

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย :
2. โครงการวิจัย : การตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล
- กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of *Neoscytalidium dimidiatum* by Polymerase Chain Reaction
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ผู้ร่วมงาน : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* โรคที่สำคัญแก้วมังกร ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคในขณะที่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรคจะปรากฏเพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสม เพื่อลดข้อจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ผลจากการศึกษาครั้งนี้นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตร

Brown spot or stem cancer caused by *Neoscytalidium dimidiatum* and it shown as the important disease of dragon fruits. The whole plant parts could be infected by the causal agent, which caused the severe damage to dragon fruit production. It would be provided the advantage and benefit to dragon fruit production if the disease could be detected before the

appearance of the symptoms. This study was conducted to the detection method to detect *N. dimidiatum*, which could reduce the limitations of morphological identification and the requirement of fast and accurate diagnosis, the species-specific primer was designed to detect *N. dimidiatum*. Two pairs of primers from this study namely, NdDOA-8F/NdDOA-6R and NdDOA-7F/ITS4 showed the specific results to *N. dimidiatum*. Developed the detection method can support the fast and accurate diagnosis, which could bring the advantages for making a decision for disease management as well as support the export and import of dragon fruits.

6. คำนำ

แก้วมังกรเป็นพืชวงศ์กระบองเพชร (*Cactaceae*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง ประเทศเม็กซิโก บริเวณแปซิฟิก ประเทศกัวเตมาลา คอสตาริกา และเลซัลวาดอ และเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า pitaya (พีทาฮา) หรือ pitahaya (พิทาฮา) หรือ strawberry pear ประเทศไทยเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่าแก้วมังกร (dragon fruit) แก้วมังกรเป็นพืชไม้เลื้อยมีลำต้น 3 แฉก ๆ เป็นหยัก ๆ คล้ายครีบกิ้งกั ที่ตาข้างมีหนาม 1-5 หนาม แฉกนั้นอวบน้ำซึ่งเป็นใบที่เปลี่ยนรูป ลำต้นจริงอยู่กึ่งกลางของแฉก เมื่อต้นสมบูรณ์มีอายุประมาณ 2 ปี จากกิ่งปักชำ ฤดูกาลของผลแก้วมังกรมีช่วงยาวพอสมควร ตั้งแต่พฤษภาคมถึงตุลาคม (สุรพงษ์, 2544)

สำหรับในประเทศไทยนั้น โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้นในหลายประเทศในเขตประเทศเอเซียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015) จีน (Yi *et al.*, 2013; 2015). มาเลเซีย (Masratul *et al.*, 2015) และเวียดนาม (Hieu *et al.*, 2015) ดังนั้นปัญหาโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเซีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็วและการป้องกันกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินงานวิจัยศึกษาอยู่ รา *N. dimidiatum* เจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชและสามารถเข้าไปพักตัวอยู่ในพืชได้โดยยังไม่แสดงอาการ ถ้าแก้วมังกรแสดงอาการของโรคชัดเจนแล้ว แสดงว่าเชื้อราเข้าไปทำลายพืชและสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราและสปอร์ ทำให้การป้องกันกำจัดโรคนั้นยากมากขึ้น เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคในขณะที่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรคจะปรากฏเพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์ ขวดดูแรน กระจบอกลง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White et al., 1990)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Bioedit และ Geneious version 8.1.9

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Neoscytalidium*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตีพิมพ์คสรึกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาคัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แขนในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Neoscytalidium*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Neoscytalidium* ศึกษาเกี่ยวกับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เชื้อเส้นใยของรา *Neoscytalidium* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Dungsard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาณ 4:1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.1

3. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2008) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

4. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ ใช้โปรแกรม GPRIME

5. ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* และราใน สกุล *Neoscytalidium* โดยทำตามขั้นตอน 2.1.5 – 2.1.7

การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ในตัวอย่างต่างๆ ของพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *N. dimidiatum*

1. การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates) จากแหล่งตัวอย่างๆ พร้อมวิธีการสกัด ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture หรือ mixed cultures ของรา *Neoscytalidium*

เขียนเส้นใยของรา *Neoscytalidium* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างลำต้น

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่ไม่แสดงอาการของโรค มาล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง และนำตัวอย่างพืชมาแช่น้ำนิ่ง ฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินน้ำออกแล้วซบด้วยกระดาษซับจนแห้ง นานประมาณ 5 นาที ย้ายขึ้นตัวอย่างพืชลงในถุงพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาผึ่ง ที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 17 ชั่วโมง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นประมาณ 4 วัน ทำการตรวจหาเส้นใยของราที่เจริญออกมา และอีกประมาณ 10 วัน ตรวจหา fruiting bodies ของราจากนั้นนำ ตัวอย่างใบพืชที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมากทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผลแก้วมังกร

นำตัวอย่างผลแก้วมังกรมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เฉือนเอาผิวผลแก้วมังกรบริเวณที่ แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 2 x 2 mm ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสกัด ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

2. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ

condition ของปฏิกิริยาตามที่ได้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ รา *N. dimidiatum* ที่ออกแบบได้

3. การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท MacroGen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การบันทึกข้อมูล

แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พิษอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

รายละเอียดของรา *Neoscytalidium* ดังนี้

Scientific name	<i>Neoscytalidium</i>
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Order	Botryosphaerales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	<i>Neoscytalidium</i>
Species	<i>N. dimidiatum</i>

พืชอาศัย

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) องุ่น (*Vitis vinifera*) มะรุุมป่า (*Albizia lebbek*) ทางนกงูฝรั่ง (*Delonix regia*) มะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) มะเดื่อ หรือ ไทร (*Ficus* spp.) นนทรี (*Peltophorum petrocarpum*) โพทะเล (*Thespesia populena*) เบย์เบอร์รี่ (*Arbutus*) เกาลัด (*Castanea*) ส้ม (*Citrus*) วอลนัท (*Juglans*) กล้วย (*Musa*) พลัม เชอร์รี่ ลูกท้อ เอพริคอต ซากุระ อัลมอน (*Prunus*) มะม่วง (*Mangifera indica*) *Populus Rhus* และ *Sequoiadendron*

การเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

ราสร้างเส้นใยลักษณะรูปร่างเป็นคลื่นและไม่แน่นอน โคลนินเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหาร เส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia ภายในส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia มักพบทั้ง 2 ชนิด

ที่อยู่อาศัยและนิเวศวิทยาของรา

ราชนิดนี้พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่น อเมริกาใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกาใต้ รวมทั้งเชื้อราชนิดนี้อยู่ในแอฟริกาตะวันตกและใต้ แแถบคาริเบียน และเอเชีย แต่ก็มีบางชนิดพบเจริญประเทศในเขตหนาวซึ่งอาจจะเป็นการแพร่กระจายมาจากประเทศเขตร้อน ราชนิดนี้พบในดินและไม้ที่สลายตัว

สาเหตุโรคพืช

N. dimidiatum เป็นราสาเหตุโรคพืชทำให้พืชมีอาการจุดคล้ายแคงเกอร์ และอาการจุดบนลำต้นของพืชหรือบนผล รวมทั้งแผลเน่าดำในผล และแผลเน่าสีน้ำตาลในลำต้นของแก้วมังกรที่มีรายงานในประเทศจีน มาเลเซีย เวียดนาม และประเทศไทย และยังมีรายงานเป็นโรคแคงเกอร์ที่ลำต้นขององุ่นในเมืองแคลิฟอร์เนียในประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรม

เลี้ยงรา *Neoscytalidium* บนอาหาร PDA สังเคราะห์ จำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากแก้วมังกร (8 ไอโซเลต) มันสำปะหลัง (1 ไอโซเลต) และเฟิร์นเขาควาง (1 ไอโซเลต) สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลตๆ ละ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS และ TEF ส่ง sequencing จำนวน 40 reactions จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดทำ consensus sequences ของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลตๆ ละ 2 ตำแหน่ง เมื่อการวิเคราะห์ชนิดของราเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลกับฐานข้อมูลต่าง ๆ และพบว่าคือรา *N. dimidiatum*

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์จำเพาะ) และการทดสอบเบื้องต้น

ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์จำเพาะ) โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ได้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ (ตารางที่ 1) ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบต่อรา *N. dimidiatum* กับฐานข้อมูลด้วยออกแบบไพรเมอร์ด้วย Primer-BLAST และ Primer3 in Geneious Prime พบว่าได้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ หรือ 20 เส้น ได้แก่

NdDOA1F NdDOA1R NdDOA2F NdDOA2R NdDOA3F NdDOA3R NdDOA4F NdDOA4R
NdDOA5F NdDOA5R NdDOA6F NdDOA6R NdDOA7F NdDOA7R NdDOA8F NdDOA8R NdDOA9F
NdDOA9R NdDOA10F และ NdDOA10R

จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์ต่อเชื้อรา *Neoscytalidium* และ เชื้อราในวงศ์ *Botryosphaeria* (ตารางที่ 1) พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R มีความจำเพาะต่อ *N. dimidiatum* เท่านั้น (ภาพที่ 1 และ 2) และไพรเมอร์ NdDOA3F NdDOA6F และ NdDOA8F จำเพาะต่อ *N. dimidiatum* และ *N. novaehollandiae* (ภาพที่ 3 และ 5) NdDOA5R จำเพาะต่อ *N. dimidiatum*, *N. novaehollandiae* และ *N. orchidacearum* (ภาพที่ 6) ถึงแม้ว่า NdDOA4R จะจำเพาะต่อ *N. dimidiatum* แต่ก็สามารถตรวจจับเชื้อรา *Botryosphaeria* อื่นๆ เช่น *Botryobambusa fusicocum* และ *Neodeightonia subglobosa* ได้ (ภาพที่ 7) ส่วนไพรเมอร์ NdDOA1F NdDOA1R NdDOA2F NdDOA2R NdDOA4F NdDOA5F NdDOA8R NdDOA9F NdDOA9R NdDOA10F และ NdDOA10R ไม่มีความจำเพาะ เนื่องจากสามารถตรวจจับเชื้อราส่วนใหญ่ในวงศ์ *Botryosphaeria* ได้ (ภาพที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

Primer code	Length (bp)	%GC	Tm	Taxa specificity
NdDOA1F	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA1R	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2F	20	50	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2R	20	55	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA3F	20	55	59.4	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA3R	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4F	20	50	57.6	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4R	20	50	58.1	<i>N. dimidiatum</i> , <i>Botryobambusa fusicoccum</i> and <i>Neodeightonia subglobosa</i>
NdDOA5F	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA5R	20	55	58	<i>N. dimidiatum</i> , <i>N. novaehollandiae</i> and <i>N. orchidacearum</i>
NdDOA6F	20	55	59.9	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA6R	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7F	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7R	20	50	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA8F	20	60	60	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA8R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9F	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9R	20	60	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10F	20	60	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>

