Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 143-146 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 143-146 (2561)

การจำแนกเชื้อรา *Lasmenia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของเงาะและการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค

Identification of *Lasmenia* sp., the Causal Agent of Rambutan Fruit Rot and Infection of the Pathogen

กัลยลักษณ์ เสนาะสำเนียง[1] สมศิริ แสงโชติ[1,2] และวีระณีย์ ทองศรี[1,2]

Kanyalak Sanosomneng[1], Somsiri Sangchote[1,2] and Veeranee Tongsri[1,2]

Abstract

Rambutan is an economically important fruit crop in Thailand. Most of the production is for domestic consumption and also export in fresh and processed forms. However, fruit rot caused by numerous genera of plant pathogenic fungi during storage is the important disease reducing the quantity and quality of the fruit. The study of some rambutan pathogens in Thailand is infrequently. This research aims were to study on the infection of the fungal pathogen including its conidial germination, and to identify the pathogens using molecular technique. The causal agents of fruit rot were obtained from diseased fruits which harvested from rambutan growing areas: Chanthaburi, Trat and Rayong provinces. The result revealed that there were 6 isolates of the pathogenic fungi consisted of CMK-1, CK-1, TB-1, TKS-1, TKP-2 and RM-3. These pathogens could infect the fruit tissues and expressed the symptoms with browning areas (1 cm in diameter) within 4 days after inoculation. The colony of the pathogens on PDA is flat with green concentric ring spore masses. The fungi produced conidia with 6.5-8 x 2.5-3 µm, hyaline and oval shaped. Conidia could germinate within 6 hr on WA. In Thailand, these morphological characteristics of the pathogens have been previously referred to the genera of *Greeneria* sp. In our study, six isolates were investigated by the nucleotide sequencing analysis of rDNA-ITS regions. It was shown that PCR products of all isolates (about 650 base pairs), were similar to the genus *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405) with 80-90% identity. The knowledge obtained from this study will be useful for investigation on fruit rot disease of rambutan for future research.

Keywords: Rambutan fruit rot, Spore germination, Fungal identification

บทคัดย่อ

เงาะเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การผลิตส่วนใหญ่เพื่อการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศทั้งในรูปของผลสดและแปรรูป อย่างไรก็ตามโรคผลเน่าระหว่างการเก็บรักษากลับเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตเงาะ โดยมีกลุ่มเชื้อราหลายสกุลที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งบางสกุลยังมีการศึกษากันน้อย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเข้าทำลาย รวมทั้งการงอกของสปอร์ และการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธีชีวโมเลกุล โดยทำการแยกเชื้อราจากผลเงาะที่แสดงอาการผลเน่าจากแหล่งปลูก 3 จังหวัด คือ จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง พบเชื้อราจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CMK-1, CK-1, TB-1, TKS-1, TKP-2 และ RM-3 โดยเชื้อราดังกล่าวทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อและปรากฏอาการแผลสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน เชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลท สร้างเส้นใยใสเจริญราบไปบนผิวหน้าอาหารและสร้างกลุ่มสปอร์สีเขียวเจริญซ้อนกันเป็นชั้นบนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์มีขนาด 6.5-8 x 2.5-3 µm ลักษณะใส เซลล์เดียว รูปร่างรี สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกบนอาหาร WA ได้ภายใน 6 hr ซึ่งรายงานในประเทศไทยที่ผ่านมาได้ระบุชื่อสกุลตามลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราดังกล่าวคือ *Greeneria* sp. แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA บริเวณ ITS พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาด 650 คู่เบส ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราสกุล *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405) ที่ความเหมือน 80-90% ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาโรคผลเน่าของเงาะในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: โรคผลเน่าเงาะ, การงอกของสปอร์, การจำแนกเชื้อรา

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of plant pathology, Faculty of agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Commission, Bangkok 10400

