Agricultural Sci. J. 45 : 3/1 (Suppl.) : 157-160 (2014) ว. วิทย. กษ. 45 : 3/1 (พิเศษ) : 157-160 (2557)

ความหลากหลายในการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เพื่อการจำแนกเชื้อ

Diversity of *Lasiodiplodia* sp. Fungal DNA Sequence Data for the Identification

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] และพิมพ์รัมภา เปี่ยมสกุล[2]

Chainarong Rattanakreetakul[1] and Phimrampha Piamsakun [2]

Abstract

Investigation of diversity of the stem-end rot pathogens in mango was made. The fungi were isolated from three different production areas. The fungal colony characters similar to *Lasiodiplodia theobromae* were selected e.g. L4, L5 and L7. The fungal growth on PDA of the three isolates was compared. *L. theobromae* isolate L7 showed best growth compared to L4 and L5. The colony morphology of isolate L5 are grayish-white with puffy mycelium similar to isolate L7. DNA from fungal mycelium was investigated on the internal transcribed spacer, using PCR with ITS1 and ITS4 primers. The amplified DNA data was sequencing and was checking their similarity compared to the database. The sequences of L5 and L7 showed high similarity to the fungus *Neofusicoccum parvum*. For sequence of L4, the database showed similarity to the fungus *Botryosphaeria dothidea.* Result from this investigation revealed that using of *Lasiodiplodia* sp. DNA sequence data for identification can give more misunderstanding on incompleteness of database. Also, these three fungi were classified to be in Botryosphaeriaceae and they were in the same class of the others stem-end rot fungi.

Keywords: Botryosphaeriaceae, stem-end rot, DNA data

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคขั้วผลเน่า โดยใช้เชื้อราตัวแทนที่มีลักษณะโคโลนีใกล้เคียงกับเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากแปลงผลิตมะม่วงในพื้นที่ผลิตต่างกัน จำนวน 3 ไอโซเลท คือ L4 L5 และ L7 จากการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่า เชื้อรา *L. theobromae* L7 เจริญเติบโตได้ดีกว่า L4 และ L5 สำหรับลักษณะเส้นใยของเชื้อรา L5 มีลักษณะสีขาวอมเทาฟูคล้ายกับเส้นใยของเชื้อรา L7 เมื่อนำข้อมูลดีเอ็นเอของเส้นใยเชื้อรามาตรวจสอบส่วนของ Internal transcribed spacer ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ ITS1และ ITS4 วิเคราะห์หาลำดับเบส ตรวจสอบความเหมือน และเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอของเชื้อรา พบว่า L5 กับ L7 มีข้อมูลลำดับเบสบางส่วนที่เหมือนกันและใกล้เคียงกับเชื้อรา *Neofusicoccum parvum* สำหรับเชื้อรา L4 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea* ผลจากการตรวจสอบครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การใช้ข้อมูลลำดับเบสเพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อรามีโอกาสผิดพลาด จากความไม่สมบูรณ์ของฐานข้อมูล และมีโอกาสที่จะพบโรคขั้วผลเน่าจากเชื้อราอื่นๆที่อยู่ในตระกูล Botryosphaeriaceae ได้

คำสำคัญ: Botryosphaeriaceae โรคขั้วผลเน่า ข้อมูลดีเอ็นเอ

คำนำ

ฐานข้อมูล genebank ที่รวบรวมข้อมูลดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิต มีส่วนช่วยให้นักวิจัยทั่วโลกได้ตรวจสอบข้อมูลร่วมกัน เพื่อการยืนยันชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษาอย่างถูกต้อง และทำให้เกิดการปรับปรุงระบบการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงการเรียกชื่อสกุลของเชื้อต้องถูกพิจารณามากขึ้น สำหรับประเทศไทยซึ่งส่งออกผลไม้ไปต่างประเทศก็ควรติดตามการเปลี่ยนแปลงโอกาสในการตรวจพบเชื้อราที่ติดไปกับผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะกลุ่ม Botryosphaeriaceae ซึ่งทำลายไม้ผลยืนต้นมากชนิดได้ จากข้อมูลโรคไม้ผลหลังการเก็บเกี่ยวของกรมวิชาการเกษตร พบว่า เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ที่พบโรคขั้วหวีเน่า (crown rot) ในกล้วย โรคผลเน่า (fruit rot) ในเงาะ แตงโม ทุเรียน ฝรั่ง มังคุด ลำไย ลองกอง ลิ้นจี่ และโรคขั้วผลเน่า (stem-end rot) ในมะม่วง มะละกอ โดยอาการโรคที่เรียกเหมือนกันอาจเกิดจากเชื้อราต่างชนิดได้ เช่น โรคขั้วผลเน่าในมะม่วงสามารถเกิดจากเชื้อรา *Dothiorella* sp. ได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อราที่พบบนผลมะม่วงแสดง

