Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 147-150 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 147-150 (2562)

การระบุชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia* species สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียนในประเทศไทย
Identification of *Lasiodiplodia* species Causing Durian Fruit Rot Disease in Thailand

รังสิมันตุ์ ธีระวงศ์ภิญโญ[1,2] สมศิริ แสงโชติ[1,2] และปัฐวิภา สงกุมาร[1,2]
Rungsimun Thirawongphinyo[1,2], Somsiri Sangchote[1,2] and Pattavipha Songkumarn [1,2]

Abstract

Durian fruit rot disease caused by *Lasiodiplodia* species is a serious problem of durian exporting market. A high incidence of *Lasiodiplodia theobromae* has been reported in Thailand. This research aimed to characterize the *Lasiodiplodia* species associated with durian fruit rot disease in Thailand currently. Samples of diseased durian fruit were collected from different producing areas in the Eastern, North-eastern and Southern of Thailand. Identification of 30 fungal isolates was obtained and based on morphological and cultural characteristics as well as sequence data of the rDNA internal transcribed spacer region (ITS) and translation elongation factor 1-α (EF1-α). The DNA sequences of both loci were analyzed and deposited in GenBank. All isolates on half potato dextrose agar (half PDA) grew rapidly and showed similar colony features with grey to dark grey mycelia. In addition to the following data of ITS and EF1- α were identified as *Lasiodiplodia* species (*L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* and *L. parva*). Inoculation trial with *Lasiodiplodia* species collected from durian fruit consequently produced the typical lesions on ripened durian fruit.

Keywords : Durian fruit rot disease, EF1-α, fungal agent

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกทุเรียนสู่ประเทศปลายทาง ในอดีตมีการรายงานว่าพบเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* มากในประเทศไทย การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียนในประเทศไทยในปัจจุบัน โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ปลูกทุเรียนภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ทั้งหมด 30 ไอโซเลท นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุล โดยศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อราที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer region (ITS) และ translation elongation factor 1-α (EF1- α) วิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบส เปรียบเทียบและนำส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ GenBank พบว่า เชื้อราทุกไอโซเลทเจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร half potato dextrose agar (half PDA) และมีลักษณะเส้นใยสีเทาถึงเทาเข้มไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS และ EF1- α มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *L. theobromae, L. pseudotheobromae* และ *L. parva* การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. พบว่าเชื้อราสามารถก่อโรคผลเน่าทุเรียนในระยะสุกแก่เต็มที่ได้

คำสำคัญ : โรคผลเน่าทุเรียน EF1-α เชื้อราสาเหตุโรค

คำนำ

เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า ลำต้นเน่า Canker และ die back กับไม้ยืนต้นและไม้ผลหลายชนิดในพื้นที่เขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (Ismail *et al*., 2012) ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อรา *L. theobromae* ก่อโรคผลเน่าทุเรียนในปี พ.ศ. 2539 ซึ่งทำการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น (สมศิริ และ คณะ, 2539) ในปัจจุบันมีการใช้เครื่องมือเพื่อศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลประกอบกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Lasiodiplodia* ซึ่งมีความแม่นยำและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การวิเคราะห์ข้อมูลทาง phylogenetic ของตำแหน่ง ITS ร่วมกับ EF1- α มีประสิทธิภาพในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Lasiodiplodia* ได้ดี (Alves *et al.,* 2008) จากข้อมูลข้างต้นจึงนำมาซึ่งการวิจัยจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia* สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียนใน

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม. 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Education Commission, Bangkok 10400, Thailand

ประเทศไทย ด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1- α เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราให้ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราจากเนื้อเยื่อของทุเรียนที่เป็นโรคผลเน่าและการจัดจำแนกเชื้อราโดยสัณฐานวิทยา