คำนำ

เงาะเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด ระยอง และบางส่วนของภาคใต้ โดยผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปต่างประเทศ โรคผลเน่าเงาะระหว่างการเก็บรักษาเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตเงาะ ซึ่งมีเชื้อราหลายสกุลที่เป็นสาเหตุโรค ดังเช่นรายงานจากฮาวายพบว่าเกิดจากเชื้อรา *Lasmenia* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.,*Gliocephalotrichum simplex* และ *Phomopsis* sp. (Johnson *et al*., 1997; Sivakumar *et al*., 1998) สำหรับประเทศไทย สมศิริและคณะ (2540) ได้รายงานสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากเชื้อราสกุลเหล่านี้ไว้เช่นเดียวกัน ยกเว้นในสกุล *Lasmenia* โดยเชื้อรา *Lasmenia* นี้เริ่มมีรายงานพบว่าเป็นสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะในแหล่งปลูกอื่นๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น ในปี 2011 พบครั้งแรกในแหล่งปลูกเงาะที่ประเทศเปอโตริโก (Serrato *et al*., 2011) ซึ่งการศึกษาทางชีววิทยาของเชื้อราในสกุลนี้ยังไม่ค่อยพบมากนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเข้าทำลายและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Lasmenia* ตลอดจนการจำแนกเชื้อราโดยวิธีศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาระดับที่สูงขึ้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคและพิสูจน์การก่อโรค

ซื้อผลเงาะพันธุ์โรงเรียนจากจังหวัดจันทบุรี ตราด และระยองในระยะผิวผลสีส้มอมแดงขนสีเขียว นำมาวางในตระกร้าที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 85% เป็นเวลา 5 วันที่อุณหภูมิห้อง (25-30ºC) สังเกตลักษณะอาการผลเน่าที่เกิดขึ้น แยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ บันทึกลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และรูปร่างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนผลเงาะ โดยหยดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 20 µl (เข้มข้น 1.5 x10^6 spore/ml) ลงบนเปลือกผลเงาะที่ผ่านการทำแผลลึก 1 มล.จำนวน 1 แผลต่อผล วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ผล บ่มผลเงาะในตะกร้าชื้น เป็นเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะอาการของโรค

2. ศึกษาการงอกของสปอร์เชื้อรา

หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปริมาตร 100 µl ลงบนอาหาร WA เกลี่ยสปอร์ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่ 25ºC เป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 hr วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ สุ่มนับเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และวัดขนาดความยาวของ Germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 400 สปอร์ต่อซ้ำ

3. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยวิธีชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อราที่ผ่านการทำ single spore ในอาหาร PDB ที่เขย่าในความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเส้นใยเชื้อรามาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด (DNeasy® Plant Mini Kit; QIAGEN) จากนั้นนำ DNA ไปทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับ universal primer ITS1 และ ITS4 (ดัดแปลงจากวิธีการของ White *et al*.,1990) นำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี Gel Electrophoresis บน Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อม Agarose gel ด้วย GelStar™ (nucleic acid gel stain; LONZA, Rockland) นาน 10 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Transluminator (BioRAD, USA) นำผลผลิต PCR ส่งไปบริษัทเพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-ITS4 rRNA นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบความใกล้เคียงกับฐานข้อมูลใน GenBank

