoccum sorghinum* Es1

รา C1-2/2 ซึ่งแยกได้จาก ไมยราบป่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Epicoccum sorghinum* isolate P8 จึงใช้ชื่อว่า *Epicoccum sorghinum*Es2

รา C2-3 ซึ่งแยกได้จาก ไมยราบป่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Phomopsis sp. strain* H213 จึงใช้ชื่อว่า *Phomopsis sp* Ps1

รา C3-4 ซึ่งแยกได้จาก บานไม่รู้โรยป่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Colletotrichum siamense* strain bl18 จึงใช้ชื่อว่า *Colletotrichum siamense* Cs2

รา C4-5 ซึ่งแยกได้จาก Unknown 2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับ *Diaporthe arecae* strain CBS 161.64 จึงใช้ชื่อว่า *Diaporthe arecae* Da1

โดยการจำแนกไอโซเลตทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน100 % ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อราที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างทั้ง 10 ตัวอย่าง กับฐานข้อมูล NCBI ได้สายพันธุ์ของเชื้อรา เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) และ ค่า *E*-value

Fungal isolate/Weed	**Morphological Identification**	**Molecular Identification using ITS sequence**	**Identity**	***E*-value**
C1-2/ ผักเบี้ยใหญ่	*Colletotrichum* sp.	*Colletotrichum truncatum* strain F213202	100%	0.0
C2-4/ กะเม็ง	*Colletotrichum* sp.	*Colletotrichum truncatum* strain F213202	100%	0.0
C3-6/ กะเม็ง	*Colletotrichum* sp.-	*Colletotrichum siamense* strain bl18	100%	0.0
C4-7/ หมอน้อย	-	*Bartalinia pondoensis* isolate CCTU 459	100%	0.0
C4-8/ หมอน้อย	-	*Phoma multirostrata* isolate VPCI 438/P/15	100%	0.0
C1-1/ ไมยราบป่า	-	*Epicoccum sorghinum* isolate P8	100%	0.0
C1-2/ ไมยราบป่า	-	*Epicoccum sorghinum* isolate P8	100%	0.0
C2-3/ ไมยราบป่า	-	*Phomopsis sp. strain* H213	100%	0.0
C3-4/ บานไม่รู้โรยป่า	-	*Colletotrichum siamense* strain bl18	100%	0.0
C4-5/ Unknown 2	-	*Diaporthe arecae* strain CBS 161.64	100%	0.0

หมายเหตุ – คือไม่สามารถจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS ของเชื้อราก่อโรคที่แยกได้จากวัชพืชใบกว้างที่เป็นโรคกับ ฐานข้อมูลของ NCBI จากวัชพืชใบกว้างพบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อราทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยเชื้อรา 3 ตัวอย่าง ที่จำแนกได้ในระดับ Genus ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาก่อนหน้า ถูกยืนยันด้วยการจำแนกทางชีวโมเลกุล ดังนี้ เชื้อราไอโซเลต C1-2 จากผักเบี้ยใหญ่ และไอโซเลต C2-4 จากวัชพืชที่เป็น กะเม็ง ระบุได้ว่าเป็น *C. truncatum* และมีความเหมือนกับ *C. truncatum* strain F213202 (100% identity) นอกจากนี้เชื้อรา ไอโซเลต C3-6 จากวัชพืชกะเม็ง จำแนกเป็น *C. siamense* และมีความเหมือนกับ *C. siamense* strain bl18 (100% identity) สำหรับเชื้อราอีก 7 ตัวอย่าง คือ C4-7, C4-8, C1-1, C1-2/2, C2-3, C3-4 และ C4-5 ที่ไม่สามารถจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเชื้อราโดยการ วิเคราะห์ระดับโมเลกุลพบว่ามีความเหมือนกับ*C. siamense* strain bl18, *B. pondoensis* isolate CCTU 45, *P. multirostrata* isolate VPCI 438/P/15, *E. sorghinum* isolate P8, *E. sorghinum* isolate P8, *Phomopsis* sp. strain H213, *C. siamense* strain bl18 และ *D. arecae* strain CBS 161.64 ตามลำดับ (100% identity) และเมื่อรวมเชื้อราที่แยกได้สายพันธุ์เดียวกันสรุปได้ว่าสามารถแยกและระบุสายพันธุ์ราได้ 7 ไอโซเลต ดังสรุปในตารางที่ 2

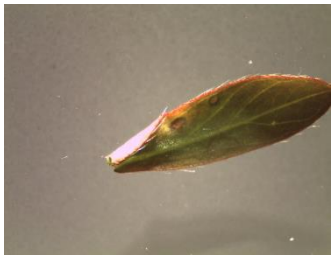
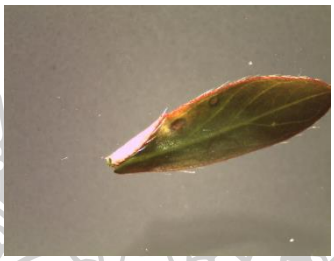
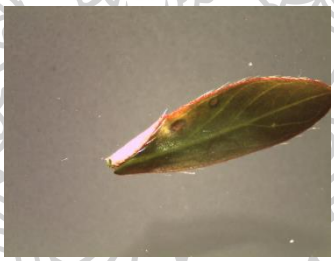
2. ผลการศึกษาการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก

2.1 ผลการเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์โดยใช้อาหารสูตร Oatmeal agar (OMA)

จากการทดลองเลี้ยงในสูตรอาหาร Oatmeal agar (OMA) เพื่อศึกษาผลผลิตสปอร์ของราแต่ละสายพันธุ์โดยอ้างอิงสูตรอาหารจากหนังสือโรคพืชและการวินิจฉัย (ชลิดา, 2557) ซึ่งพบว่าการเลี้ยงราในอาหาร OMA ช่วยกระตุ้นการสร้างสปอร์ในไอโซเลตรหัส *C. truncatum* Ct1 (C1-2), *C. siamense* Cs1 (C3-6), *B. pondoensis* Bp1 (C4-7), *P. multirostrata* Pm1 (C4-8) และ *D. arecae* Da1 (C4-5) หลังบ่มได้ 7 วัน (ดังตารางที่ 3) โดยพบว่า ราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้สามารถผลิตส่วนของ pycnidia และภายในพบสปอร์เมื่อเทียบกับ *E. sorghinum* Es1 (C1-1) และ *Phomopsis sp* Ps1 (C2-3) ที่มีการสร้างเฉพาะเส้นใย

ตารางที่ 2 การจำแนกเชื้อราก่อโรคที่แยกจากวัชพืชใบกว้างที่เป็นโรค

ลำดับที่	วัชพืช (รหัส)	ลักษณะอาการโรค	สายพันธุ์ที่ระบุได้
1	*Portulaca oleracea* (C1-2)		*Colletotrichum truncatum* strain F213202
2	*Eclipta prostrata* (C2-4)		*Colletotrichum truncatum* strain F213202
3	*Eclipta prostrata* (C3-6)		*Colletotrichum siamense* strain bl18
4	*Vernonia cinerea* (C4-7)		*Bartalinia pondoensis* isolate CCTU 459
5	*Vernonia cinerea* (C4-8)		*Phoma multirostrata* isolate VPCI 438/P/15

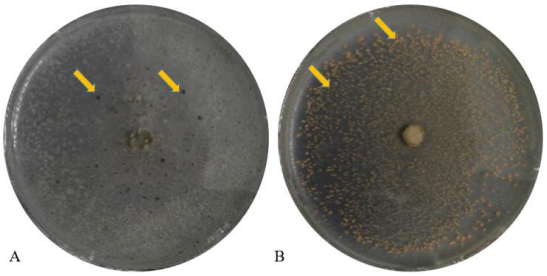
ลำดับที่	วัชพืช	ลักษณะอาการโรค	สายพันธุ์ที่จำแนกได้
6	*Mimosa pudica* (C1-1)		*Epicoccum sorghinum* isolate P8
7	*Mimosa pudica* (C1-2/2)		*Epicoccum sorghinum* isolate P8
8	*Mimosa pudica* (C2-3)		*Phomopsis* sp. strain H213
9	*Gomphrena celosioides* (C3-4)		*Colletotrichum siamense* strain bl18
10	Unknown 2 (C4-5)		*Diaporthe arecae* strain CBS 161.64

ตารางที่ 3 ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ เส้นใย ของเชื้อรา ในวัชพืชใบกว้าง 7 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oatmeal agar

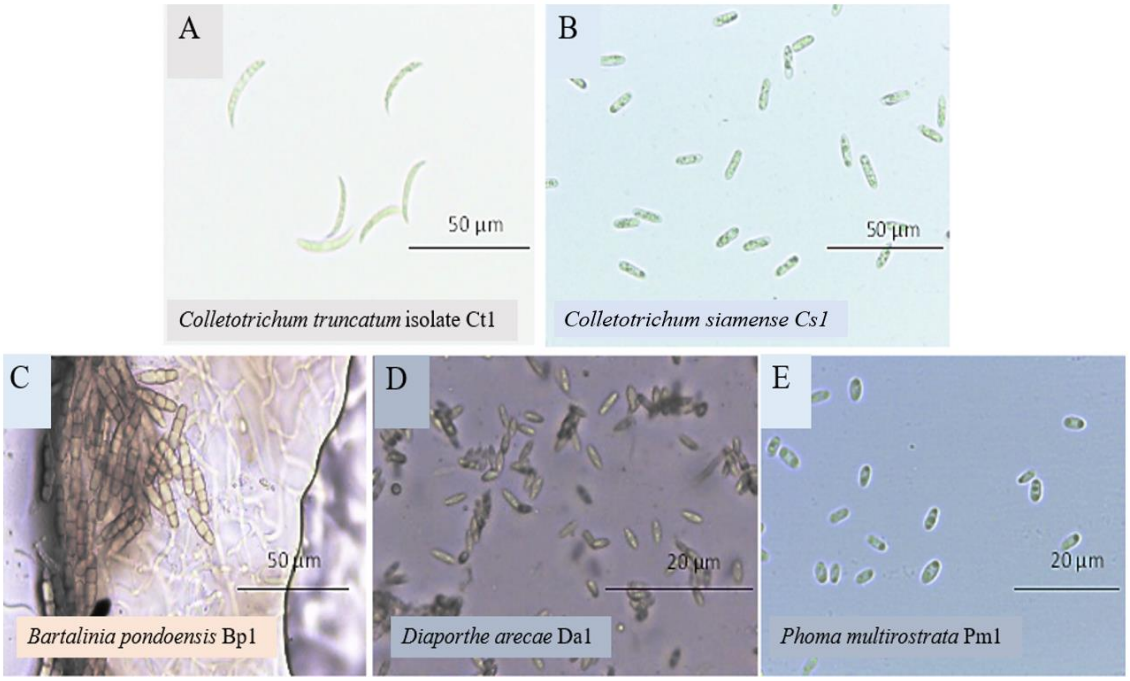
เชื้อรา	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์และเส้นใย
C. truncatum Isolate Ct1		มีการสร้าง pycnidia สีดำบางบริเวณบนจานเพาะเชื้อซึ่ง ภายในมีปริมาณสปอร์จำนวนมาก
C. siamense isolate Cs1		มีการสร้าง conidial mass สีส้ม ทั่วบริเวณบนจานเพาะเชื้อจำนวนมาก ซึ่งภายในมีสปอร์จำนวนมากมาย
B. pondoensis Isolate Bp1		มีการสร้าง pycnidia สีดำบางบริเวณจานเพาะเชื้อ
P. multirostrata Isolate Pm1		มีการสร้าง pycnidia สีดำบริเวณบนจานเพาะเชื้อ ภายในมีสปอร์จำนวนมาก
E. sorghinum Isolate Es1		มีการสร้างเส้นใยจำนวนมาก แต่ไม่พบสปอร์

เชื้อรา	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์และเส้นใย
Phomopsis sp. Isolate Ph1		ไม่มีการสร้างสปอร์ แต่มีการสร้างเส้นใยจำนวนน้อย
D. arecae Isolate Da1		มีการสร้าง pycnidia สีดำบริเวณรอบข้างจำนวนน้อย

การเลี้ยงราบนอาหาร OMA ช่วยกระตุ้นการผลิตสปอร์ในเชื้อราหลายไอโซเลตเพราะอาหารมีส่วนผสมของข้าวโอ้ตซึ่งกระตุ้นการเจริญของราโรคพืชและเอื้อต่อการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ชลิดา, 2557) รวมทั้งเพื่อใช้ผลิตสปอร์สำหรับการนำไปใช้ควบคุมวัชพืช โดย *C. truncatum* isolate Ct1 และ *C. siamense* Cs1 มีกระเปาะสปอร์ (pycnidia) หรือ conidial mass เป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 15 โดยสปอร์รา *C. truncatum* Ct1 มีลักษณะเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวซึ่งสปอร์จะอยู่ภายในกระเปาะสปอร์ที่มีลักษณะกลมสีดำ ส่วนสปอร์รา *C. siamense* Cs1 มีลักษณะเป็นรูปวงรี ห้วท้ายมน (รูปที่ 16A และ 16B) ซึ่งส่วนสปอร์จะเกาะตัวกันแน่นเป็นกลุ่มซึ่งมีลักษณะ conidial mass สำหรับเชื้อรา *B. pondoensis* และ *D. arecae* มีการสร้าง pycnidia เช่นกัน แต่จะมีปริมาณที่น้อยกว่า *P. multirostrata*, *C. truncatum* และ *C. siamense* มากเมื่อเทียบตามสายตาเบื้องต้น ส่วนสปอร์รา *B. pondoensis* มีลักษณะเป็นรูปวงรีสีน้ำตาลอ่อนและมี 3 septa จึงประกอบด้วย 4 เซลล์ต่อสปอร์ นอกจากนี้ยังมี flagella 3 เส้น ที่ปลายด้วย สปอร์รา *D. arecae* มีลักษณะเป็นรูปวงรีขนาดเล็ก และสปอร์รา *P. multirostrata* มีลักษณะเป็นรูปรี ขนาดเล็กเช่นเดียวกัน ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร (รูปที่ 16C-16E) ซึ่งสปอร์ที่แตกต่างกันบ่งบอกถึงสายพันธุ์ที่จำเพาะและใช้ระบุราเบื้องต้นได้



รูปที่ 15 ลักษณะกลุ่มสปอร์ของราโรคพืชที่เจริญบนอาหาร OMA **A.** กระเปาะสปอร์สีดำ (pycnidia) ของ *C. truncatum* isolate Ct1 และ **B.** กลุ่มสปอร์สีส้ม (conidial mass) ของ *C. siamense* Cs1



รูปที่ 16 ลักษณะสปอร์ของราที่แยกได้จากวัชพืชที่เลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

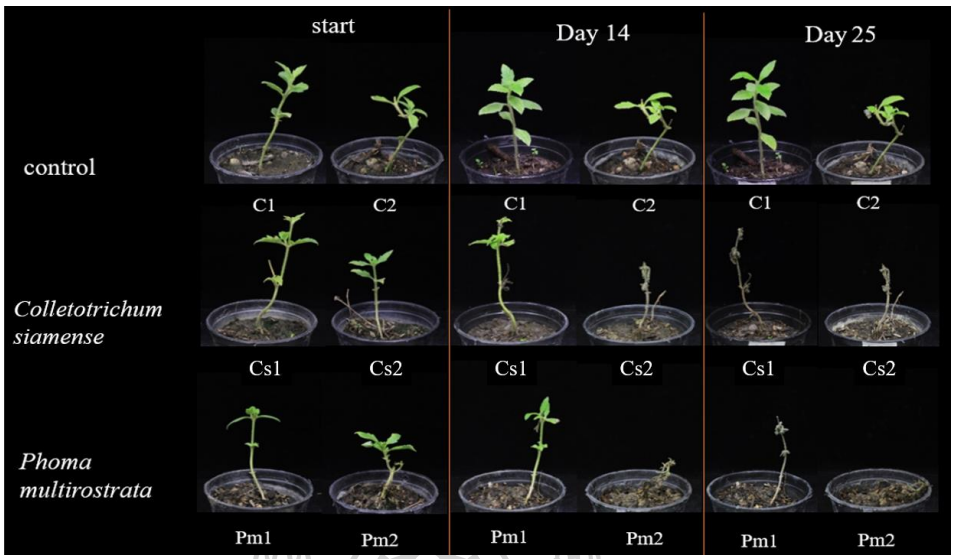
A. *Colletotrichum truncatum* Ct1 (รูปพระจันทร์เสี้ยว) (bar, 50 µm)
B. *Colletotrichum siamense* Cs1 (รูปวงรี ขนาดใหญ่) (bar, 50 µm)
C. *Bartalinia pondoensis* Bp1 (สปอร์มีรูปทรงกระเปาะยาวและมี 4 เซลล์) (bar, 50 µm)
D. *Phoma multirostrata* Pm1 (รูปวงรี ขนาดเล็ก) (bar, 20 µm)
E. *Diaporthe arecae* Da1 (รูปวงรี ขนาดเล็กมาก) (bar, 20 µm)

2.2 ผลการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของราที่สร้างสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก

จากผลการเพิ่มปริมาณสปอร์บนอาหาร OMA คือ รา *C. truncatum* isolate Ct1, *C. siamense* Cs1, *B. pondoensis* Bp1, *P. multirostrata* Pm1 และ *D. arecae* Da1 สามารถผลิตสปอร์ได้และ เมื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแกเบื้องต้น โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์บนวัชพืชตีนตุ๊กแก ซึ่งจากการทดสอบพบว่าราที่มีแนวโน้มในการก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในวัชพืชตีนตุ๊กแกโดยการสังเกตการเกิดโรคและการตายของวัชพืชคือ *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 ซึ่งเป็นราที่สร้างสปอร์ได้ปริมาณมากบนอาหาร OMA ส่วนราสายพันธุ์อื่นนั้นไม่พบการก่อโรคที่ชัดเจน ดังนั้นจึงคัดเลือกราทั้ง 2 ไอโซเลตมาทดสอบในสภาวะที่กำหนดตามขั้นตอนวิธีการตามการทดลองที่กล่าวมา โดยการทดลองขั้นแรกใช้ความหนาแน่นสปอร์ของราทั้ง 2 ไอโซเลต เป็น $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร ทำการเก็บผลทุก 7 วัน จนถึง 25 วัน เป็นวันสุดท้ายของการเก็บผล ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่ารา *C. siamense* สามารถก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก ตั้งแต่วันที่ 14 หลังการฉีดพ่นเมื่อเก็บผลครบ 25 วัน ดังรูปที่ 17 พบว่ามีการตายของตีนตุ๊กแกทั้งหมด 4 ซ้ำจาก 8 โดยคิดเป็นร้อยละการตาย 50% ส่วน *P. multirostrata* สามารถก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก ตั้งแต่วันที่ 14 หลังการฉีดพ่นเช่นกันเมื่อเก็บผลครบ 25 วัน พบว่ามีการตายของตีนตุ๊กแกทั้งหมด 3 ซ้ำจาก 8 ซ้ำ โดยคิดเป็นร้อยละการตาย 37.5% ดังตารางที่ 4

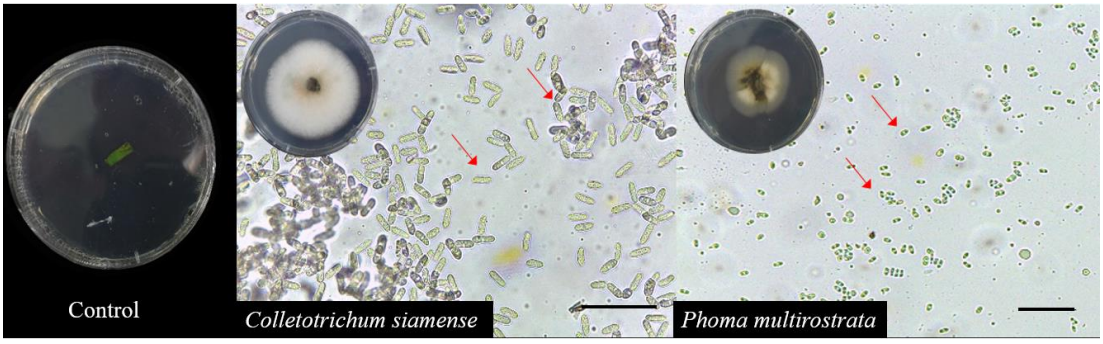
ตารางที่ 4 การตายของวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ฉีดด้วยสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่น 1.0×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ในเวลา 25 วัน โดยทำการทดลอง 8 ซ้ำ

รา	จำนวนต้นที่มีชีวิต	จำนวนต้นที่ตาย	ร้อยละของการตาย (%)
ชุดควบคุม	8	0	0
P. multirostrata	5	3	37.5
C. siamense	4	4	50

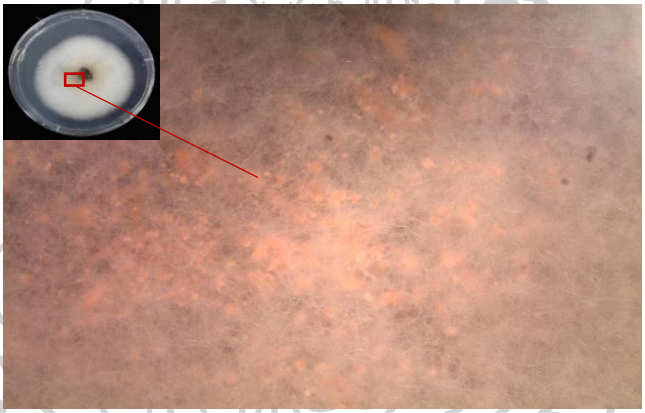


รูปที่ 17 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 25 ของการทดลองครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ)