นำเปลือกทุเรียนจากผลทุเรียนที่แสดงอาการผลเน่ามาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique จากนั้นเลี้ยงเชื้อราบน half PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราทุกไอโซเลท ศึกษาลักษณะและการสร้าง pycnidia และโคนิเดีย (conidia) โดยวางใบทุเรียนขนาด 1 ตารางเซนติเมตร บนอาหาร half PDA ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา วางลงบนกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราสร้าง pycnidia สมบูรณ์บนใบทุเรียน นำใบไปเข้าสู่กระบวนการตัดด้วยเทคนิค microtome technique ใบทุเรียนส่วนหนึ่งย้ายลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อโคนิเดียปลดปล่อยออกจาก pycnidia แตะมาวางบนสไลด์แก้วแล้วส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope บันทึกลักษณะของโคนิเดียพร้อมวัดขนาด ในส่วนของการทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test) ทำโดยเลี้ยงเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. บนอาหาร half PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว เจาะที่ขอบของโคโลนี นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราแปะลงบนผลทุเรียนบริเวณที่ถูกทำแผลไว้ด้วยเข็มเขี่ยลึก 0.5 เซนติเมตร ใช้เทปกาวใสแปะทับชิ้นวุ้นเพื่อป้องกันการหล่นของชิ้น ทำการปลูกเชื้อ 3 ซ้ำต่อ 1 ไอโซเลท จากนั้นนำผลทุเรียนไปเก็บในห้องที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 2 วัน แล้วบ่มในห้องที่มีความชื้นปกติตามสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 4-5 วัน ทำการบันทึกข้อมูลการเกิดโรคผลเน่าเมื่อผลทุเรียนสุกแก่เต็มที่และเริ่มมีรอยแตกของเปลือก

2. การจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ทำการสกัด DNA ของเชื้อรา โดยนำเชื้อราเลี้ยงในอาหารเหลว Complete medium เป็นเวลา 2 วัน นำเส้นใยมาซับให้แห้งแล้วใส่ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร จากนั้นบดด้วยเครื่อง drilling machine 1 นาที เพื่อตีเส้นใยให้แตก เติม chloroform 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใส 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate 30 ไมโครลิตร และ iso-propanol 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีทิ้งส่วนใส ละลายด้วย 70% EtOH (4 องศาเซลเซียส) 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เท 70% EtOH ทิ้งแล้วผึ่งให้แห้ง 30 นาที เติม deionizied water 30 ไมโครลิตร นำ DNA ที่สกัดได้ไปวัดคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Biodrop นำ DNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ ITS1-4 primer และ EF1-α primer จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ส่ง sequence ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้ง 2 บริเวณ ระบุชนิดของเชื้อราโดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA7

ผล

1. การแยกเชื้อราจากเนื้อเยื่อของทุเรียนที่เป็นโรคผลเน่าและการจัดจำแนกเชื้อราโดยสัณฐานวิทยา

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราพบว่า เส้นใยเจริญเร็วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ภายใน 2-3 วัน บนอาหาร PDA ในระยะแรกเส้นใยมีสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้มเมื่ออายุมากขึ้น (Figure 1A)โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า pycnidia (Figure 1B)ลักษณะคล้ายน้ำเต้ามีโคนิเดียอยู่ภายใน เมื่อ pycnidia เจริญเต็มที่จะปลดปล่อยโคนิเดียใสไม่มี septate ออกมาซึ่งเป็นระยะ Immature (Figure 1C) เมื่อผ่านไป 5-24 ชั่วโมง โคนิเดียเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นและมี 1 septate เป็นระยะ Mature (Figure 1D) เมื่อวัดขนาดของโคนิเดีย พบว่ามีขนาด 22.24-26.68x12.24-13.66 (Figure 1D), 21.32-27.71x9.57-13.64 (Figure 1E)และ16.74-24.01x8.82-13.79 µm (Figure 1F) ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ทุกไอโซเลท พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดโรคผลเน่าทุเรียนได้ อาการแผลระยะเริ่มต้นเนื้อเยื่อเปลือกมีสีน้ำตาลเป็นวงกลม ต่อมาแผลเริ่มลุกลามตามแนวพูของทุเรียน ระหว่างหนามสีดำ อาจมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นบริเวณหนาม

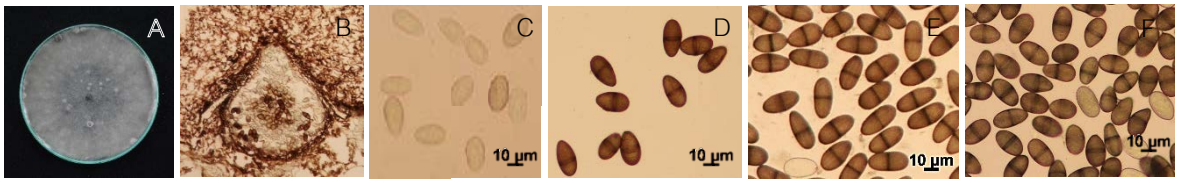

Figure 1 Characteristics of *Lasiodiplodia* spp. (A) colony, (B) pycnidium. (C,D) immature and mature conidia of *L. theobromae* (E) *L. pseudotheobromae* and (F) *L. parva*

2. การจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1-α ที่ได้ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลใน GenBank และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามแผนภาพ Phylogenetic tree (Figure 2) พบว่า แต่ละไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *L. theobromae, L. pseudotheobromae* และ *L. parva* จำนวน 26 2 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ

Figure 2 Maximum-likelihood tree obtained from combined alignment of internal transcribed spacer region (ITS) and translation elongation factor 1-α (EF1- α) sequence data with bootstrap support value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

วิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. พบว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อรา pycnidia รูปทรง สีและขนาดของโคนิเดียแต่ละไอโซเลทมีความใกล้เคียงกันมากทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดของเชื้อรา (Slippers *et al*., 2013) จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1-α จากนั้นหาความสัมพันธ์บนแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างเชื้อรามีความใกล้เคียงกับ *L. theobromae L. pseudotheobromae* และ *L. parva* ซึ่งบ่งชี้ว่าการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1-α นั้นมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของเชื้อราในสกุลนี้ได้สอดคล้องกับรายงานของ Dissanayake *et al.* (2016) ซึ่งจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Botryosphaeria, Diplodia, Dothiorella, Lasiodiplodia* และ *Neofusicoccum* ได้เช่นกัน จากผลการวิจัยนี้กล่าวได้ว่าในปัจจุบันเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าทุเรียนในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายมากขึ้นจากอดีตที่พบเพียง *L. theobromae* เมื่อจำแนกโดยลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียว (สมศิริ และ คณะ, 2539) นอกจากนี้ Trakunyingcharoen *et al*. (2015) ได้รายงานว่า ในประเทศไทยพบ *L. pseudotheobromae* ก่อโรคผลเน่ากับอโวกาโดและโรค canker บนลำต้นของยางพารา *L. theobromae* ก่อโรค canker กับมะม่วงและโรค dieback กับสนสามใบ ละมุด ชมพู่ และเงาะ เป็นต้น (Chirawut, 2014) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของพืชอาศัยที่เชื้อรากลุ่มนี้สามารถเข้าทำลายได้ ฉะนั้นการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคให้ชัดเจนเพื่อประโยชน์ในการป้องกันควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคอย่างตรงจุดและมีประสิทธิภาพต่อไป

สรุป

เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. สามารถก่อให้เกิดโรคผลเน่าทุเรียนได้ การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าว ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาประกอบกับข้อมูลทางชีวโมเลกุล พบว่า *L. theobromae, L. pseudotheobromae* และ *L. parva* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่แพร่กระจายอยู่ในภาคตะวันออก ภาคใต้ และภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยในปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่พบ *L. theobromae* มากที่สุด (ร้อยละ 87)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวและโรคเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องของอุปกรณ์และสถานที่ที่ใช้ในการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม.

เอกสารอ้างอิง

สมศิริ แสงโชติ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2539. โรคที่เกิดกับผลทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยว. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34: 148-152.

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

Chirawut, B. 2014. Fruit Rot Disease of Harvested Rambutan and Its Control. Thai Agricultural Research Journal 32 (1).

Dissanayake, A.J., A.J.L. Phillips, X.H. Li and K.D. Hyde. 2016. *Botryosphaeriaceae*: Current status of genera and species. Mycosphere 7(7): 1001–1073.

Ismail, A. M., G. Cirvilleri, G. Polizzi, P.W. Crous, J.Z. Groenewald and L. Lombard. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australasian Plant Pathology 41: 649-660.

Slippers, B., E. Boissin and A.J.L. Phillips. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. Studies in Mycology 76: 31–49.

Trakunyingcharoen, T., L. Lombard, J.Z. Groenewald, R. Cheewangkoon, C. To-anun and P.W. Crous. 2015. *Caulicolous Botryosphaeriales* from Thailand. Persoonia 34: 87–99.