Species/Abbrev	Group Name	* * * * *
1. <i>Neoscytalidium_orchidacearum</i> _MFLUCC_12-0533	<i>N. orchidacearum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - - T T C T C A A G
2. <i>Neoscytalidium_novaehollandiae</i> _WAC13275	<i>N. novaehollandiae</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C T T T T G A A C - T T T C T C A A G
3. <i>Neoscytalidium_novaehollandiae</i> _WAC13273	<i>N. novaehollandiae</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C T T T T G A A C - T T T C T C A A G
4. <i>Neoscytalidium_novaehollandiae</i> _CBS122072	<i>N. novaehollandiae</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C T T T T G A A C - T T T C T C A A G
5. <i>Neoscytalidium_novaehollandiae</i> _CBS_122071	<i>N. novaehollandiae</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C T T T T G A A C - T T T C T C A A G
6. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _CBS_145.78	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
7. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13305	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
8. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13302	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
9. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13287	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
10. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13282	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
11. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13277	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
12. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC13274	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
13. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _WAC12693	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
14. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _UTHSCSA_DL_14-340	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
15. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _CBS_499.66	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
16. <i>Neoscytalidium_dimidiatum</i> _CBS_251.49	<i>N. dimidiatum</i>	G G C G C C G C C C G C C G G A C C G T T T T G A A C - T T T C T C A A G
17. <i>Neodeightonia_subglobosa</i> _CBS_448.91		G G C G C C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
18. <i>Neodeightonia_phoenicum</i> _CBS_122528		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C G A A C T T T T C T C A A G
19. <i>Macrophomina_phaseolina</i> _CBS_460.70		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
20. <i>Macrophomina_phaseolina</i> _CBS_227.33		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
21. <i>Lasiodiplodia_theobromae</i> _CBS_164.96		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
22. <i>Lasiodiplodia_pseudotheobromae</i> _CBS116459		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
23. <i>Diplodia_rosulata</i> _CBS116470		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
24. <i>Diplodia_multia</i> _CBS_112553		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
25. <i>Cophinforma_atrovirens</i> _MFLUCC_11-0425		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
26. <i>Cophinforma_atrovirens</i> _CBS_117444		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
27. <i>Botryosphaeria_ramosa</i> _CMW_26167		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
28. <i>Botryosphaeria_fusispora</i> _MFLUCC_10-0098		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
29. <i>Botryosphaeria_dothidea</i> _CMW8000		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
30. <i>Botryosphaeria_dothidea</i> _CBS110302		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
31. <i>Botryosphaeria_agaves</i> _MFLUCC_11-0125		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
32. <i>Botryobambusa_fusicoccum</i> _MFLUCC_11-0143		G G C G T C G C C C G C C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G
33. <i>Barriopsis_fusca</i> _CBS_174.26		G G A G T C G C C C G C G G A C C T T C T G A A C T T T T C T C A A G

ภาพที่ 1 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ NdDOA7F จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

Species/Abbrv	Group Name	* * * * *
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
2. Neoscytalidium_novaehollandiae_WAC13275	N. novaehollandiae	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
3. Neoscytalidium_novaehollandiae_WAC13273	N. novaehollandiae	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
4. Neoscytalidium_novaehollandiae_CBS122072	N. novaehollandiae	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
5. Neoscytalidium_novaehollandiae_CBS_122071	N. novaehollandiae	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C G A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		G G C G G C G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		G G C G G C G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		G G C G G T G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		G G C G G T G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		G G C G G T G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
24. Diplodia_mutila_CBS_112553		G G C G G T G G C T G T T C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
25. Cophinforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		G G C G G T G G C T G T T C T G C - C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
26. Cophinforma_atrovirens_CBS_117444		G G C G G T G G C T G T T C T G C - C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A
27. Botryosphaeria_ramosa_CMW_26167		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A C A - - - T A C A
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A C A - - - T A C A
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A C A - - - T A C A
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A C A - - - T A C A
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		G G C G G T G G C - G T C T T G - C C T C A A G G G T A G T A G A A C A T - - - T A C A
32. Botryobambusa_fusicoccum_MFLUCC_11-0143		G G C G G C G G C - G T C C A G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - A A C A
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		G G C G G T G G C - T C T T G C C C T C A A G G G T A G T A G A A - - - T A C A

ภาพที่ 6 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ NdDOA5R จำเพาะต่อเชื้อรา *N. dimidiatum*,
N. novaehollandiae และ *N. orchidacearum*