คัดแยกราจากต้นที่เป็นอาการโรคด้วยวิธี Koch's postulate เพื่อทำการยืนยันการก่อโรค โดยราทั้ง 2 ไอโซเลต เริ่มจากทำการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวใบตีนตุ๊กแกที่ฉีดพนด้วยสปอร์รา *C. siamense* และ *P. multirostrata* ด้วยสารละลาย 6% Sodium hypochlorite (surface sterilization) แล้วเจือจาง 1/10 ของความเข้มข้น หลังจากที่ทำการฆ่าเชื้อภายนอกแล้วตัดชิ้นส่วนใบขนาด 5x5 เซนติเมตรที่แสดงอาการโรคมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมเป็นยาต้านแบคทีเรีย Streptomycin ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงไฟตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วัน หากมีเชื้อที่ฉีดพ่นเข้าไปก่อโรคในใบตีนตุ๊กแก จะปรากฏรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* เจริญออกมาจากชิ้นส่วนใบนั้น ทั้งเส้นใยและพบการสร้างสปอร์ของราทั้ง 2 ไอโซเลต ดังรูปที่ 18 ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการเจริญของเส้นใยหรือสปอร์ จากการคัดแยกราจะพบว่า *C. siamense* ที่ฉีดพ่นไปที่ตีนตุ๊กแกเมื่อทำการคัดแยกออกมา พบลักษณะโคโลนีกลมที่มีเส้นใยฟูเจริญขึ้นมาสีขาวและกึ่งกลางสีชมพูส้มดังรูปที่ 19 ซึ่งเป็นโคโลนีของ *C. siamense* จริง และทำการศึกษาลักษณะสปอร์พบว่าตรงกับราต้นแบบที่ฉีดบนตีนตุ๊กแก



รูปที่ 18 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm)



รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีของ *C. siamense* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อส่องดูจุดกึ่งกลางภายใต้กล้อง Leica stereo microscope (กำลังขยาย 350x)

P. multirostrata พบว่าโคโลนีที่แยกได้มีลักษณะเส้นใยแนบไปกับอาหารวุ้นซึ่งไม่เจริญฟูขึ้นมาแบบ *C. siamense* และเส้นใยยังมีการสร้างสารสีเหลืองซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *P. multirostrata* แต่เมื่อศึกษาลักษณะสปอร์แล้วพบว่าเป็นของ *P. multirostrata* จริง ดังรูปที่ 20

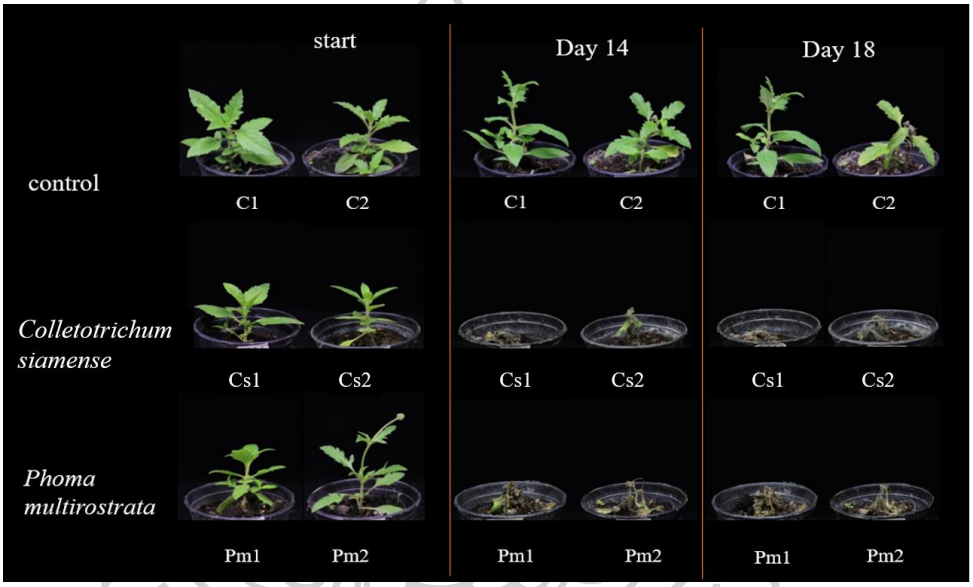
รูปที่ 20 ลักษณะเส้นใยที่สร้างสารสีเหลือง (ดังลูกศรสีแดง) และลักษณะสปอร์ของ *P. multirostrata* (ดังวงกลมสีแดง) แยกได้จากตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X)

เนื่องจาก *P. multirostrata* มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า *C. siamense* อยู่พอสมควรจึงใช้เวลาในการก่อโรคในตีนตุ๊กแกนานกว่า จากการทดลองจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การก่อโรคค่อนข้างน้อย เนื่องมาจากความหนาแน่นสปอร์ $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร อาจไม่เพียงพอต่อการก่อโรคแต่ก็มีแนวโน้มที่บ่งบอกถึงการก่อโรค จึงทดลองเพิ่มความหนาแน่นเป็น $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร แล้วทำการฉีดพ่น

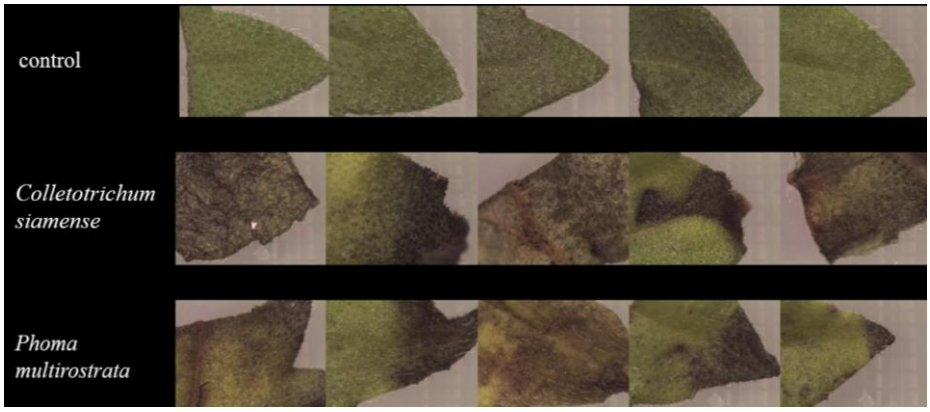
การทดลองการฉีดพ่นสปอร์ลงบนวัชพืชในครั้งนี้ทำการฉีดพ่นความหนาแน่นสปอร์ที่ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร เนื่องจากการฉีดพ่นที่ความหนาแน่นสปอร์ $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร ให้ผลการก่อโรคที่ล่าช้าซึ่งหมายความว่าการใช้ความหนาแน่นสปอร์ $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร ใช้ปริมาตรต้นละ 3 มิลลิลิตร ซึ่งผลปรากฏว่าไม่เพียงพอต่อการก่อโรคในวัชพืช โดยครั้งนี้ เริ่มทำการทดลอง *P. multirostrata* และ *C. siamense* ในความเข้มข้นที่มากที่สุดเท่าที่ราจะผลิตสปอร์ได้คือ $3.3x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร สำหรับราทั้ง 2 ไอโซเลต และใช้ตีนตุ๊กแก 3 ซ้ำ พบว่าวันที่ 14 หลังการฉีดพ่น *P. multirostrata* และ *C. siamense* มีวัชพืชที่เริ่มแสดงอาการไหม้และเหี่ยวลงบ้าง และตายลงทั้งหมดในวันที่ 19 โดยตายทุกซ้ำ แต่ชุดควบคุมมีเหี่ยวลง 1 ซ้ำ ดังผลในตารางที่ 5 รูปที่ 26A (การทดลองที่ 1) โดยจากตารางจะเห็นว่า *C. siamense* สามารถเข้าทำลายวัชพืชได้สูงในช่วง 14 วันคือ 91.7% ในขณะที่ *P. multirostrata* เข้าทำลายที่ประมาณ 55.6% ซึ่ง *C. siamense* สามารถก่อโรคได้เร็วกว่าจนถึงในวันที่ 19 ทั้ง 2 เชื้อสามารถเข้าทำลายวัชพืชได้ 100% ทั้งคู่

ต่อมาทำการทดลองแบบเดิมอีก 2 ครั้งเพื่อเป็นการยืนยันการก่อโรคของราทั้ง 2 ไอโซเลต โดยครั้งนี้มีปัจจัยคือเริ่มทำการทดลอง *P. multirostrata* และ *C. siamense* ในความหนาแน่นเท่ากัน คือ $1.3x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ทดสอบตีนตุ๊กแก 5 ซ้ำ จะเห็นว่าวันที่ 14 หลังการฉีดพ่น *P. multirostrata* และ *C. siamense* มีวัชพืชที่เริ่มแสดงอาการไหม้และเหี่ยวลงสูงขึ้นกว่าการทดลอง

ก่อนหน้านี้และตายลงในวันที่ 18 ดังรูปที่ 21 แล้วทำการเก็บผลโดยการนับเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงจากการก่อโรคของวัชพืชแต่ละต้น โดยผลการทดลองครั้งที่ 2 พบว่า *C. siamense* มีเปอร์เซ็นต์การก่อโรคที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 14 คือ 90% และ ตายเกือบทั้งหมดในวันที่ 18 คือ 93.8% ในขณะที่ *P. multirostrata* มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 คือ 72.7% และ ตายเกือบทั้งหมด 88.6% ในวันที่ 18 ดังรูปที่ 26B (การทดลองที่ 2) ซึ่งแสดงถึงการก่อโรคที่ชัดเจนในวัชพืชตีนตุ๊กแกของราทั้ง 2 ไอโซเลต และสรุปการตายของจำนวนต้นวัชพืชตีนตุ๊กแก ดังตารางที่ 5 และ 6 ต่อมาได้ทำการนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคมาศึกษาอาการภายใต้กล้องสเตอริโอพบลักษณะรอยไหม้ของใบที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ราเทียบกับใบที่ไม่มีอาการโรคของชุดควบคุม ดังรูปที่ 22

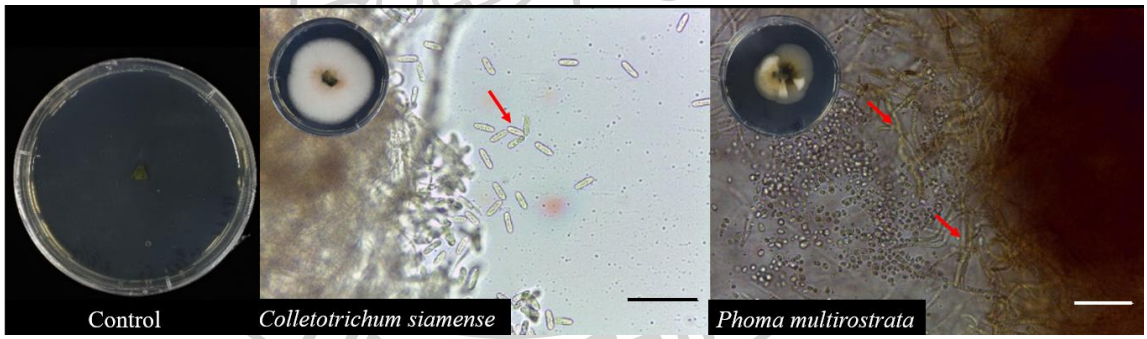


รูปที่ 21 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 18 ของการทดลองครั้งที่ 2 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ)



รูปที่ 22 อาการโรคที่เกิดบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกของ *P. multirostrata* และ *C. siamense* ที่ส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ Leica stereo microscope (กำลังขยาย 200x)

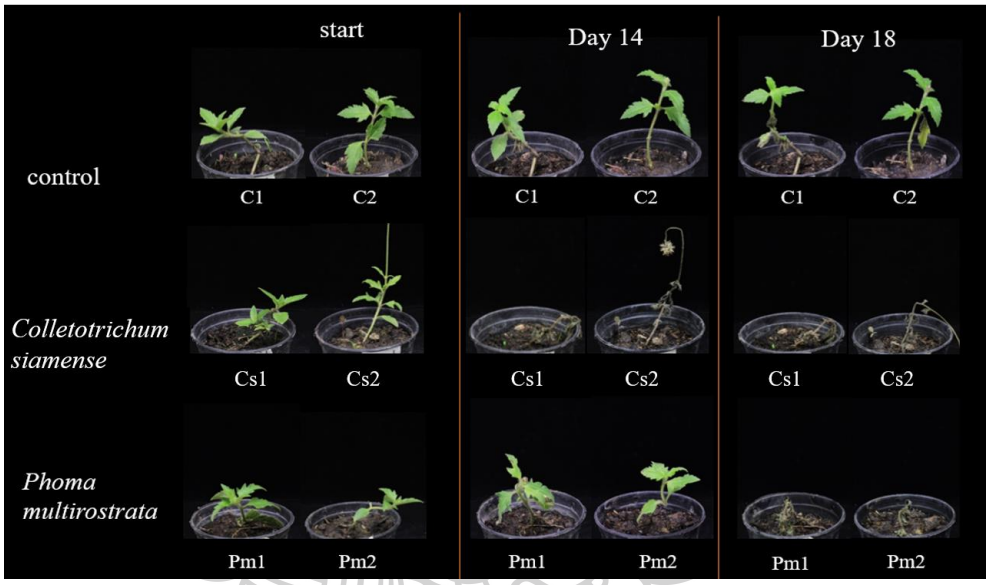
จากรูปที่ 22 จะเห็นว่ามีอาการเหี่ยวไหม้สีน้ำตาลที่ใบคล้ายกันระหว่าง 2 เชื้อนี้และตัดส่วนที่แสดงอาการในช่วงวันที่เริ่มมีอาการโรคมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite 5.25-6% แล้วเลี้ยงลงบนอาหาร ดังรูปที่ 23 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา



รูปที่ 23 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm) ในการทดลองที่ 2 ที่ความหนาแน่นสปอร์10^8 สปอร์/มิลลิลิตร

จากรูปที่ 23 จะพบว่าการแยกเชื้อพบว่า *C. siamense* นั้นสามารถแยกเชื้อได้ออกมามีลักษณะโคโลนีสีขาวและจุดกึ่งกลางมีสปอร์สีชมพูเหมือนต้นแบบส่วน *P. multirostrata* มีลักษณะโคโลนีสีออกน้ำตาลดำที่ตรงกับราที่แยกจากวัชพืชอย่างชัดเจนทั้ง 2 ไอโซเลต และทำการศึกษาลักษณะสปอร์ของราที่เข้าก่อโรค จะเห็นสปอร์ของ *C. siamense* ที่มีลักษณะรียาวตรงกับทางลักษณะที่แยกได้จากวัชพืชครั้งแรกและ *P. multirostrata* มีลักษณะของเส้นใยที่สร้างสารสีเหลืองและสปอร์ขนาดเล็กตรงกับลักษณะที่แยกได้จากวัชพืชครั้งแรกเช่นกัน

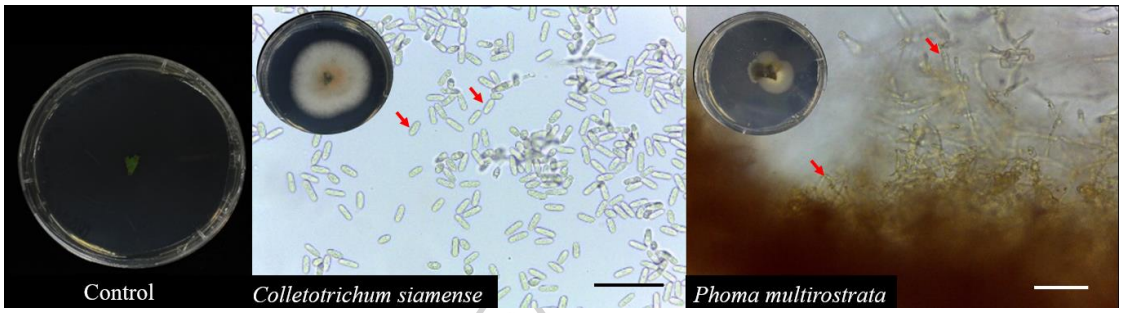
ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเป็นครั้งที่ 3 ซึ่งกำหนดสภาวะแวดล้อมทุกอย่างแบบเดียวกับการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งปรากฏผลการทดลองจากตารางที่ 5 รูปที่ 26C (การทดลองที่ 3) พบว่า *C. siamense* มีเปอร์เซ็นต์การก่อโรคที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 14 คือ 68.6% และ ตายเกือบทั้งหมดในวันที่ 18 คือ 79.6% ในขณะที่ *P. multirostrata* มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 คือ 85.5% และ ตายทั้งหมด 92% ในวันที่ 18 ซึ่งแสดงถึงการก่อโรคที่ชัดเจนในวัชพืชตีนตุ๊กแกของราทั้ง 2 ไอโซเลต ซึ่ง 3 การทดลองนั้น มีแนวโน้มที่ราทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จะสามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้และจำนวนการตายของวัชพืชตีนตุ๊กแก ดังรูปที่ 24 ดังตารางที่ 5



รูปที่ 24 ลักษณะต้นตีนตุ๊กแกที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. Siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นสปอร์ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1/Pm1 และ Cs2/Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และวันที่ 18 ของการทดลองครั้งที่ 3 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ)

ทำการยืนยันการก่อโรคพบว่าการแยกเชื้อพบว่า *C. siamense* นั้นสามารถแยกเชื้อได้ออกมามีลักษณะโคโลนีสีขาวและจุดกึ่งกลางมีสปอร์สีชมพูเหมือนต้นแบบส่วน *P. multirostrata* มีลักษณะโคโลนีสีออกน้ำตาลดำที่ตรงกับต้นตำรับแต่ราชนิดนี้โตช้าจึงมีราประเภทอื่นที่เป็น Endophyte แทรกเข้ามาเจริญด้วยและทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทางโคโลนีและสปอร์จะเห็นสปอร์ของ *C. siamense* ที่มีลักษณะรียาวตรงกับเชื้อ *C. siamense* ที่คัดแยกจากวัชพืชในการทดลองเริ่มต้น ในขณะที่ *P. multirostrata* มีลักษณะของเส้นใยที่สร้างสารสีเหลืองตรงกับเชื้อที่คัดแยกจากวัชพืชเช่นกันแต่เนื่องจากเจริญช้าจึงยังไม่ถึงการสร้างสปอร์ได้ในรูปที่ 25 และสรุปร้อยละการก่อโรคเฉลี่ยของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* และ จำนวนการตายของวัชพืช

ตีนตุ๊กแกที่ฉีดด้วยสปอร์ความหนาแน่นเป็น 1.0 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ทั้ง 3 การทดลอง ในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ



รูปที่ 25 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* บนจานเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แยกจากวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีการ Koch's postulate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400X) (bar 50 µm) ในการทดลองที่ 3 ที่ความหนาแน่นสปอร์10^8 สปอร์/มิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ร้อยละการก่อโรคเฉลี่ยของราของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ที่ความหนาแน่นเป็น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก ในวันที่ 7, 14 และ 18-19 ของการฉีดพ่นสปอร์ (ทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 จำนวน 3 ซ้ำ ครั้งที่ 2 และ 3 จำนวน 5 ซ้ำ)

