

การจำแนกชนิดและความแปรปรวนทางพันธุกรรมบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ที่แยกได้จากทุเรียน (*Durio* sp.)

Identification and genetic variation of internal transcribed spacer (ITS) in *Lasiodiplodia theobromae* isolated from durian (*Durio* sp.)

อาภัสรา หีดรอด¹, รัตติยา พงศ์พิสุทธา^{1*} และ ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล¹
Arphatsara Heedrod¹, Ratiya Pongpisutta^{1*} and Chainarong Rattanakreetakul¹

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ: นำเชื้อรา *Lasiodiplodia* จำนวน 20 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาการกิ่งแห้งของทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี ชุมพร และตราด มาจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคออสซิลโลกราฟฟี จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) จำแนกเป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากทุเรียนทั้งหมด เปรียบเทียบกับ *L. theobromae* ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่น ๆ อีก 8 ชนิด พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แตกต่างกัน 7 bp จาก 510 bp คิดเป็นค่าความแตกต่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.00 – 0.78% สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ pairwise sequence comparison โดยพบว่าเชื้อรา *L. theobromae* ที่เข้าทำลายทุเรียนมีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *L. theobromae* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่า, มะพร้าว, อะโวคาโด, มะละกอ และเสาวรส เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดที่ใกล้เคียง พบว่าเชื้อรา *L. theobromae* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *L. parva* และ *L. pseudotheobromae* ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 89% ด้วยวิธีการ unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค single primer amplification reaction (SPAR) โดยเลือกใช้เทคนิค ISSR-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด ได้แก่ (AG8)C, (CAG)5, (GACA)4, (GTG)5, UBC809 และ UBC891 พบว่าเชื้อรา *L. theobromae* จากทุเรียนทั้ง 20 ไอโซเลท มีความผันแปรภายในประชากร จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณดีเอ็นเอสามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ 5 กลุ่ม ที่ค่า $r=0.3485$ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของเชื้อรา *L. theobromae* ที่พบในทุเรียนกับพืชอื่น ๆ โดยใช้เทคนิค ITS ในขณะเดียวกันเทคนิค ISSR สามารถบอกถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อราได้

คำสำคัญ: ทุเรียน; *Lasiodiplodia*; ITS; ISSR

ABSTRACT: Twenty isolates of *Lasiodiplodia* were recovered from durian dieback samples collected from Chanthaburi, Chumphon and Trat provinces. A combination of morphology and ITS sequence analysis is a robust of the internal transcribed spacer (ITS) were analyzed and identified as *Lasiodiplodia theobromae*. Genetic variation of all isolations of *L. theobromae* isolated from durian compared with *L. theobromae* isolated from eight other plants was revealed. The nucleotide sequence of the ITS region differed in 7 bp from 510 bp, representing 0.00. – 0.78% of nucleotide difference, and related to the pairwise sequence comparison. It was found that *L. theobromae* invading durian was closely associated to *L. theobromae* destroying mango, coconut, avocado, papaya and passion fruit. Furthermore, genetic relationship of *L. theobromae* was closely related to *L. parva* and *L. pseudotheobromae* with 89% bootstrap value by the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). Genetic diversity by single primer amplification reaction (SPAR) technique, using ISSR-PCR technique was investigated. Six primers, such as (AG8)C, (CAG)5, (GACA)4, (GTG) 5, UBC809 and UBC891 were used and found that

* Corresponding author: agrryp@ku.ac.th

Received: date; June 13, 2022 Accepted: date; September 19, 2022 Published: date; January , 2023

20 isolates of *L. theobromae* was variable within the population. Moreover, the DNA fingerprint analysis of this fungi was separated into 5 groups at $r=0.35$. This research indicated the genetic relationship of *L. theobromae* from durian and other plants using ITS technique. Meanwhile, the ISSR technique was useful to inspect genetic variability of this fungus.

Keywords: durian; *Lasiodiplodia*; ITS; ISSR

บทนำ

Lasiodiplodia เป็นเชื้อราใน family Botryosphaeriaceae พบได้ทั่วไปในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน โดยเฉพาะทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อเมริกาใต้ และแอฟริกา ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้มากถึง 500 ชนิด ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Centre for Agriculture and Bioscience International: CABI, 2022) อาการที่พบส่วนมากเกิดบริเวณลำต้นและผล เช่น อาการลำต้นเน่า แคงเกอร์ กิ่งแห้ง และผลเน่า (Ismail et al., 2012) ในประเทศไทย สมศิริ และคณะ (2539) พบเชื้อราสกุล *Lasiodiplodia* สามารถก่อให้เกิดโรคผลเน่ากับทุเรียน ส่งผลให้เกิดแผลสีน้ำตาลเข้มบริเวณก้นผล ต่อมาพบการสร้างเส้นใยสีขาวเทาถึงเขียวขี้ม้า เจริญปกคลุมแผล และลูกกลีบอย่างรวดเร็ว สามารถพบส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราเป็นก้อนสีขาวเทาถึงดำบริเวณแผล ทำให้เกิดอาการผลเน่าและผลแตกได้ (Lim and Sangchote, 2003) จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกชนิด (species) ได้เป็น *L. theobromae* อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ รังสิมันต์ และคณะ (2562) พบว่าเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคอนุชีวโมเลกุล สามารถจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* สาเหตุโรคในทุเรียนได้เป็น 3 ชนิด คือ *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* และ *L. parva*

เชื้อรา *Lasiodiplodia* เป็นเชื้อราที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเชื้อราหลายชนิดใน order Botryosphaeriales ทำให้การจำแนกเชื้อราตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันที่อาศัยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้นไม่เพียงพอในการจำแนกชนิดได้ชัดเจน อีกทั้งความผันแปรระหว่างการเจริญเติบโต รวมถึงสภาพแวดล้อมทำให้มีตัวแทนเชื้อราหลายชนิดมากขึ้น (Phillips et al., 2013) ดังนั้นเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทในการจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ gene/region ต่าง ๆ ได้แก่ small sub unit (SSU), large sub unit (LSU), eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (EF1-alpha) และ beta tubulin สามารถใช้ร่วมกันในการจัดกลุ่มและกำหนดชนิดที่แน่นอนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) หรือ ITS ร่วมกับ EF1-alpha ยังเป็นบริเวณที่เหมาะสมในการจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวได้ดี (Phillips et al., 2013)

ITS คือบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (noncoding sequence) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง SSU 5.8S และ LSU (White et al., 1990; Lafontaine and Tollervey, 2001) ปัจจุบันมีรายงานว่าบริเวณดังกล่าวเป็น 1 ใน 6 บริเวณที่มีศักยภาพและเป็นที่ยอมรับในการพัฒนาเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของเชื้อราและสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต เนื่องจากมีขอบเขตของลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีความผันแปรในส่วน inter- และ intra-specific ที่ชัดเจน โดยทั้งนี้การทำ DNA barcode เพื่อเพิ่มความรวดเร็ว และความถูกต้องในการจำแนกชนิด และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางชีวภาพ (Stackebrandt and Goebel, 1994; Hebert et al., 2003; Blackwell, 2011; Mora et al., 2011; Schocha et al., 2012)

การศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิค SPAR (single primer amplification reaction) โดยเลือกใช้เทคนิค ISSR (inter-simple sequence repeat) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้อัตราความสำเร็จสูงกว่าเทคนิค RAPD, AFLP และ SSR เข้าไว้ด้วยกัน ที่สำคัญประสิทธิภาพในการทำซ้ำดีกว่าเทคนิค RAPD และการตรวจผลใช้เวลาสั้นกว่าเทคนิค AFLP นอกจากนี้ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ข้อดีอีกประการหนึ่งของเทคนิค ISSR คือขั้นตอนในการทำไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาไม่นาน ซึ่งหลักการโดยทั่วไปคล้ายกับเทคนิค RAPD แต่ต่างกันที่การใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันแบบไมโครแซทเทลไลต์ และมีขนาดที่ยาวกว่าจึงทำให้มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้มากกว่า (Gupta et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994; Staub et al., 1996; Gupta and Varshney, 2000; Uddin and Cheng, 2015) รวมไปถึงการตรวจสอบ intraspecific ของเชื้อราเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ (strain/isolate) ที่เข้าทำลายพืชในพื้นที่เขตร้อนชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลสำหรับพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อรา การแพร่กระจาย การเข้าทำลายพืชอาศัย และการหาวิธีการควบคุมที่เหมาะสมต่อไป งานวิจัยนี้ได้ทำการจำแนก และตรวจสอบ

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมบริเวณ ITS region ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่แยกได้จากทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี ชุมพร และตราด เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค SSR

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคกิ่งแห้งของทุเรียน

ตัวอย่างกิ่งทุเรียนที่แสดงอาการแผลแห้งสีน้ำตาลอ่อน แผลด้านในสีน้ำตาลเข้มถึงดำ จากพื้นที่ปลูกทุเรียนในจังหวัด จันทบุรี ชุมพร และตราด นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของทุเรียนที่แสดงอาการขนาดประมาณ 1x1 ซม. นำไปฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1.2% เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation จากนั้นเก็บเชื้อราในหลอดอาหารเลี้ยง potato carrot agar (PCA) ที่ 14°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

นำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีและการเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกวันจนครบ 5 วัน กระตุ้นการสร้างสปอร์โดยใช้ cork borer ขนาด 0.6 ซม. เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายลงหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 20 มล. ที่บรรจุซีลีเยจากกิ่งทุเรียนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 1 ก. บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง นาน 5-7 วัน ตรวจสอบองค์ประกอบเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope) ที่กำลังขยาย 10 – 100 เท่า เปรียบเทียบกับหนังสือ The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata (Sutton, 1980)

การจัดจำแนกเชื้อราด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคตามวิธีการของ Pongpisutta et al. (2013) และ Bincader et al. (2022) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 5 วัน จากนั้นแยกเฉพาะเส้นใยมาบดให้ละเอียดด้วย liquid nitrogen ย้ายลงหลอดขนาด 1.5 มล. ที่มี DNA extraction buffer (50 mM Tris HCl pH 7.8, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1%SDS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร กำจัดโปรตีนโดยเติมเอนไซม์ proteinase K บ่มที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย phenol chloroform isoamyl alcohol (PCI) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาณ 300 ไมโครลิตร ย้ายลงหลอดขนาด 1.5 มล. เติม RNase A เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย PCI ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ตกตะกอนสารพันธุกรรมโดยใช้ absolute alcohol บ่มที่ -20°C นาน 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และปล่อยให้แห้งโดยวิธี air drying นาน 20 – 30 นาที ทำการละลายสารพันธุกรรมด้วยการเติมสารละลาย 1xTE buffer (10 mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990) โดยเตรียมดีเอ็นเอเชื้อราความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ผสมกับสารทำปฏิกิริยา (master mix) ดังแสดงใน Table 1 จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR รุ่น T professional Standard Gradient โดยตั้งระบบ pre-denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที และ denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 57.2°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1.30 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ PCR product บน 1.2% agarose gel ใน 1X TBE buffer ปล่อยให้กระแสไฟไหลผ่านที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที บันทึกการเกิดแถบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน O' GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) นำตัวอย่าง PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ sanger sequencing

ที่บริษัท ATCG Co., Ltd นำผลที่ได้มาลบบนิวคลีโอไทด์ส่วนของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม EditSeq (DNASTar Inc., WI, USA) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank ของ national center for biotechnology information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Table 1 Configuration of master mix for PCR

Element	Concentration	Final concentration	Volume/1 reaction (μl)
1. DNA template	20 ng/μl	20 ng	2.0
2. <i>Taq</i> buffer	10X	0.96X	2.4
3. MgCl ²⁺	25 mM	2.4 mM	2.4
4. dNTPs	10 μM	0.48 μM	1.2
5. Forward primer	10 μM	0.48 μM	1.2
6. Reverse primer	10 μM	0.48 μM	1.2
7. <i>Taq</i> polymerase	5 U/ μl	1 U	0.2
8. Sterile distilled water	-	-	14.4
Total			25.0

วิเคราะห์แผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia*

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่เป็น type species บริเวณ ITS ของ International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Mae Fah Luang University Culture Collection (MFLUCC), International Mycological Institute (IMI) และ CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (CBS) จากฐานข้อมูลของ GenBank (Phillips et al., 2013) จากนั้นสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์(dendrogram) แบบ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ที่ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 (Tamura et al., 2021) เพื่อวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของเชื้อรา *Lasiodiplodia* แต่ละชนิด

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Lasiodiplodia* บริเวณ internal transcribed spacer (ITS region)

ศึกษาความแปรปรวนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่แยกได้จากทุเรียนโดยใช้การวิเคราะห์การจัดตำแหน่งแบบ ClustalW (Thompson et al., 1994) ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 (Tamura et al., 2021) จากนั้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในทุเรียนกับเชื้อราในพืชอื่น (Table 2) ด้วยวิธีการ pairwise sequence comparison โดยใช้โปรแกรม sequence demarcation tool version 1.2 (SDTv 1.2) (Muhire et al., 2014) กำหนดค่า identify percentage มากกว่า 95% บันทึก matrix of pairwise similarity scores และ plot of pairwise similarity scores เปรียบเทียบกับแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์แบบ UPGMA ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 (Tamura et al., 2021)

Table 2 *Lasiodiplodia theobromae* isolates used in the phylogenetic study

Isolate	Host	Country	GenBank accession number
UCD1012BC	<i>Vitis vinifera</i>	Mexico	EU012372
UCD1014BC	<i>Vitis vinifera</i>	Mexico	EU012373
UCD1028BC	<i>Vitis vinifera</i>	Mexico	EU012374
Mex.GrTGal-4	<i>Mangifera indica</i>	Mexico	MW301276
Mex.VrCot-5.1	<i>Mangifera indica</i>	Mexico	MW301277
Mex.GrSMar-6	<i>Mangifera indica</i>	Mexico	MW301275
BOT23	<i>Mangifera indica</i>	Egypt	JN814400
BOT6	<i>Mangifera indica</i>	Egypt	JN814399
BOT7	<i>Mangifera indica</i>	Egypt	JN814396
LACIS1	<i>Mangifera indica</i>	Peru	KU507458
LACIS2	<i>Mangifera indica</i>	Peru	KU507459
LAMAL3	<i>Mangifera indica</i>	Peru	KU507457
CDA 444	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	KP244699
CDA 465	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	KP244701
CDA 469	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	KP244691
UFRPE CFS 061	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	MG870592
UFRPE CFS 062	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	MG870593
UFRPE CFS 069	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	MG870594
YLSEB0221	<i>Persea americana</i>	China	MT093434
DZN-27	<i>Persea americana</i>	China	OK599035
DZN-24	<i>Persea americana</i>	China	OK599034
LA-VLCA7	<i>Persea americana</i>	Peru	MW467417
LA-MOP24	<i>Persea americana</i>	Peru	MW467411
LA-MOCH1	<i>Persea americana</i>	Peru	MW467407
LAS601	<i>Carica papaya</i>	Mexico	KR001861
BOT223	<i>Carica papaya</i>	Mexico	KR001858
LAM134	<i>Carica papaya</i>	Mexico	KR001860
81.I	<i>Dimocarpus longan</i>	Puerto Rico	KC964548
PHLO9	<i>Dimocarpus longan</i>	Puerto Rico	KC964546
PHLO10	<i>Dimocarpus longan</i>	Puerto Rico	KC964547
ZW 49-1	<i>Passiflora laurifolia</i>	China	MT644473
ZW 50-1	<i>Passiflora laurifolia</i>	China	MT644474
PaS-1	<i>Passiflora laurifolia</i>	China	MN646259
17-200	<i>Fragaria ananassa</i> Duchesne	The United States	MH809519
16-619	<i>Fragaria ananassa</i> Duchesne	The United States	MF449518
17-198	<i>Fragaria ananassa</i> Duchesne	The United States	MH809518

ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Lasiodiplodia* โดยเทคนิค SPAR (single primer amplification reaction)

การศึกษานี้เลือกใช้ single primer ชนิด inter-simple sequence repeat (ISSR) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ microsatellite ด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด (AG8)C, (CAG)5, (GACA)4, (GTG)5, UBC809 และ UBC891 ได้เตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 25 นาโนกรัม ผสมสารทำปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 3 นำเข้าเครื่อง PCR machine รุ่น T professional Standard Gradient โดยตั้งระบบดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งระบบ denature ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 วินาที annealing เป็นเวลา 45 วินาที (อุณหภูมิตามชนิดไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 4) extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที นำ PCR product ไปตรวจแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค electrophoresis โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วย agarose gel ความเข้มข้น 1.5% ในบัฟเฟอร์ 1×TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 90 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง UV และบันทึกแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel documentation เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์

Table 3 Configuration of master mix for SPAR

Element	Concentration	Volume/1 reaction (μl)
DNA template	25 ng/μl	1.0
Sterile distilled water	-	15.075
Dream Tap buffer	10X	2.5
MgCl ²⁺	2 mM	0.25
dNTPs	1 mM	5
Primer	10 μm	1.2
Dream Tap polymerase	5 u/μl	0.175
Total		25

โดยการวิเคราะห์ตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนนเป็น 1 และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 นำคะแนนที่ได้ไปวิเคราะห์ในโปรแกรม NTSYS-pc version 2.20e (Rohlf, 1988) โดยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธีของ Dice (Dice Similarity Coefficient) และจัดกลุ่มโดย UPGMA ซึ่งแสดงออกมาในรูปของสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ หรือ dendrogram จากนั้นตรวจสอบและการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) (Rohlf and Sokal, 1981) คำนวณค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ในการจัดกลุ่มสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ โดยใช้โปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) และวิเคราะห์ค่า genetic diversity (h) และ genetic distance matrices ด้วยโปรแกรม GenALEx version 6.1 (Peakall and Smous, 2006)

Table 4 Primers used in this study, with sequences and annealing temperatures

Primer	Sequence (5' -> '3)	Annealing temp. (°C)
(AG8)C	AGA GAG AGA GAG AGA GC	53
(CAG)5	CAG CAG CAG CAG CAG	58
(GACA)4	GACA GACA GACA GACA	54
(GTG)5	GTG GTG GTG GTG GTG	56
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	54
UBC891	HVH* TGT GTG TGT GTG TG	54

*H=A, C, T; V=A, C, G

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคกิ่งแห้งของทุเรียน

จากการแยกเชื้อราบริเวณกิ่งทุเรียนที่แสดงลักษณะแผลแห้งสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ในพื้นที่ปลูกทุเรียน 3 จังหวัด พบว่าสามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อราจากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ DCHA106 DCHA221 DCHA416 DCHA506 DCHA901 DCHA1105 DCHA1703 DCHA1805 และ DCHA1806 ชุมพร จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ DCHU106 DCHU204 DCHU601 DCHU1203 DCHU1802 และ DCHU1804 และตราด จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ DTRA12 DTRA203 DTRA211 DTRA407 และ DTRA706 เชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลทมีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทุกไอโซเลทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่อายุ 3 วัน เท่ากับ 9 ซม. ลักษณะโคโลนีสร้างเส้นใยสีขาวละเอียด เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร เมื่อโคโลนีอายุมากขึ้น เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียวมะกอกถึงเทา บริเวณกลางโคโลนีสีเข้ม มีการสร้างมัดเส้นใยเป็นจุดกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร (Figure 1A) ด้านหลังโคโลนี (reverse) มีสีเขียวมะกอก ถึงขาวอมเหลือง (Figure 1B) เมื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์เชื้อราด้วยซีลี้อย่างทุเรียนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พบเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลท มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยทุกไอโซเลทเมื่อเส้นใยเชื้อราอายุมากขึ้นจะสร้างโครงสร้างสำหรับสร้างส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia (Figure 1D) ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างและปล่อยสปอร์ (conidia) สปอร์ที่ถูกปล่อยมีลักษณะอัดแน่นมองเห็นเป็นสายสีขาว เรียกว่า cirrus (Figure 1C) ภายใน pycnidia สร้าง conidiogenous cell สี ไม่มีสี ผนังบางและเรียบ สปอร์ถูกสร้างบนส่วนปลายของก้านชูสปอร์ (conidiophore) (Figure 1E) รูปร่างรีคล้ายไข่ (oval) มีผนังสปอร์ 2 ชั้น ขนาดประมาณ 26.8-25.4 × 14.8-15.7 ไมครอน ผนังยังอ่อนมีเพียงเซลล์เดียว สี ไม่มีสี (hyaline) (Figure 1F) ต่อมาเมื่อสปอร์แก่จะเริ่มสร้างเม็ดสี มีสีน้ำตาลเข้มและสร้างผนังกันตามขวาง (septum) ทำให้แบ่งสปอร์ออกเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ขนาดประมาณ 25.2-23.4 × 13.4-16.7 ไมครอน (Figure 1G) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุดังกล่าว สามารถจำแนกเบื้องต้นได้เป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ซึ่งสอดคล้องกับคำอธิบายในหนังสือ The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata (Sutton, 1980)

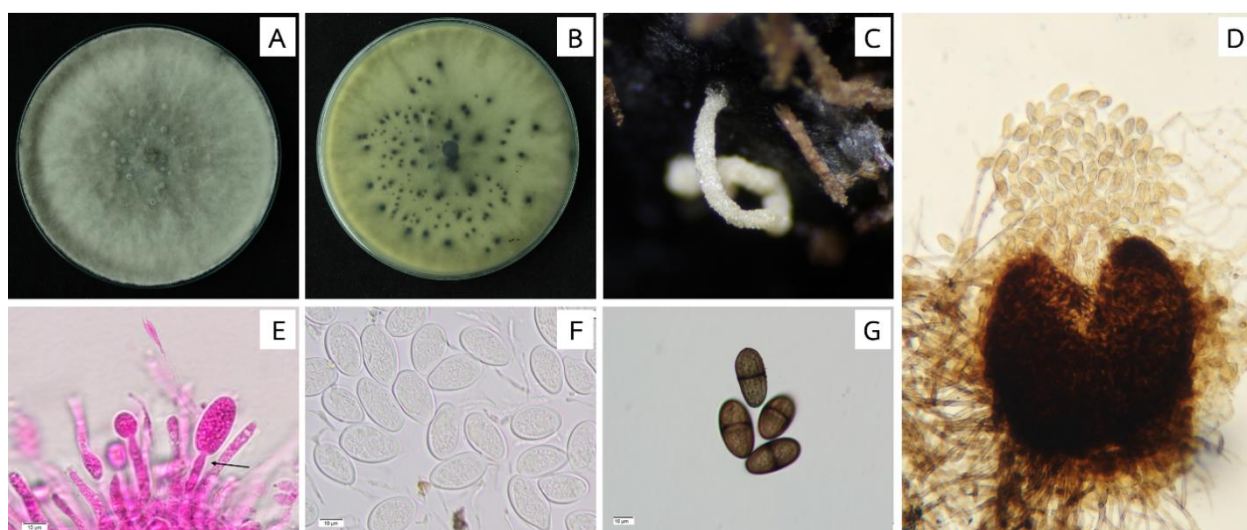


Figure 1 Morphological characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* ; Colony characteristics on PDA incubated at 25°C under a 12 light/12 dark photoperiod for 5 days (A-B), conidia released from conidiomata called cirrus (C), conidiomata (D), conidia developing on conidiogenous cells (E), hyaline immature conidia, aseptate (F) and dark brown mature conidia, one-septate (G). Scale bar = 10 µm.