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

[2] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

[2] Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Kamphaeng sean, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

อาการขั้วผลเน่า ที่มีลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *L. theobromae* ทำการเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอของเชื้อกับฐานข้อมูลพันธุกรรม genebank เพื่อยืนยันความชัดเจนในการบ่งบอกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคขั้วผลเน่าที่พบในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อราจากอาการโรคขั้วผลเน่า

แยกเชื้อราจากโรคขั้วผลเน่ามะม่วงจากพื้นที่ผลิต จ.เชียงใหม่ (L4) จ.ศรีสะเกษ (L5) และ จ.สุพรรณบุรี (L7) โดยวิธี tissue transplanting นำเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวปนเทา ฟู เจริญได้เร็ว มาเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกขนาดโคโลนีของเชื้อรา ย้ายเส้นใยเชื้อราลงในอาหารเหลว PDB นำไปเขย่าความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน กรองและล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำปลอดเชื้อ ทำ freeze dry จนเส้นใยแห้ง

2. การสกัดดีเอ็นเอเชื้อรา

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราแห้ง โดยวิธีของ Weiland (1997) ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer และตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยใช้ gel electrophoresis เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน ย้อมสีด้วย Gel star และวัดแถบสีด้วย Dark Reader ของบริษัท Clare Chemical Research

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับเบส

ใช้ PCR Kit ของ Fermentas ร่วมกับไพรเมอร์ ITS1-4 ในการสังเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอ โดยมีโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ Pre denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรมจำนวน 34 รอบ นำตัวอย่าง DNA ไปวิเคราะห์ลำดับเบสกับบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd นำข้อมูลลำดับเบสที่เพิ่มปริมาณได้ ไปเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล genebank จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างข้อมูลดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม clustal 2.1 จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

เชื้อราที่แยกมาจากอาการขั้วผลเน่าของมะม่วงทั้งสามแหล่ง ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา ฟู เจริญได้เร็ว จากทั้งสามพื้นที่ ได้นำมาเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ และการเพิ่มปริมาณเส้นใย ผลดังแสดงใน Figure 1

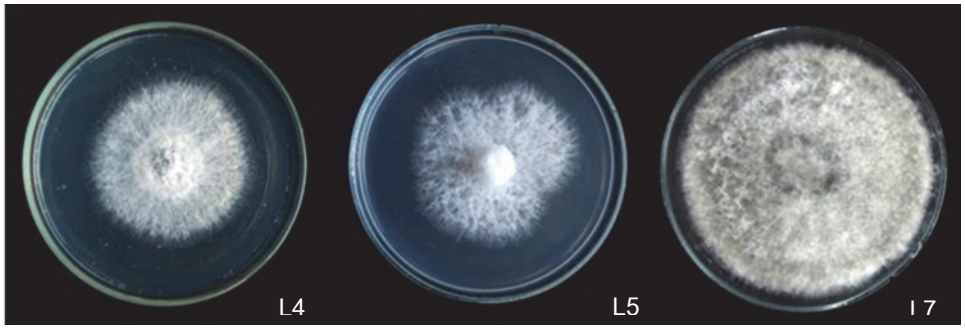

Figure 1 Different growth and colony character of three fungal isolates, isolated from the stem-end rot fruit on PDA, 3 days after inoculation: L4 (Chiang Mai), L5(Si Sa Ket) and L7 (Suphan Buri) isolate

การตรวจสอบข้อมูลจากฐานพันธุกรรม genebank

ข้อมูลพันธุกรรมบนสายของ chromosomal DNA ในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งลำดับเบสส่วนนี้เป็นส่วนของ RNA ที่ไม่ได้ทำหน้าที่ และอยู่บนสายของ ribosomal RNA ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ข้อมูลโปรตีน โดยข้อมูลลำดับเบสในส่วน ITS จัดเป็นส่วนที่มีการใช้เพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้ออย่างกว้างขวาง ทั้งในระดับระหว่างชนิด (species) และความแตกต่างในชนิดเดียวกัน (within species) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1-4 กับตัวอย่างเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสมาเปรียบเทียบความเหมือนของข้อมูลลำดับเบส ผลดังแสดงใน Figure 2