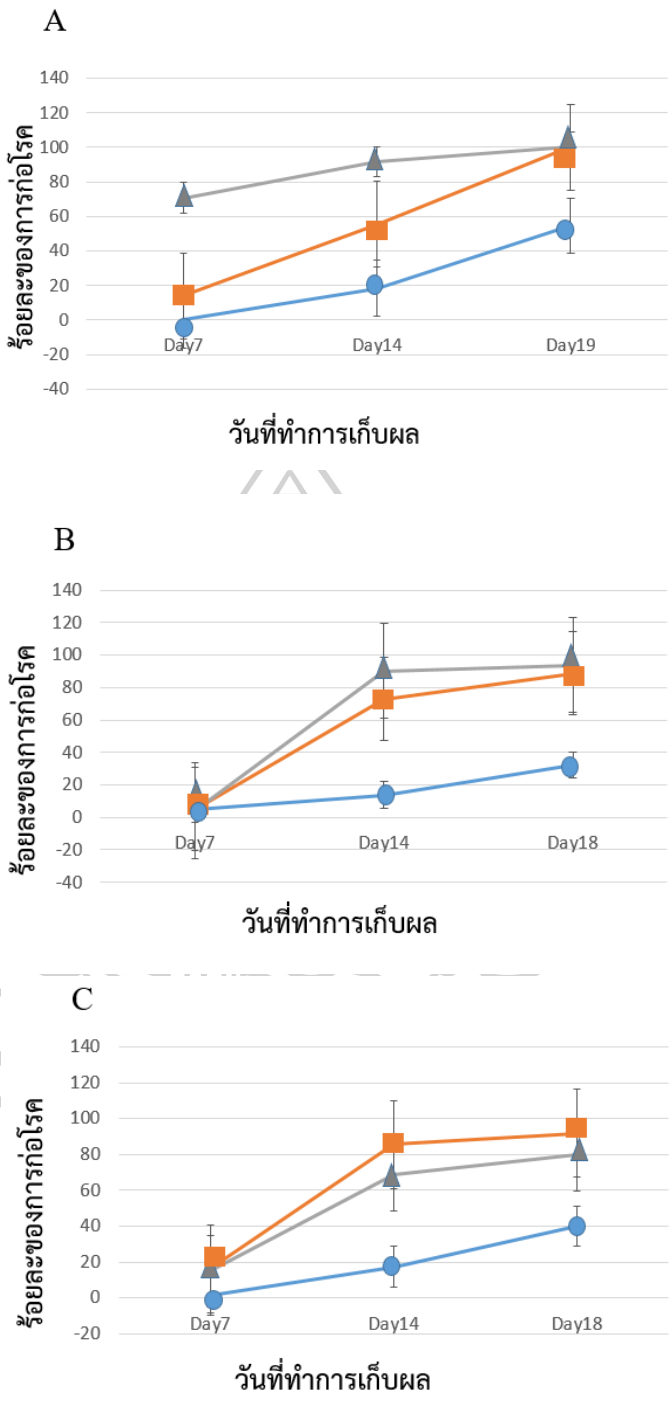
การทดลองครั้งที่	ร้อยละการก่อโรค			
	วันที่	ชุดควบคุม	*P. multirostrata*	*C. siamense*
1	7	0	14.1 ± 13.2	70.8 ± 27.8
	14	18.5 ± 23.1	55.6 ± 31.6	91.7 ± 14.4
	18-19	54.5 ± 39.6	100 ± 0	100 ± 0
2	7	5 ± 8.1	5 ± 6.3	4.2 ± 1.0
	14	13.8 ± 12.8	72.7 ± 40.8	90 ± 22.4
	18-19	32.3 ± 28.4	88.6 ± 25.6	93.8 ± 14
3	7	1.3 ± 1.4	16.2 ± 12.8	15 ± 18.6
	14	17.4 ± 15.3	85.5 ± 10.7	68.6 ± 43.8
	18-19	40.1 ± 31.7	92 ± 17.9	79.6 ± 29.2

ตารางที่ 6 จำนวนการตายของวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ฉีดด้วยสปอร์ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ความหนาแน่นเป็น 1.0×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ต่อวัชพืชตีนตุ๊กแก ในวันที่ 18-19 ของการฉีดพ่นสปอร์ (ทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 จำนวน 3 ซ้ำ ครั้งที่ 2 และ 3 จำนวน 5 ซ้ำ)

การทดลองครั้งที่	ร้อยละการก่อโรค (จำนวนต้นที่ตาย/จำนวนทั้งหมด)		
	ชุดควบคุม	*P. multirostrata*	*C. siamense*
1	54.5% (1/3)	100% (3/3)	100% (3/3)
2	32.3% (0/5)	88.6% (4/5)	93.8% (5/5)
3	40.1% (0/5)	92% (4/5)	79.6% (3/5)

จากการทดลองเพื่อคัดเลือกราสายพันธุ์ที่เข้าก่อโรคอย่างมีประสิทธิภาพในวัชพืชตีนตุ๊กแก พบว่าทั้ง *C. siamense* และ *P. multirostrata* ทั้ง 2 ไอโซเลต นี้สามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งคู่โดยการใช้สปอร์มีประสิทธภาพสูงทั้ง 2 ไอโซเลตและสามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้ภายใน 18 วันโดยการฉีดพ่นสปอร์ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร โดยทำการฉีดซ้ำทุก 3 วัน รวม 3 ครั้ง ทั้งนี้ขึ้นกับความชื้นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ช่วง 60-75% จะส่งผลต่อการเจริญของราและการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแก

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 26 กราฟเส้นร้อยละการก่อโรคเฉลี่ยของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* ในวัชพืชตีนตุ๊กแกในวันที่ 7,14 และ 18-19 โดยกำหนดให้ control = ชุดควบคุม (สีฟ้า), Pm = *P. multirostrata* (สีส้ม), Cs = *C. siamense* (สีเทา) ในการทดลอง **A**. ครั้งที่ 1 **B**. ครั้งที่ 2 และ **C**. ครั้งที่ 3

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติในส่วนอัตราการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกด้วยวิธีของ Duncan รวมทั้ง 3 การทดลอง พบว่า ชุดควบคุม ชุดฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* และ *P. multirostrata* ด้วยความหนาแน่นสปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร มีค่าทางสถิติ 3.1500 [a] 9.6000 [a] และ 10.6000 [a] ตามลำดับ ในวันที่ 7 หลังการฉีดพ่น ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

			Subset
	TREAT	N	1
Duncan[a,b]	c	2	3.1500
	ca	2	9.6000
	pm	2	10.6000
	Sig.		.323

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 36.035.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

ต่อมาเป็น 15.6000 [a] 79.2500 [b] และ 79.3000 [b] ตามลำดับ ในวันที่ 14 หลังการฉีดพ่น ซึ่งชุดควบคุมมีค่าทางสถิติแตกต่างกับชุดฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* และ *P. multirostrata* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

			Subset	
	TREAT	N	1	2
Duncan[a,b]	c	2	15.6000	
	pm	2		79.2500
	ca	2		79.3000
	Sig.		1.000	.997

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 154.452.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

ลำดับสุดท้าย 36.2000 [a] 86.7000 [b] และ 96.0000 [b] ตามลำดับ ในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่น ซึ่งชุดควบคุมมีค่าทางสถิติแตกต่างกับชุดฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* และ *P. multirostrata* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

	TREAT	N	Subset 1	Subset 2
Duncan[a,b]	c	2	36.2000	
	ca	2		86.7000
	pm	2		96.0000
	Sig.		1.000	.366

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 64.340.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

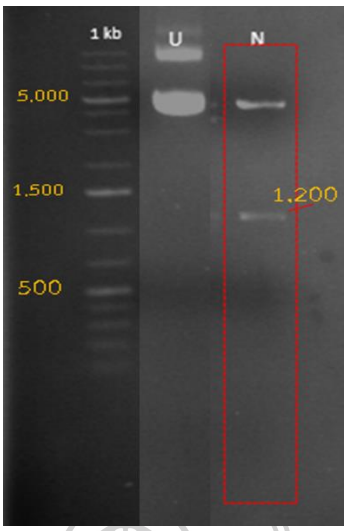
2.3 ผลการศึกษาติดตามการก่อโรคของราที่คัดเลือกได้ในวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ระยะต่างๆ

ผลการนำเวคเตอร์ pCT74 ที่มียีน Green Fluorescent Protein (*sGFP*) เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ Transformation

จากการนำเวคเตอร์เข้าสู่ *E. coli* แล้ว บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะพบลักษณะโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli*

ผลขั้นตอนการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*

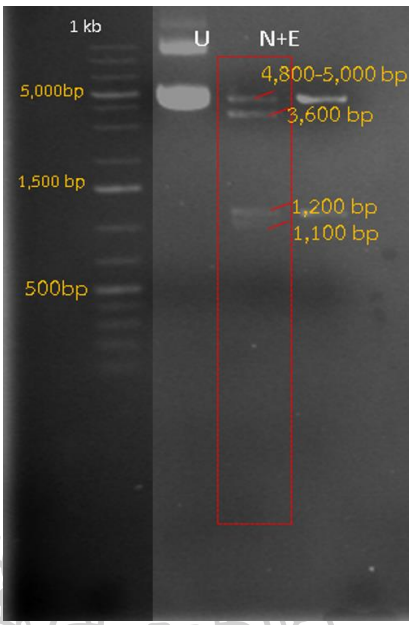
จากการสกัดพลาสมิดเมื่อนำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nano drop พบว่าได้ความเข้มข้นได้ 401 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาคผนวกข้อ 9) เมื่อได้พลาสมิดแล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดด้วยวิธีตรวจสอบ pCT74 โดยใช้เอนไซม์ตัดส่วนพลาสมิดเพื่อตรวจสอบขนาดความถูกต้องของขนาดพลาสมิดที่สกัด พบว่าจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I ทำให้เกิดการตัดที่ตำแหน่ง (ภาคผนวกข้อ 10) การตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp กับชิ้นส่วนขนาดใหญ่ซึ่งมีขนาด 4,800 bp เมื่อทำ gel electrophoresis พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 bp ตรงตามแผนภาพการจำลอง ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp จากการสกัดพลาสมิด pCT74 ที่มียีน GFP ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I (โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ U คือ ชุดควบคุมส่วนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ N คือ ส่วนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I)

จากรูปที่ 27 เห็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 bp ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I ส่วนแถบดีเอ็นเอบนคือส่วนของแถบดีเอ็นเออีกส่วนที่มีขนาด 4,800-5,000 bp จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์ *Nco*I เพียงชนิดเดียวสามารถทำให้ตรวจสอบขนาดของ pCT74 ได้แต่เพื่อยืนยันจึงทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI อีกครั้งโดย เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้วทำการเติมด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพิ่มจากสารละลายเดิมโดยเพิ่มปริมาตรเพียง 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งสภาวะ ตามวิธีการที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะเกิดการตัดที่ตำแหน่ง nos-terminator (ภาคผนวกข้อ 11)

การตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp กับขึ้นส่วนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp และอีกชิ้นส่วนขนาดใหญ่ ขนาด 3,600 bp ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์ *Eco*RI ร่วมกับ *Nco*I เมื่อทำ gel electrophoresis พบว่าได้แถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 28



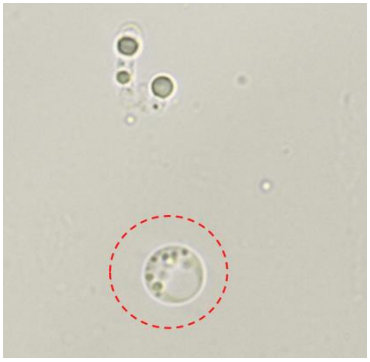
รูปที่ 28 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp, 1,200 bp และ 3,600 bp จากการสกัดพลาสมิด pCT74 ที่มียีน GFP ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Eco*RI (โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ U คือ ชุดควบคุมส่วนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ N+E คือ ส่วนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Eco*RI)

จากรูปที่ 28 จะเห็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 bp ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และแถบดีเอ็นเอล่างขนาดประมาณ 1,100-1,200 bp และแถบดีเอ็นเอขนาด 3,600-3,800 bp ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ส่วนแถบดีเอ็นเอบนคือส่วนของแถบดีเอ็นเออีกส่วนที่มีขนาด 4,800-5,000 bp ซึ่งมาจากการตัดไม่สมบูรณ์ของเอนไซม์ จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์ *Eco*RI สามารถทำให้ตรวจสอบขนาดของ pCT74 ได้โดยเกิด 3 แถบดีเอ็นเอหลักตามแผนภาพและการใช้เอนไซม์ *Nco*I เพียงชนิดเดียวสามารถทำให้ตรวจสอบขนาดของ pCT74 ได้ 2 แถบดีเอ็นเอหลักตามแผนภาพ (ภาคผนวกที่ 11) เช่นกันจึงสรุปได้ว่าเป็น pCT74 ที่ถูกต้อง

ผลขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์และขั้นตอนนำพลาสมิดเข้าไปในโปรโตพลาสต์

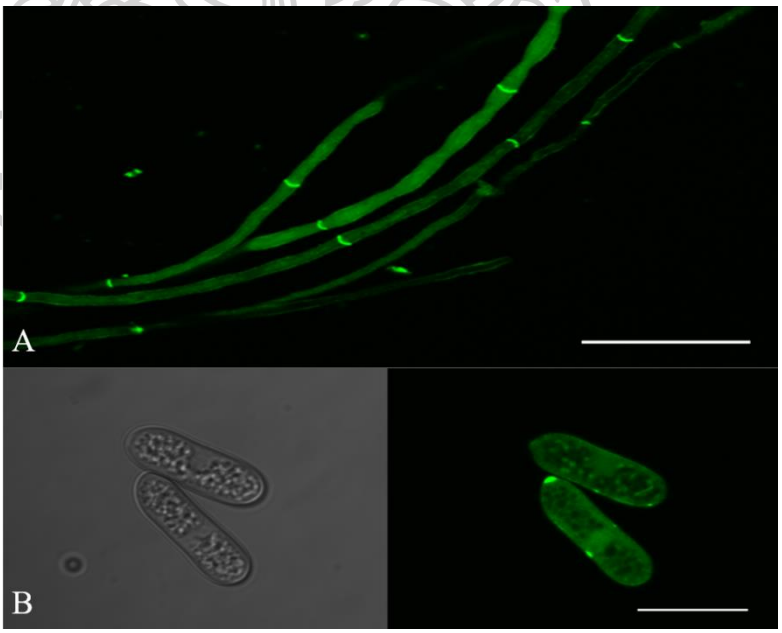
วิธีของ *C. siamense* (ทำการแทรกยีนโดย นางสาว กนกพร คำทอง ทิพย์)

จากวิธีการของ *Colletotrichum graminicola* (Epstein, 1997) สามารถสร้างโปรโตพลาสต์ได้โดยมีลักษณะเซลล์ใส ปราศจากผนังเซลล์หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาคผนวกข้อ 8) ได้ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ใสและปราศจากผนังเซลล์หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ *C. siamense* เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000X)

จากที่ทำการแทรก pCT74 ได้สำเร็จในโปรโตพลาสต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วย Hygromycin B ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบการเจริญของโคโลนีสปอร์และเส้นใยจึงนำไปถ่ายรูปภายใต้กล้องคอนโฟคอล เห็นลักษณะการเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ของเส้นใยและสปอร์ ซึ่งแสดงถึงลักษณะ *C. siamense* ที่พร้อมใช้ติดตามระยะการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแก ดังรูปที่ 30



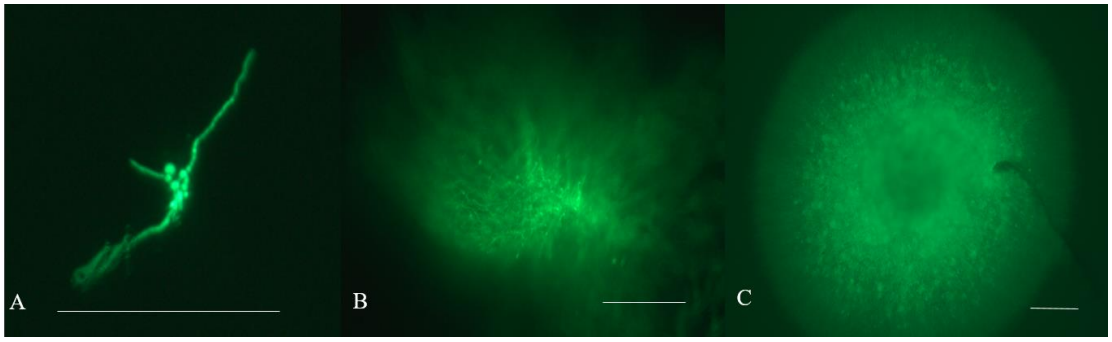
รูปที่ 30 ลักษณะการเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ของ **A.** เส้นใย *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar 20 µm) และ สปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar 10 µm)

วิธีของ *P. multirostrata* อ้างอิงจาก *Beauveria bassiana* (Srisuksam, 2015)

โดยเริ่มจากการสร้างโปรโตพลาสต์โดยวิธีดัดแปลงจาก *C. graminicola* ตามวิธีการที่กล่าวในส่วนวิธีดำเนินงานวิจัย จากการทดลอง การเตรียม ทำการสร้างโปรโตพลาสต์ (ภาคผนวกข้อ 8) เมื่อครบ 16 ชั่วโมง นำโปรโตพลาสต์มาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบพบการเกิดลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลม ใส ไร้ผนังเซลล์ ดังรูปที่ 31

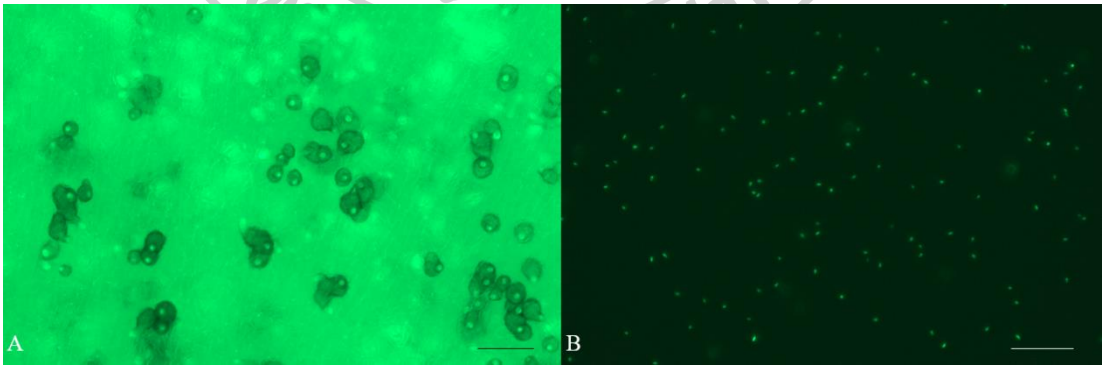
รูปที่ 31 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ใสและปราศจากผนังเซลล์หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 130 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ *P. multirostrata* เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400X)

หลังจากทำการแทรกยีน GFP และบ่มที่ห้องเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการเจริญของเส้นใยและเรืองแสงเมื่อส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์บางบริเวณที่สามารถแทรกยีนได้สำเร็จ ดังรูปที่ 32A จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าโปรโตพลาสต์ของ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA ที่ผสมยา Hygromycin B ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ขนาดเล็กเกินไปที่จะเขี่ยสปอร์เดี่ยว ให้บ่มต่อให้มีการเจริญเติบโตมากขึ้นจนครบเวลา 5 วัน จึงสามารถใช้ปลายเข็มแยกโคโลนีภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ sterio ได้ ต่อมาทำการแยกส่วนเส้นใยที่เรืองแสงมาลงอาหาร PDA ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จะพบว่าโคโลนี *P. multirostrata* ที่มียีน GFP เจริญเติบโตและพร้อมนำไปใช้ทดสอบได้ดังรูปที่ 32C



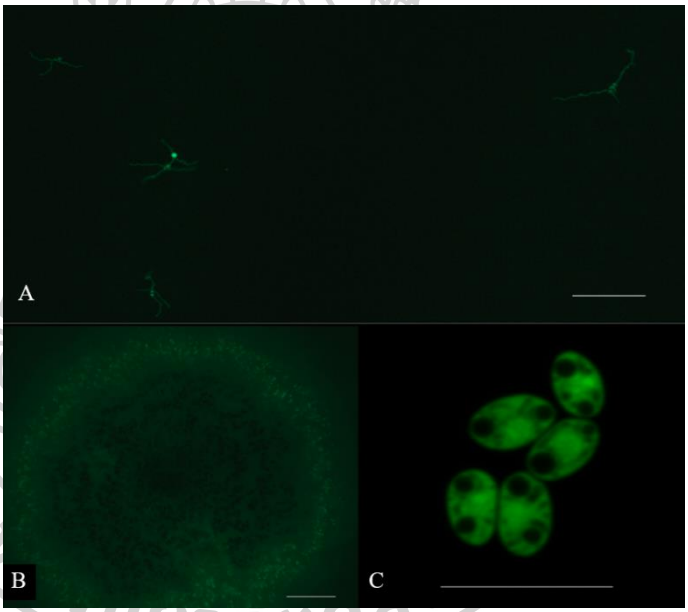
รูปที่ 32 ลักษณะการเจริญของ *P. multirostrata* ที่แทรกยีน GFP บนอาหาร PDA ที่ประกอบด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร **A.** การงอกของสปอร์เป็นเส้นใยในเวลา 48 ชั่วโมง (bar 200 µm) **B**. เส้นใยเจริญในเวลา 5 วัน (bar 200 µm) และ **C.** เจริญเป็นโคโลนีในเวลา 7 วัน (bar 500 µm)

เมื่อแยกเส้นใยมาเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารสูตร Oatmeal agar (OMA) ที่ประกอบด้วยด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำการผลิตสปอร์แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จะพบลักษณะ pycnidia ของ *P. multirostrata* ดังรูปที่ 33A แล้วทำการชะสปอร์ด้วยน้ำกลั่น นำมาหยดบนสไลด์เพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์อีกครั้งจะพบลักษณะของสปอร์ที่เรืองแสงสีเขียว ดังรูปที่ 33B



รูปที่ 33 ลักษณะ *P. multirostrata* ที่แทรกยีน GFP บนอาหาร OMA ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์**A**. pycnidia ซึ่งเป็นที่บรรจุสปอร์ของ *P. multirostrata* (bar 200 µm) **B.** ลักษณะสปอร์ของ *P. multirostrata* (bar 50 µm)

ต่อมาเมื่อสปอร์เกิดขึ้นแล้วทำการชะสปอร์ด้วยน้ำกลั่น นับสปอร์ได้ความหนาแน่นสปอร์ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ทำการเจือจางลง 100 เท่า แล้วใช้ปริมาตรสปอร์ 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร ½ PDA จนแห้งแล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 2 วัน จะพบว่าโคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยมีการแยกโคโลนีกันอย่างชัดเจนดังรูปที่ 34A จึงวงสัญลักษณ์แล้วแยกโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยใช้ปลายเข็มฉีดยาเขี่ยโคโลนีเดี่ยวออกมาเลี้ยงบนอาหาร Oatmeal agar (OMA) ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน จะได้โคโลนีเดี่ยวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 34B และ ลักษณะสปอร์ที่รีและมี 2 วงกลมภายในซึ่งเป็นสปอร์ที่มียีน GFP พร้อมใช้งาน เมื่อศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องคอนโฟคอล ดังรูปที่ 34B