Species/Abbrv	Group Name	* * * * *
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T C T G G A G C - G C A C G G C G C
2. Neoscytalidium_novaehollandiae_WAC13275	N. novaehollandiae	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T C T G G A G C - G C A C G G C G C
3. Neoscytalidium_novaehollandiae_WAC13273	N. novaehollandiae	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T C T G G A G C - G C A C G G C G C
4. Neoscytalidium_novaehollandiae_CBS122072	N. novaehollandiae	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T C T G G A G C - G C A C G G C G C
5. Neoscytalidium_novaehollandiae_CBS_122071	N. novaehollandiae	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T C T G G A G C - G C A C G G C G C
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A C G G C G C
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G G T C G G C G T
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G G T C G G C G T
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G T A A G G C G T
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G T A A G G C G T
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G G T T G G C G T
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G T - G G T T G G C G T
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G G C T G G C G T
24. Diplodia_mutila_CBS_112553		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G T - G G T T G G C G T
25. Cophinforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A G G G C G T
26. Cophinforma_atrovirens_CBS_117444		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C - G C A G G G C G T
27. Botryosphaeria_ramosa_CMW_26167		A G C S T A G T A G A A A - T A C A T C T C G C T T C G G A G C - G C A G G G C G T
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		A G C S T A G T A G A A A - T A C A T C T C G C T T C G G A G C - G C A G G G C G T
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		A G C S T A G T A G A A A - T A C A T C T C G C T T C G G A G C - G C A G G G C G T
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		A G C S T A G T A G A A A - T A C A T C T C G C T T C G G A G C - G C A G G G C G T
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		A G C S T A G T A G A A A - T A C A T C T C G C T T C G G A G C - G C A G G G C G T
32. Botryobambusa_fusicoccum_MFLUCC_11-0143		A G C S T A G T A G A A - - - A A C A C C T C G C T T T G G A G C - G S T T G G C G T
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		A G C S T A G T A G A A - - - T A C A C C T C G C T T T G G A G C G S T T T G G A G C

ภาพที่ 7 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ NdDOA4R จำเพาะต่อเชื้อรา *N. dimidiatum* และ เชื้อรา
Botryosphaeria อื่นๆ เช่น *Botryobambusa fusicoccum* และ *Neodeightonia subglobosa*

Species/Abbrv	Group Name	* * * * *
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
2. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13275	N. novaeohollandiae	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
3. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13273	N. novaeohollandiae	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
4. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS122072	N. novaeohollandiae	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
5. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS_122071	N. novaeohollandiae	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
24. Diplodia_multia_CBS_112553		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
25. Cophinforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
26. Cophinforma_atrovirens_CBS_117444		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
27. Botryosphaeria_amosa_CMW_26167		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
32. Botryobambusa_fusicoccum_MFLUCC_11-0143		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T

ภาพที่ 8 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ NdDOA3R ซึ่งสามารถตรวจจับเชื้อราส่วนใหญ่ในวงศ์

Botryosphaeria

Species/Abbrv	Group Name	* * * * *
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
2. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13275	N. novaeohollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
3. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13273	N. novaeohollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
4. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS122072	N. novaeohollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
5. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS_122071	N. novaeohollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
24. Diplodia_multia_CBS_112553		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
25. Cophinforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
26. Cophinforma_atrovirens_CBS_117444		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
27. Botryosphaeria_amosa_CMW_26167		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
32. Botryobambusa_fusicoccum_MFLUCC_11-0143		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G G G A T A A G T A A T

ภาพที่ 9 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ NdDOA7R ซึ่งสามารถตรวจจับเชื้อราส่วนใหญ่ในวงศ์

Botryosphaeria

เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R สามารถตรวจจับได้ด้วยวิธี blastn พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R ตรงกับเชื้อรา *N. dimidiatum* (syn. *N. hyalinum*) ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10)