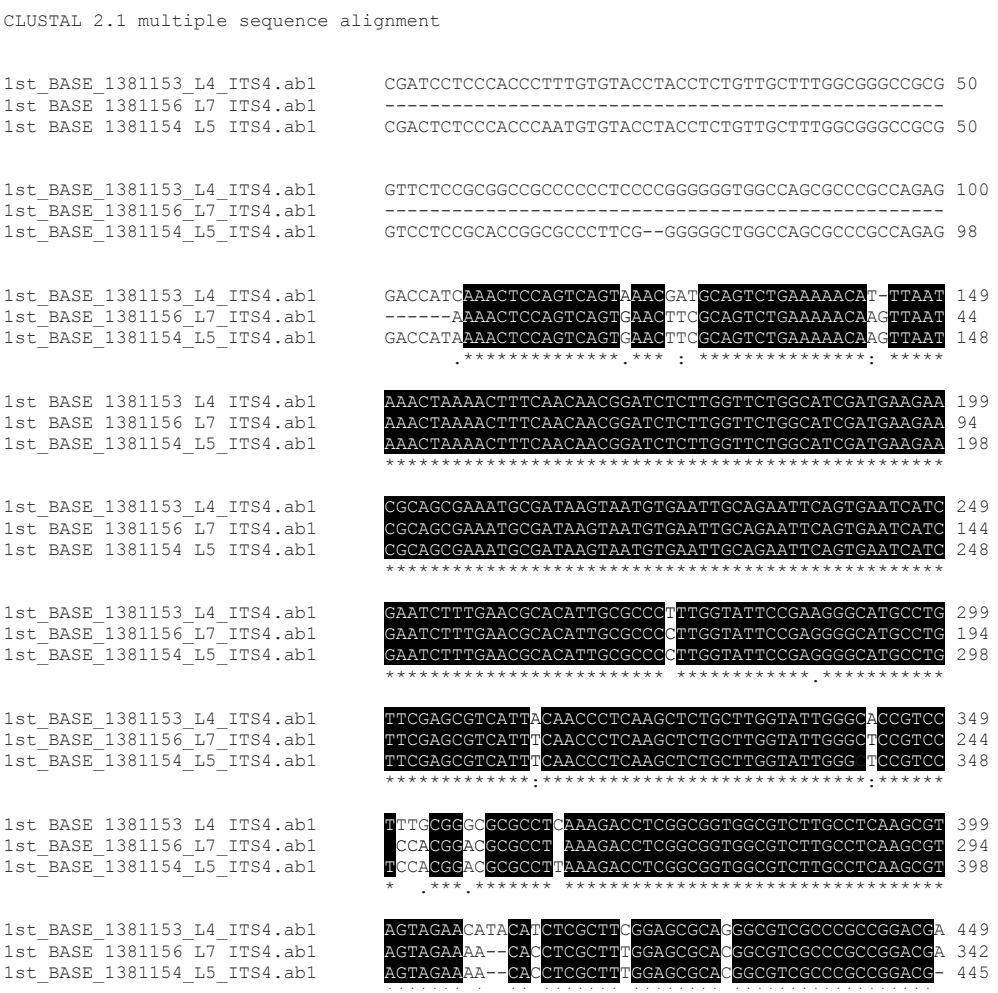

Figure 2 Sequence alignment of three isolates of fungi causing stem-end rot : L4 (Chiang Mai), L5 (Si Sa Ket) and L7 (Suphan Buri)

Table 1 Description of previous described fungi in NCBI genebank of L4 (Chiang Mai), L5 (Si Sa Ket) and L7 (Suphan Buri)

Isolate	Description	Accession
L4	1. *Botryosphaeria dothidea* isolate PGLW3	KF516940.1
	2. *Botryosphaeria dothidea* isolate LLW1	KF516938.1
	3. *Botryosphaeria dothidea* strain LJT5811	KC960936.1
L5	1. *Neofusicoccum parvum* strain MGEF45	KC492488.1
	2. *Neofusicoccum parvum*	JN811822.1
	3. *Neofusicoccum parvum* isolate E8902D	JN411805.1
L7	1. *Neofusicoccum sp.* M28	JQ936162.1
	2. *Neofusicoccum parvum* isolate CPO/NPa5	JN411805.1
	3. *Neofusicoccum parvum* isolate CPO/NPa4	HQ332206.1

จากการใช้ไพรเมอร์ ITS1-4 เพื่อตรวจสอบส่วนของ ITS จากเชื้อราขั้วผลเน่า 3 แหล่งผลิต พบเชื้อที่มาจาก จ. เชียงใหม่ (L4) มีลำดับเบสที่เพิ่มปริมาณได้ 482 ลำดับเบส เชื้อที่มาจาก จ.ศรีสะเกษ (L5) เพิ่มปริมาณได้ 376 ลำดับเบส และเชื้อที่มาจาก จ.สุพรรณบุรี (L7) เพิ่มปริมาณได้ 445 ลำดับเบส เมื่อนำข้อมูลดีเอ็นเอ มาเปรียบเทียบความเหมือนโดยใช้