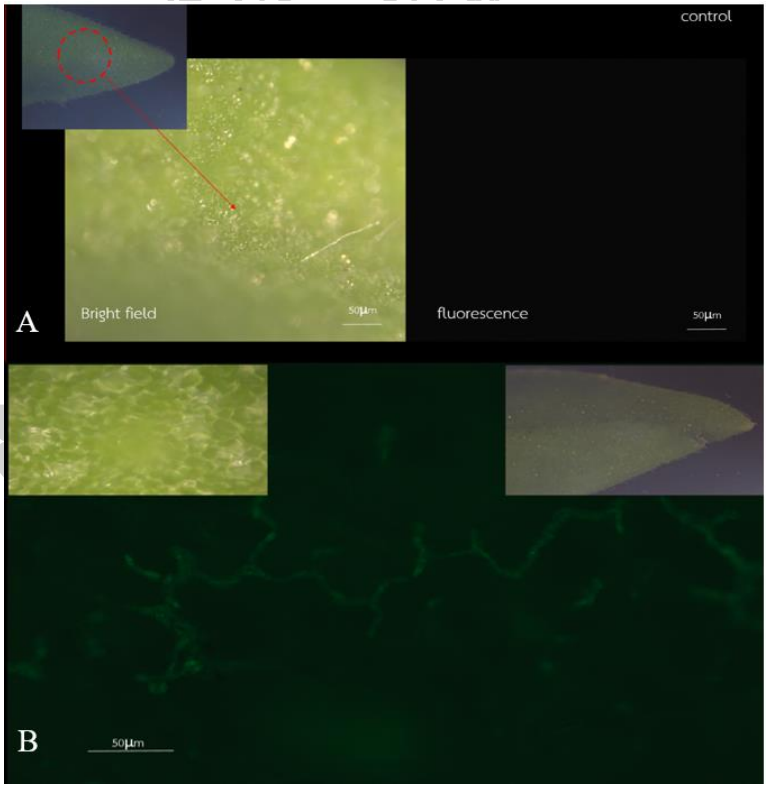
รูปที่ 34 A. ลักษณะการเจริญของเส้นใยมีการแยกโคโลนีกันอย่างชัดเจนของ *P. multirostrata* (bar 200 µm) **B**. ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของ *P. multirostrata* ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (bar 2,000 µm) และ **C**. สปอร์รูปรีที่มีวงกลม 2 วงภายใต้กล้องคอนโฟคอล (bar 10 µm)

เมื่อได้โคโลนีที่พร้อมใช้ทดสอบกระบวนการก่อโรคซึ่งในขั้นตอนลำดับต่อไปจะทำการผลิตสปอร์ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP บนอาหาร Oatmeal agar สำหรับฉีดพ่นสปอร์บนตีนตุ๊กแกเพื่อติดตามการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก

ผลการติดตามระยะการก่อโรคของราในวัชพืชตีนตุ๊กแก

ผลการศึกษาระยะการก่อโรคของรา *C. siamense* ที่มียีน GFP ในวัชพืชตีนตุ๊กแก

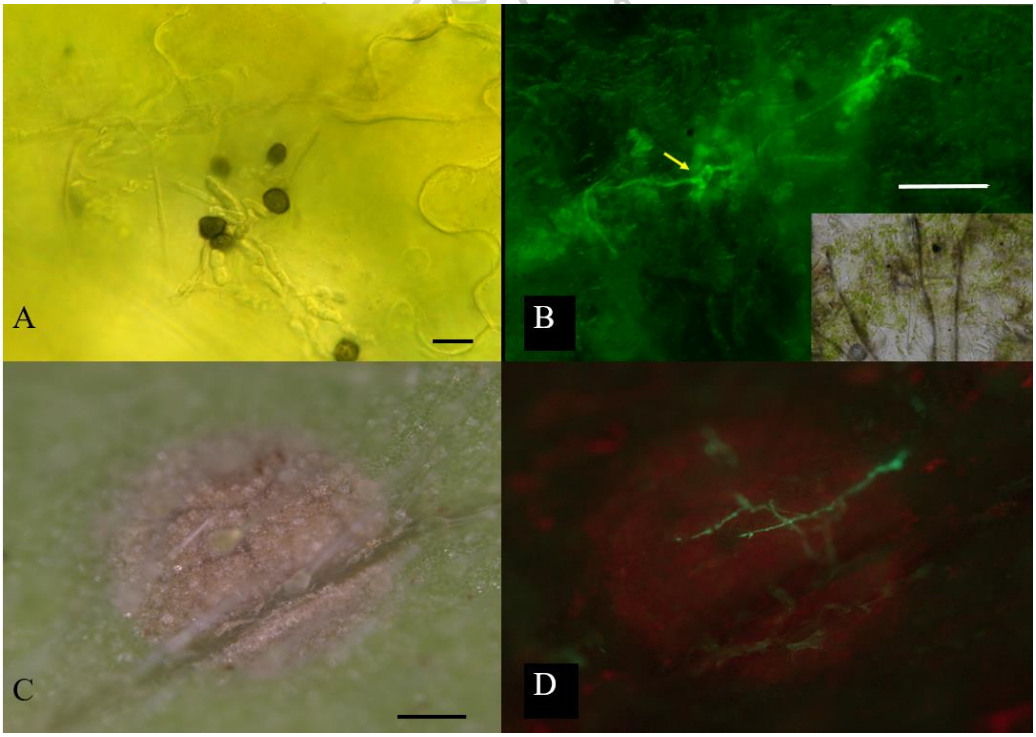
จากการทดลองที่มีการจัดสภาวะเหมือนกับการทดลองการก่อโรคดังข้อ 2.2 ทุกประการแต่เปลี่ยนเป็นใช้สปอร์ราที่มียีน GFP ในการฉีดพ่นที่วัชพืชตีนตุ๊กแกและมันสำปะหลัง ส่วนชุดควบคุม ซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 แล้วทำการศึกษาระยะการก่อโรคภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ในวันแรกของการฉีดพ่นพบว่า ชุดควบคุมไม่พบเห็นสปอร์ แต่ใบที่ฉีดพ่นสปอร์จะเห็นสปอร์ของ *C. siamense* บริเวณร่องใบและผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแกทั่วบริเวณเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เห็นสปอร์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 ลักษณะใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ **A.** จากการฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ในชุดควบคุม และ **B.** ฉีดพ่นด้วย สปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP

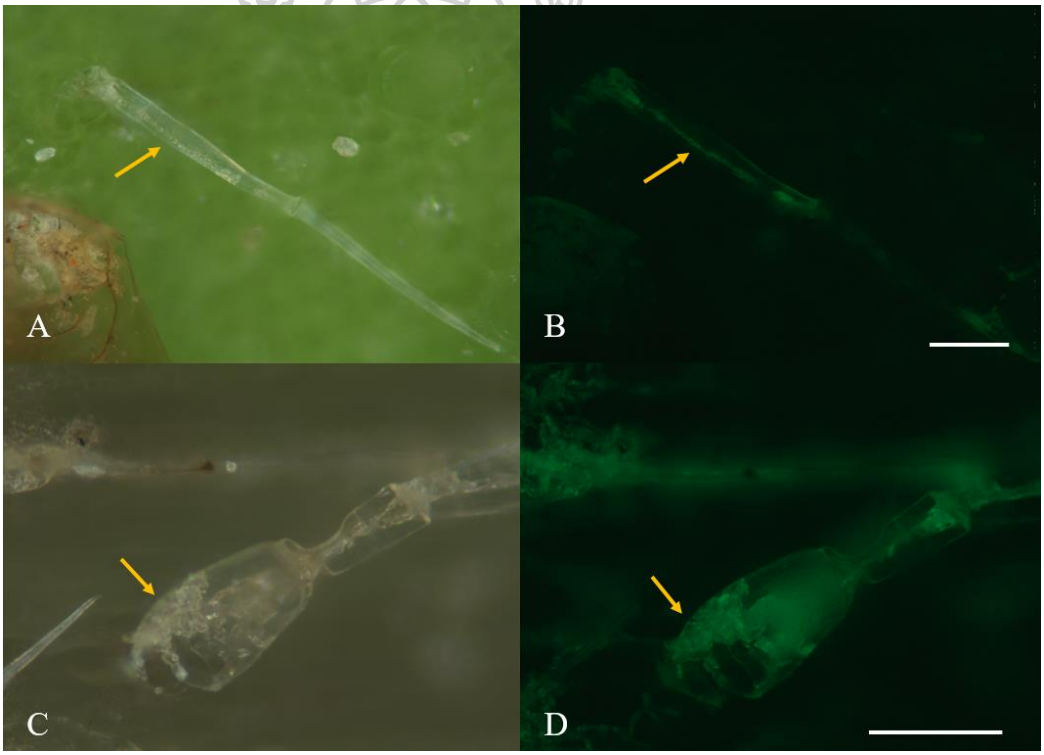
ในช่วงสัปดาห์แรกหลังจากฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* พบว่าเกิดการงอกของสปอร์และมีการพัฒนาเป็นส่วนที่เรียกว่า แอพเพรสซอเรียม (appressorial formation) บนผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแก

ซึ่งลักษณะของ แอพเพรสซอเรียม จะมีลักษณะเป็นกระเปาะสีดำและแทงเส้นใยลงบนพื้นผิวของวัชพืชตีนตุ๊กแกเข้าไปในส่วนของผนังเซลล์ในช่วงที่เซลล์พืชยังมีชีวิตอยู่ (biotrophic phase) ดังรูปที่ 36A ในวันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นพบการติดของสปอร์บางส่วนบริเวณขนใบและร่องใบรวมถึงพบการเจริญของสปอร์เป็นเส้นใยตรงบริเวณผิวใบซึ่งจะพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรครอยไหม้ของผิวใบรอบบริเวณเส้นใยดังรูปที่ 36C และ 36D ส่วนของจุดดำที่เกิดโรค (leaf spot) เมื่อทำการส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์พบการเจริญของสปอร์เป็นเส้นใยบริเวณผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแกและมีการแทงเส้นใยในส่วนของใบบริเวณที่แสดงอาการโรค และพบการแทรกตัวของเส้นใยราที่เจริญในส่วนของช่องว่างระหว่างเซลล์พืชบริเวณที่ยังไม่เกิดอาการโรคหรือช่วง Biotrophic phase รวมถึงพบการเจริญผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืช ดังรูปที่ 36B



รูปที่ 36 ลักษณะการงอกเป็นเส้นใยและการเกิดโรค วันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* เมื่อส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์โดย **A.** ลักษณะการเกิด แอพเพรสซอเรียม (bar 10 µm) **B.** การเจริญของเส้นใยผ่านระหว่างเซลล์ของวัชพืชในระยะ biotrophic phase (bar 50 µm) **C.** การเจริญของเส้นใยที่เป็นสาเหตุของการเกิดวงรอยโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก (bar 200 µm) **D.** การเจริญของเส้นใยที่เป็นสาเหตุของการเกิดวงรอยโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก (รูปประสานด้วยรูปแสงสีแดงกับแสงฟลูออเรสเซนต์) (bar 200 µm)

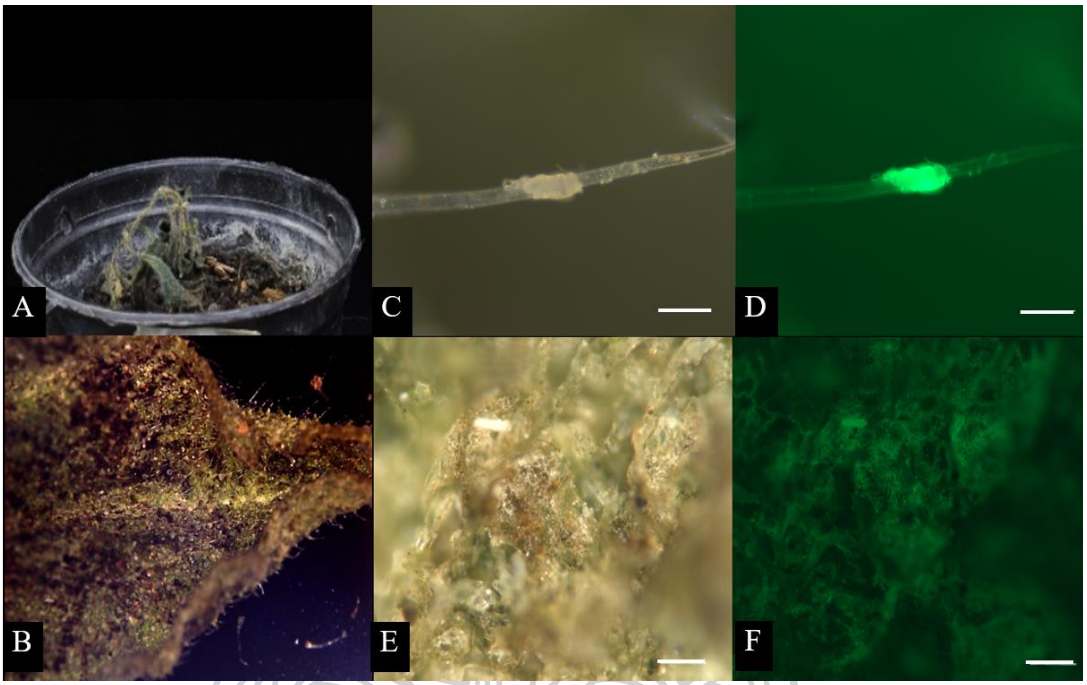
ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 พบว่าบริเวณของพื้นที่ใบที่ทำการฉีดพ่นเกิดการพัฒนาของสปอร์ *C. siamense* ในลักษณะ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) อยู่ในบริเวณภายในขนใบ (leaf hair) ของวัชพืชตีนตุ๊กแก ซึ่งมีลักษณะการเพิ่มเป็นทวีคูณ มีลักษณะเป็น conidia ทรงรี ยังไม่พบบริเวณอื่นๆ ของผิวใบ การเจริญของ เส้นใยเทียม มีลักษณะร่วมระหว่างเซลล์ยีสต์ (yeast cell) และเส้นใย (hyphae) โดยเส้นใยเทียมจะแสดงให้เห็นผนังกั้นเซลล์ (septa) ชัดเจนและจะพัฒนาไปเป็นเส้นใยที่สมบูรณ์ โดย เส้นใยเทียม จะมีส่วนที่เรียกว่า เซลล์แม่ (mother cell) และเกิดการแบ่งเซลล์เจริญออกเป็นอีกเซลล์ในขนาดที่เท่ากันเรียกว่า เซลล์ลูก (daughter cell) ลักษณะดังกล่าวเกิดจากภาวะขาดออกซิเจนภายในขนใบ (leaf hair) ของวัชพืชตีนตุ๊กแก ดังรูปที่ 37 หลังจากที่สปอร์รา *C. siamense* เข้าสัมผัสที่บริเวณฐานของขนใบจนกระทั่งเกิดการงอกและพัฒนาเป็นเส้นใย แผ่ขยายก่อโรคบิเวณรอบข้าง



รูปที่ 37 ลักษณะเส้นใยเทียม (pseudohyphae) **A.** เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบ (ภายใต้แสงปกติ) **B.** เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบ (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์) **C.** เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบและก่อให้เกิดการเหี่ยวไหม้ (ภายใต้แสงปกติ) **D.** เกิดเส้นใยเทียมภายในขนใบและก่อให้เกิดการเหี่ยวไหม้ (ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์)

เมื่อเวลาผ่านไปถึงวันที่ 14 และ18 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* พบว่าเกิดการเจริญเป็นเส้นใยของ *C. siamense* เจริญครอบคลุมบริเวณทั้งผิวใบและขนใบของวัชพืชที่มีอาการโรครอย

ไหม้ทั้งใบจนเหี่ยวแห้งทั้งต้นและมีการตายเกิดขึ้นซึ่งเป็นช่วง Necrotrophic phase ของการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกซึ่งจะพบเส้นใยเจริญพันรอบขนใบและเจริญปกคลุมผิวใบของวัชพืชและเป็นสาเหตุการตายของต้นวัชพืช ดังรูปที่ 38



รูปที่ 38 ลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยระหว่างเซลล์พืชช่วง Necrotrophic phase และการเกิดโรควันที่ 14-18 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* **A.** การเหี่ยวตายของใบและต้นวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง 18 วัน **B.** ลักษณะรอยไหม้ที่ใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Necrotrophic phase 18 วัน **C.** การเจริญของเส้นใยที่พันรอบขนใบภายใต้แสงปกติ (bar 100 µm) ใน 14 วัน **D.** การเจริญของเส้นใยที่พันรอบขนใบภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) ใน 14 วัน **E.** การเหี่ยวแห้งของใบวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ตายภายใต้แสงปกติ (bar 100 µm) ใน 18 วัน **F.** การเหี่ยวแห้งของใบวัชพืชตีนตุ๊กแกที่ตายภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) ใน 18 วัน

จากการศึกษาผลก่อโรคของรา *C. siamense* ที่มียีน GFP ในวัชพืชตีนตุ๊กแกทำให้ทราบกระบวนการก่อโรคซึ่งหลังจากการฉีดพ่นสปอร์ลงบนวัชพืชตีนตุ๊กแกพบว่าหลังฉีดพ่นตามกำหนดทั้ง 3 ครั้งและปรับสภาวะแวดล้อมจนมีความเหมาะสมแล้ว ในวันที่ 7 พบการงอกของสปอร์ *C. siamense* บนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกและเกิดการงอกของเส้นใยในระหว่างเซลล์พืชของพื้นผิวใบที่ยังมีชีวิตอยู่หรือบริเวณที่เขียวและยังไม่เกิดโรค (biotrophic phase) ช่วงวันที่ 7-9 จนกระทั่งในวันที่ 14 หลังการฉีดพ่น พบลักษณะอาการโรคใบไหม้เป็นสีน้ำตาลจุด (leaf blight) บริเวณรอบเส้นใยที่เจริญ

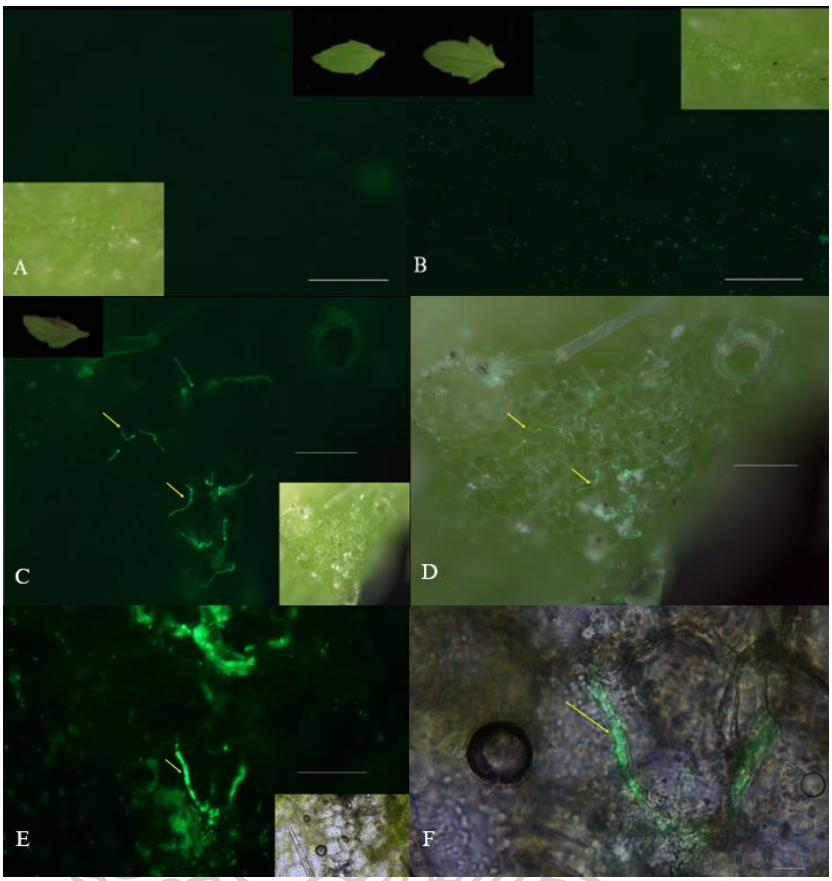
ซึ่งเป็นวันที่วัชพืชเริ่มแสดงอาการโรคและมีบริเวณใบไหม้ที่เซลล์ตาย (necrotrophic phase) ถึงในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่น พบการเหี่ยวตายของวัชพืชทั้งต้น