ผล

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคและพิสูจน์การก่อโรค

จากการแยกเชื้อราจากเงาะที่แสดงอาการผลเน่า พบเชื้อราที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อรา *Greeneria* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท (ไอโซเลท CMK-1, CK-1, TB-1, TKS-1, TKP-2 และ RM-3) โดยเชื้อราสกุลดังกล่าวพบมากเป็นอันดับต้นๆ ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรค ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA เป็นชั้นซ้อนกัน และสร้างกลุ่มสปอร์สีเขียวเข้ม โดยแต่ละไอโซเลทมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกัน (Fig.1) เชื้อราทุกไอโซเลทมีลักษณะของสปอร์คล้ายกันคือมีเซลล์เดียว ใส รูปร่างกลมรีเล็กน้อย หัวท้ายมน มีขนาด 6.5-8 x 2.5-3 µm (Fig. 2) และเมื่อนำเชื้อรามาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่า ทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดโรคได้ไม่แตกต่างกัน โดยจะทำให้เนื้อเยื่อเปลือกผลเงาะช้ำเป็นสีคล้ำในช่วงแรกต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีขนาดแผลประมาณ 1 ซม. ที่ 3-4 วันหลังจากปลูกเชื้อ อาการเน่าจะลุกลามอย่างช้าๆ เชื้อราสามารถเข้าทำลายที่เนื้อผล ต่อมาแผลจะค่อยๆ ยุบตัวและแห้งเป็นสีน้ำตาลเข้ม (Fig. 3)

2. ศึกษาการงอกของสปอร์เชื้อรา

จากการศึกษาการงอกของสปอร์เชื้อราไอโซเลท CK-1 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา พบว่า สปอร์เริ่มงอกที่ 6 hr บนอาหาร WA โดยพบการงอก 51.3% และมีความยาว germ tube เฉลี่ย 36.7 µm germ tube มีการเจริญยืดยาวมากขึ้นที่ 12 hr และมีการเจริญเป็นเส้นใยแตกเป็นสาขาตั้งแต่ 18 hr. เป็นต้นไป (Fig. 4)

3. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยวิธีชีวโมเลกุล

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาด 650 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล (database) ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อรา 5 ไอโซเลท (CMK-1, CK-1, TKS-1, TKP-2 และ TB-1) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อราสกุล *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405.2) ที่ความเหมือน 90% ในขณะที่ไอโซเลท RM-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อราในฐานข้อมูลดังกล่าว ที่ความเหมือน 80% (Fig. 5)

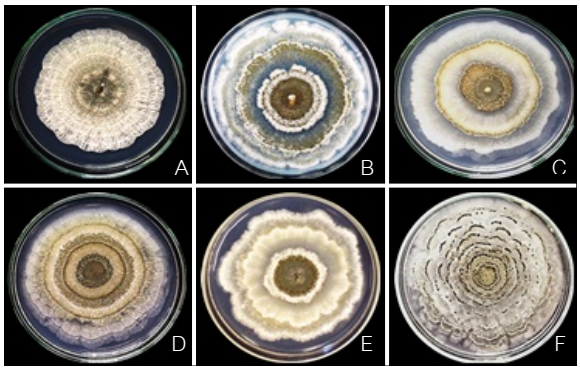

Figure 1 Colony characteristics of *Lasmenia* spp. on PDA incubated at 25ºC for 7 days A) CMK-1, B) CK-1, C) TKS-1, D) TB-1, E) TKP-2 and F) RM-3

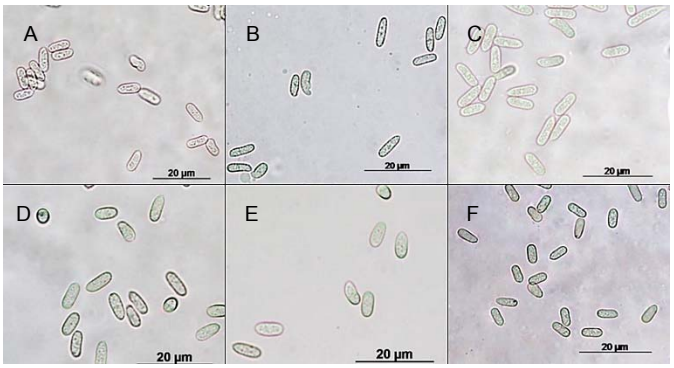

Figure 2 Spore characteristics of *Lasmenia* spp. on PDA, A) CMK-1, B) CK-1, C) TKS-1, D) TB-1, E) TKP-2 and F) RM-3