โปรแกรม clustal 2.1 multiple sequence alignment ผลดัง Figure 2 โดยพบว่า เชื้อราขั้วผลเน่า จ.ศรีสะเกษ (L5) และ จ.สุพรรณบุรี (L7) มีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแตกต่างจากเชื้อรา จ.เชียงใหม่ (L4) และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูล genebank ผลดังแสดงใน Table 1 โดยเชื้อราขั้วผลเน่าจาก จ.ศรีสะเกษ (L5) และ จ.สุพรรณบุรี (L7) แสดงความเหมือนกับข้อมูลของเชื้อรา *Neofusicoccum parvum* ในขณะที่เชื้อราขั้วผลเน่าจาก จ.เชียงใหม่ (L4) แสดงความเหมือนกับเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea*

ในการศึกษาเชื้อราขั้วผลเน่ามะม่วง เมื่อเทียบข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย ITS 1-4 กับฐานข้อมูล genebank (Table 1) พบว่าตรงกับลักษณะของเชื้อ *N. parvum* ซึ่งมี telemorph เป็น *B. parva* และเชื้อรา *Fusicoccum aesculi* ซึ่งมี telemorph เป็น *B. dothidea* โดยเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการขั้วผลเน่า เป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายในชนิดของเชื้อ ลักษณะอาการที่พบบนพืชจะคล้ายคลึงกัน และสามารถพบได้ในไม้ผลยืนต้นหลายชนิด (Marques, *et al*., 2013) จากรายงานของ Slippers, *et al*. (2005) ที่ได้รายงานเชื้อรา *N. parvum* และ *B. dothidea* ในมะม่วงจากหลายๆส่วนของโลก และรายงานของ Huang and Wang (2011) ที่ได้สำรวจพบเชื้อกลุ่มเดียวกันใน Araucariaceae ของประเทศไต้หวัน เชื้อราในกลุ่มเดียวกันนี้ก็ได้พบในการศึกษาครั้งนี้ด้วย ด้วย โดย Alves, *et al*. (2008) พบว่า เชื้อรา *L. theobromae* ซึ่งมี telemorph เป็น *B. rhodina* มีความแตกต่างจาก *L. parva* ซึ่งมี telemorph เป็น *N. parvum* ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เป็นเชื้อรา L5 (Si Sa Ket) และ L7 (Suphan Buri)

การตรวจสอบลำดับเบสจากฐานข้อมูลสากล โดยที่เชื้อรากลุ่ม Botryosphereaceae ของประเทศไทย ยังไม่มีรายงานการพบและการศึกษาเกี่ยวกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอมากนัก ทั้งนี้นักวิจัยจะรายงานการเกิดโรคจากตัวอย่างพืช และลักษณะโคโลนีว่าเป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia sp.*หรือเชื้อรา *Diplodia* sp.ที่จะมีอาการและลักษณะเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ฐานข้อมูลทางพันธุกรรม genebank เพื่อการจำแนกเชื้อที่พบในประเทศไทย ยังต้องอาศัยความร่วมมือในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อรากลุ่มที่ทำให้เกิดปัญหาในระบบการส่งออก และความร่วมมือในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อราที่พบในทรงพุ่มของไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

สรุป

ข้อมูลของฐานพันธุกรรม และการสำรวจเชื้อในกลุ่ม Botryosphaeriaceae ของไม้ผลที่มีการส่งออก จำเป็นต้องได้รับการทบทวนและตรวจสอบในพื้นที่ผลิต เนื่องจากในการศึกษานี้ได้พบว่า เชื้อราที่ทำให้เกิดอาการขั้วผลเน่ามะม่วงในประเทศไทย ไม่ได้มีข้อมูลทางพันธุกรรมตรงกับเชื้อรา *L. theobromae* แต่มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *B. dothidea* และ *N. parvum* ซึ่งมีรายงานพบในมะม่วงของออสเตรเลีย และบราซิล ผลตรวจพบดังกล่าวแสดงว่าฐานข้อมูล gene bank และรวมไปถึงการสำรวจเชื้อราในกลุ่ม Botryosphaeriaceae ในแปลงไม้ผลของประเทศไทยต้องมีการพัฒนา

ขอขอบคุณ

ภาควิชาโรคพืช และสาขาเทคโนโลยีชีวภาพฯ คณะเกษตร กำแพงแสน สนับสนุนสถานที่ และค่าใช้จ่ายบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

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.

Huang C. L. and Y. Z. Wang. 2011. New records of endophytic fungi associated with the Araucariaceae in Taiwan. Collection and Research 24: 87-95

Marques, M. W., N. B. Lima, M. A. de Morais Jr, S. J. Michereff , A. J. L. Phillips and M. P. S. Câmara. 2013. *Botryosphaeria , Neofusicoccum, Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. Fungal Diversity 61 : 195–208.

Slippers B., G. I. Johnson, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield and M.J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the Botryosphaeria species causing diseases of *Mangifera indica*. Mycologia 97 : 99–110.

Weiland, J.J. 1997. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. Fungal Genetics Newsletter 44:60-63.