การจัดจำแนกเชื้อราด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4/ITS5 พบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลท เกิดแถบ PCR product ขนาดประมาณ 750 bp เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับข้อมูล GenBank ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลท มีค่าความเหมือน (% Identify) กับเชื้อรา *L. theobromae* เท่ากับ 98.07 – 100.00% จากข้อมูลของ Schoch et al. (2012) มีรายงานหลายฉบับที่จำแนกเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* โดยอาศัยข้อมูลสัณฐานวิทยา ร่วมกับข้อมูลอนุชีวโมเลกุลบริเวณ ITS (Silva et al., 2019; Chen et al., 2021; Suwannarach et al., 2022)

วิเคราะห์แผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยสร้าง dendrogram พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากทุเรียนจำนวน 20 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *L. theobromae* (ไอโซเลท CBS306.58 และ CBS190.73) ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% ซึ่งแยกออกจากเชื้อรา *L. parva* (ไอโซเลท CBS356 และ CBS456) และ *L. pseudotheobromae* (ไอโซเลท CSB374.54 และ CSB304.79) ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 100% แยกออกจาก out group (*Diplodia mutila* AY236955 และ *Colletotrichum acutatum* MK215706) อย่างชัดเจน (Figure 2) เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดใกล้เคียง (*L. cupressi*, *L. mutila*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. gonubiensis*, *L. venezuelensis*, *L. rubropurpurea*, *L. seriata*, *L. sapinea*, *L. scrobiculata* และ *L. corticola*) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าเชื้อรา *L. theobromae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *L. parva* และ *L. pseudotheobromae* ที่ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) เท่ากับ 82% แต่เชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถแยกออกจากกันได้โดยการใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS โดยมีค่าความเชื่อมั่น 69-96% ด้วยวิธีการ UPGMA ที่ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง (Figure 3)

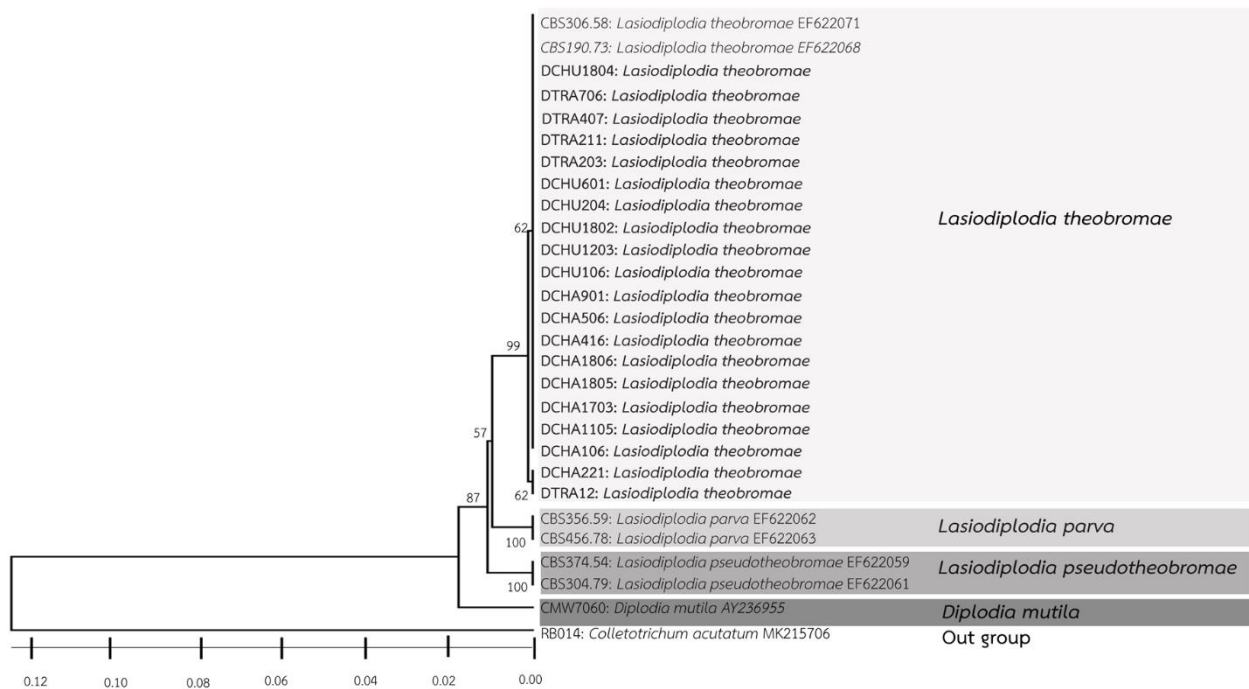


Figure 2 Dendrogram derived from UPGMA analysis of 28 taxa of the ITS-region sequences. *Diplodia mutila* CMW7060 and *Colletotrichum acutatum* RB014 were used as the outgroups. The numbers above branches are bootstrap values with 1,000 replicates obtained from MEGA version 11 software.

ความคล้ายคลึงทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อราในชนิด *L. theobromae*, *L. parva* และ *L. pseudotheobromae* อาจส่งผลให้การจำแนกเชื้อเกิดความคลาดเคลื่อนได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alves et al. (2008) ซึ่งได้ศึกษาเชื้อรา *L. theobromae* จำนวน 25 ไอโซเลท จากพืชอาศัยหลายชนิด ในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีเชื้อรา *L. theobromae* บางไอโซเลทมีขนาดเฉลี่ยของสปอร์ที่ใหญ่และเล็กกว่าไอโซเลทอื่นๆ ทำให้เกิดความสับสนในกระบวนการจำแนกชนิด จึงได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS region และ EF1-alpha พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Lasiodiplodia* ออกได้เป็น 3 ชนิด คือ *L. theobromae*, *L. parva* sp. nov. และ *L. pseudotheobromae* sp. nov. พบว่าขนาดสปอร์ของ *L. parva* sp. nov. เล็กกว่า มีรูปร่างทรงกระบอก แต่บริเวณฐานกว้าง ส่วน pycnidia มีสีดำถึงน้ำตาลเข้ม ในขณะที่ *L. pseudotheobromae* sp. nov. มีขนาดสปอร์ที่ใหญ่ รูปร่างรี บริเวณหัวท้ายค่อนข้างมน บริเวณกลางเซลล์กว้าง และพบการแตกแขนงของ paraphyses ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบว่า *L. theobromae* ที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราอีก 2 ชนิด เนื่องจากในอดีตเคยมีการจำแนกชนิดของเชื้อรานี้เป็นกลุ่มเดียวกัน และต่อมาได้มีการยืนยันด้วยวิธีทางอนุชีวโมเลกุลที่มีความแม่นยำมากขึ้นนั่นเอง