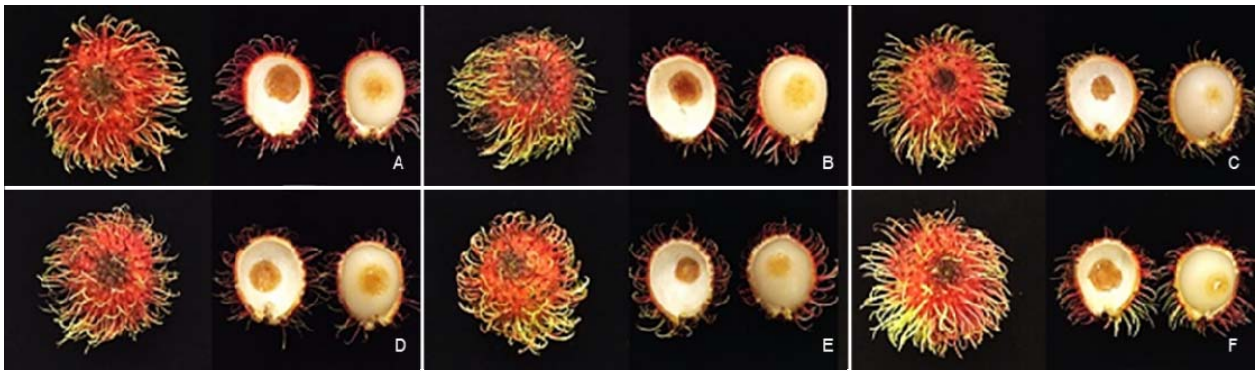

Figure 3 Rambutan fruit rot diseases caused by artificial inoculation of *Lasmenia* sp. isolates A) CMK-1, B) CK-1, C) TKS-1, D) TB-1, E) TKP-2 and F) RM-3, incubated at room temperature (25-30ºC) for 4 days

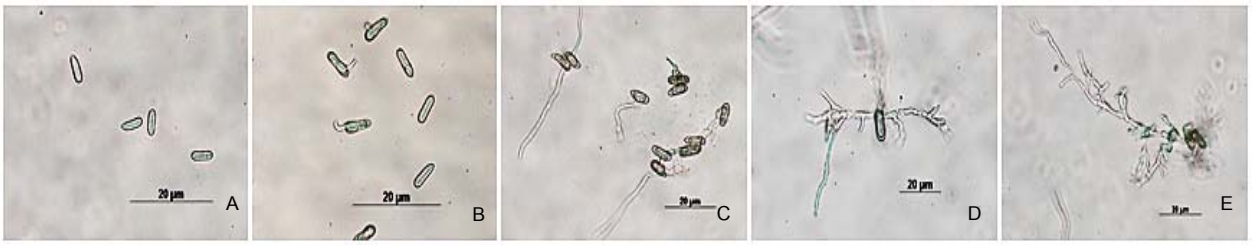

Figure 4 Spore germination of *Lasmenia* sp. isolate CK-1 at different periods of time A) 0 hr, B) 6 hr, C) 12 hr, D) 18 hr and E) 24 hr

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อรา *Lasmenia* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลทมีลักษณะการเจริญของโคโลนี รูปร่างและขนาดของสปอร์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Greeneria* spp. (นิพนธ์, 2542) เมื่อวิเคราะห์แผนภาพความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) โดยวิธี neighbor-joining พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลท (CMK-1, CK-1, TKS-1, TKP-2 และ TB-1) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราสกุล *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405.2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Senanayake *et al*. (2017) ที่ได้จัดจำแนกเชื้อราในวงศ์ *Diaporthales* พบว่าเชื้อรา *Lasmenia* spp. ถูกจัดอยู่คนละกลุ่มสายสัมพันธ์กับเชื้อรา *Greeneria* spp. ส่วนเชื้อรา *Lasmenia* ไอโซเลท RM-3 นั้น ถึงแม้จะมีขนาดและรูปร่างของสปอร์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Lasmenia* ทั้ง 5 ไอโซเลท แต่กลับมีความแตกต่างทางสายสัมพันธ์กับเชื้อรา *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405.2) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากลำดับเบสมีความแตกต่างจากทั้ง 5 ไอโซเลท รวมทั้งไอโซเลท RM-3 มีรูปแบบของการเจริญเติบโตของโคโลนีที่แตกต่างไปจาก 5 ไอโซเลท