ผลการศึกษาระยะการก่อโรคของรา *P. multirostrata* ที่มียีน GFP ในวัชพืชตีนตุ๊กแก

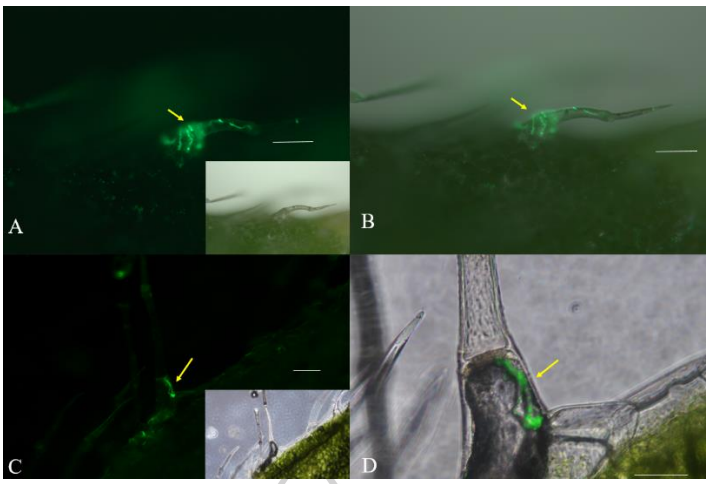
ทำการจัดการทดลองเหมือนกับการทดลองการก่อโรคทุกประการ แต่เปลี่ยนเป็นใช้สปอร์ราที่มียีน GFP ในการฉีดพ่นที่วัชพืชตีนตุ๊กแก ในส่วนชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 ทำการศึกษาระยะการก่อโรคภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ในวันแรกของการฉีดพ่นพบว่าเห็นสปอร์ของ *P. multirostrata* บริเวณร่องใบและผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแกทั่วบริเวณเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เห็นสปอร์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 39A-39B เมื่อเวลาผ่านไป 7 วันพบการงอกและเจริญของสปอร์ *P. multirostrata* เป็นเส้นใย บริเวณผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแก เมื่อส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ทำการผสานรูปภาพระหว่างรูปแสงปกติ (bright field) และรูปฟลูออเรสเซนต์ ทำให้สามารถเห็นตำแหน่งที่เกิดการเจริญของสปอร์เป็นเส้นใยบนใบของวัชพืชตีนตุ๊กแก ซึ่งจะเห็นลักษณะการงอกของเส้นใยแทงผ่านบนพื้นผิวผนังเซลล์ ดังรูปที่ 39C-39D และพบตำแหน่งการงอกเป็นเส้นใย ช่วงวันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* ในช่วงระยะ Biotrophic phase (bar 100 µm) พบว่าเส้นใยที่เจริญบนใบวัชพืชและสอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืชตีนตุ๊กแกในขณะที่ยังไม่แสดงอาการโรคหรือในช่วง Biotrophic phase และเมื่อทำการผสานรูปภาพระหว่างรูปแสงปกติและรูปฟลูออเรสเซนต์ ทำให้สามารถเห็นตำแหน่งที่เกิดการแทรกผ่านของเส้นใยระหว่างช่องว่างของผิวใบ ดังรูปที่ 39E-39F

ในจุดอื่นๆจากการสังเกตพบลักษณะการพัฒนาของสปอร์ *P. multirostrata* ที่สัมผัสฐานของขนใบเป็นเส้นใย เจริญและแทงเส้นใยขยายภายในและพันรอบบริเวณขนใบ ก่อนที่จะแสดงอาการโรคดังรูปที่ 40A และ 40B เส้นใยบางส่วนเจริญผ่านในเซลล์ขนใบดังรูปที่ 40C และ 40D ซึ่งอยู่ในช่วง biotrophic phase ซึ่งเป็นการก่อโรคในอีกตำแหน่งหนึ่งที่ขนใบนอกเหนือจากผิวเซลล์

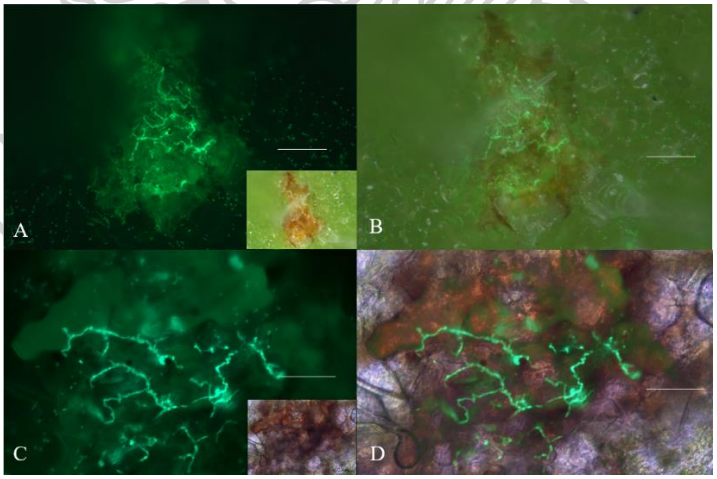
บางจุดของใบวัชพืชเกิดการเจริญของเส้นใยเป็นกลุ่มเล็กดังรูปที่ 41A-41B และเริ่มก่อโรคบริเวณรอบเส้นใยทำให้เกิดรอยไหม้รอบด้านทำให้เป็นรอยต่อเข้าสู่ช่วง Necrotrophic phase ดังรูปที่ 41C-41D



รูปที่ 39 ลักษณะใบวัชพืชตีนตุ๊กแกเมื่อส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ **A.** ชุดควบคุม ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ไม่พบการเกาะติดของสปอร์ สปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm) **B.** วันแรกของการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* และพบสปอร์ทั่วบริเวณผิวใบตีนตุ๊กแก (bar 100 µm) **C.** การงอกเป็นเส้นใยของสปอร์ *P. multirostrata* เมื่อส่องภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ วันที่ 7 (bar 100 µm) **D.** ตำแหน่งการงอกเป็นเส้นใยช่วง วันที่ 7-9 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* ในช่วงระยะ Biotrophic phase (bar 100 µm) **E.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบนใบวัชพืชและสอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืชตีนตุ๊กแกในช่วง Biotrophic phase (bar 50 µm) **F.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบนใบวัชพืชและสอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์วัชพืชตีนตุ๊กแกในช่วง Biotrophic phase (bar 10 µm)

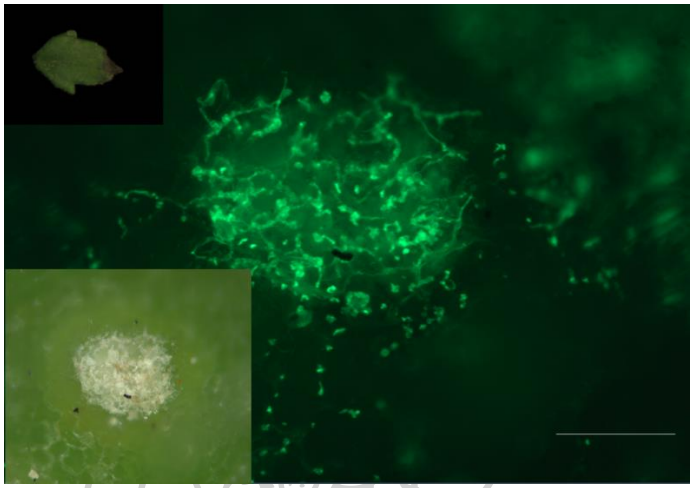


รูปที่ 40 ลักษณะเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญบริเวณขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก **A.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่พันรอบขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) **B.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่พันรอบขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกรูปผสาน (bar 100 µm) **C.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่สอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์ของขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) และ **D.** เส้นใย *P. multirostrata* ที่สอดแทรกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์ของขนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 50 µm)

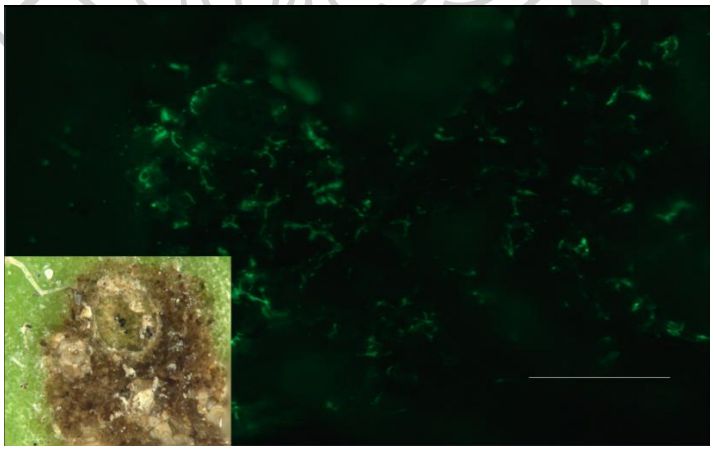


รูปที่ 41 ลักษณะเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญก่อโรควงกว้างบนใบตีนตุ๊กแก **A.** กลุ่มของเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญเป็นกลุ่มภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 100 µm) **B.** กลุ่มของเส้นใย *P. multirostrata* ที่เจริญเป็นกลุ่มโดยรูปผสาน (bar 100 µm) **C.** บริเวณเส้นใยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ (bar 50 µm) และ **D.** บริเวณเส้นใยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคโดยรูปผสาน (bar 50 µm)

ในช่วงวันที่ 12-14 วันหลังการฉีดพ่นพบการเจริญเป็นเส้นใยขนาดใหญ่ขึ้นพันขดกันเป็นเซลล์บริเวณใบวัชพืชตีนตุ๊กแกซึ่งมีส่วนที่ยังไม่แสดงอาการโรคดังรูปที่ 42 และบริเวณที่เริ่มแสดงอาการโรคเป็นรอยไหม้ดังรูปที่ 43 ซึ่งเกิดจากการปล่อยสารบางอย่างของเส้นใยราเข้าทำลายเซลล์บริเวณใบพืช

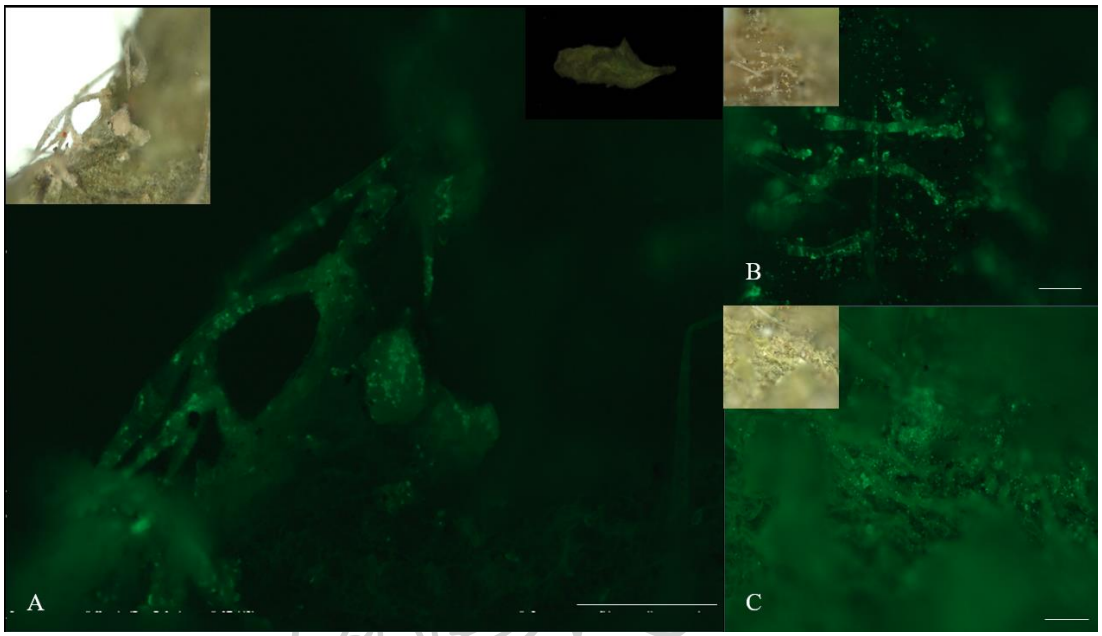


รูปที่ 42 ลักษณะเส้นใยที่เจริญมากขึ้นบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Biotrophic phase ในวันที่ 12-14 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm)



รูปที่ 43 ลักษณะเส้นใยที่ก่อโรคบนใบวัชพืชตีนตุ๊กแกช่วง Necrotrophic phase ในวันที่ 12-14 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* (bar 100 µm)

เมื่อถึงวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นจะพบการขดพันของเส้นใยและยังมีสปอร์ติดอยู่บริเวณทั้งขนใบและผิวใบหรืออยู่บริเวณใบที่ถูกก่อโรคโดย *P. multirostrata* จนกระทั่งแห้งตายดังรูปที่ 44



รูปที่ 44 การขดพันของเส้นใยและสปอร์ที่ติดอยู่บริเวณใบที่ถูกก่อโรคจนแห้งตายในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* **A.** สปอร์ที่ติดอยู่บริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 200 µm) **B.** เส้นใยที่ขดพันบริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 100 µm) และ **C.** เส้นใยที่ขดพันบริเวณขนใบที่ถูกก่อโรค (bar 100 µm)

จากการทดลองการก่อโรคของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* พบว่าราทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งพบว่า *C. siamense* Cs1 สามารถก่อโรคในช่วง 80-100 % และ *P. multirostrata* สามารถก่อโรคในช่วง 92-100 % ของวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นสปอร์และเมื่อทำการศึกษาลักษณะการก่อโรคภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จากราทั้ง 2 ไอโซเลต ที่มียีน GFP พบว่าราทั้ง 2 ไอโซเลต มีความคล้ายกันซึ่งจะเกิดการเจริญจากสปอร์เป็นเส้นใยในช่วงวันที่ 7-9 และบางพื้นที่ในช่วงนี้ที่ยังไม่เกิดการก่อโรค (biotrophic phase) คือพื้นที่ที่ใบวัชพืชยังมีสีเขียว ในขณะที่บางบริเวณเกิดการก่อโรคขึ้นโดยบริเวณที่มีอาการโรคจะแสดงอาการโรคลักษณะของรอยไหม้บนใบ (leaves blight) ในบางบริเวณจะสังเกตเห็นสปอร์และเส้นใยขดพันบริเวณขนใบซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรค จนกระทั่งวันที่ 14 เกิดการก่อโรคอย่างชัดเจนบนใบวัชพืช (necrotrophic phase) ในบางส่วนของใบและพบว่าเกิดเส้นใยพันรอบผิวใบ ขน

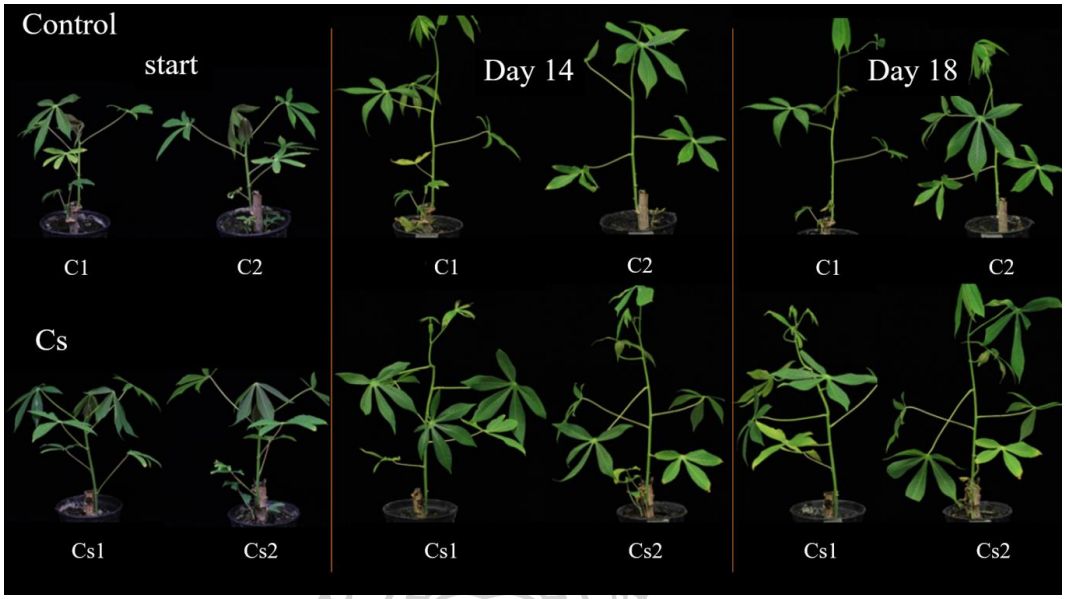
ใบ ที่ แห้งเหี่ยวในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นซึ่งการทดลองทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กันในเรื่องการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก

3. ผลการศึกษาผลกระทบของราก่อโรคกับมันสำปะหลัง

ผลการทดสอบการก่อโรคของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* กับมันสำปะหลัง

ในการทดลองใช้ชุดควบคุมมันสำปะหลัง 2 ชุดแยกกัน สำหรับผลการทดสอบการก่อโรคของ *C. siamense* และ *P. multirostrata* กับมันสำปะหลัง จากการทดลองฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* ความหนาแน่น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร บนต้นมันสำปะหลังเพื่อทดสอบผลกระทบต่อพืชเศรษฐกิจ เมื่อทำการจัดสภาพแวดล้อมการทดลองให้เหมือนการทดสอบกับวัชพืชตีนตุ๊กแกพบว่าในการทดลองครั้งแรกเมื่อเวลาผ่านไป 7-18 วัน อัตราการเกิดผลกระทบต่อต้นมันสำปะหลังในชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 เป็น 4.9-14.2% ส่วนที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* เป็น 2.4-8.9% และในการทดลองครั้งที่ 2 อัตราการเกิดผลกระทบต่อต้นมันสำปะหลังในชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 เป็น 24.3% ในวันที่ 18 ส่วนที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* เป็น 23.7% ในวันที่ 18 เช่นกันและพบว่าไม่มีการตายของต้นมันสำปะหลังทั้ง 5 ซ้ำ ดังตารางที่ 7 ซึ่งลักษณะการเหี่ยวเฉาของใบมันสำปะหลังอาจเกิดจากปัจจัยการขาดธาตุอาหารเป็นหลักเพราะใบมีลักษณะเหลืองรวมถึงอาจมาจากการก่อโรคบางส่วนของ *C. siamense* บนใบมันสำปะหลัง ส่วนชุดควบคุมสามารถโตได้ตามปกติ ดังรูปที่ 45

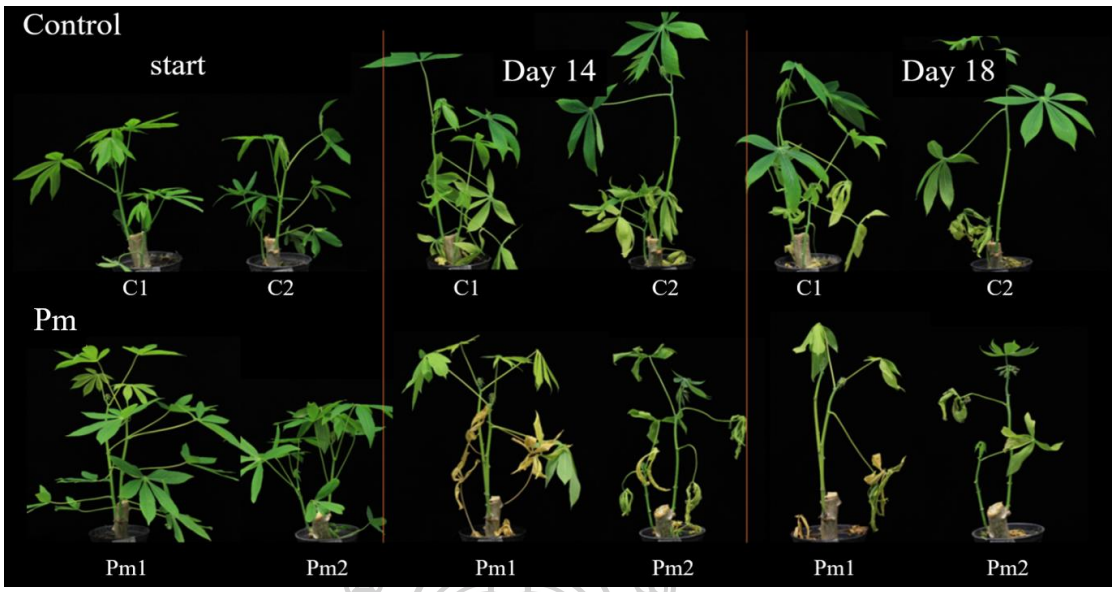
จากรูปที่ 45 แสดงถึงการก่อโรคหรือผลกระทบจาก *C. siamense* ต่อมันสำปะหลังค่อนข้างน้อย ต่อมาจากการฉีดพ่นสปอร์ *P. multirostrata* ความหนาแน่น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร บนต้นมันสำปะหลังเพื่อทดสอบผลกระทบต่อพืชเศรษฐกิจ เมื่อทำการจัดสภาพแวดล้อมการทดลองให้เช่นเดียวกับการทดสอบกับวัชพืชตีนตุ๊กแกพบว่า ในการทดลองครั้งแรกเมื่อเวลาผ่านไป 7-18 วัน อัตราการเกิดผลกระทบต่อต้นมันในชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 เป็น 0.7-9.2% ส่วนที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* เป็น 3.1-81.3% และในการทดลองครั้งที่ 2 อัตราการเกิดผลกระทบต่อต้นมันในชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.1% tween-80 เป็น 29.2% ในวันที่ 18 ส่วนที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* เป็น 43.8% ในวันที่ 18 เช่นกัน พบว่ามีการตายของต้นมันสำปะหลังทั้ง 2 ต้นจาก 5 ต้นจากการทดลองครั้งที่ 1 นอกนั้นใบค่อนข้างเหี่ยวแห้งเป็นส่วนใหญ่ของต้นโดยการทดลองครั้งที่ 2 พบการเหี่ยวแห้งและใบร่วงหลุดจากต้นแต่ไม่พบการตาย ดังตารางที่ 7 ซึ่งลักษณะการเหี่ยวเฉาของใบมันสำปะหลังอาจเกิดจากปัจจัยธาตุอาหารเพราะใบมีลักษณะเหลืองรวมถึงอาจมาจากการก่อโรคส่วนใหญ่ของ *P. multirostrata* บนใบมันสำปะหลัง ส่วนชุดควบคุมสามารถโตได้ตามปกติ ดังรูปที่ 46



