Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 188-191 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 188-191 (2554)

เชื้อรา *Leptoxyphium kurandae* Crous & R.G. Shivas สาเหตุโรคปื้นดำของลองกอง

Leptoxyphium kurandae Crous & R.G. Shivas causal pathogen of black mold on longkong fruit

ธัญมน สังข์ศิริ[1] **และ สมศิริ แสงโชติ**[1, 2]

Thunyamon Sungsiri[1] and Somsiri Sangchote[1, 2]

Abstract

Black mold on longkong fruit (*Aglaia dookkoo* Griff.) is a constraint of export. It causes a black stain on the surface which is unacceptable for the importing countries. The causal pathogen had been studied based on its morphology and DNA sequence. It showed that this fungus was in the genus *Leptoxyphium kurandae* Crous & R.G. Shivas that had not been reported in Thailand. Its nucleotide sequence was closely related to *Leptoxyphium madagascariense* and melanized fungi from limestone at 97%. Conidia of *L. kurandae* were hyaline, rod-shape with rounded ends, produced in slime mass at the apex of synnema. Isolates of this fungus obtained from orchards in Chantaburi, Sukhotai and Nakhon Si Thammarat province, had conidia size of 2.25-3.00 µm × 4.50-6.25 µm, 1.94-3.24 µm x 4.10-7.18 µm and 1.9-4.08 µm x 3.81-6.38 µm and synnemata length of 51.50-503.16 µm 72.50-295.41 µm 126.26-903.44 µm, respectively. The conidia width was not significantly different but the length of the isolate from Nakhon Si Thammarat province was the shortest and synnemata were the highest.

Keywords: *Leptoxyphium kurandae*, morphological characteristics, molecular technique

บทคัดย่อ

โรคปื้นดำของผลลองกอง (*Aglaia dookkoo* Griff.) เป็นโรคที่เป็นปัญหากับการผลิตลองกองเพื่อการส่งออก เนื่องจากโรคนี้ทำให้ผิวผลมีรอยปื้นดำ ไม่เป็นที่ยอมรับของประเทศผู้นำเข้า จึงศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล พบว่าเกิดจากเชื้อรา *Leptoxyphium kurandae* Crous & R.G. Shivas ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย โดยที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับเชื้อรา *Leptoxyphium madagascariense* และ melanized fungi ที่แยกได้จากหินปูน 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโคนิเดียของเชื้อรา *L. kurandae* มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายหยดน้ำสีขาวที่ส่วนปลายของ synnemata จากการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำบนผลลองกองในจังหวัดจันทบุรี สุโขทัย และนครศรีธรรมราช พบว่าโคนิเดียมีขนาด 2.25-3.00 µm × 4.50-6.25 µm 1.94-3.24 µm x 4.10-7.18 µm และ 1.9-4.08 µm x 3.81-6.38 µm และ synnemata มีความสูง 51.50-503.16 µm 72.50-295.41 µm 126.26-903.44 µm ตามลำดับ โดยความกว้างโคนิเดียไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ความยาวโคนิเดียของเชื้อที่ได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชมีขนาดสั้นที่สุด และ synnemata มีความสูงที่สุด

คำสำคัญ: *Leptoxyphium kurandae* สัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล

คำนำ

ปัจจุบันตลาดต่างประเทศมีความต้องการลองกองเพิ่มมากขึ้น แต่การผลิตลองกองกำลังประสบกับปัญหาโรคปื้นดำเข้าทำลายผล ทำให้ผลลองกองมีปื้นสีดำ ดูไม่สะอาด ราคาตก คุณภาพลดลง และเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2549) ลักษณะของโรคจะเป็นปื้นสีดำติดอยู่บนผิวผลแบบบางๆ การเจริญของเชื้อราสาเหตุอาศัยแหล่งอาหารจากน้ำหวานที่ผลลองกองปล่อยออกมาจาก extrafloral nectaries โดยที่ไม่เข้าทำลายลงในเนื้อเยื่อผลโดยตรง ซึ่งรายงานที่ผ่านมายังไม่ทราบเชื้อสาเหตุ ลักษณะการเข้าทำลาย และการแพร่ระบาด อีกทั้งยังมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคปื้นดำค่อนข้างน้อย จากปัญหาและความเสียหายดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษารายละเอียดของเชื้อและโรคดังกล่าว

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Plant Pathology , Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม. 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400, Thailand

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำบนผลลองกอง นำเนื้อเยื่อส่วนเปลือกของผลที่พบอาการปื้นดำจากแหล่งปลูกมาทำ freehand section เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำ และนำผลลองกองที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี สุโขทัย และนครศรีธรรมราช มาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร PDA โดยวัดขนาดสปอร์และโครงสร้างต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้โปรแกรม AxioVision Rel. 4.8