นอกจากนี้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับอนุชีวโมเลกุลยังเป็นที่ยอมรับ และแพร่หลายในการจำแนกชนิดเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* งานวิจัยของ Phillips et al. (2013) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระดับสกุล (genus) และชนิด ของเชื้อราในกลุ่ม Botryosphaeriaceae จำนวน 17 สกุล 110 ชนิด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคอนุชีวโมเลกุล สามารถใช้เพียงตำแหน่งยีนบริเวณ ITS เพียงอย่างเดียว หรือใช้ ITS ร่วมกับ EF1-alpha เป็นการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการแบบ multilocus phylogenetic พบว่ามีศักยภาพในการจำแนกสกุลและชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้ได้ ส่วนงานวิจัยของ Correia et al. (2016) ที่ศึกษาสายวิวัฒนาการ การกระจายตัว และการเกิดโรคของชนิด *Lasiodiplodia* สาเหตุโรกกิ่งแห้งขององุ่นในประเทศบราซิล พบว่าสามารถจำแนกชนิดเชื้อราในกลุ่ม Botryosphaeria ที่ทำให้เกิดโรกกิ่งแห้งในองุ่น ได้ 8 ชนิด ได้แก่ *L. brasiliense*, *L. crassispota*,

L. egyptiaca, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* และ *L. theobromae* โดย การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของบริเวณ ITS ร่วมกับยีน EF1-alpha นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ยีนหรือบริเวณอื่นๆ ร่วมด้วย จาก รายงานของ Biju et al. (2021) ที่ทำการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรค กิ่งแห้งของจันทน์เทศ ได้จำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโดยอาศัย ความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity test) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS ร่วมกับ ยีน EF1-alpha และ beta tubulin ทำให้สามารถจำแนกชนิดเชื้อรา *L. theobromae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคได้ชัดเจน และแม่นยำขึ้น

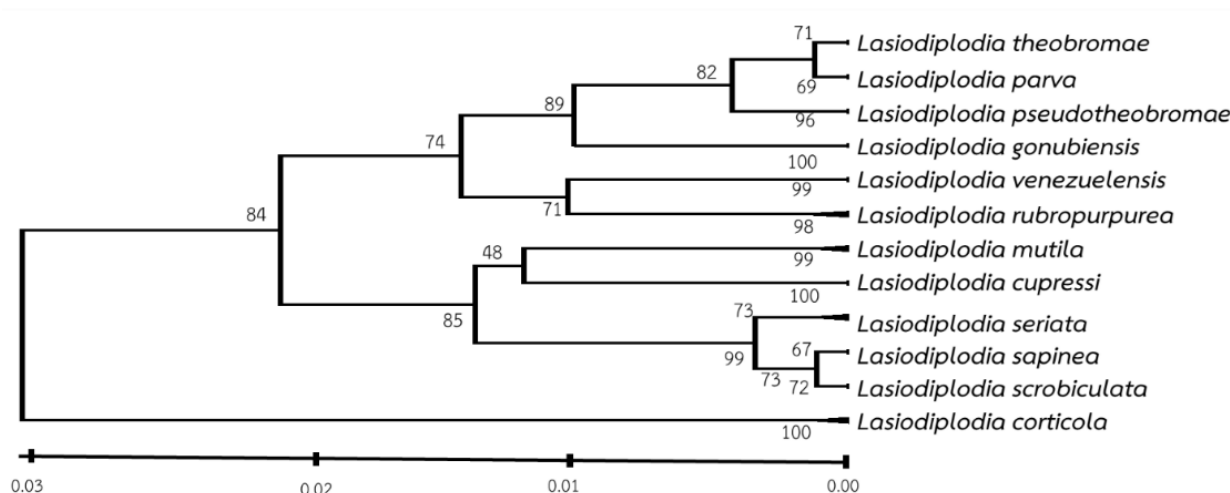


Figure 3 UPGMA dendrogram relationship generated from nucleotide sequences based on ITS-region of 12 different *Lasiodiplodia* species using MEGA version 11 software. Clade stability was assessed using a bootstrap with 1,000 replicates.

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อราบริเวณ internal transcribed spacer (ITS region)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนผังความสัมพันธ์ของเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากกิ่งทุเรียน 20 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับเชื้อรา *L. theobromae* จากพืชอื่นใน Table 2 ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาซึ่งมีข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 เท่ากับ 510 bp มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 7 bp โดยอยู่ในลำดับที่ 23, 25, 73, 78, 80, 98 และ 407 ดังแสดงใน Table 5 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 1.3726% และจากการวิเคราะห์ค่าความ แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความแตกต่างในระดับของ intraspecific เพียง 0.00 – 0.78% (เฉลี่ย 0.1236%)

Table 5 Differentiation in ITS1-5.8s-ITS2 of *Lasiodiplodia theobromae* used in this study

Host	Country	Nucleotide position (bp)							Total (bp)	% Different Nucleotide
		23	25	73	78	80	98	407		
		C	A	G	C	T	T	A		
<i>Vitis vinifera</i>	Mexico	-	G	A	A	-	-	T	510	0.78
<i>Mangifera indica</i>	Mexico	T	-	T	-	C	-	-	510	0.58
	Egypt	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
	Peru	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
<i>Persea americana</i>	China	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
	Peru	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
<i>Carica papaya</i>	Mexico	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
<i>Dimocarpus longan</i>	Puerto Rico	-	G	-	-	-	C	-	510	0.39
<i>Passiflora edulis</i>	China	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00
<i>Fragaria x ananassa</i>	US	-	G	-	-	-	C	-	510	0.39
<i>Durio zibethinus*</i>	Thailand	-	-	-	-	-	-	-	510	0.00

* Used in this study

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์แผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์แบบ UPGMA โดยค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในทุเรียนกับเชื้อราในพืชอื่นด้วยวิธี pairwise sequence comparison ซึ่งกำหนดค่า identify percentage มากกว่า 95% พบว่าเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากกิ่งทุเรียน 20 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง มะพร้าว อะโวคาโด มะละกอ และเสาวรส ที่ค่าความเชื่อมั่น 86% แยกออกจากเชื้อรา *L. theobromae* ในลำไยและสตรอว์เบอร์รี่ที่ค่าความเชื่อมั่น 65% ในขณะที่มะม่วงจากเม็กซิโก พบว่าแยกออกจากเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวโดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 71% นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *L. theobromae* จากองุ่น มีความแตกต่างกับเชื้อราทั้งหมด โดยแยกออกจากกลุ่มเชื้อรา *L. theobromae* ที่กล่าวมาข้างต้น (Figure 4B) ในขณะที่การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า matrix of pairwise similarity scores มีความน่าเชื่อถือสูงถึง 98-100% (Figure 4A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดกลุ่มด้วยแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์แบบ UPGMA ให้ผลที่สอดคล้องกัน