รูปที่ 45 ลักษณะต้นมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *C. siamense* ความเข้มข้น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Cs1 และ Cs2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และ วันที่ 18 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ)

ตารางที่ 7 ผลการก่อโรคของรา *P. multirostrata* และ *C. siamense* ในมันสำปะหลังของการทดลองครั้งที่ 1 และ 2

การทดลองครั้งที่	ร้อยละการก่อโรคในมันสำปะหลัง				
	วันที่	ชุดควบคุม 1	*P. multirostrata*	ชุดควบคุม 2	*C. siamense*
1	7	0.7±1.1	3.1±1.9	4.9±4.0	2.4±1.8
	14	3.7±5.7	60.6±32.7	7.0±8.5	3.0±4.2
	18	9.2±6.8	81.3±17.4	14.2±13.6	8.9±8.5
2	7	0.1±0.2	2.2±3.3	5.6±4.1	6.8±9.5
	14	7.4±6.8	15.4±8.2	15.7±4.7	18.2±18.2
	18	29.2±23.4	43.8±21.3	24.3±5.1	23.7±17.2



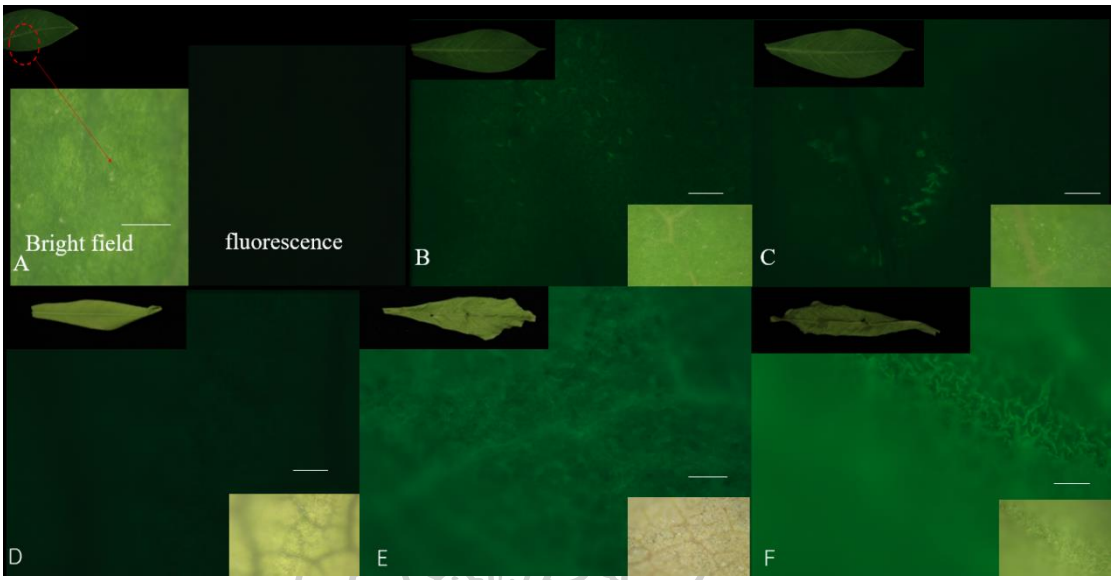
รูปที่ 46 ลักษณะต้นมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์รา *P. multirostrata* ความเข้มข้น 1 x 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร (Pm1 และ Pm2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) และ ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 สำหรับชุดควบคุม (C1 และ C2 คือ ซ้ำที่ 1 และ 2) ในวันเริ่มฉีดพ่น, วันที่ 14 และ วันที่ 18 (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ)

จากการทดลองราก่อโรคในมันสำปะหลังพบว่า *C. siamense* มีผลกระทบต่อมันสำปะหลังค่อนข้างน้อยโดยทั้ง 2 การทดลองพบว่ามีอัตราการเกิดโรค 8.9-23.7% ซึ่งอยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้กับต้นวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังได้ ส่วน *P. multirostrata* ส่งผลกระทบต่อมันสำปะหลังค่อนข้างมากโดยทั้ง 2 การทดลองพบว่ามีอัตราการเกิดโรค 43.8-81.3% อย่างไรก็ตาม *P. multirostrata* สามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้มากถึง 92-100% ในวันที่ 18 หลังการฉีดพ่นจึงสามารถนำไปใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในบริเวณเป้าหมายอื่นๆได้

ผลการศึกษาระยะการก่อโรคของรา *C. siamense* และ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP ในมันสำปะหลัง

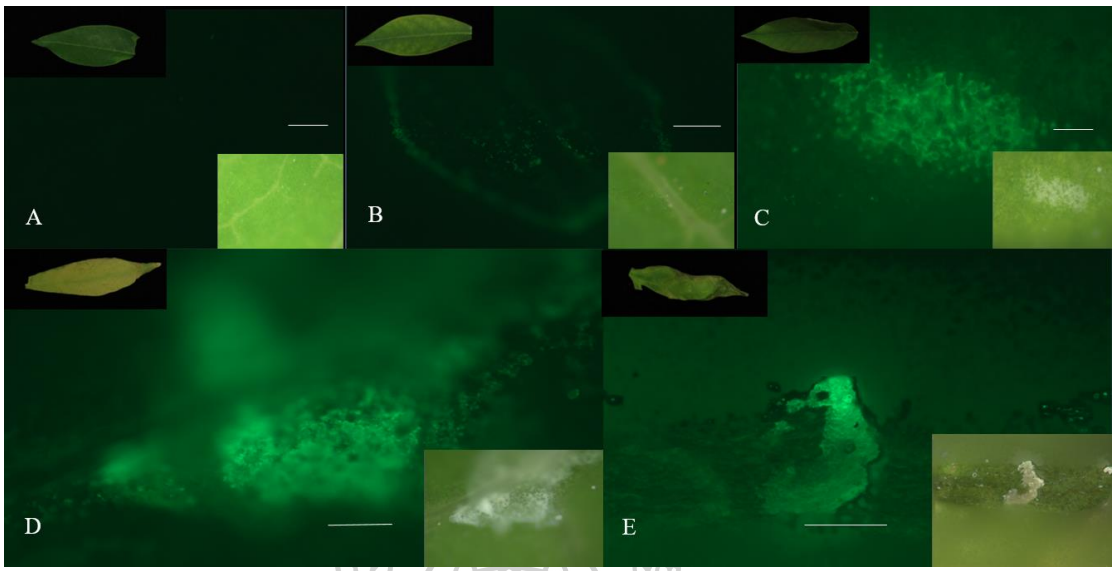
ผลการศึกษาการก่อโรคของ *C. siamense* ที่แทรกยีน GFP ในมันสำปะหลังภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ซึ่งเตรียมสภาพการทดลองเช่นเดียวกับตีนตุ๊กแก พบว่าชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ไม่พบสปอร์ ส่วนวันที่ 4 หลังการฉีดพ่นพบว่ามีการเกาะติดของสปอร์แต่ไม่ปรากฏการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์และเมื่อถึงวันที่ 8 ไม่พบการเกาะติดของสปอร์อาจเกิดการหลุดของสปอร์เนื่องจากสปอร์ไม่เกิดการพัฒนา เมื่อถึงวันที่ 14-18 หลังการฉีดพ่น พบว่าใบมันสำปะหลังที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งนั้นไม่มีรอยโรคและไม่พบการพัฒนาของสปอร์เป็นเส้นใยบริเวณผิวใบแบบที่เกิดขึ้น

ในวัชพืชตีนตุ๊กแก แต่เกิดการเหี่ยวโดยธรรมชาติเมื่อศึกษาภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จะเห็นเฉพาะสีเขียวที่เกิดจาก auto fluorescence ตามรอยย่นในธรรมชาติเท่านั้นซึ่งไม่พบลักษณะของเซลล์รา *C. siamense* ดังรูปที่ 47



รูปที่ 47 ลักษณะใบมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP ที่ระยะเวลาต่างๆคือ **A.** วันเริ่มฉีดพ่น (ชุดควบคุม) (bar, 50 μm) **B.** วันเริ่มฉีดพ่นด้วยสปอร์ *C. siamense* ที่มียีน GFP (bar, 50 μm) **C.** วันที่ 4 (bar, 50 μm) **D.** วันที่ 8 (bar, 50 μm) **E.** วันที่ 14 (bar, 50 μm) และ **F.** วันที่ 18 (bar, 50 μm)

ต่อมาทำการทดลองในมันสำปะหลังโดยฉีดพ่นด้วยสปอร์ของ *P. multirostrata* และจัดสภาพแวดล้อมให้เหมือนการทดลองข้างต้น พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปตั้งแต่วันที่เริ่มฉีดพ่น พบการเกาะติดของสปอร์บนใบมันสำปะหลังในส่วนของใบมันสำปะหลังที่ทำการฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* แต่ไม่พบการเกาะติดของสปอร์ในชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วย 0.1% tween-80 ดังรูปที่ 48A-48B ในวันที่ 7 มีบางส่วนของใบที่เขียวมีลักษณะคล้ายราเกิดขึ้นบนใบมันสำปะหลังจนกระทั่งวันที่ 14 - 18 พบการเจริญของเส้นใยบางส่วนบริเวณใบของมันสำปะหลัง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุการก่อโรคกับมันสำปะหลังดังรูปที่ 48C-48E จากการทดลองพบว่ารา *P. multirostrata* มีการก่อโรคต่อต้นมันสำปะหลังอย่างชัดเจน



รูปที่ 48 ลักษณะใบมันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP ที่ระยะเวลาต่างๆคือ **A.** วันเริ่มฉีดพ่น (ชุดควบคุม) (bar, 50 µm) **B.** วันเริ่มฉีดพ่นด้วยสปอร์ *P. multirostrata* ที่มียีน GFP (bar, 100 µm) **C.** วันที่ 7 (bar, 50 µm) **D.** วันที่ 14 (bar, 50 µm) **E.** วันที่ 18 (bar, 100 µm)

จากการทดลองที่ผ่านมาจะพบว่า *P. multirostrata* สามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกได้ชัดเจนทั้งการทดลองความรุนแรงในการก่อโรคและการติดตามระยะการก่อโรคภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ โดย *C. siamense* มีผลกระทบน้อยสำหรับการก่อโรคในมันสำปะหลังซึ่งในช่วงสัปดาห์ที่ 2 หลังการฉีดพ่นสปอร์ ไม่พบการเจริญเป็นเส้นใยแสดงให้เห็นว่า *C. siamense* ไม่จำเพาะต่อการก่อโรคในมันสำปะหลัง ดังนั้นจึงใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังได้แต่ *P. multirostrata* มีผลกระทบค่อนข้างมากสำหรับการก่อโรคในมันสำปะหลังแต่สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในพื้นที่เป้าหมายอื่นๆต่อไป

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างวัชพืชใบกว้างที่แสดงอาการโรคมาแยกราแล้วทดสอบความรุนแรงในวัชพืชตีนตุ๊กแกแสดงให้เห็นว่า ราที่อยู่ในกลุ่มที่แยกจากวัชพืชใบกว้างบางไอโซเลตสามารถก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแก ซึ่งเป็นหนึ่งในวัชพืชใบกว้างได้ โดยเฉพาะ *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงกับตีนตุ๊กแก ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการใช้รา 2 ไอโซเลตนี้ควบคุมตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังมาก่อน โดยเฉพาะการใช้สปอร์รา จากการทดลองการเพิ่มปริมาณสปอร์ของราโรคพืชทั้ง *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 พบว่าสามารถผลิตสปอร์ได้ในอาหารแข็งสูตร OMA เนื่องจากอาหารสูตรนี้มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสปอร์ของราโรคพืชและสปอร์ของราก่อโรคพืชนั้นมีผลต่อการก่อโรคในพืชอย่างมาก (ชลิดา, 2557) จึงมีปริมาณสปอร์ที่มากพอสำหรับการก่อโรคในวัชพืชตีนตุ๊กแกคือที่ความหนาแน่นสปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร จากรายงานผลการทดลองก่อนหน้านี้ ราสายพันธุ์ *Colletotrichum* sp. เป็นราที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพืชเศรษฐกิจทั่วไป (Agrios, 2004; Hyde และคณะ, 2009, 2014; Cannon และคณะ, 2012) ส่วนใหญ่ในผลไม้และผัก การก่อโรคในใบ, ต้นหัวใต้ดิน และเมล็ด (Damm และคณะ, 2012; Udayanga และคณะ, 2013) ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีพืชเจ้าบ้านที่แตกต่างกัน แต่ลักษณะอาการโรคที่เกิดกับพืชเจ้าบ้านนั้นมีอาการรอยไหม้และจุดด่างสีน้ำตาล สำหรับ *C. siamense* Cs1 บนวัชพืชตีนตุ๊กแกก่อโรคใบไหม้ชัดเจนคล้ายอาการจากโรคแอนแทรคโนส ซึ่งลักษณะวงจรชีวิตของ *Colletotrichum* sp. เมื่อเทียบกับ *C. siamense* Cs1 ที่มียีน GFP ในการทดลองการติดตามการก่อโรค จะมีช่วงที่เป็น biotrophic phase และ necrotrophic phase ซึ่งช่วงที่เป็น biotrophic phase คือช่วงที่สปอร์เกิดการงอก (germination) ของสปอร์และติดบนชิ้นส่วนพืชเช่น ใบ ผล ลำต้น หรือ ยอด และเกิดการเจริญบนชิ้นส่วนพืช โดยในระยะนี้ราจะแทงส่วนของเส้นใยเข้าไปในเซลล์พืชเพื่อดูดซับสารอาหาร (Mendgen และ Hahn, 2002) โดยที่เซลล์ของพืชนั้นยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งส่วนที่งอกจากสปอร์และแทงเส้นใยบุกเข้าไปเรียกว่า Appressorium ซึ่งจะทำการดูดซึมสารที่สำคัญในการดำรงชีวิต เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน (Agrios, 2004; De Silva และคณะ, 2016) ช่วง biotrophic phase นี้ชิ้นส่วนพืชที่ถูกรุกรานยังไม่แสดงอาการโรคให้เห็นชัดเจน ซึ่งเซลล์พืชหรือเซลล์เจ้าบ้านมีการหลั่งสารจำพวกโปรตีนหรือเอนไซม์มาต่อต้านเส้นใยที่บุกรุกเซลล์ เป็นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (Dou และ Zhou, 2012; O'Connell และคณะ, 2012; Gan และคณะ, 2013; Guyon และคณะ, 2014) ต่อมาเมื่อเส้นใยของราที่บุกรุกหรือ *Colletotrichum* sp. เจริญมากขึ้นจากการดูดซับสารจากต้นพืชและจะเริ่มขยายพื้นที่ในการรุกล้ำของเส้นใยไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งเซลล์เดิมที่ถูกรุกล้ำจะมีอาการเกิดโรคชัดเจนเมื่อเซลล์พืชเริ่มตายลง ทำให้การสังเกตด้วยตาเห็นเป็นโรครอยไหม้ หลังจากนั้นเส้นใยจะบุกรุกเข้าไปในเซลล์พืชที่ยังมีชีวิตอยู่ต่อไปซึ่งวงจรนี้จะเข้าสู่ necrotrophic phase เป็น

วงจรที่เกิดการก่อโรคขั้นที่ 2 หรือ secondary infection (Perfect และคณะ, 1999; Barimani และคณะ, 2013) ทำให้เซลล์พืชแห้งตาย จากจุดเล็กๆจนกระทั่งทั้งต้น

การผลิตชีวภัณฑ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น BioMal ซึ่งเป็นชีวภัณฑ์ทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. malvae ใช้ควบคุม leaf mallow (*Malva pusilla*) (Mortensen, 1988) และในอเมริกายังใช้สายพันธุ์นี้ควบคุม northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) โดยเริ่มการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในปี 1982 ในชื่อ Collego โดยใช้ *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Daniel และคณะ, 1973) นอกจากนั้นยังมี *C. truncatum* ที่ใช้ควบคุมต้นโสนหรือ hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) (Schisler และคณะ, 1991) และใช้ควบคุม spiny cocklebur (*Xanthium spinosum*) (Auld และคณะ, 1988, 1990) และจากรายงานยังพบว่ารา *C. gloeosporioides* และ *C. orbiculare* ในขณะที่กำลังบุกรุกเซลล์พืชสามารถสร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชและหลั่งสาร small secreted proteins (SSPs) เข้าไปในเซลล์พืช ซึ่งมีผลต่อการก่อโรคในพืชอีกด้วย (Gan และคณะ, 2013) สำหรับรายงานวิจัยนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *C. siamense* Cs1 ในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแก สำหรับการฉีดพ่นสปอร์ *C. siamense* Cs1 บนวัชพืชตีนตุ๊กแก พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมวัชพืชชนิดนี้ และมีผลกระทบต่อพืชเศรษฐกิจอย่างมันสำปะหลังต่ำ จึงสามารถใช้ในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในแปลงมันสำปะหลังได้ สำหรับ *P. multirostrata* Pm1 ไม่เคยรายงานการใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกเช่นกัน โดยเฉพาะการใช้สปอร์ในการควบคุมวัชพืช แต่จากรายงานก่อนหน้านี้ พบการสร้างสารพิษของ *Phoma* sp. ต่อพืช หรือ phytotoxin ซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์อย่างเช่น *Phoma herbarum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากใบ dandelion ที่แสดงอาการโรคโดยใช้ควบคุมต้น dandelion (Neumann และ Boland, 1999; Stewart-Wade และ Boland, 2005) นอกจากนี้ยังมี *Phoma macrostoma* ซึ่งใช้ควบคุมวัชพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป (Bailey และคณะ, 2011, 2013; Smith และคณะ, 2015) โดยจะมีการหลั่งสาร macrocidins (Graupner และคณะ, 2003) ซึ่งมีผลเฉพาะวัชพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้นและไม่มีผลกระทบต่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Bailey และคณะ, 2011) ในการศึกษานี้พบว่า *P. multirostrata* Pm1 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแก (88.6-92%) และเมื่อทำการยืนยันการก่อโรคของรานี้ที่มี GFP พบลักษณะการงอกของสปอร์ในวันที่ 7 และพบการแทรกตัวของเส้นใยที่ขนใบรวมถึงพบเส้นใยที่เจริญรอบบริเวณใบและต้น ส่วนในบริเวณที่เกิดรอยโรครอบเส้นใยของราเกิดจากการหลั่งสารบางอย่างของราที่มีผลในการก่อโรคดังที่กล่าวมาจากการศึกษาของ *Phoma* sp. สายพันธุ์อื่น

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การแยกราจากตัวอย่างวัชพืชใบกว้างต่างๆคือ ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*), ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri.*), หมอน้อย (*Vernonia cinerea*), บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides.*), ไมยราบป่า (*Mimosa pudica*), Unknown2 และ กะเม็ง (*Eclipta prostrata*) สามารถแยกราได้ 7 ไอโซเลต พบว่า *Colletotrichum siamense* Cs1 ที่แยกจากวัชพืช กะเม็ง และ *Phoma multirostrata* Pm1 จากวัชพืชหมอน้อย มีประสิทธิภาพในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแกแกสูง และนำมาทดสอบการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก

จากการศึกษาราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกแบบชีววิธีพบว่า รา *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแก โดยยืนยันจากผลการทดลองความรุนแรงในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก พบว่าสปอร์ *C. siamense* Cs1 มีความรุนแรงในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแกสูงในช่วง 79.6-100% (การทดลอง 3 ครั้ง) เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ทั้งความชื้นสัมพัทธ์ช่วง 65-75% และการให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองความรุนแรงในการก่อโรคบนวัชพืชตีนตุ๊กแก พบอาการโรคโดยเป็นรอยไหม้บริเวณผิวใบในช่วง 14 วันหลังการฉีดพ่นสปอร์ ซึ่งเข้าสู่ช่วง necrotrophic phase จนเหี่ยวแห้งในเวลาวันที่ 18 จากการยืนยันการก่อโรคด้วยการศึกษาสปอร์ราที่มียีน GFP ในรา *C. siamense* Cs1 เมื่อทำการฉีดพ่นสปอร์สามารถติดตามระยะการก่อโรคของราโรคพืช โดยทำการส่องตัวอย่างใบวัชพืชที่ถูกราเข้าทำลายภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ และเพื่อทำการศึกษากระบวนการก่อโรคของราโรคพืชบนวัชพืชตีนตุ๊กแกและผลกระทบต่อมันสำปะหลัง พบการเจริญเป็นเส้นใยชัดเจนของ *C. siamense* Cs1 ในวันที่ 7 แต่ยังไม่แสดงอาการโรค (ช่วง biotrophic phase) จนกระทั่งวันที่ 14 เกิดการเจริญของเส้นใยไปทั่วบริเวณใบ ขนใบ และลำต้น (ช่วง necrotrophic phase) จนกระทั่งวันที่ 18 ที่วัชพืชเริ่มแห้งตายและเต็มไปด้วยเส้นใยทั่วบริเวณใบและต้นพืช โดยในสัปดาห์ที่ 2 *C. siamense* Cs1 มีการสร้าง เส้นใยเทียม หรือ pseudohyphae เป็นลักษณะพิเศษที่เกิดในภาวะความกดดันเช่น ขาดสารอาหาร หรือสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อ *C. siamense* Cs1 นอกจากนี้พบว่า *P. multirostrata* Pm1 ที่ใช้ในการทดลองมีประสิทธิภาพ ในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกเช่นกันเนื่องจากสร้างความเสียหายให้กับวัชพืชตีนตุ๊กแกได้ถึง 88.6-100% เมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมคือ ความชื้น 65-75% และช่วงแสง 12 ชั่วโมง ทำให้ *P. multirostrata* Pm1 สามารถควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดลองที่มีรายงานไว้พบว่า *Phoma* sp. มีการก่อโรคในพืชโดยอาจบุกรุกทางบาดแผล หรือเข้าบุกรุกโดยตรงทางชั้นผิวเซลล์หรือชั้นเอพิเดอมิส ซึ่งลักษณะการเจริญหลังจากที่สปอร์สัมผัสบนชิ้นส่วนพืชและเจริญเป็นเส้นใยแทรกเนื้อเยื่อระหว่างเซลล์พืช (Hammond and

Lewis, 1987) ซึ่งในระยะแรกยังไม่แสดงอาการคือช่วง biotrophic phase จากการทดลองนี้ช่วงวันที่ 7-9 พบว่าเกิดการงอกของสปอร์บนใบวัชพืชตีนตุ๊กแก และพบการแทรกตัวบางส่วนบริเวณขนใบ แต่ยังไม่พบส่วนใบบริเวณที่มีรอยโรคเกิดขึ้นหรืออาจพบบางส่วนมีอาการเล็กน้อยจนกระทั่งวันที่ 14 พบการเกิดโรคเริ่มเข้าสู่ช่วง necrotrophic phase กระทั่งวัชพืชแห้งเหี่ยวในวันที่ 18

จะเห็นว่าราทั้ง 2 ไอโซเลต นี้ มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแก เมื่อนำการทดลองในรูปแบบเดียวกันมาทดสอบผลกระทบต่อมันสำปะหลังโดยในการทดลองใช้ชุดควบคุม 2 ชุด แยกกันระหว่าง 2 เชื้อ พบว่า *C. siamense* Cs1 มีผลกระทบต่อมันสำปะหลัง 8.9-23.7% ซึ่งอยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ *P. multirostrata* Pm1 ที่ส่งผลกระทบต่อมันสำปะหลัง 43.8-81.3% ซึ่งอยู่ในระดับที่สูง เมื่อทำการติดตามการก่อโรคด้วยราที่มียีน GFP พบว่าเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งสปอร์ของ *C. siamense* Cs1 จะเสื่อมสลายลงเนื่องจากไม่สามารถใช้สารอาหารจากต้นมันสำปะหลังในการเจริญได้และไม่ก่อโรคบนใบและต้นมันสำปะหลัง ส่วนหนึ่งมาจากลักษณะผิวใบที่เรียบกว่าผิวใบวัชพืชตีนตุ๊กแกและอาจไม่ใช่พืชเจ้าบ้านที่จำเพาะต่อรา *C. siamense* Cs1 จึงไม่เกิดการก่อโรค ในขณะที่ *P. multirostrata* Pm1 พบลักษณะเส้นใยที่เรืองแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์บนใบมันสำปะหลังซึ่งมีแนวโน้มเดียวกับการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรค แม้ว่าจะเกิดผลกระทบกับพืชเศรษฐกิจมันสำปะหลังค่อนข้างสูงถึง 43.8-81.3% แต่ *P. multirostrata* Pm1 เป็นราที่ใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกได้

จากการวิจัย ราเพื่อการควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกนี้พบว่า *C. siamense* Cs1 และ *P. multirostrata* Pm1 เป็นราไอโซเลตที่สามารถใช้ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกได้ หวังว่าการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่การพัฒนาราสองไอโซเลตเพื่อเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมวัชพืชตีนตุ๊กแกในอนาคตต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก

1. วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมด้วยยา Streptomycin ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Potato dextrose broth	9.6	กรัม
วุ้น (Agar) 1.5 %	6	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อาหารอุ่นก่อนเติมด้วยยา Streptomycin 2.8 มิลลิลิตร

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Oatmeal agar ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Oatmeal (บดเป็นผงละเอียด)	12	กรัม
วุ้น (Agar) 2 %	8	กรัม

ต้ม Oatmeal ให้เดือดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยการเติมน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตรแล้วต้ม 15 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Yeast extract (SDY) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Sabouraud dextrose broth	12	กรัม
Yeast extract	4	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luberia-Bertani (LB) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Luberia-Bertani (LB)	10	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potatoes dextrose broth (PDB) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Potato dextrose broth	9.6	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. วิธีการเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียม Sodium hypochlorite (NaClO) 0.5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sodium hypochlorite (NaClO) 6%	8	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	92	มิลลิลิตร

ทำการผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อกับ Sodium hypochlorite (NaClO) ลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ

2.2 การเตรียม Lysis buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

8.0 M LiCl	250	ไมโครลิตร
0.25 M EDTA	800	ไมโครลิตร
1.0 M Tris (pH 7.5)	200	ไมโครลิตร
20% SDS	500	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	18.25	มิลลิลิตร

ทำการปิเปตสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ลงในหลอดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

2.3 การเตรียม agarose gel electrophoresis ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สำหรับขั้นตอน Gel electrophoresis

Agarose 1 %	1	กรัม
0.5 M TAE buffer	100	มิลลิลิตร

ชั่ง Agarose 1 กรัม เติมสารละลาย 0.5 M TAE buffer ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปลอด

เชื้อจากนั้นให้ความโดยการนำเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ผงวุ้นละลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

2.4 การเตรียม Filter sterilize water ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

0.7 M NaCl	14	มิลลิลิตร
Novozyme	0.7	กรัม
β-mercaptoethanol	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	6	มิลลิลิตร

ทำการปิเปตสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ลงในหลอดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

3. วิธีการปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังส่วนใหญ่นิยมปลูกด้วยท่อนพันธุ์และมีระยะปลูกค่อนข้างห่างโดยจะใช้ระยะระหว่างแถว 1 เมตร และระยะระหว่างต้น 1 เมตร เก็บเกี่ยวที่อายุ 8-12 เดือน ซึ่งการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังระยะแรกช้าโดยใบแรกเริ่มคลี่ให้เห็นได้หลังจากปลูกประมาณ 3-4 เดือนหลังจากปลูกประมาณ 3 สัปดาห์ และต่อมาจะสร้างพุ่มใบให้ชนกันจนคลุมพื้นที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือนหลังจากปลูกมันสำปะหลังเริ่มเอาอาหารไปเก็บที่ราก ที่เรียกว่า “การลงหัว” โดยประมาณเดือนครึ่งถึง 2 เดือนหลังจากปลูก และหลังจาก 4 เดือน ไปแล้วไม่มีการลงหัวเพิ่ม แต่จะขยายขนาดหัวให้ใหญ่ขึ้นจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ในการทดลองนี้ใช้ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังความสูงโดยประมาณ 15 เซนติเมตร ปักลงกระถาง กระถางละ 1 ท่อนพันธุ์และบ่มในโรงเรือนจนกระทั่งอายุ 1 เดือนจึงนำต้นมันสำปะหลังมาทดสอบ

4. วิธีการปลูกวัชพืชตีนตุ๊กแก

ทำการเก็บต้นอ่อนของวัชพืชตีนตุ๊กแกและนำต้นอ่อนที่มีราก ความสูงโดยประมาณ 5-10 เซนติเมตรปลูกลงกระถางและบ่มในโรงเรือนจนกระทั่งอายุ 45 วัน จึงนำมาทดสอบ

5. วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา

ทำการตัดชิ้นส่วนราบนอาหารแข็งที่ได้จากข้อ 3 เป็นชิ้นขนาด 2x2 เซนติเมตร แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร 1% Sabouraud Dextrose Yeast extract (SDY) ในฟลาสค์รูปชมพู่นำไปเข้าตู้เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 วัน เมื่อครบเวลาแล้วทำการเก็บเซลล์จากฟลาสค์รูปชมพู่มาใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในตู้ทำความเย็น – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาพแข็ง จากนั้นทำให้เซลล์แห้งโดยเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพแห้งให้นำเซลล์ที่แห้งแล้วมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้สารละลายไนโตรเจนซึ่งการที่ทำการ freeze dry ก่อนจะทำให้น้ำในเซลล์แข็งและแห้งทำให้สามารถบดได้ละเอียดและเพิ่มพื้นที่ผิวเซลล์ในการย่อยด้วยเอนไซม์มากขึ้น และนำผงเซลล์ละเอียดมาทำการสกัดดีเอ็นเอ (Reader และ Broda, 1985) โดยเริ่มจากใส่ผงเซลล์ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยให้ผงเซลล์อยู่ในระดับขีด 0.1 มิลลิลิตร ต่อมาใส่ Lysis buffer 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปปั่นที่เครื่อง vortex ให้เซลล์กระจายทั่วที่สุดเพื่อเป็นการทำให้เซลล์แตก จะสังเกตเห็นฟองอากาศที่เกิดจาก SDS ที่เป็นส่วนผสมของ Lysis buffer ต่อมาใส่ Phenol : Chloroform : Isoamyl อัตราส่วน 25 : 24 :1 400 ไมโครลิตร เพื่อทำให้

ตกตะกอนโปรตีน แล้วปิดฝาหลอดทดลองแล้วกลับหลอด ขึ้น-ลง อย่างเบา 30 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที หลังจากที่ปั่นเหวี่ยงจะพบว่าเกิดการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ให้ดูดสารละลายชั้นบนสุดเท่านั้นมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ หลังจากนั้นใส่ chloroform 750 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอด ขึ้น-ลง อย่างเบา 30 ครั้ง จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที จะพบว่าเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้นให้ดูดชั้นบนสารละลายชั้นบนสุดมาใส่หลอดใหม่แล้วจึงใส่ chloroform 750 ไมโครลิตร อีกครั้งแล้วทำการกลับหลอด ขึ้น-ลงอย่าง เบา 30 ครั้งแล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง ต่อมาดูดสารละลายชั้นบนสุดมาใส่หลอดทดลองใหม่แต่ละหลอดให้ใส่ isopropanol ขณะเย็น 1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการตกตะกอนสายดีเอ็นเอ แล้วทำการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้งจะเห็นตะกอนสาย DNA พันขดกันหลังจากนั้นให้แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของสายดีเอ็นเอ เมื่อนำออกจากตู้เย็นแล้วให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที 4 องศาเซลเซียส ต่อมาจึงใส่ 75% Ethanol 750 ไมโครลิตร เพื่อทำความสะอาดตะกอนดีเอ็นเอ แล้วจึงดูดสารละลาย ขึ้น-ลง เพื่อให้ตะกอนหลุดลอยในสารละลายแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิมให้ตกตะกอนอีกครั้ง หลังจากนั้นใส่ Absolute Alcohol ขณะเย็น 750 ไมโครลิตร เพื่อช่วยดูดซับน้ำทำให้ตะกอนแห้งเร็วต่อมาดูดตะกอน ขึ้น-ลง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิมหลังจากนั้นเทสารละลายส่วนใสออกเหลือแต่ตะกอนไว้ให้ตากในตู้เขี่ยเชื้อประมาณ 30 นาที เพื่อให้ตะกอนแห้ง เมื่อตะกอนแห้งแล้วให้ใส่ Nuclease free water 40 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอแล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอนี้ไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอ ต่อมาจึงตรวจหาดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เป็นการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการใช้ 1% Agarose gel เป็นแผ่นวุ้นในการหยอดสารละลาย และใช้ Thermo Scientific O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker DNA) โดยทำการหยอด 1 kb Plus DNA Ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ส่วนสารละลายดีเอ็นเอจะใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสม 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อให้เห็นขนาดดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำการเปิดเครื่อง gel electrophoresis และปรับกระแส 400 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

6. วิธีการทำความสะอาดผลิตภัณฑ์จาก PCR ด้วยชุด kit ของ Fermentas

นำหลอดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Binding buffer โดยสารละลายนี้จะไปจับกับสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนต่างๆ ในปริมาตร 1:1 คือใส่ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนแล้วทำการ spin down 10 วินาที แล้วย้ายสารผสมลงคอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนของดีเอ็นเอจะเกาะติดอยู่ในคอลัมน์และสารอินทรีย์ต่างๆจะถูกชะลงมาด้านล่างหลอดทดลองจึง

ทำการล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีโดยเป็นการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้นแล้ว ทำขั้นตอนการชะดีเอ็นเอ (Elute purified DNA) โดยนำคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่นำไปปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีส่วนของดีเอ็นเอก็จะหลุดออกมาที่หลอดทดลองจึงได้ดีเอ็นเอในส่วนที่บริสุทธิ์

7. Gene JET Plasmid Miniprep Kit

ขั้นตอนแรก ละลายตะกอนด้วย Resuspension buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม Lysis buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดขึ้น-ลง ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน, เติม Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ต่อมาดูดส่วนใสลงในคอลัมน์สกัด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และนำสารละลายที่ไม่ต้องการออก ต่อมาเติม washing buffer 700 ไมโครลิตร เพื่อชะล้างสารอินทรีย์ต่างๆออก ต่อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ไม่ต้องการออก (ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 1 ครั้ง) ต่อมานำคอลัมน์เดิมไปปั่นอีกรอบเพื่อชะคอลัมน์ให้แห้งที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ต่อมานำคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Elution buffer) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยเติมปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนคอลัมน์แล้ววางที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ก็จะได้ส่วน พลาสมิดที่ต้องการลงมาที่หลอดทดลองแล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอพลาสมิดที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop และทำการทดสอบด้วย วิธี gel electrophoresis โดยสำหรับพลาสมิด pCT74 นี้มีขนาด 6,000 เบส ต่อมาทำขั้นตอนตรวจสอบและยืนยันความถูกต้องของขนาดพลาสมิดที่ได้เป็น pCT74 โดยแบ่งการตรวจสอบเป็นสองขั้นตอน

ขั้นที่ 1 ทำการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด โดยตัดครั้งละ 1 ชนิด เริ่มจากการตัดด้วยเอนไซม์ NcoI แล้วเตรียมสภาวะโดยเติม pCT74 (ความเข้มข้น 517 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Ncol 0.5 ไมโครลิตร 10×Tango buffer เจือจางความเข้มข้นเป็น 1x ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Sterilize water 15.5 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose gel

ขั้นที่ 2 เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้วทำการด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยเพิ่มปริมาตรเพียง 10 ไมโครลิตร แล้วเตรียมสภาวะโดยเติม EcoRI 0.5 ไมโครลิตร, 10×EcoRI buffer เจือจางความเข้มข้นเป็น 1x ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, Sterilize water 6.5 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร

จากนั้นจึงนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำ Gel electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose gel

8. วิธีการสร้างโปรโตพลาสต์และแทรกยีนในราทั้ง 2 ไอโซเลตและขั้นตอนการแยกโคโลนีเดี่ยว (ทำวิธีเดียวกันสำหรับราทั้ง 2 ไอโซเลต)

วิธีการสร้างโปรโตพลาสต์และแทรกยีนสำหรับ *Colletotrichum siamense* isolate Cs1

การทำโปรโตพลาสต์และนำพลาสมิดเข้าไปในโปรโตพลาสต์เป็นการทำให้เซลล์เชื้อราปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ เพื่อให้พลาสมิดสามารถเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ สำหรับราสายพันธุ์ *Colletotrichum siamense* isolate Cs1 โดยวิธีการนี้ได้ดัดแปลงมาจากการทำโปรโตพลาสต์ของราโรคพืชสายพันธุ์ *Colletotrichum graminicola* (Epstein, 1997) และดัดแปลงจากวิธีการของ Srisuksam และคณะ (2015) โดยมีวิธีการคือเริ่มจากการตัดชิ้นวุ้นในส่วนของสปอร์บนอาหารแข็งสูตร Oatmeal อายุ 7-14 วัน ความยาว 2x2 เซนติเมตร แล้วสับให้เป็นชิ้นเล็กๆเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Potatoes dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่เครื่อง shaker อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อทำให้ราเจริญในลักษณะเส้นใยทรงกลม (Hyphal body) เมื่อได้ลักษณะเส้นใยกลมแล้วทำการกรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ 4 ชั้น แล้วเก็บเส้นใยทรงกลมในหลอดทดลอง 50 มิลลิลิตร ต่อมาใส่สารละลาย Filter sterilize water ที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ Vinotaste ความเข้มข้น 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยอยโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 20 มิลลิลตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บผล ทุกชั่วโมง เมื่อได้โปรโตพลาสต์แล้ว นำเซลล์ที่เป็นโปรโตพลาสต์ปั่นตกด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเทส่วนสารละลายออก เติมสารละลาย STC ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายออก ต่อมาเติมด้วยสารละลาย STC ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ละลายตะกอนแล้วแบ่งสารละลายออกเป็น 3 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 และ 2 เป็นโปรโตพลาสต์ หลอดที่ 3 เป็นโปรโตพลาสต์ที่ผสมด้วยพลาสมิด pCT74 ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม และ Spermidine 5 ไมโครกรัม ต่อมาแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมด้วย Transformation solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดโปรโตพลาสต์ลงในจานเพาะเชื้อที่แบ่งไว้ 3 จานโดยจานที่ 1 เป็นอาหารแข็งสูตร PDA ซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยใส่โปรโตพลาสต์เปล่าลงไปซึ่งราที่เป็นโปรโตพลาสต์เปล่าสามารถโตได้ จานที่ 2 เป็นอาหารแข็งสูตร PDA ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้ง *Colletotrichum siamense* ได้ โดยใส่โปรโตพลาสต์เปล่าลงไปซึ่งราที่เป็นโปรโตพลาสต์เปล่าไม่สามารถโตได้และ จานที่ 3 เป็นอาหารแข็งสูตร PDA ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใส่โปรโตพลาสต์ที่มีพลาสมิด pCT74 ลงไปซึ่งราที่มี พลาสมิด pCT74 สามารถเจริญได้ เพราะในพลาสมิด

pCT74 มีการติดฉลากตัวต้านยา hygromycin phosphotransferase (*hph*) หรือ Hygromycin B (Lorang และคณะ, 2001) นำไปบ่ม 25 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วัน จะได้รา ที่มียีน GFP