จำแนกเชื้อราโดยใช้อณูวิทยา โดยนำเชื้อราที่แยกสปอร์เดี่ยวแล้วมาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) จากนั้นดูด spore suspension ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในอาหาร PDB ปริมาตร 50 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ บ่มเชื้อไว้โดยเขย่าบน rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม เก็บเส้นใยโดยนำมากรองบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) จากนั้นล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผ่านกระดาษกรอง แล้วนำเส้นใยไปสกัดดีเอ็นเอ โดยนำเส้นใยที่กรองได้ 0.05 g มาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวและนำมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml (microcentrifuge) จากนั้นเติม solution I 300 µl (30 mM Tris HCl, pH 8; 0.1 M Nacl; 1 mM EDTA และ 0.2 M sucrose) และ solution II 300 µl (400 mM Tris HCl, pH 9.2; 250 mM EDTA และ 2.5% SDS) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 65°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม solution III 192 µl (60 ml 5 M KOAC; 11.5 ml 96% acetic acid และ 28.5 ml H_2O) และ chloroform 200 µl แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 10 นาที แล้วดูดส่วนใสข้างบนย้ายลงหลอดใหม่ เติม absolute alcohol ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 5 นาที เท absolute alcohol ทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% alcohol ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (10 mM Tris HCl pH 8 และ 1 mM EDTA) 30 µl หลังจากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็คโตรโฟริซิสบนอะกาโรสเจล 1% ใน 0.5XTBE buffer เวลา 25 นาที กระแสไฟ 135 โวลล์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 มก/มล) 10 นาที นำไปล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation (SYNGENE BIO IMAGING) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 50 µl โดยการเตรียมส่วนผสมหลัก สำหรับทำ PCR (master mix) ก่อนซึ่งประกอบด้วย 10xPCR buffer 5 µl $MgCl_2$ 2 µl dNTP 2.5 µl Primer ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') 0.5 µl Primer ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') 0.5 µl (White *et al*, 1990) Sterile dH_2O 37.5 µl Taq DNA polymerase 1 µl จากนั้นนำ master mix ดังกล่าว ใส่ในหลอด PCR ที่มี DNA template ปริมาตร 1 µl นำใส่ในเครื่อง ThermoCycler® โดยจำนวนรอบในการทำ PCR คือ 35 รอบ ใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 94 °ซ 5 นาที denaturation อุณหภูมิ 94 °ซ 1 นาที annealing อุณหภูมิ 56 °ซ 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 °ซ 1 นาที และ final extension อุณหภูมิ 72 °ซ 5 นาที ตรวจคุณภาพของ PCR product โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยนำดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ Bio Design และนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank เพื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงในระดับสกุลและสปีชีส์

ผล

เมื่อนำผลลองกองในระยะเก็บเกี่ยวที่เป็นโรคปื้นดำมาส่องภายใต้กล้อง stereo microscope พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีดำ เจริญปกคลุมผิวผลแบบบางๆ แต่เมื่อนำมาทำ freehand section แล้วส่องภายใต้กล้อง compound microscope พบว่าเส้นใยมีสีน้ำตาลเข้ม (Figure 1A) เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA โคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยฟูคล้ายกำมะหยี่ ขอบไม่เรียบ สีเขียวเข้มถึงดำ มีระดับการเจริญเติบโตต่ำ (Figure 1B) ซึ่งจะสร้างโคนิเดียรวมกันอยู่เป็นกลุ่มคล้ายหยดน้ำค้างสีขาวที่ส่วนปลายของ synnemata กระจายอยู่ทั่วบนโคโลนี (Figure 1C) เส้นใยมี septum รวมตัวกันเป็น synnemata (Figure 1D) โดยที่ปลายของ synnemata จะสร้างโคนิเดียมีรูปทรงกระบอก ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว (Figure 1F) ซึ่งจากการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำบนผลลองกองในจังหวัดจันทบุรี สุโขทัย และนครศรีธรรมราช พบว่าโคนิเดียมีขนาด 2.25-3.00 × 4.50-6.25 1.94-3.24 x 4.10-7.18 และ 1.9-4.08 x 3.81-6.38 µm และ synnemata มีความสูง 51.50-503.16 µm 72.50-295.41 µm 126.26-903.44 µm ตามลำดับ โดยความกว้างโคนิเดียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่ความยาวโคนิเดียและความสูง synnemata ของเชื้อจังหวัดนครศรีธรรมราชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (Table 1)

