Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 55-58 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 55-58 (2554)

การตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยวของสวนมะม่วงอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

Determination of *Colletotrichum* spp. on 'Nam Dok Mai Si Thong' Mango in pre- and post- harvest stage at Prao District Mango Orchards, Chiang Mai

ปริญญา จันทรศรี [1,2], พงศธร ธรรมถนอม[1], พิเชษฐ์ น้อยมณี [2], รัฐพล พรประสิทธิ์ [2] และศศิธร การะบุญ [2]
Parinya Chantrasri [1,2], Pongsathorn Dhumtanom[1], Pichet Noimanee [2], Rattapol Pornprasit [2] and Sasithorn Karaboon [2]

Abstract

A survey of anthracnose was conducted in 'Nam Dok Mai Si Thong' mango orchards at Prao district, Chiang Mai Province, from October 2009 to April 2010 with 5 year-old trees of the mango from pruning stage to harvesting stage. The fungal pathogens were isolated by using paraquat technique to induce the growth of the fungi. Morphological and molecular biology characteristics of 21 *Colletotrichum* spp. Isolates were determined. Fifteen isolates from flower, peduncle, leaf, branch, immature fruit and harvest fruit samples were identified as *C. gloeosporioides* while only six isolates as *C. acutatum.* Pathogenicity tests conducted on detached mango leaves showed that both species were pathogenic. Necrotic lesions produced orange conidial masses 7 days after inoculation. Polymerase chain reaction assay was used complementary to morphological results and confirmed *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* causing anthracnose in 'Nam Dok Mai Si Thong' mango orchards at Prao district.

Keywords: 'Nam Dok Mai Si Thong' mango, Prao, anthracnose

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจโรคแอนแทรกโนสในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่มีอายุ 5 ปีในแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553 และเมื่อนำตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการโดยการกระตุ้นการเจริญของเชื้อราด้วยสารพาราควอท ในชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากส่วนของดอก ก้าน ใบ กิ่งและผลทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยว จำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลต ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลตรวจพบว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลต และ *C. acutatum* จำนวน 6 ไอโซเลต การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบ โดยสามารถตรวจพบกลุ่มสปอร์สีส้มบนรอยแผลไหม้สีน้ำตาลหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน การใช้วิธีการทางพอลิเมอเรสเชนรีแอกชั่น ร่วมกับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สามารถช่วยสนับสนุน และยืนยันผลว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองของแหล่งปลูกอำเภอพร้าว

คำสำคัญ: มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง พร้าว แอนแทรกโนส

คำนำ

โรคสำคัญของการปลูกมะม่วงในประเทศไทยคือโรคแอนแทรกโนส ซึ่งมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. อย่างไรก็ตามในสภาพของการเกิดโรคแอนแทรกโนสในแหล่งปลูกมะม่วงเพื่อการส่งออกของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ พบลักษณะอาการของโรคที่มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันปรากฏกับส่วนต่างๆของมะม่วง และเชื้อที่แยกได้มีความแตกต่างทางลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ซึ่งจากความหลากหลายของชนิดเชื้อราสาเหตุ น่าจะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคที่ปรากฏ ด้วยเหตุนี้จึงได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อร่วมกับวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส

[1] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ , เชียงใหม่ 50200
[1] Science and Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ , เชียงใหม่ 50200
[2] Postharvest Technology Research Institute / Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคและการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

