T165685

จากการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletrotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสของพืชเศรษฐกิจในเขตภาคเหนือของไทย พบว่าสามารถแยกเชื้อราดังกล่าวได้จากพืช 52 ชนิด รวม 88 ไอโซเลท โดยเชื้อราที่แยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไป เช่น สีของโคโลนีที่พบมีตั้งแต่สีขาว, เขียว, ส้ม และเทา มีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันตั้งแต่ 0.82 ถึง 1.72 เซนติเมตรต่อวัน เมื่อทำการศึกษาลักษณะและรูปร่างของ conidia พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่สร้าง conidia รูปทรงกระบอก มีขนาดตั้งแต่ 3.00-4.68 x 12.38-14.34 ไมโครเมตร มีการสร้าง appressoria ทั้งที่มีลักษณะเป็นแบบผิวเรียบและผิวขรุขระ มีขนาดตั้งแต่ 5.58-8.22 x 9.09-13.73 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราบางไอโซเลทมีการสร้าง sclerotia เช่น เชื้อราที่แยกได้จากกล้วย กล้วยไม้ ข้าวฟ่าง ทับทิม มะนาว และส้ม เป็นต้น ส่วนเชื้อราที่สร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นพบเพียงไอโซเลทเดียวคือเชื้อราที่แยกได้จากมะนาว เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวมาใช้ในการจัดจำแนกชนิด ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่จัดเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยพบมีมากถึง 54 ไอโซเลทจากพืชอาศัย 22 ชนิด โดยที่มะม่วงจัดเป็นพืชอาศัยที่แยกเชื้อได้จำนวนมากที่สุดคือ 23 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *C. capsici, C. coccodes* และ *C. lagenarium* อย่างละ 2 ไอโซเลท, และเชื้อรา *C. graminicola* 1 ไอโซเลท ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* อื่นๆ รวม 27 ไอโซเลทที่เหลือนั้น ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

เมื่อทำการสุ่มนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 13 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชต่างๆ ดังนี้ คือ *Begonia* sp., *Coffea arabica, Caladium bicolar, Citrus reticulata, Codiaeum variegatum, Diospyros kaki, Euphoria longana, Limonium* sp., *Lycopersicon*

T165685

esculentum, Musa sapientum และ *Sorghum bicolor* มาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราภายในกลุ่ม โดยนำมาสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง nuclear rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS 5 และ P 3 จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 17 สปีชีส์ ได้แก่ *C. acutatum, C. capsici, C. coccodes, C. dematium, C. destructivum, C. fragariae, C. fuscum, C. gloeosporioides, C. graminicola, C. kahawae, C. lindemuthianum, C. linicola, C. musae, C. orbiculare, C. sublineolum, C. trichellum* และ *C. trifolii* ที่ได้จาก The DNA databank of Japan (DDBJ) โดยนำผลที่ได้มาสร้าง neighbor-joining tree และวิเคราะห์หาค่า bootstrap เปรียบเทียบข้อมูล 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0 และคำนวณค่า data matrix ด้วย PAUP version 3.1 พบว่าเชื้อราที่นำมาทดลองสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นัลทรานสไครพ์สเพเซอร์นี้ กลุ่มที่ได้จะสอดคล้องกับกลุ่มที่แยกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ *C. gloeosporioides, C. capsici* และ *C. coccodes* ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จาก *Musa sapientum* ที่ถูกจัดเป็นเชื้อรา *C. musae* ดังนั้นลำดับเบสบน rDNA เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในจีนัส Colletotrichum และใช้ในการจัดจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ (species)

นอกจากนี้ จากการสุ่มวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ คือ สตรอเบอรี่ 1, สตรอเบอรี่ 2, ทับทิม, ส้ม 1, ส้ม 2, ฝรั่ง, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, ลำไย, พลับ, กาแฟ, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, มะนาว, และพริก ด้วยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ *Eco*RI/*Mse*I เป็น adapter และใช้ *Eco*RI-A/*Mse*I-C เป็น primer ในการทำ PCR ครั้งที่หนึ่ง และใช้ *Eco*RI-A/*Mse*I-CAG, *Eco*RI-A/*Mse*I-CAC, *Eco*RI-A/*Mse*I-CAT, และ *Eco*RI-AC/*Mse*I-C เป็น primer ในการทำ PCR ครั้งที่สอง ปรากฏว่า พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างภายในสปีชีส์ (polymorphic bands) รวม 154 แถบ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม UPGMA (Unweighted Paired Group Method Using averages) and parsimony ผลปรากฏว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราที่นำมาทดสอบออกเป็น 11 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.7 ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ 1 และสตรอเบอรี่ 2, กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากทับทิม, กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า, กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากลำไย, กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพลับ, กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากมะนาว, กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง, กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพริก, กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากฝรั่ง, กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ และกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากส้ม 1 และส้ม 2 โดยที่ผลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ยังพบว่า เชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดเดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟและข้าวฟ่างที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันแต่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าเทคนิค AFLP มีประโยชน์ในการใช้จัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งจัดเป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่และมีความซับซ้อนมากได้ถึงระดับสายพันธุ์ (strains)