เมื่อนำเชื้อรามาจำแนกโดยวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำ โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ทำให้ทราบขนาดของ PCR product คือประมาณ 550-600 คู่เบส (bp) และเมื่อนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกับเชื้อรา *Leptoxyphium madagascariense* CBS 124766 97 เปอร์เซ็นต์ และ melanized fungi CR-2004 strain TRN125

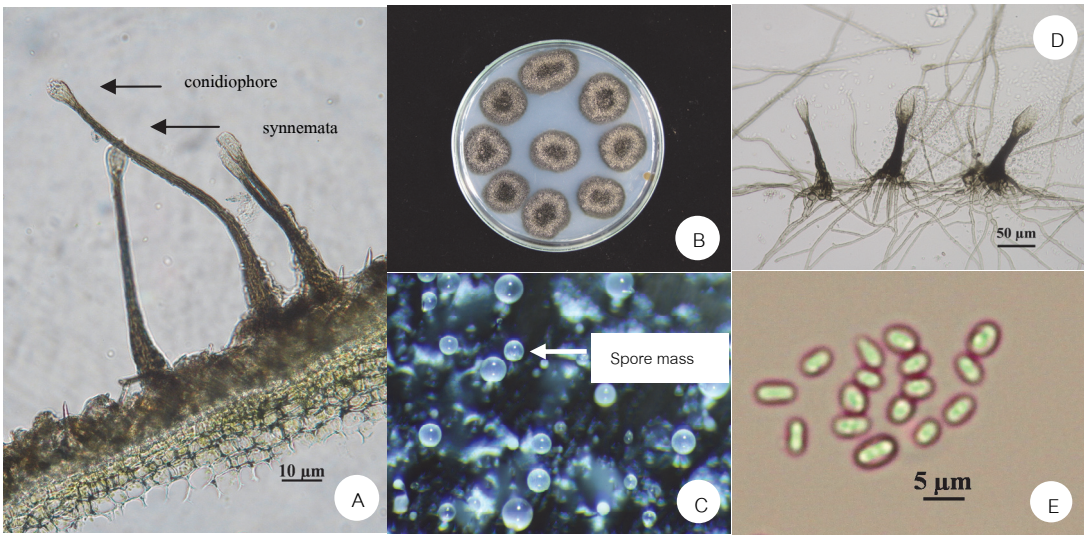

Figure 1 *Leptoxyphium kurandae* : *Leptoxyphium kurandae* on fruit surface of longkong by tissue sectioning (A), colony on PDA at 10 days (B), conidial masses produced in culture (C), *Leptoxyphium kurandae* in culture (D) and conidia. (E)

Table 1 Conidial size of *Leptoxyphium kurandae* obtained from orchards in Chantaburi, Sukhotai and Nakhon Si Thammarat province

Origin	Synnemata length	Conidial size[1/]	
		length	width
Sukhotai, north	176.99 b	5.90 a	2.55 a
Nakhon Si Thammarat, south	344.85 a	4.91 b	2.84 a
Chantaburi, east	146.88 b	5.60 a	2.60 a

1/ Values in the column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to DMRT

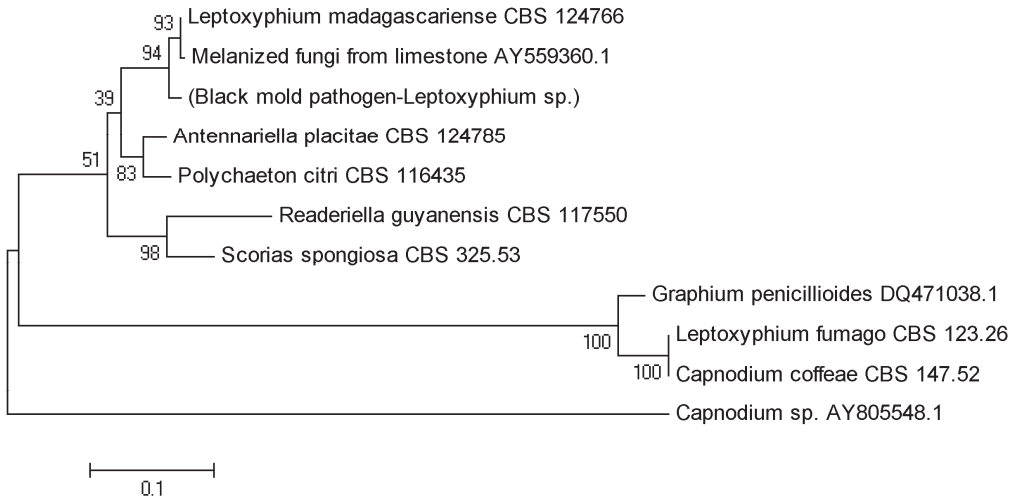

Figure 2 Neighbour-joining obtained from ITS sequence data. Bootstrap values are for 1000 replicates. Bar = 0.1 expected changes per site.

