Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 31-34 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 31-34 (2554)

การจำแนกชนิดในระดับโมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากตัวอย่างในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

Molecular Identification of Anthracnose Pathogen of 'Nam Dok Mai Si Thong' Samples from Mango Orchards at Prao District, Chiang Mai Province

พงศธร ธรรมถนอม[1] **และ ปริญญา จันทรศรี**[1,2]
Pongsathorn Dhumtanom[1] and Parinya Chantrasri[1,2]

Abstract

Anthracnose pathogen causes severe symptoms and yield loss in pre- and postharvest of mango. Despite previous reports, *Colletotrichum gloeosporioides* was the causal agent of mango anthracnose. In this experiment, more than 10 isolates of *Colletotrichum* spp. were derived from leaf, branch, flower and fruit samples collected from pruning stage to harvesting stage of 'Nam Dok Mai Si Thong' mango orchards at Prao district, Chiang Mai province. Restriction enzyme digestion technique was applied for the determination in species level and additional confirm by specific pairs of primer in Polymerase Chain Reaction. According to the results, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* were identified.

Keywords: mango, anthracnose, restriction enzyme

บทคัดย่อ

เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงและทำให้เกิดความสูญเสียของผลมะม่วงทั้งในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จากการทดลองนี้เชื้อ *Colletotrichum* spp. มากกว่า 10 ไอโซเลต ที่ได้มาจากตัวอย่างใบ กิ่ง ดอก และผล ที่เก็บเริ่มตั้งแต่ระยะตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะเก็บเกี่ยวของสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ได้รับการตรวจสอบในระดับโมเลกุลโดยอาศัยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อจำแนกเชื้อราในระดับสปีชี่ส์เนื่องจากลำดับการเรียงตัวของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน รวมทั้งการใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งอาศัยไพรเมอร์สองชุดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลการทดลองพบเชื้อที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum*

คำสำคัญ: มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง, แอนแทรกโนสม เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

คำนำ

แหล่งปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออกของพื้นที่ปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรกโนส ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. แต่เนื่องจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการพบความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ ซึ่งได้แก่ รูปร่างลักษณะของสปอร์ สีของโคโลนีและเส้นใย ตลอดจนอาการที่ปรากฏบนใบมีความแตกต่างกัน จึงเชื่อว่าน่าจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงที่นอกเหนือไปจาก *C. gloeosporioides* ดังที่เคยมีรายงานในแหล่งปลูกมะม่วงในต่างประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย ไต้หวันและศรีลังกา (Plotez, 1994; Weng และ Chuang, 1995; Jayasinghe และ Fernando, 2009) ที่ตรวจพบเชื้อ *C. acutatum* Simm. อีกชนิดหนึ่งจากอาการแอนแทรกโนส ด้วยเหตุนี้จึงได้นำวิธีการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุ ซึ่งจะสามารถช่วยแยกความแตกต่างของชนิดเชื้อราสาเหตุได้แม่นยำยิ่งขึ้น โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ หรือส่วนของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อราสาเหตุโรคแล้วนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อราชนิดนั้นๆ เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อไปเพื่อการตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคในส่วนต่างๆของมะม่วงนี้ได้

[1] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100
[1] Science and Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัด DNA ของเชื้อราสาเหตุโรค รวบรวมส่วนของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่ได้จากตัวอย่าง ยอดอ่อน ช่อดอก ผลอ่อนและใบ ของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองระยะต่างๆ ที่เก็บมาในช่วงระหว่างเดือน ตุลาคม 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2553 มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง จากสวนของสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออกอำเภอพร้าว เลขที่ 78 หมู่ 4 ตำบลป่าไหน อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ผ่านการคัดแยกให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วนำมาสกัด genomic DNA ด้วย fungal genomic DNA extraction kit (Favorgen, Taiwan) โดยใช้เส้นใยเชื้อราประมาณ 20 mg ต่อตัวอย่าง

การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทำการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ ribosomal DNA ในช่วง *ITS1-5.8s-ITS2* ของไมโทคอนเดรียโดยอาศัยคู่ไพรเมอร์ ITS-1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) และ ITS-4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (20 µl) ประกอบด้วย DNA template 10 ng, 1X *Taq* polymerase buffer dNTPs อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM, *Taq* polymerase 1 Unit (Vivantis, Chino, USA) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-Rad PTC-200, Bio-Rad, USA) โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาทีที่ 95 °C ตามด้วย 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 55°C และ 30 วินาที 72°C (รวม 25 รอบ) และที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการตัด PCR products ดังกล่าวด้วย *Rsa*I หรือ *Hae*III แยกกัน โดยในหลอดทดลองประกอบด้วย reaction buffer 1x, PCR products 10-15 ng และ 10 unit ของ *Rsa*I หรือ *Hae*III และ distilled water นำไปบ่มที่ 37°C นาน 6 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 85°C นาน 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยการทำ gel electrophoresis บน agarose gel (1.5%) ใน 0.5x Tris-boric acid-EDTA buffer

การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระดับสปีชีส์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ทำการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในช่วง *ITS1-5.8s-ITS2* โดยอาศัยคู่ของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสปีชี่ส์ของ *Colletotrichum spp.* โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Freeman และคณะ (2000) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *C. acutatum* คือ 5′-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3′ (*Ca*Int2) และที่ใช้ในการตรวจสอบ *C. gloeosporioides* คือ 5′-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3′ (*Cg*Int) โดยแต่ละตัวจะใช้คู่กับ ITS-4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (20 µl) ประกอบด้วย DNA template 10–100 ng, 1X *Taq* buffer dNTPs อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM, *Taq* polymerase 0.5 unit (Vivantis, Chino, USA) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-Rad PTC-200, Bio-Rad, USA) โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาทีที่ 95 °C ตามด้วย 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 60°C และ 30 วินาที 72°C (รวมทั้งสิ้น 25 รอบ) และที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำ gel electrophoresis บน agarose gel (1.5%) ใน 0.5x Tris-acetate-EDTA buffer นำมาย้อมในเอทิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ผลและวิจารณ์

เชื้อที่แยกจาก ตัวอย่างยอดอ่อน ช่อดอก ผลอ่อนและใบ ของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองระยะต่างๆ ที่เก็บมาในช่วงเดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2553 จากสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 21 ไอโซเลต สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทาออกเขียว ซึ่งตัวแทนของกลุ่มคือไอโซเลต P5Rn (n = 15 ไอโซเลต) และกลุ่มที่มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทาซึ่งตัวแทนของกลุ่มคือไอโซเลต P6Rn (n = 6 ไอโซเลต) (Fig.1) พบว่าเมื่ออาศัยหลักการของการนำชิ้นส่วนของ rDNA มาตัดด้วยเอ็นไซมน์ตัดจำเพาะบางตัวเช่น *Rsa*I ทำให้สามารถแบ่งเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่ถูกย่อยได้หรือไม่ได้ด้วย *Rsa*I พบว่าไอโซเลต P5R1 อยู่ในกลุ่มที่ถูกย่อย และไอโซเลต P6R2 อยู่ในกลุ่มที่ไม่ถูกย่อย ขณะที่ *Hae*III ไม่สามารถทำให้เกิดความแตกต่างในกลุ่มตัวอย่างเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้งหมด คือตัวอย่างทั้งหมดถูกย่อยได้และแสดงรูปแบบของ bands หลังการทำ gel electrophoresis ที่เหมือนกัน (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้)

เมื่อนำมาตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของเชื้อราก่อโรคโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์และคู่ของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. คือคู่ไพรเมอร์ ITS-4/*Cg*Int (จำเพาะต่อ C. *gloeosporioides*) และคู่ไพรเมอร์ ITS-4/*Ca*Int2 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*) สามารถตรวจพบและจำแนกความแตกต่างของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสได้ทั้ง 2 ชนิด จากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บมาจากสวนเดียวกัน ซึ่งจะให้พีซีอาร์โพรดักส์ ขนาด 450 และ 490 bp ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้

สอดคล้องกับผลของการย่อย rDNA ข้างต้นด้วย *Rsa*I ทำให้สามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต P5R1 เป็นเชื้อ *C. acutatum* ขณะที่กลุ่มไอโซเลต P6R2 เป็น *C. gloeosporioides* (Fig.2)

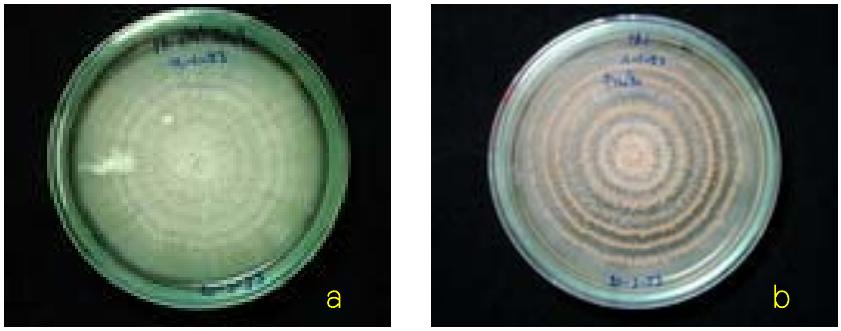

Fig. 1 *Colletotrichum* spp. colony types grown on acidified potato dextrose agar were : **a)** green to grey mycelia with different levels of sporulation, showing pale orange spore masses ; **b)** grayish white, cottony mycelia with sporulation, showing orange spore masses.