การจัดกลุ่มโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *L. theobromae* ที่เข้าทำลายพืชแต่ละชนิด มีจุดประสงค์เพื่อเป็นการศึกษาและยืนยันถึงความเป็นไปได้ในการที่เชื้อราชนิดนี้ จะสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด ส่งผลต่อกระบวนการควบคุมโรคในแง่ของการปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) หากวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จะพบว่า *L. theobromae* ที่เข้าทำลายทุเรียนมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS region ใกล้เคียงกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง มะพร้าว อะโวคาโด มะละกอ และเสาวรส จากงานวิจัยของ อาภัสรา (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ได้นำเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากกิ่งทุเรียนไปปลูกเชื้อบนกิ่งของมะม่วง โกโก้ ยางพารา พริกไทย และมะละกอ เพื่อต้องการทดสอบการเป็นพืชอาศัยร่วมกัน พบว่าพืชทดสอบทั้ง 4 ชนิด เกิดอาการกิ่งแห้ง พบแผลสีน้ำตาลเข้ม เมื่อทิ้งไว้ 21 วัน หลังการปลูกเชื้อ พบการสร้างโครงสร้างสำหรับสร้างส่วนขยายพันธุ์ ยกเว้นมะละกอซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพืชชนิดนี้มียางทำให้เป็นอุปสรรคในความสำเร็จของการปลูกเชื้อ ส่วนงานวิจัยของ พัทยา (2557) ได้ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากอาการขั้วผลเน่าของมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย กับผลไม้อีก 8 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล พลัม ส้ม กล้วยหอม ฝรั่ง มะม่วงน้ำดอกไม้ แก้วมังกร และชมพู พบว่าเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายนั้น สามารถก่อให้เกิดอาการขั้วผลเน่ากับผลไม้ทั้ง 8 ชนิดได้

สอดคล้องกับรายงานของ Baird et al. (1995) ที่ศึกษาอิทธิพลของการปลูกพืชหมุนเวียนที่ส่งผลต่อความหลากหลายของเชื้อราในถั่วลิสง โดยปลูกถั่วลิสงและสำรวจโรค พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* ได้จากบริเวณเปลือกของถั่วลิสง เมื่อทดสอบการปลูกพืชหมุนเวียนจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) ไรย์ (*Secale cereale*) หญ้าเอี้ย (*Paspalum notatum*) และข้าวโพด (*Zea mays*) พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* ได้จากพืชทั้ง 4 ชนิด เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราทั้ง 2 สกุล สามารถอาศัยอยู่ในแปลงได้ทั้งในรูปของ plant parasite และ saprophyte กับพืชทั้ง 4 ชนิด ได้

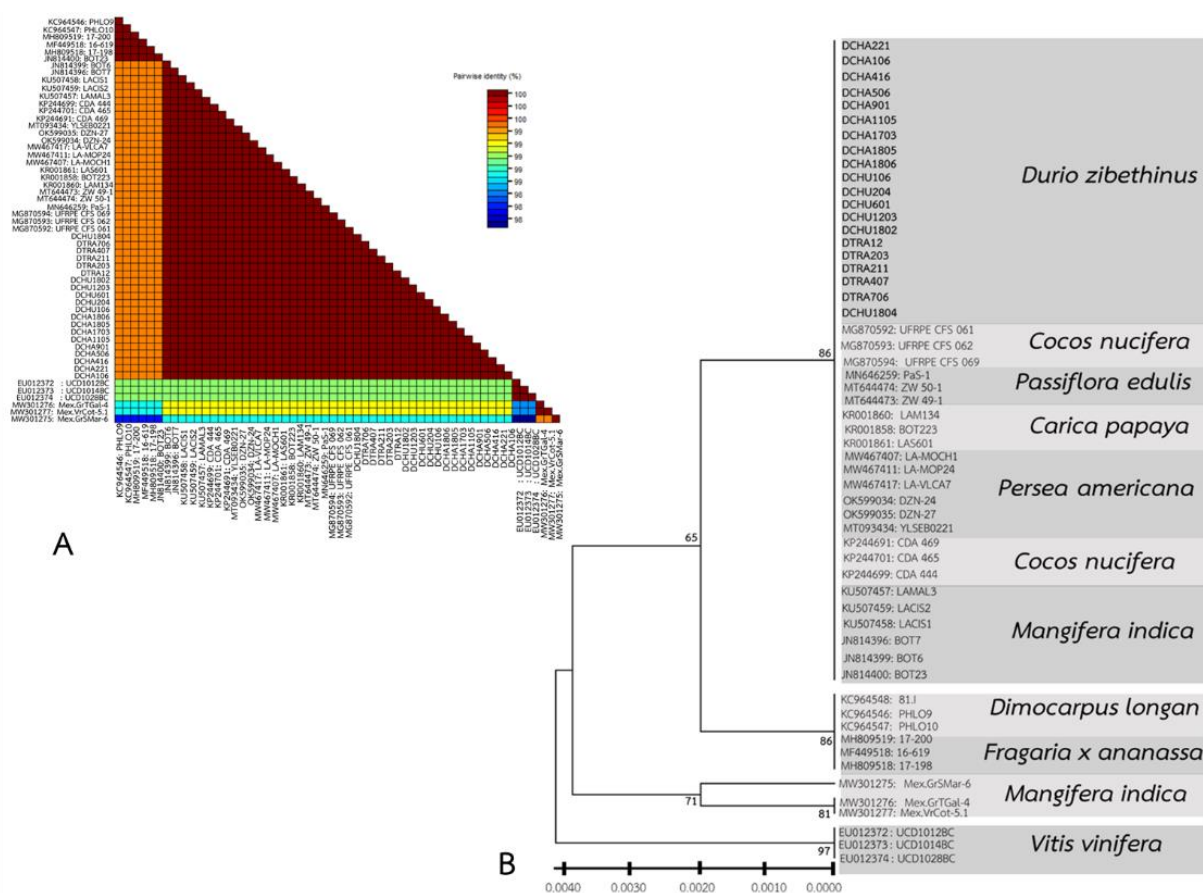


Figure 4 Comparison and relationship of nucleotide; Color matrix of pairwise nucleotide sequence identity inferred from ITS region alignments of *L. theobromae* and representative isolates from the GenBank (A) and dendrogram obtained from UPGMA, based on aligned ITS region using bootstrap values ($\geq 50\%$) from 1,000 replicates (B).

โดยทั่วไปแล้วเชื้อรา *L. theobromae* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของพืชหลายชนิดในประเทศไทย เช่น ถั่วลิสง มะม่วง ส้ม เงาะ พุเรียน ลิ้นจี่ ลำไย และส้มโอ สามารถแพร่ระบาดได้ดีทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อน มีรายงานว่าเชื้อราดังกล่าวมีพืชอาศัยมากถึง 500 ชนิด และสามารถอาศัยอยู่ในดิน ท่อนพันธุ์ หรือวัสดุปลูก ได้เป็นระยะเวลานาน รวมทั้งทนต่อสภาพแล้งได้ดี ดังนั้นการควบคุมโรคด้วยวิธีการต่าง ๆ รวมถึงการปลูกพืชหมุนเวียน จะต้องมีความมั่นใจได้ว่าพืชที่นำมาปลูกและสายพันธุ์ของเชื้อรานั้นไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (Punithalingam, 1976; Ismail et al., 2012; CABI, 2022)

ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยเทคนิค SPAR (single primer amplification reaction)

จากการศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรม โดยเลือกใช้เทคนิค ISSR ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ (AG8)C, (CAG)5, (GACA)4, (GTG)5, UBC809 และ UBC891 พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *L. theobromae* ได้จำนวนแถบ 55 แถบ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์แถบที่แตกต่างกัน (%polymorphic band) เฉลี่ยเท่ากับ 76.39% (Table 5) โดยพบว่าไพรเมอร์ที่ให้ polymorphic band มากที่สุด คือ (AG8) C เท่ากับ 100.00% ในขณะที่ไพรเมอร์ (GTG) 5 มี polymorphic band ที่แตกต่างกันน้อยที่สุดเท่ากับ 41.67% ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อความแปรปรวนของดัชนีระดับทางพันธุกรรม (h) และข้อมูลของ Shannon's (I) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณความหลากหลายทางชีวภาพที่เฉพาะเจาะจง ดังแสดงใน Table 6

Table 6 Frequency of bands and alleles, and estimated population diversity for binary data using GenAlEx software version 6.5

Pop	n	Na ¹	Ne ²	I ³	h ⁴	uh ⁵	%Polymorphic loci
(AG8)C	12	2.00	1.55	0.48	0.32	0.34	100.00
(CAG)5	10	1.66	1.47	0.41	0.27	0.28	83.33
(GACA)4	8	1.33	1.41	0.35	0.24	0.25	66.67
(GTG)5	5	0.83	1.21	0.21	0.13	0.14	41.67
UBC809	11	1.83	1.35	0.36	0.23	0.24	91.67
UBC891	9	1.50	1.36	0.34	0.22	0.23	75.00
Mean	9.16	1.52	1.39	0.36	0.23	0.25	76.39

¹Na = No. of different alleles.