TE165685

The isolation and identification of *Colletotrichum* spp. from the economic host plants in Northern Thailand was conducted. In this study, 88 isolates of *Colletotrichum* spp. have been isolated from 52 host plant species. Study on the morphology of these isolates found that they were difference in colony color (vary from white, green, orange to gray) and the growth rate on the medium (ranges from 0.82 to 1.72 centimeters/day). Microscopic studies showed that most of the tested fungi produced cylindrical conidia (3.00-4.68 x 12.38-14.34 micrometers) and produced smooth or rough appressoria ranged from 5.58-8.22 x 9.09-13.75 micrometers. Some of the tested fungi produced sclerotia but most of them were not produced setae except the isolate from lime. However classification of Sutton (1980), most of them (54 isolates from 22 host plant species) were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. Two isolate of *C. capsici*, *C. coccodes* and *C. lagenarium* were found and one isolate of *C. graminicola* has been identified. The other 27 isolates could not identified, thus, the classification and identified based on their morphology alone could not be used.

By randomly, thirteen isolates of *Colletotrichum* spp. which isolated from *Begonia* sp., *Coffea arabica*, *Caladium bicolar*, *Citrus reticulata*, *Codiaeum variegatum*,

Diospyros kaki, *Euphoria longana*, *Limonium* sp., *Lycopersicon esculentum*, *Musa sapientum*, and *Sorghum bicolor* were used in this study for determine the phylogenetic relationship. Total DNA of each fungus was extracted from mycelia and the nuclear rDNA region was amplified by PCR technique using primers ITS5 and P3. The nucleotide sequences of the PCR product were determined in order to analyze their phylogenetic relationship. The nucleotide sequences of 17 known species of the *Colletotrichum* spp. (*C. acutatum*, *C. capsici*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. fragariae*, *C. fuscum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. kahawae*, *C. lindemuthianum*, *C. linicola*, *C. musae*, *C. orbiculare*, *C. sublineolum*, *C. trichellum* and *C. trifolii*) from the DNA databank of Japan (DDBJ) were used for comparison. A neighbor-joining tree was constructed by PAUP version 4.0 program using the nucleotide sequence data of the conserved site of the ITS regions (used only ITS1). A bootstrap analysis using 1,000 resamples of the data was carried out. Finally, the data matrix was calculated by PAUP version 3.1. The result showed that the tested fungi were divided into four groups. This grouping was similar to that grouping by based on the morphological characters, such as *C. gloeosporioides*, *C. capsici* and *C. coccodes*, excepts the fungus isolated from *Musa sapientum* that was identified as *C. musae*. Thus, the nucleotide sequences of rDNA region was useful for analysis phylogenetic relationship in the genus *Colletotrichum* at the speceis level.

More over, using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique to analysis the phylogenetic relationship of the fifteen isolates of *Colletotrichum* spp. which were isolated from difference host species; strawberry 1, strawberry 2, pomegranate, orange 1, orange 2, guava, banana 1, banana 2, longan, persimon, coffee, orchid, sorghum, lime and pepper. DNA of each fungal isolate was extracted and was analyzed by AFLP technique using *Eco*RI/*Mse*I as adapter, *Eco*RI-A/*Mse*I-C as the primers for the 1st PCR and *Eco*RI-A/*Mse*I-CAG, *Eco*RI-A/*Mse*I-CAC, *Eco*RI-A/*Mse*I-CAT and *Eco*RI-AC/*Mse*I-C as the primers for the 2nd PCR. After analysis the PCR product by PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), a total of 154 polymorphic bands were obtained and they were analyzed by UPGMA (unweighted paired group using averages) and parsimony. The result showed that all of the tested fungi can be divided into 11 groups at a similarity of 0.7 as follows; the first group consisted of the fungi isolated from strawberry 1 and strawberry 2, the second group was isolated from pomegranate, the third group was isolated from banana 1 and banana

2, the fourth group was isolated from longan, the fifth group was isolated persimon, the sixth group was isolated from lime, the seventh group isolates from coffee and sorghum, the eighth group was isolated from pepper, the ninth group was isolated from guava, the tenth group was isolated from orchid, and the eleventh group was isolated from orange 1 and orange 2. Thus the result also showed that these fungi which isolated from the same host species were closely related except the isolates from coffee and sorghum, they were identified as the same group. Therefore, the AFLP technique was useful technique that can be used for identification of *Colletotrichum*. at strains or cultivar level.