วิธีการสร้างโปรโตพลาสต์และแทรกยีนสำหรับ *Phoma multirostrata* Pm1

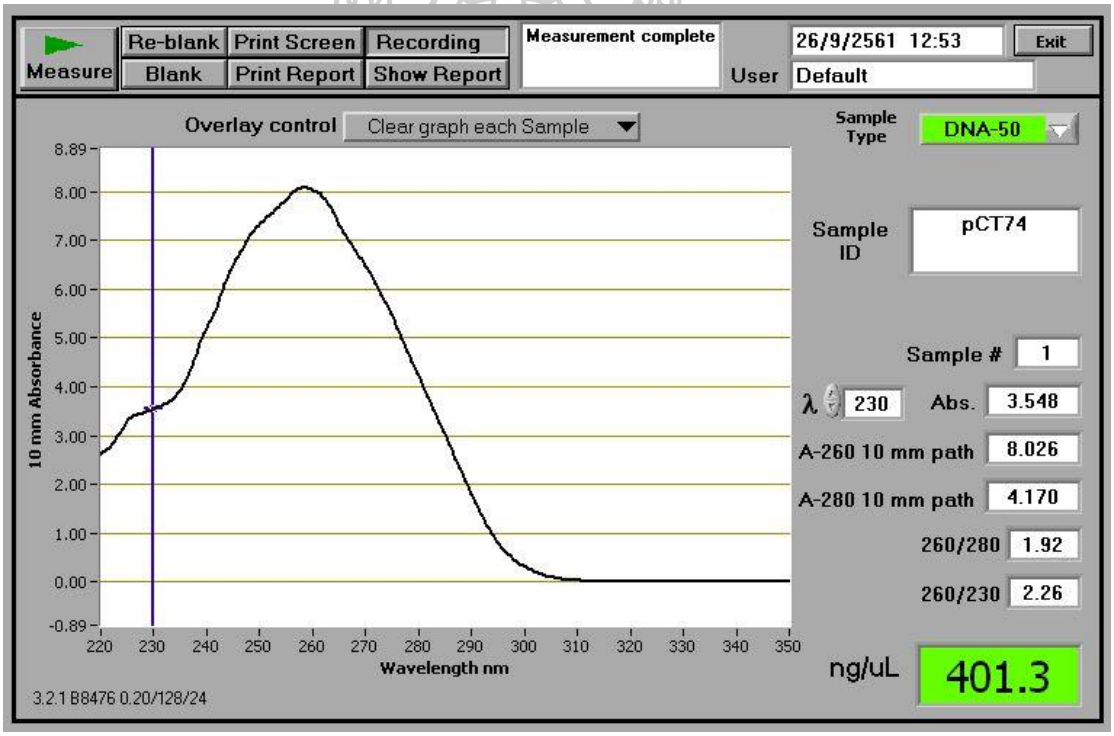
สำหรับ ทำวิธีการดัดแปลงเป็นขั้นตอนดังนี้อ้างอิงวิธีการ *Beauveria bassiana* (Srisuksam, 2015) การเตรียมเซลล์เพื่อทำการสร้างโปรโตพลาสต์เริ่มจากการเลี้ยงรา *Phoma multirostrata* บนอาหารแข็งสูตร OMA เป็นเวลา 7 วัน ทำการชะสปอร์ที่เลี้ยงบน OM ด้วยสารละลาย PDB ให้มีความเข้มข้น สปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร นำสารแขวงลอยสปอร์ 2 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการงอกของสปอร์เป็นเส้นใยแต่ไม่รวมกลุ่มกันมากจนเป็นก้อนเหมือน hyphal ball ต่อมาการย่อยเส้นใยเพื่อสร้างโปรโตพลาสต์ วิธีดัดแปลงจาก *Colletotrichum graminicola* (Epstein, 1997) เมื่อได้เส้นใยในอาหารแล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยง (แบบ fix rotor) ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายออก จากนั้นเติม 0.7M NaCl 20 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex ล้างสารละลายอาหาร PDB จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge (fix rotor) ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง) หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วให้เทสารละลายออกแล้วเติม 0.7M NaCl 20 มิลลิลิตร อีกครั้งต่อมาจะมีเส้นใยที่อยู่ใน 0.7M NaCl แล้วแบ่งสารละลายเป็น 4 หลอด (50 มิลลิลิตร) หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 เป็นชุดควบคุม หลอดที่ 2-4 เป็นชุดที่จะนำไปย่อยโดยเอนไซม์ นำชุดที่ 2-4 ไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge (fix rotor) ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายออกเหลือแต่เส้นใย แล้วเทใส่สารละลายเอนไซม์ vinotaste ความเข้มข้น 130 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว 10 มิลลิลิตร ลงไป (vinotaste ความเข้มข้น 130 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้ผงเอนไซม์ vinotaste pro 0.65 กรัม ละลายใน 0.7M NaCl 10 มิลลิลิตร แล้ว vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วแช่เก็บในน้ำแข็งตลอดเวลาก่อนนำมาใช้) นำหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ย่อยเส้นใยมาเข้าเครื่อง shaker 90 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้โปรโตพลาสต์ที่ปราศจากผนังเซลล์ เมื่อผ่านไป 16 ชั่วโมงได้โปรโตพลาสต์แล้วทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วเติม solution 6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (โดยใช้ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร) จุ่มปลายทิปที่ก้นหลอดแล้วปล่อย solution 6 อย่างระมัดระวัง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (Flexible rotor) ใน rotor ขาแมงมุมเพื่อลดแรงกระแทกและป้องกันการแตกของโปรโตพลาสต์ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนโปรโตพลาสต์ เทสารละลายออกโดยให้ตะกอนอยู่ด้านบนเพื่อป้องกันการชะตะกอนออกตามสารละลาย แล้วเติม solution 7 ปริมาตร 300-500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ

เวลาทำการแบ่งสารละลายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร 3 หลอดโดยแบ่งเป็นหลอดที่ 1 คือโปรโตพลาสต์ปริมตาร 150 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม หลอดที่ 2 และ 3 คือโปรโตพลาสต์ปริมตาร 150 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ เป็นชุดทดลองที่ต้องการแทรกพลาสมิด pCT74 โดยในหลอดที่ 1 (ชุดควบคุม) ให้เติม spermidine (เพื่อรักษาสภาพพลาสมิด) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ Transformation solution 50 ไมโครลิตร, ในหลอดที่ 2 ให้เติม spermidine ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, Transformation solution 50 ไมโครลิตร และพลาสมิด pCT74 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 3 ให้เติม spermidine ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Transformation solution 50 ไมโครลิตร และพลาสมิด pCT74 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรหลังจากนั้นนำทั้ง 3 หลอด บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ทำการเติม Transformation solution 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา ทำการผสมสารละลาย PDA ขณะอุ่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เข้ากับ สารละลาย Transformation reaction ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเทลงอาหาร PDA bottom agar 10 มิลลิลิตร ที่ผสมยา Hygromycin B ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมไว้แล้ว เมื่อเทอาหาร PDA ขณะอุ่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลาย Transformation reaction แล้วจะทำให้ความเข้มข้นยาลดลงเหลือ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน

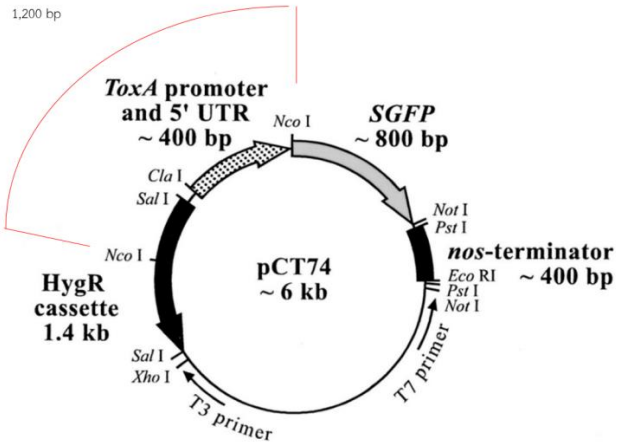
เมื่อโคโลนีของ *Phoma multirostrata* และ *Colletotrichum siamense* เจริญแล้วตามจานเพาะเชื้อ วิธีต่อมานำจานเพาะเชื้อตรวจสอบใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์แล้วใช้ปากกาวงส่วนโคโลนีหรือส่วนของเส้นใยที่มีการเรืองแสง โดยขั้นต่อไปจะนำกล้องจุลทรรศน์ sterio เข้าตู้ปลอดเชื้อโดยใช้ 75% alcohol ฉีดกระดาษทิชชูแล้วเช็ดทำความสะอาดก่อน ต่อมานำจานเพาะเชื้อที่ทำการวงสัญลักษณ์มาวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ sterio แล้วใช้ปลายเข็มฉีดยาเผาจนแดงแล้วใช้ค้อนทุบจนมีลักษณะแบนบางก่อนที่จะจุ่ม 90% alcohol แล้วเผาอีกครั้ง เมื่ออุณหภูมิลดลงแล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยเส้นใยที่ทำการวงสัญลักษณ์ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ *Phoma multirostrata* และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ *Colletotrichum siamense* แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน เมื่อ *Phoma multirostrata* เจริญแล้วนำเส้นใยที่ได้มาตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์อีกครั้งถ้าเส้นใยที่เรืองแสงสีเขียวมีความบริสุทธิ์แล้วให้ streak ลงบนอาหารสูตร Oatmeal agar (OMA) ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ *Phoma multirostrata* และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรสำหรับ *Colletotrichum siamense* เพื่อทำการผลิตสปอร์แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน อีกครั้งจนมีสปอร์เกิดเมื่อสปอร์เกิดขึ้นแล้วทำการชะสปอร์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนับสปอร์ในที่นี้ได้ความหน้าแน่นสปอร์ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ทำการเจือจางลง 100 เท่า แล้วใช้ปริมาตรสปอร์ 100 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหาร ½ PDA จนแห้งแล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 2 วัน เมื่อเกิดการงอกของเส้นใยแล้วนำมาตรวจสอบที่ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์จะเห็นว่าแต่ละโคโลนีแยกกันชัดเจนและมีสีเขียวแล้วทำการวงสัญลักษณ์แล้วแยกโคโลนีภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ sterio แบบที่เคยทำ โดยใช้ปลายเข็มฉีดยาเขี่ยโคโลนีเดี่ยวออกมาเลี้ยงบนอาหาร Oatmeal agar (OMA) ที่ผสมด้วยยา Hygromycin B ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรสำหรับ *Phoma multirostrata* และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรสำหรับ *Colletotrichum siamense* แล้วบ่มที่ห้องบ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีแสงไฟตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน จะได้โคโลนีเดี่ยว (single colony)

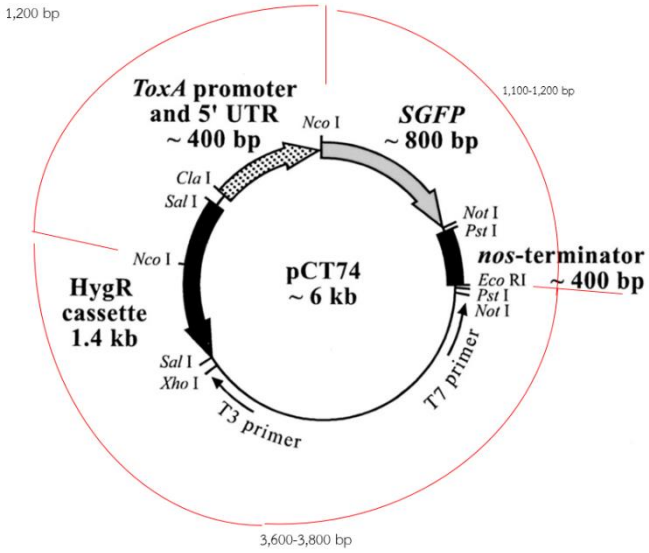
9. วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pCT74 ด้วยเครื่อง nano drop พบว่าได้ความเข้มข้น 401 นาโนกรัม/ไมโครลิตร



10. ตำแหน่งของการตัดพลาสมิด pCT74 ด้วยเอนไซม์ *Nco* I (Lorang, 2001)



11. ตำแหน่งของการตัดพลาสมิด pCT74 ด้วยเอนไซม์ *Nco* I และ *Eco* RI (Lorang, 2001)



รายการอ้างอิง

Agrios, G. (2004). Losses caused by plant diseases. *Plant Pathology. Elsevier, Oxford, UK*, 29-45.

Auld, B., Say, M., Ridings, H., & Andrews, J. (1990). Field applications of Colletotrichum orbiculare to control Xanthium spinosum. *Agriculture, ecosystems & environment, 32*(3-4), 315-323.

Auld, B. A., McRae, C. F., & Say, M. M. (1988). Possible control of Xanthium spinosum by a fungus. *Agriculture, ecosystems & environment, 21*(3-4), 219-223.

Bailey, K. L. (2014). The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. In *Integrated Pest Management* (pp. 245-266): Elsevier.

Bailey, K. L., Falk, S., Derby, J.-A., Melzer, M., & Boland, G. J. (2013). The effect of fertilizers on the efficacy of the bioherbicide, Phoma macrostoma, to control dandelions in turfgrass. *Biological Control, 65*(1), 147-151.

Bailey, K. L., Pitt, W., Falk, S., & Derby, J. (2011). The effects of Phoma macrostoma on nontarget plant and target weed species. *Biological Control, 58*(3), 379-386.

Barimani, M., Pethybridge, S., Vaghefi, N., Hay, F., & Taylor, P. (2013). A new anthracnose disease of pyrethrum caused by C olletotrichum tanaceti sp. nov. *Plant Pathology, 62*(6), 1248-1257.

Bridge, P. D. (1998). *Applications of PCR in Mycology*: Cabi.

Brown, F., & Ogle, J. (1997). Biocontrol of weeds using plant pathogens. *Plant Pathogens and Plant Diseases. Rockvale Publications, Armidale NSW, Australia*, 330-339.

Cannon, P., Damm, U., Johnston, P., & Weir, B. (2012). Colletotrichum–current status and future directions. *Studies in mycology, 73*, 181-213.

Cartter, J. L., & Hartwig, E. E. (1962). The management of soybeans. In *Advances in Agronomy* (Vol. 14, pp. 359-412): Elsevier.

Charudattan, R., & Dinoor, A. (2000). Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. *Crop Protection, 19*(8-10), 691-695.

Crafts, A. S. (1975). *Modern weed control*: Univ of California Press.

Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., & Crous, P. (2012). The Colletotrichum acutatum species complex. *Studies in mycology, 73*, 37-113.

Daniel, J., Templeton, G., Smith Jr, R., & Fox, W. (1973). Biological Control of Northern Jointvetch in Rich with an Endemic Fungal Disease. *Weed Science*, 303-307.

De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. (2017). Life styles of

Colletotrichum species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews, 31*(3), 155-168.

De Silva, N., Lumyong, S., Hyde, K., Bulgakov, T., Phillips, A., & Yan, J. (2016). Mycosphere essays 9: defining biotrophs and hemibiotrophs.

Dou, D., & Zhou, J.-M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell host & microbe, 12*(4), 484-495.

Eisele, J. F., Fäßler, F., Bürgel, P. F., & Chaban, C. (2016). A rapid and simple method for microscopy-based stomata analyses. *PLoS One, 11*(10), e0164576.

Epstein, L., Lusnak, K., & Kaur, S. (1998). Transformation-Mediated Developmental Mutants ofGlomerella graminicola (Colletotrichum graminicola). *Fungal Genetics and Biology, 23*(2), 189-203.

Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O'Connell, R. J., Narusaka, Y., . . . Shirasu, K. (2013). Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of Colletotrichum fungi. *New Phytologist, 197*(4), 1236-1249.

Graupner, P. R., Carr, A., Clancy, E., Gilbert, J., Bailey, K. L., Derby, J.-A., & Gerwick, B. C. (2003). The Macrocidins: Novel Cyclic Tetramic Acids with Herbicidal Activity Produced by Phoma m acrostoma. *Journal of natural products, 66*(12), 1558-1561.

Guyon, K., Balagué, C., Roby, D., & Raffaele, S. (2014). Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen Sclerotinia sclerotiorum. *BMC genomics, 15*(1), 336.

HAMMOND, K. E., & Lewis, B. (1987). The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by Leptosphaeria maculans. *Plant Pathology, 36*(2), 135-147.

Harding, D. P., & Raizada, M. N. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in plant science, 6*, 659.

Henson, J. M., & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of phytopathology, 31*(1), 81-109.

Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J., & Prihastuti, H. (2009). Colletotrichum: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity, 39*(1), 1-17.

Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., . . . Goonasekara, I. D. (2014). One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity, 67*(1), 21-125.

Lorang, J., Tuori, R., Martinez, J., Sawyer, T., Redman, R., Rollins, J., . . . Dickman, M. (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(5), 1987-1994.

Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H., & Sharon, A. (2004). In planta production of indole-3-acetic acid by Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(3), 1852-1854.

Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science, 7*(8), 352-356.

Moolani, M. K., Knake, E. L., & Slife, F. W. (1964). Competition of smooth pigweed with corn and soybeans. *Weeds, 12*(2), 126-128.

Mortensen, K. (1988). The Potential of an endemic fungus, Collectotrichum gloeosporioides, for biological control of round-leaved mallow (Malva pusilla) and velvetleaf (Abutilon theophrasti). *Weed Science*, 473-478.

Neumann, S., & Boland, G. J. (1999). Influence of selected adjuvants on disease severity by Phoma herbarum on dandelion (Taraxacum officinale). *Weed technology*, 675-679.

O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., . . . Alkan, N. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics, 44*(9), 1060-1065.

Pacanoski, Z. (2012). *Advantages and limitations in bioherbicides use.* Paper presented at the International Symposium: Current Trends in Plant Protection-Proceedings.

Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., & Green, J. R. (1999). Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genetics and Biology, 27*(2-3), 186-198.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene, 111*(2), 229-233.

Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology, 1*(1), 17-20.

Rai, M., Deshmukh, P., Gade, A., Ingle, A., Kövics, G. J., & Irinyi, L. (2009). Phoma Saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology, 35*(3), 182-196.

Schisler, D., Howard, K., & Bothast, R. (1991). Enhancement of disease caused by Colletotrichum truncatum in Sesbania exaltata by coinoculating with epiphytic bacteria. *Biological Control, 1*(4), 261-268.

Smith, J., Wherley, B., Reynolds, C., White, R., Senseman, S., & Falk, S. (2015). Weed control spectrum and turfgrass tolerance to bioherbicide Phoma macrostoma. *International journal of pest management, 61*(2), 91-98.

Srisuksam, C., Toopaang, W., Phonghanpot, S., Punya, J., Wattanachaisareekula, S., Tanticharoen, M., . . . Amnuaykanjanasin, A. (2015). *Enhanced efficiency of Agrobacterium-mediated transformation in Beauveria bassiana.* Paper presented at the Proceedings of the Burapha University International Conference, Chonburi, Thailand.

Stewart-Wade, S., & Boland, G. (2005). Oil emulsions increase efficacy of Phoma herbarum to control dandelion but are phytotoxic. *Biocontrol Science and Technology, 15*(7), 671-681.

Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity, 61*(1), 165-179.

Wiese, A. F., & Vandiver, C. W. (1970). Soil moisture effects on competitive ability of weeds. *Weed Science, 18*(4), 518-519.

เว็บไซต์เมดไทย. ตีนตุ๊กแก สรรพคุณและประโยชน์ของต้นตีนตุ๊กแก (หญ้าตีนตุ๊กแก). เข้าถึงเมื่อ 7 ธันวาคม 2560. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/ตีนตุ๊กแก.

กรมการค้าต่างประเทศ. (2560). รายงานการส่งสินค้ามาตรฐานออกนอกราชอาณาจักร. เข้าถึงเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2562. เข้าถึงได้จาก http://www.dft.go.th/th-th/Detail-Law/ArticleId/9981/9981-2560

กรมการค้าต่างประเทศ. (2561). รายงานการส่งสินค้ามาตรฐานออกนอกราชอาณาจักร. เข้าถึงเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2562. เข้าถึงได้จาก http://www.dft.go.th/th-th/DetailHotNews/ArticleId/12275/12275

กรมการค้าต่างประเทศ. (2562). รายงานการส่งสินค้ามาตรฐานออกนอกราชอาณาจักร. เข้าถึงเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2562. เข้าถึงได้จาก http://www.dft.go.th/th-th/Detail-Law/ArticleId/12533/-2562-1-2-3.

กรมวิชาการเกษตร. (2562). ปริมาณและมูลค่านำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2557-2561. เข้าถึงเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2562. เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/view/1/TH-TH.

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. วัชพืชในระบบนิเวศน์เกษตร. เข้าถึงเมื่อ 15 พฤศจิกายน 2560. เข้าถึงได้จาก http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/weed/pdf/part1.pdf

จรรยา มณีโชติ, ยุรวรรณ อนันตนมณี, โสภิส ใจปาละ, วันทนา เลิศศิริวรกุล, จารุณี ติสวัสดิ์, อภิชาติ เมืองซอง, สุพัตรา ชาวกงจักร์, และลักขณา ร่มเย็น. (2556). การจัดการวัชพืชแบบผสมผสานในมันสำปะหลัง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556. กรมวิชาการเกษตร. .

จำลอง เจียมจำนรรจา, เอ็จ สโรบล, วิจารณ์ วิชชุกิจ, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, ปิยะวุฒิ พูลสงวน, วัชรี เลิศมงคล, และปิยะ ดวงพัตรา. (2542). การจัดการวัชพืชในไร่มันสำปะหลัง. รายงานการวิจัยเชิงวิชาการจัดการวัชพืชในไร่มันสำปะหลัง. พฤษภาคม 2542.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2557). การแยกเชื้อจากสาเหตุโรคพืช. โรคพืชและการวินิจฉัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 63-67.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2557). การปลูกเชื้อเข้าสู่พืช. โรคพืชและการวินิจฉัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 69-71.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2557). หลักการวินิจฉัยโรคพืช. โรคพืชและการวินิจฉัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 63-67.

นิพนธ์ วิสารทานนท์, ไพโรจน์ จ่วงพานิช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มานะกาญจนเสถียร, Barnett, H.L., Hunter, B.B. และ Browing, J.A. (2557). การวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์และตัวอย่างโรคพืช. รายงานการวิจัยเชิงวิชาการการตรวจวินิจฉัยโรคพืช. 22 กรกฎาคม 2557.

ประภาส ช่างเหล็ก, สุดประสงค์ สุวรรณเลิศ, และสกล ฉายศรี. (2552). “มันสำปะหลัง” เพื่ออาหารและพลังงานทดแทนของโลก. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธาสินี อั้งสูงเนิน. (2558). ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 9:50-63.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปิยพัทธ์ เทพบุญเรือง
วัน เดือน ปี เกิด	7 ก.ย. 2536
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	10 ม. 7 ต.พงสวาย อ.เมือง จ.ราชบุรี 70000
ผลงานตีพิมพ์	Jongsareejit, B., Tepboonrueng, P., Srisuksam, C., Yodpanan, P., Wattananukit, W., Wichienchote, N., & Amnuaykanjanasin, A. (2020). Colletotrichum siamense as a myco-biocontrol agent for management of the tridax daisy (Tridax procumbens). Physiological and Molecular Plant Pathology, 101563.

มหาวิทยาลัยศิลปากร