	Description	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Neoscytalidium dimidiatum ND9 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474119.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum ND8 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474118.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum ND4 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474114.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum ND2 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474112.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum ND1 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474111.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM_508 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK488051.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM_493 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK488046.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM_400 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK488037.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain URM8036 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK488036.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM425 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK480472.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM364 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK480471.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM214 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK480469.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain ARM203 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK480467.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate COUFPI241 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MT026927.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate COUFPI239 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MT026926.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum clone URF_P102 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MT010217.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum clone URF_P101 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MT010216.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain URM8030 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK461880.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate UFE8N1 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN520610.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate PY320N2 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN520609.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate MW403N1 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN520608.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum isolate HL321N1 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN520607.1
✓	Neoscytalidium sp_ETAC-2019a strain ITD_G6 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MK677466.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G93 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526951.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G311 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526950.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-G112 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526949.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G111 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526948.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G43 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526947.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G42 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526946.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-G81 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526945.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-M10 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526944.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-M9 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526943.1
✓	Neoscytalidium hyalinum strain MMG-M8 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526942.1
✓	Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-M7 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal transcribed spacer 2 complete sequence	100%	0.47	100.00%	MN526941.1

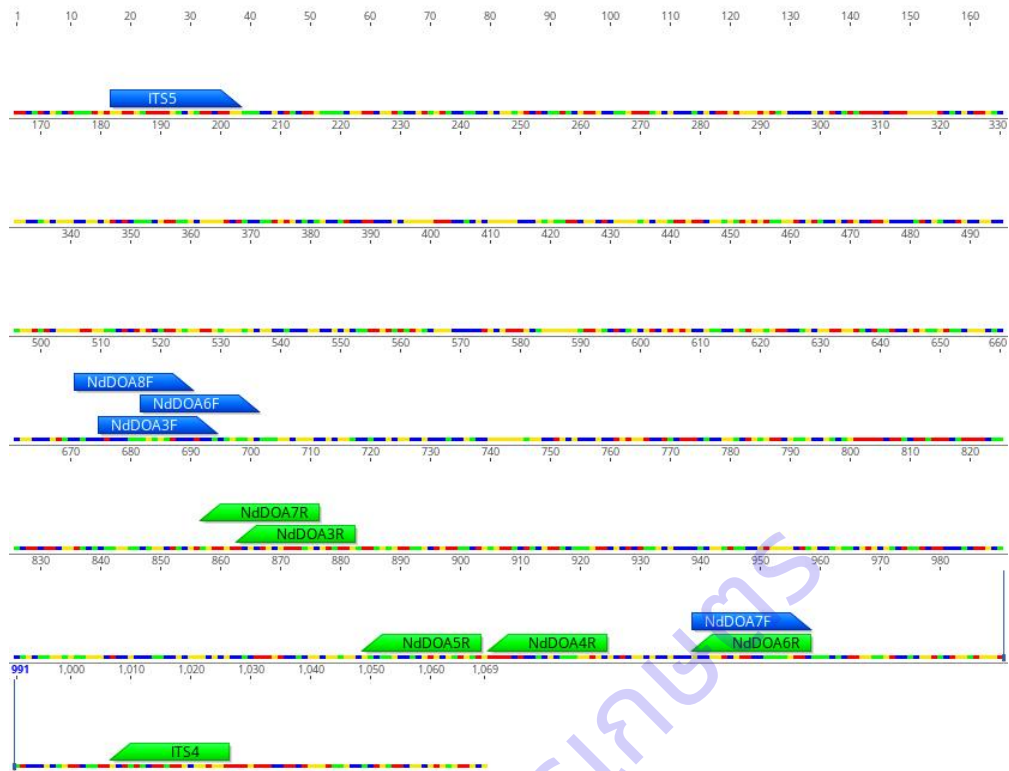
ภาพที่ 10 ผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R สามารถตรวจจับได้ด้วยวิธี blastn

ตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์พบว่าได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจำนวน 5 เส้น และจับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทดสอบได้จำนวน 5 คู่ ได้แก่ ITS5/NdDOA6R NdDOA6F/NdDOA6R NdDOA3F/NdDOA6R NdDOA8F/NdDOA6R และ NdDOA7F/ITS4 ขนาดของ PCR product จะมีขนาดประมาณ 942 442 449 453 และ 88 bp (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การจับคู่ไพรเมอร์

Pair	Primer code	target size (bp)	Taxa specificity
1	ITS5	942	universal primer
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
2	NdDOA6F	442	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
3	NdDOA3F	449	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
4	NdDOA8F	453	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
5	NdDOA7F	88	<i>N. dimidiatum</i>
	ITS4		universal primer

เมื่อทดสอบการจับคู่ไพรเมอร์โดยทดสอบกับ sequence ของ DNA template โดยการวิเคราะห์เบื้องต้นจาก primer map เพื่อพิจารณาไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product (ภาพที่ 11) จากการทำ primer optimization พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมของทุกคู่ไพรเมอร์คือ 56 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 primer map ของไพรเมอร์ ITS5, NdDOA6R, NdDOA6F, NdDOA6R, NdDOA3F, NdDOA6R, NdDOA8F, NdDOA6R, NdDOA7F และ ITS4

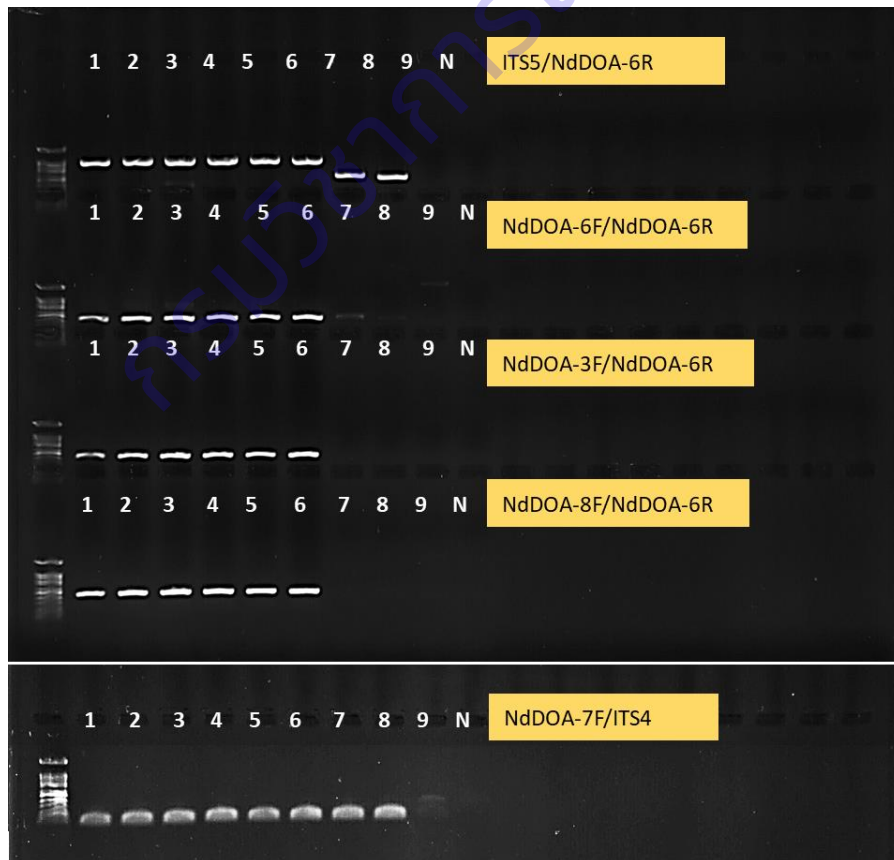
การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ดีเอ็นเอของราราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* ที่ทำการทดสอบ