²Ne = No. of effective alleles = $1/(p^2 + q^2)$.

³I = Shannon's information index = $-1 * [p * \ln(p) + q * \ln(q)]$.

⁴h = Diversity = $1 - (p^2 + q^2)$.

⁵uh = Unbiased diversity = $(N/(N-1)) * h$.

เมื่อสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพันธุกรรมของเชื้อรา *L. theobromae* ทั้ง 20 ไอโซเลท พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient reached) เท่ากับ 0.3485 และแบ่งกลุ่มเชื้อราได้ 5 กลุ่ม โดยที่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 13 ไอโซเลท ได้แก่ DCHU106, DCHU601, DCHA416, DCHA106, DCHA901, DCHA221, DCHA1806, DCHA1805, DCHA1105, DTRA407, DTRA211, DCHA506 และ DCHU204 ส่วนกลุ่มที่ 2 มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ DCHU1802 กลุ่มที่ 3 มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ DCHU1804 กลุ่มที่ 4 มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ DTRA12 อยู่ และกลุ่มที่ 5 มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ DTRA706, DTRA203, DCHU1203 และ DCHA1703 โดยมีค่า bootstrap ต่ำสุด เท่ากับ 65% และสูงสุดเท่ากับ 74% (Figure 5) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของเชื้อรา พืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคลนีย์ รวมถึงชนิดเชื้อรา พบว่าข้อมูลดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กันแต่อย่างใด

โดยทั่วไปแล้วความแตกต่างของเชื้อราดังกล่าวมักขึ้นกับสภาพแวดล้อม รวมถึงปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อราในระดับห้องปฏิบัติการ จึงเกิดความผันแปร (variation) ขึ้นได้ (Mohali et al., 2005) ในขณะเดียวกันการแบ่งกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลวิธีการ single primer amplification โดยเทคนิค ISSR พบว่า similarity coefficient reached มีค่าต่ำ ($r=0.3485$) ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่นำมาศึกษานั้น มีความหลากหลายทางชีวภาพที่ค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และพบว่าเชื้อรา *L. theobromae* ในแต่ละตัวอย่างประชากร มีความหลากหลายทางชีวภาพภายในชนิดที่ค่อนข้างต่ำ และมีความใกล้เคียงกันใน

แต่ละไอโซเลทของประชากรตัวอย่างที่นำมาใช้ศึกษา ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยจากรายงานของ Xie et al. (2016) ได้ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากหม่อน (*Morus alba*) และป่านครนารายณ์ (*Agave sisalana*) ด้วยวิธี ISSR และ RAPD พบว่าวิธีการทั้งสองให้ผลที่สอดคล้องกันคือสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา *L. theobromae* จำนวน 23 ไอโซเลท ออกเป็น 5 กลุ่ม มีค่า $r=0.746$ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA พบว่ามีความหลากหลายของลักษณะโคโลนี แต่เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ และความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อราแต่ละกลุ่มนั้น ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Sathya et al. (2017) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากอาการกิ่งแห้งของต้นมะม่วงในรัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย โดยจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลท มีความหลากหลายของลักษณะโคโลนี ตั้งแต่สีเขียวมะกอก พูจากผิวหน้าอาหาร ไปจนถึงเส้นใยสีขาวแผ่ราบไปกับผิวหน้าอาหาร อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลทพบการสร้างส่วนขยายพันธุ์หลังการย้ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 5 วัน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพด้วยเทคนิค ISSR พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 15 ไอโซเลท ได้แก่ LT1, LT2, LT13, LT14, LT10, LT12, LT15, LT16, LT3, LT8, LT9, LT11, LT4, LT5 และ LT6 ส่วนกลุ่มที่ 2 มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ LT7 ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือสภาพภูมิศาสตร์

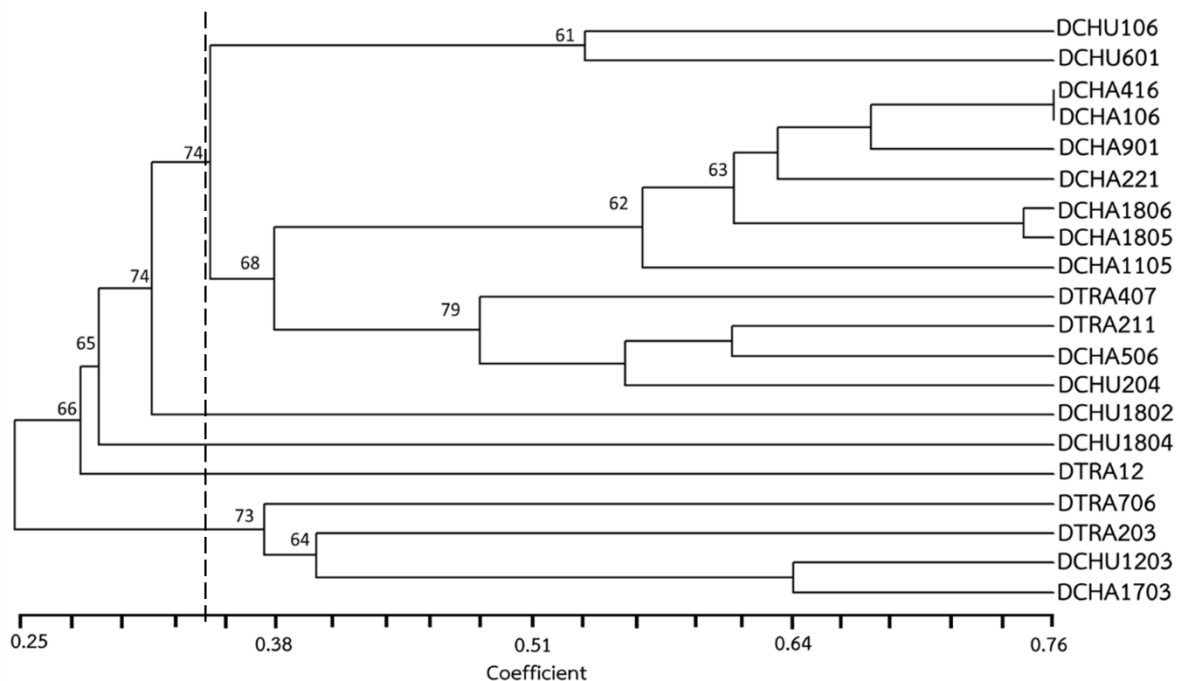


Figure 5 UPGMA dendrogram of twenty *L. theobromae* isolates based on PCR-ISSR analysis ($r=0.3485$)