AY 559360.1 ที่แยกได้จากหินปูน 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำมาศึกษาความสัมพันธ์ พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราทั้ง 2 ชนิด (Figure 2)

ดังนั้นเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำคือเชื้อรา *Leptoxyphium* sp. เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เหมือนกับเชื้อรา *L. madagascariense* มากกว่า melanized fungi ที่แยกได้จากหินปูน แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ในระดับสปีชีส์ เนื่องจากในระดับสปีชีส์ต้องการความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปกับข้อมูลใน GenBank จึงจะมีความแน่นอนในการจำแนกชนิด (species) ดังนั้นจึงนำเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำดังกล่าวไปจำแนกชนิดที่ CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) ประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งพบว่าคือเชื้อรา *Leptoxyphium kurandae* Crous & R.G. Shivas ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

วิจารณ์

เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกับเชื้อรา *L. madagascariense* CBS 124766 97 เปอร์เซ็นต์ และ melanized fungi CR-2004 strain TRN125 AY 559360.1 ที่แยกได้จากหินปูน 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำมาศึกษาความสัมพันธ์พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราทั้ง 2 ชนิดด้วย ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานทดลองของ Cheewangkoon *et al*. (2009) ที่พบเชื้อรา *L. madagascariense* เป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างชิ้นพืชที่เป็นโรคใบจุดของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ที่นำมาจากเมือง Morondavo ประเทศ Madagascar ซึ่งเมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำไปจำแนกชนิดที่ CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) ประเทศเนเธอร์แลนด์ ชนิดของเชื้อราที่ได้คือ *L. kurandae* Crous & R.G. Shivas ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย ดังนั้นจึงไม่สอดคล้องกับที่สมศิริ และ คณะ (2553) รายงานว่าโรคปื้นดำเกิดจากเชื้อรา *Graphium* sp. เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในทางสรีรวิทยาเท่านั้น นิพนธ์ (2542) ได้รายงานว่าราดำบนผลลองกองเกิดจากเชื้อรา *Meliola* sp. พบปนเปื้อนอยู่บริเวณผิวผล แต่ทั้งนี้ลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนผลลองกองนั้นมีความแตกต่างกันคืออาการที่เกิดจากเชื้อรา *Meliola* sp. เชื้อราจะมีสีดำเข้ม ลักษณะการเจริญเป็นแผ่นปกคลุมผลลองกอง

การที่มีเชื้อรา *L. kurandae* ขึ้นปกคลุมผลลองกองที่วางขายตามท้องตลาดจนเป็นที่คุ้นตาของผู้บริโภคนั้น อาจไม่มีผลกระทบมากนักสำหรับผู้บริโภคภายในประเทศ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไม่ได้เข้าทำลายผลโดยตรง ไม่มีผลกระทบต่อกลิ่นและรสชาติ สามารถบริโภคได้ปกติ แต่ก็ทำให้ผลลองกองมีปื้นสีดำ ดูไม่สะอาด ราคาขายต่ำ และเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออก ซึ่งมาตรฐานการส่งออกลองกองนั้นกำหนดให้ผิวผลสะอาด ปราศจากสิ่งแปลกปลอมที่สามารถมองเห็นได้ ไม่มีศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อรูปลักษณ์ทั่วไปของผล และไม่มีความเสียหายของผลิตผลเนื่องมาจากศัตรูพืช (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2549)

สรุป

เชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำบนผลลองกองคือเชื้อรา *Leptoxyphium kurandae* Crous & R.G. Shivas ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย และจากการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคปื้นดำบนในจังหวัดจันทบุรี สุโขทัย และนครศรีธรรมราช พบว่าความกว้างโคนิเดียของทั้ง 3 จังหวัด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่ความยาวโคนิเดียของเชื้อที่ได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชมีขนาดสั้นที่สุด และ synnemata มีความสูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. **โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด**. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ หลักสูตรหมอพืช-ไม้ผล ฉบับที่ 1 โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมเนื่องจาก วิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมศิริ แสงโชติ เนตรนภิส เขียวขำ และ ธัญมน สังข์ศิริ. 2553. โรคปื้นดำบนผลลองกอง (*Aglaia dookkoo* Griff.) ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว. ว. วิทย. กษ. 41:1 (พิเศษ): 361-364.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2549. ลองกอง. ม.ป.ท.

Cheewangkoon, R., J. Z. Groenewald, B. A. Summerell, K. D. Hyde, C. To-anun and P. W. Crous. 2009. *Myrtaceae*, a cache of fungal biodiversity. Persoonia 23: 55–85.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. J. White (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Acadamic Press Inc. New York.