เก็บตัวอย่างที่ระยะการเจริญต่างๆกันของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง จากสวน อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ จำนวน 2 สวน ได้แก่ ช่อดอก กิ่ง ใบ และผลก่อนและหลังเก็บเกี่ยว นำมาใช้แยกเชื้อราสาเหตุ โดยวิธีการกระตุ้นให้เชื้อที่เจริญแฝงอยู่ปรากฏออกมาโดยการทำให้เนื้อเยื่อพืชเสื่อมสลายด้วยการใช้ paraquat (แช่ใน 95% ethanol 30 วินาที NaOCl 2% 5 นาที และ 0.4% paraquat 5 นาที ผึ่งให้แห้ง บ่มไว้ในกล่องเก็บรักษาความชื้น) เชื้อที่แยกจากตัวอย่างพืชระยะต่างๆ นำมาเพาะเลี้ยงบน acidified potato dextrose agar (PDA + 25 % lactic acid อัตรา 0.1%) หลังจากเชื้อเจริญบนอาหาร มีการสร้างเส้นใยและสปอร์ นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากลักษณะสีของเส้นใยและรูปร่างของสปอร์หรือโคนิเดีย และนำมาสกัด DNA ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ โดยเก็บส่วนของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ลงใน microfuge tube ขนาด 2 ml ให้ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด แล้วสกัด DNA ด้วย fungal genomic DNA extraction kit (Favogen, USA) ใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Freeman และคณะ (2000) ทำการเพิ่มปริมาณของ DNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) คู่กับไพรเมอร์ของ *C. gloeosporioides* (*Cg*Int) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG) และไพรเมอร์ของ *C. acutatum* (*Ca*Int2) (GGGGAAGCCTCTCGCGG) ในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ PCR reactions total volume = 20 µl ประกอบด้วย genomic DNA 10 – 100 ng, 1X Tag buffer (Vivantis, Poland), 10mM Tris-HCL ,pH 9.0 ; 50 mM KCL, dNTP อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM ,Taq polymerase 0.5 unit (Vivantis, Poland), $MgCl_2$ 1.5 mM นำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PTC-Thermocycler ; MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาทีที่ 95 °C ตามด้วย 25 รอบของ 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 55°C และ 30 วินาที 72°C หลังจากที่ทำปฏิกริยาครบจำนวนรอบทั้งหมดแล้วบ่มต่อที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis บน 1.5 % agarose gel ใน Tris-acetate-EDTA buffer ย้อมใน ethidium bromide แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างของชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส (positive controls คือ *C. acutatum* CIAT isolate : TOM 021 และ *C. gloeosporioides* CIAT isolate : 1613 negative control คือ *C. fragariae* isolate : 120-S)

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

เชื้อราที่ผ่านการตรวจสอบทางลักษณะสัณฐานวิทยาและอณูชีวิทยาระดับโมเลกุล นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร acidified PDA บ่มไว้จนสร้าง spore mass แล้วขูดส่วนสปอร์มาเตรียมเป็น spore suspension (10^6 spore/ml) ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปลูกเชื้อบนใบมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการเช็ดผิวใบด้วย 70% ethanol หยดสปอร์ของเชื้อปริมาตร 50 µl ลงบนรอยแผลที่ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อแล้วทำแผลบนใบ บ่มไว้ในกล่องบ่มเชื้อ 5 - 7 วัน ที่รักษาความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 95% บันทึกอาการเกิดโรค

ผลและวิจารณ์

การใช้ paraquat ทำให้เนื้อเยื่อพืชเสื่อมสลายเร็วขึ้นและเป็นการกระตุ้นให้เชื้อที่เจริญแฝงอยู่ให้ปรากฏออกมา สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง (Barnet and Barry, 2003) เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะของโคนิเดียค่อนข้างยาวเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมนมีความยาวตั้งแต่ 12 - 20 µm และกว้าง 3.5 - 6 µm และมีเส้นใยเป็นสีเทาออกเขียว สร้างกลุ่มสปอร์ (spore masses) สีเหลืองรวมทั้งสิ้น 15 ไอโซเลต (P5Rn : P5R1 – P5R15) และกลุ่มที่มีลักษณะของโคนิเดียค่อนข้างรีหัวท้ายแหลมมีความยาวตั้งแต่ 8 - 13 µm และกว้าง 2 - 5 µm และมีเส้นใยเป็นสีขาวปนเทา สร้างกลุ่มสปอร์ (spore masses) สีส้มรวมทั้งสิ้น 6 ไอโซเลต(P6Rn : P6R1 – P6R6) (Fig. 1)

การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction สำหรับคู่ของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิด ของ *Colletotrichum* sp. คือคู่ primer ITS4-*Ca*Int (จำเพาะต่อ C. *gloeosporioides*) และคู่ primer ITS4-*Ca*Int1 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*,) สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสได้ 2 ชนิด จากตัวอย่างมะม่วง คือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 450 และ 490 bp ในกลุ่มไอโซเลต P5Rn(1-15) และในกลุ่มไอโซเลต P6Rn (1-6) (Fig.2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมีมากกว่าหนึ่งชนิดจากแหล่งปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้จากสวนมะม่วงดังกล่าว พบว่ามีความแตกต่างเช่นกัน

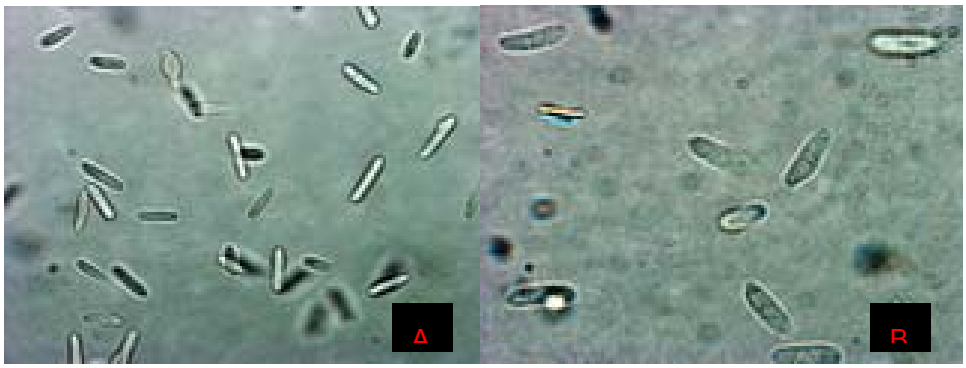

Figure 1 Conidia of isolated group P5Rn identified as *C. gloeosporioides* (A) and isolated group P6Rn identified as *C. acutatum* (B)