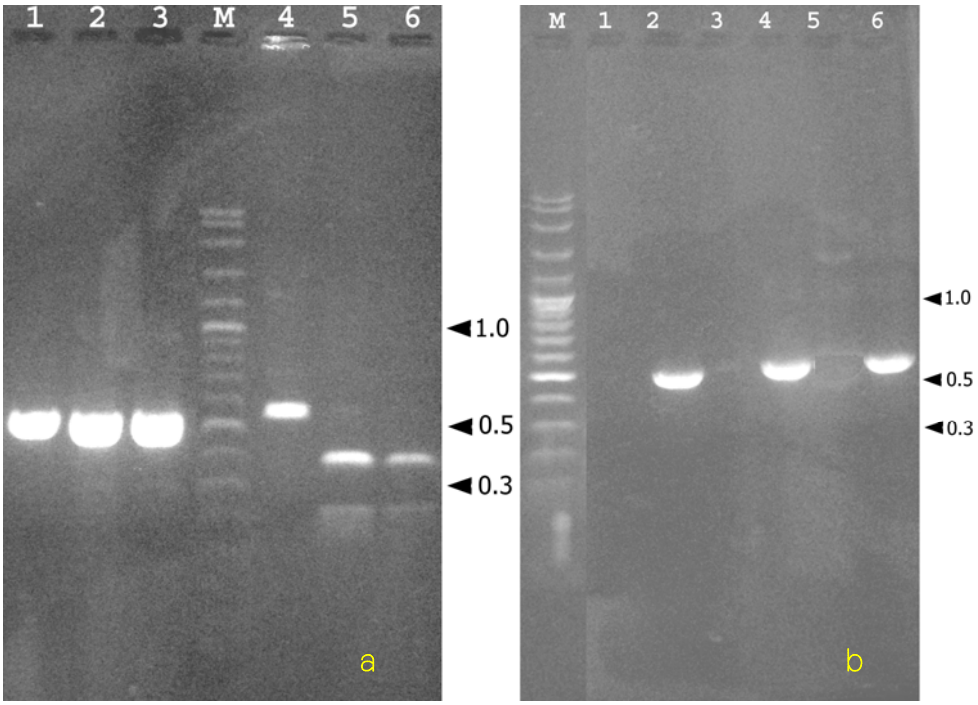

Fig.2 **a)** *Colletotrichum* isolates from 'Nam Dok Mai Si Thong' mango were identified into 2 groups according to the *ITS1-5.8s-ITS2*/*Rsa*I digestion results. The uncut products are on the left side of DNA ladder. Lane 1 and 4 ; isolate P5R1, Lane 2 and 5 ; isolate P6R2, Lane 3 and 6 ; isolate P6R3, L; 100 bp DNA ladder (Vivantis, Chino, USA)

b) *Colletotrichum* isolates from 'Nam Dok Mai Si Thong' mango identified as *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* using primers ITS-4/*Cg*Int (lane 1-3) and primer ITS-4/*Ca*Int2 (lane 4-6), respectively. Lane 1 and 4; isolate P5R1, Lane 2 and 5; isolate P6R2, Lane 3 and 6; isolate P5R2. Isolate P6R2 was identified as *C. gloeosporioides* and P5R1 and P5R2 were identified as *C. acutatum*. L; 100 bp DNA ladder (Vivantis, Chino, USA)

สรุป

ผลการศึกษาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* ในช่วงระยะตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะติดช่อดอกของสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองอายุ 5 ปีในแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2552 ถึงกุมภาพันธ์ 2553 และเมื่อนำตัวอย่างใบและกิ่งมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกเชื้อราแอนแทรกโนสที่มีความแตกต่างได้มากกว่า 2 ชนิด และได้นำเทคนิคพีซีอาร์และการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง โดยเมื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในช่วง *ITS1-5.8s –ITS2* แล้วย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ทำให้สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อราทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบ 21 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม จากนั้นอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สองชุดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในการจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคที่พบ โดยไพรเมอร์ ITS-4/*Ca*Int จำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* ขณะที่ ไพรเมอร์ ITS-4/*Ca*Int2 จำเพาะต่อเชื้อ C. *acutatum* พบว่ากลุ่มไอโซเลต P6Rn คือ *C. gloeosporioides* ขณะที่กลุ่มไอโซเลต P5R1 คือ *C. acutatum*

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณและครุภัณฑ์วิจัยในการดำเนินการโครงการวิจัยเรื่องการตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา

เอกสารอ้างอิง

Freeman, S., D. Minz, E. Jurkevitch, M. Maymon and E. Shabi. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathol.* 90(6):608-614.

Jayasinghe, C.K. and T.H.P.S. Fernando. 2009. First report of *Colletotrichum acutatum* on *Mangifera indica* in Sri Lanka. *Cey.J.Sci. (Bio. Sci.)* 38 (1): 31 – 34.

Plotez, R.C. 1994. Anthracnose. *In* R.C. Ploetz, G.A. Zentmyer, W.T. Nishijima, K.G. Rohrbach and H.D. Ohr (*eds*.). Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS Press. St.Paul, Minnesota. p. 35 – 36.

Weng, F.Y. and T.Y. Chuang. 1995. Grouping of mango anthracnose fungus in Taiwan. *Plant Protect. Bull.* (Taichung 37) 3: 295 – 309.