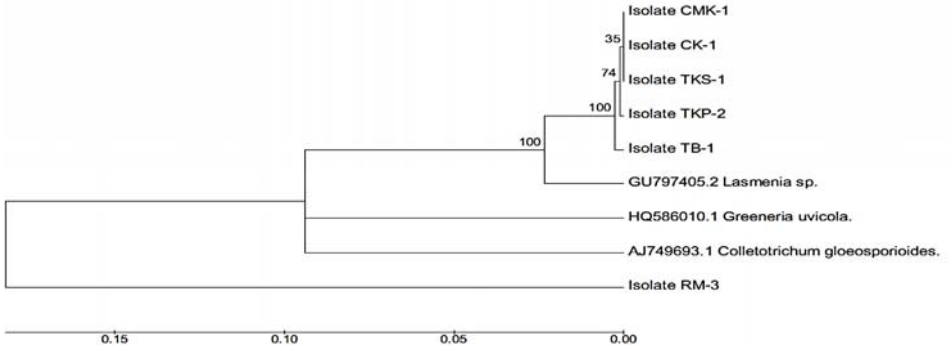

Figure 5 The neighbor-joining tree based on rDNA-ITS nucleotide sequence 6 isolates causing agent fruit rot disease of rambutan. comparing with those of *Lasmenia* sp., *Greeneria uvicola* and *Colletotrichum gloeosporioides* from EMBL and NCBI database via MEGA program 5.0 (bootstrap 1000 replicates)

สรุป

เชื้อรา *Lasmenia* ทั้ง 6 ไอโซเลท ที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่าของเงาะในแหล่งปลูกจังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง มีลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA แตกต่างกัน แต่ผลิตสปอร์ที่มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกัน รวมทั้งมีความสามารถในการก่อโรคได้ไม่แตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อรามาวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถระบุได้ว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อราสกุล *Lasmenia* sp. CBS 124122 (Accession no. GU797405.2) ที่ความเหมือน 80-90% ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิด (species) ของเชื้อราได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคเงาะ. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร “หมอพืช-ไม้ผล” ฉบับที่ 8, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 29 หน้า.

สมศิริ แสงโชติ, อุดม ฟ้ารุ่งสาง และ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง. 2540. การเข้าทำลายของผลเงาะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่า และการควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35, สาขาพืชส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร อุตสาหกรรมเกษตร, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ.

Senanayake, W.J. Li, S.C. Karunarathna and K.D. Hyde. 2017. Families of *Diaporthales* based on morphological and phylogenetic evidence. Studies in Mycology. 86: 217–296.

Johnson, G.I., D.C. Joyce and M.J. Gosbee. 1997. *Botryosphaeria* (anamorphs *Fusicoccum* and *Dothiorella*) *Diaporthe* (anamorphs *Phompsis* spp.) and *Lasiodiplodia* infection and defense. *In*: G.I. Johnson G I and Highly E (eds.). Disease Resistance in Fruit, Australia, Australian Centre for International Agricultural Research 80: 46–52.

Serrato-Diaz, L.M., L.I. Rivera-Vergas, R. Goenaga, G.J.M. Verkley and R.D. French-Monar. 2011. First report of *Lasmenia* sp. causing rachis necrosis, flower absorption, fruit rot, and leaf spots on rambutan in Puerto Rico. American Phytopathological Society 95: 1313-1314.

Sivakumar, D., R.S. W. Wijeratnam and M. Abeyesekere. 1998. Report on minimizing postharvest loss of rambutan in storage, Sri Lanka, Council of Agricultural Research Policy.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press, Inc. pp 315-322.