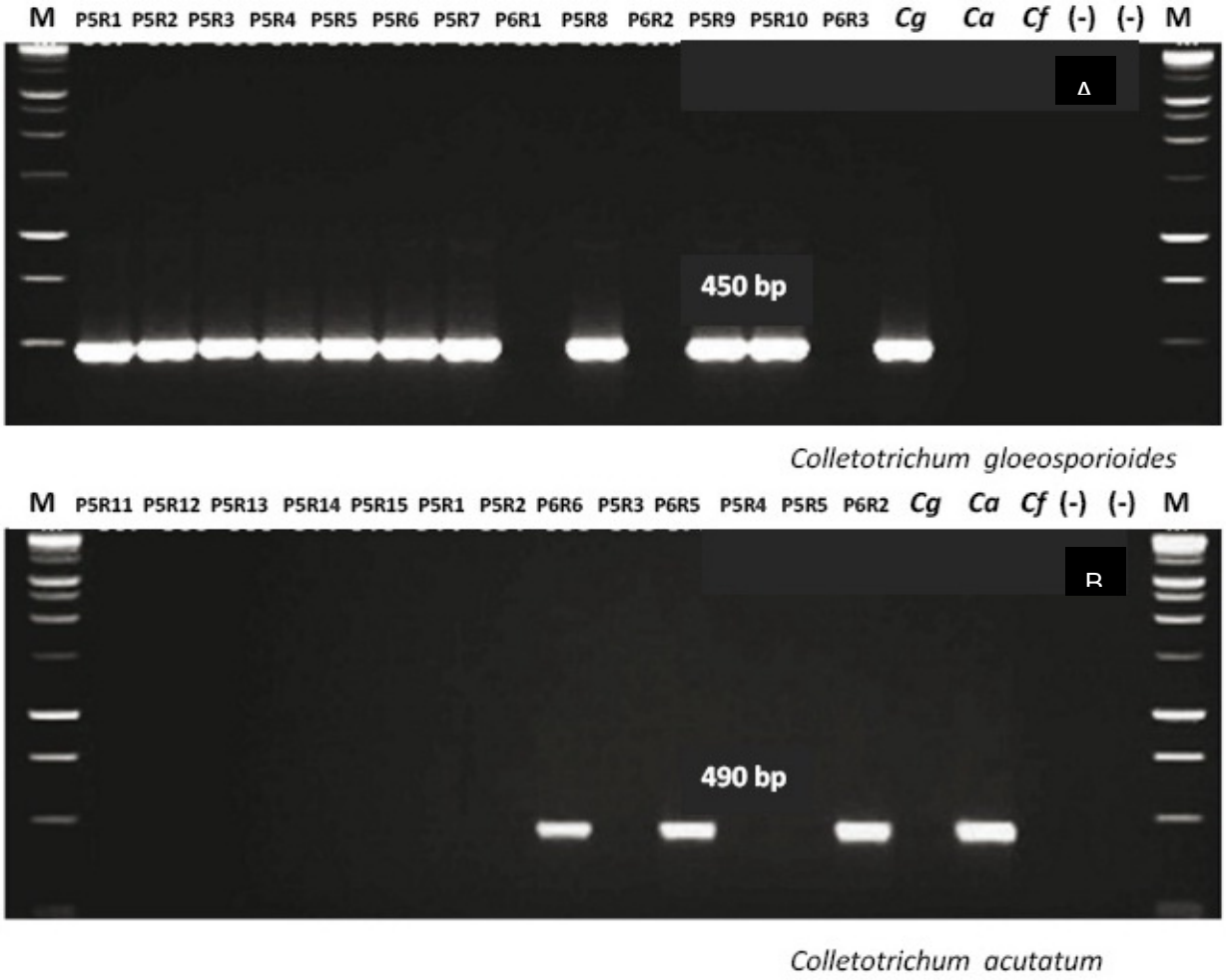

Figure 2 Identification of 'Nam DoK Mai Si Thong' mango *Colletotrichum* spp. isolates with species specific primers,: A = *C. gloeosporioides* (CgInt / ITS4); B = *C. acutatum* (CaInt2 / ITS4) positive control;(Cg) *C. gloeosporioides* positive control; (Ca) *C. acutatum* positive control; (Cf) *C. fragariae* ;(-) : negative control

ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุแอนแทรกโนสที่แยกจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากสวนอำเภอพร้าว จำนวน 21 ไอโซเลต บนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการพบว่าทุกไอโซเลตสามารถทำให้เกิดรอยแผลไหม้สีน้ำตาลดำ (necrotic) และเกิดกลุ่มสปอร์ (spore masses) บนรอยแผลที่สังเกตได้ในระยะเวลา 5 ถึง 7 วันหลังการปลูกเชื้อ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลแตกต่างกันออกไป โดยเชื้อในกลุ่ม P6Rn (P6R1 – 6) ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อในกลุ่ม P5Rn (P5R1 – 15) (Table 1)

Table 1 Pathogenicity tests of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* isolates collected from mango tissues from Prao orchards. Data represent mean lesion diameter (mm.) per number of isolates tested on detached mango leaves *in vitro* after 5 to 7 days of incubation at 25°C

Isolates from	Mean lesion diameter (mm), isolate origin and No. of isolates tested			
	Leaf	Pre- and post-harvest fruit	Branch	Flower
Orchard 1				
Cg (P5Rn: 1-9)	11.37 (n = 3)	12.40(n = 2)	14.02(n = 2)	14.02(n = 2)
Ca (P6Rn: 1-6)	15.57 (n = 2)	18.62(n = 2)	18.00(n = 2)	Not determined
Orchard 2				
Cg (P5Rn: 10-15)	12.16 (n = 2)	13.24(n = 2)	14.38(n = 2)	Not determined

สรุป

เชื้อที่แยกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะการเจริญต่างๆจากสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองของแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธี PCR สามารถจำแนกเชื้อราแอนแทรกโนสได้ 2 ชนิด โดยสามารถระบุได้ว่าเชื้อในกลุ่มไอโซเลต P5Rn คือ *C. gloeosporioides* และกลุ่มไอโซเลต P6Rn คือ *C. acutatum* และเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบมะม่วง เมื่อนำมาปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณและครุภัณฑ์วิจัยในการดำเนินการโครงการวิจัยเรื่องการตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา

เอกสารอ้างอิง

Barnet, H.L. and B. Barry. 2003. Ilustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. APS Press, St. Paul, MN. p.188-191.

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.