สำหรับในประเทศไทยนั้น มีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *L. theobromae* ค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาจากอาการที่พบกับกิ่งทุเรียน ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถทำให้เกิดโรคมลเน่ากับทุเรียนได้ค่อนข้างรุนแรง อย่างไรก็ตามการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ยังคงพบอยู่ในปัจจุบัน เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกและตลาดผู้บริโภคในประเทศไทย จึงเห็นความสำคัญในการศึกษาชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่พบในแปลงทุเรียนในประเทศไทยว่ามีความหลากหลายหรือไม่และอย่างไร เพื่อที่จะหาวิธีการจัดการที่มีประสิทธิภาพในแปลงปลูก ซึ่งจะช่วยลดปัญหาเรื่องโรคมลเน่าของทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยวได้

สรุป

ผลการจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคอนุชีวโมเลกุล สามารถจำแนกเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลตเป็น *L. theobromae* จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดที่ใกล้เคียง พบว่าการใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถแยกเชื้อรา *L. theobromae* ออกจากชนิดอื่น เช่น *L. parva* และ *L. pseudotheobromae* ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 82% มีความแปรปรวนของ intraspecific เพียง 0.00 – 0.78% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *L. theobromae* ในพืชชนิดอื่น ๆ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *L. theobromae* ในพืชชนิดอื่น ๆ กับเชื้อราที่แยกได้จากทุเรียนในงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อราที่เข้าทำลายทุเรียนมีความใกล้ชิดกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง มะพร้าว อะโวคาโด มะละกอ และเสาวรส จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SPAR โดยใช้ ISSR-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากทุเรียน ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยไม่พบความเชื่อมโยงระหว่างพื้นที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของเชื้อรา พืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะโคโลนี งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการปลูกพืชที่มีเชื้อสาเหตุร่วมกันและมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมในแปลงปลูกทุเรียนเป็นเรื่องที่ควรพิจารณาให้รอบคอบ เนื่องจากพืชเหล่านั้นเป็นพืชอาศัยของเชื้อรา *L. theobromae* ด้วยเช่นกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) กรุงเทพฯ และขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- พัทยา จำปีเรือง. 2557. ผลของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ต่อการควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคขั้วผลเน่าบนมะละกอ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.
- รังสิมันต์ อีระวงศ์ภิญโญ, สมศิริ แสงโชติ และปฐวิภา สงกุมาร. 2562. การระบุชนิดของเชื้อรา *Lasiodiplodia* species สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียนในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 50(พิเศษ3): 147-150.
- สมศิริ แสงโชติ, รติยา พงศ์พิสุทธา และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2539. โรคที่เกิดกับผลทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยว. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34: 148-152.
- 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.
- Baird, R.E., T.B. Brenneman, D.K. Bell, D.R. Sumner, N.A. Minton, B.G. Mullinix, and A.B. Peery. 1995. Influence of crop rotation and flutolanil on the diversity of fungi on peanut shells. Phytoprotection. 76(3): 101-113.
- Biju, C.N., A. Jeevalatha, M.F. Peeran, R.S. Bhai, F. Basima, V.A. Nissar, V. Srinivasan, and L Thomas. 2021. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with die-back and decline of nutmeg as revealed through phenotypic pathogenicity and phylogenetic analyses. 3 Biotech. 11(9): 1-10.
- Bincader, S., R. Pongpisutta, and C. Rattanakreetakul. 2022. Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease from mango cv. Nam Dork Mai See Tong based on ISSR-PCR. Indian Journal of Agricultural Research. 56: 81-90.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species. American Journal of Botany. 98: 426-438.
- Centre for Agriculture and Bioscience International. 2022. *Lasiodiplodia theobromae*. Available: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20103281413>. Accessed April.27, 2022.
- Chen, J., Z. Zhu, Y. Fu, J. Cheng, J. Xie, and Y. Lin. 2021. Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing fruit rot of citrus in China. Plants. 10(2): 1-8.

- Correia, K.C., M.A. Silva, M.A. de Morais Jr, J. Armengol, A.J. Phillips, M.P.S. Cômara, and S.J. Michereff. 2016. Phylogeny distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with die-back of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant pathology*. 65: 92-103.
- de Silva, N.I., A.J. Phillips, J.K. Liu, S. Lumyong, and K.D. Hyde. 2019. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with magnolia forest plants. *Scientific Reports*. 9(1): 1-11.
- Gupta, M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson, and J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 998–1006.
- Gupta, P.K., and R.K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 113: 163–185.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes, pp. 313-321. In *Proceedings of Biological Sciences Conference 8 January 2003*. London, UK.
- Ismail, A.M., G. Cirvilleri, G. Polizzi, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, and L. Lombard. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica* L.) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*. 41: 649-660.
- Lafontaine, D.L.J., and D. Tollervy. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(7): 514–520.
- Lim, T.-K., and S. Sangchote. 2003. Disease of durian. pp. 241-251. In R.C. Ploetz (ed.) *Diseases of tropical fruit crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Mohali S, T.I. Burgess, and M.J. Wingfield. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*. 35: 385–396.
- Mora, C., D.P. Tittensor, S. Adl, A.G.B. Simpson, and B. Worm. 2011. How many species are there on Earth and in the Ocean. *PLOS Biology*. 9: e1001127.
- Muhire, B.M., A. Varsani, and D.P. Martin. 2014. SDT: a virus classification tool-based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One*. 9: e108277.
- Peakall, R.O.D., and P.E. Smouse. 2006. GenAlex 6: genetic analysis in excel, population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6(1): 288-295.
- Phillips, A.J.L., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M.J. Wingfield, J.Z. Groenewald, and P.W. Crous. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51–167.
- Pongpisutta, R., W. Winyarat, and C. Rattanakreetakul. 2013. RFLP identification of *Colletotrichum* species isolated from chilli in Thailand. *Acta Horticulturae*. 973: 181–186.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria, No 519: Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Rohlf, F. 1988. NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. New York, US.
- Rohlf, F.J., and R.R. Sokal. 1981. Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Biology*. 30(4): 459–490.

- Sathya, K., S. Parthasarathy, G. Thiribhuvanamala, and K. Prabakar. 2017. Morphological and molecular variability of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango in Tamil Nadu India. International Journal of Pure and Applied Bioscience. 5(6): 1024-1031.
- Schocha, C.L., K.A. Seifertb, S. Huhndorfc, V. Robertd, J.L. Spougea, C.A. Levesqueb, W. Chen, and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi, pp. 6241-6246. In Proceedings of the National Academy of Sciences Conference 27 March 2012. US.
- Stackebrandt, E., and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 44: 846-849.
- Staub, J.E., F.C. Serquen, and M. Gupta, 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 31(5): 729-739.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK.
- Suwanarach, N., S. Khuna, J. Kumla, R. Cheewangkoon, P. Suttiprapan, and S. Lumyong. 2022. Morphology characterization molecular identification and pathogenicity of fungal pathogen causing kaffir lime leaf blight in Northern Thailand. Plants. 11(3): 1-13.
- Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution. 38(7): 3022-3027.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22(22): 4673-4680.
- Uddin, M.S., and Q. Cheng. 2015. Recent application of biotechniques for the improvement of mango research, pp. 195-212. In Applied Plant Genomics and Biotechnology. Woodhead Publishing, India.
- 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. Sninsky and T.J. White, eds. PCR protocols: a guide to method and application. Academic Press, New York, US.
- Xie, H.H., J.G. Wei, R.S. Huang, and X.B. Yang. 2016. Genetic diversity analyses of *Lasiodiplodia theobromae* on morus alba and Agave sisalana based on RAPD and ISSR molecular markers. Mycology. 7(4): 155-164.
- Yap, I., and R.J. Nelson. 1996. Winboot: a program for performing bootstrap: analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda, 1994. Genome finger- printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20: 176-183.