No.	Voucher	Taxa	พืชอาศัย
1	M0303	<i>N. dimidiatum</i>	มันสำปะหลัง
2	M0305	<i>N. dimidiatum</i>	เขากวาง
3	M0330	<i>N. dimidiatum</i>	แก้วมังกร
4	M0352	<i>N. dimidiatum</i>	แก้วมังกร
5	M0566	<i>N. dimidiatum</i>	แก้วมังกร
6	M0567	<i>N. dimidiatum</i>	แก้วมังกร
7	M0207	<i>Neodeightonia</i>	มะพร้าว
8	M0484	<i>Lasiodiplodia</i>	ส้มโอ
9	M0514	<i>Colletotrichum</i>	มะเขือ
10	negative		

ผลจากการทดสอบกับดีเอ็นเอพบว่าไพรเมอร์คู่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบไพรเมอร์ primer

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของราการจัด จำแนกโดยรหัสพันธุกรรม และรวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จาก ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 12 ไอโซเลต พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโรคของแก้วมังกรและเฟิร์นเขากวางมาแยกเชื้อ ผลจากการแยกเชื้อจากลำต้นและผลของแก้วมังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 30 ไอโซเลต จากเฟิร์นเขากวาง มังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 2 ไอโซเลต แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากผลการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคของแก้วมังกร และต้นเขากวาง จำแนกโดยลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและข้อมูลพันธุกรรม จำแนกชนิดเป็นรา *N. dimidiatum* ทั้งหมด

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 10 คู่ เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้น และทดสอบกับดีเอ็นเอของราในกลุ่ม *Botryosphaeria* ได้ไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยรา *Neoscytalidium dimidiatum* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของส้มโอ และ โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรซึ่งสามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

11. คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บ ตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล

12. เอกสารอ้างอิง

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตมงคล พจนา ตระกูลสุขรัตน์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ บุรณี พัววงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2550. การศึกษาชนิดของโรคแก้ว มังกรและกวนอิมเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. จตุจักร กรุงเทพฯ. หน้า 1024 – 1034.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเต็อ และ ชนินทร ดวงสอด. 2552. โรคผลเน่าของแก้วมังกรสาเหตุเกิด จาก *Bipolaris cactivora*. หน้า 216-223. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เติบโตอย่างยั่งยืน ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” ณ โรงแรมสุนิย์แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี. 24-26 พฤศจิกายน 2552.

Athipunyakom, P, S. Likhitekaraj. 2010. Fruit Rot Diseases of Dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Thailand, pp. 156. In 9th International Mycological Congress, Edinburgh, UK, 1-6 August.

- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2012. Anthracnose Diseases of Dragon Fruit in Thailand. pp. 90. *In* The International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases 2012, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 7-10 February.
- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2015. Diseases of dragon fruit in Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. *In* International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Alcorn, J.L. 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon* 17: 1-86.
- Carmichael, J.W., W. Bryce Kendrick, I.L. Connors and Lynne Sigler. 1980 Genera of Hyphomycetes. Univ. of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canada. 386 p.
- Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Ellis, M.B. 1993. More Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 507pp.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Mizrahi, Y. 2015. Thirty-one of research and development in the vine cacti pitaya in Israel. pp. 1-18. *In* International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Hui-Fang Ni, C-W. Huang, S-L. Hsu, S-Y. Lai and H-R. Yang. 2013. Pathogen characterization and fungicide screening of stem cancer of pitaya. *J. Taiwan Agric. Res.* 62 (3): 225-234.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England. 695 p.
- Taba, S., N. miyahira and K. Nasu. 2007. Fruit rot of Strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora*. *J. Gen.Plant Pathol.* 73: 374-376.
- Valencia-Botín A.J., J.S Sandoval-Islas and E. Cárdenas-Soriano. 2004. A new stem spot disease of Pithaya [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose] caused by Fusicoccum -like anamorph of *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces.and De Not. in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatologia* 22 (1): 140-142.

Wang, C.L. and Lin, C.C. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14: 269-274.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press.

กรมวิชาการเกษตร