

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค ISSR

Genetic Relationship of *Colletotrichum* spp. by Morphology and ISSR Technique

รัฐกร ศรีสุทธิ^{1/} และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1/}
Rattakorn Srisuttee^{1/} and Sarunya Nalumpang^{1/}

Abstract: Forty-one isolates of *Colletotrichum* spp. were identified by morphological characteristic such as character and growth rate of colony, size and shape of conidia and appressoria, present/absent of setae and sclerotia. The morphological observation showed that *Colletotrichum* spp. isolates could be classified into 4 species; *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae* and *C. capsici*. Genetic relationship of the tested fungi by 6 ISSR primers generated 161 bands and they were analyzed by Phylip could be divided into 4 groups; *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. musae* and the remaining are *C. gloeosporioides*. There was also a highly genetic relationship between *C. musae* and *C. gloeosporioides*. Moreover, this grouping was similar to that based on the morphological characteristic. Therefore, the ISSR technique was useful for analysis phylogenetic relationship in the genus *Colletotrichum*.

Keywords: *Colletotrichum*, morphology, molecular biology, phylogeny, ISSR

บทคัดย่อ: การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 41 ไอโซเลท โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะและอัตราการเจริญของ colony ขนาดและรูปร่างของ conidia และ appressoria การสร้างหรือไม่สร้าง setae และ sclerotia พบว่าสามารถจำแนกได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae* และ *C. capsici* เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 161 แถบ และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip พบว่าสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มของเชื้อรา *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. musae* และที่เหลือเป็นกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยพบว่ากลุ่มของเชื้อรา *C. musae* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และผลการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิค ISSR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง ในการวิเคราะห์ประวัติเชิงวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

คำสำคัญ: *Colletotrichum*, สัณฐานวิทยา, อนุชีววิทยา, phylogeny, ISSR

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

เชื้อรา *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ซึ่งสามารถเกิดได้กับพืชแทบทุกชนิด ทั้งพืชตระกูลถั่ว หญา ผัก ธัญพืช ไม้ผล และไม้ประดับ (Bailey and Jeger, 1992) และมีการสำรวจพบการเกิดโรคแอนแทรคโนสในหลายประเทศทั่วทุกทวีป โดยเฉพาะประเทศในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน ที่มีการระบาดของโรคชนิดนี้อยู่มาก ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนั้นประเทศไทยยังเป็นแหล่งที่พบความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มากกว่าประเทศในแถบอื่นๆ ของโลกอีกด้วย (นิพนธ์, 2535) ส่งผลให้พืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง เงาะ สตรอเบอรี่ ส้ม หอม กระเทียม ถั่วเหลือง ฯลฯ มีความเสียหายและปริมาณผลต่ำลง ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงจัดเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการส่งออกผลไม้ของไทย (วิชัย, 2541) การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสให้ได้ผลนั้น จำเป็นที่จะต้องทราบถึงชนิดและคุณสมบัติของเชื้อสาเหตุที่แน่นอน ดังนั้นการศึกษาและจัดจำแนกเชื้อจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก (Freeman *et al.*, 1998) ในอดีตการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว แต่เนื่องจากเชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก จึงมีการผันแปรค่อนข้างสูง และสามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่ายขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อีกทั้งมีการพบเชื้อสาเหตุเพิ่มมากขึ้น หลักเกณฑ์ที่ใช้จึงไม่สามารถจำแนกเชื้อราได้อย่างชัดเจน (Cano *et al.*, 2004) จึงมีการประยุกต์เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ศึกษาในระดับดีเอ็นเอ เข้ามาร่วมในการจัดจำแนกด้วย และเทคนิคที่น่าสนใจอีกเทคนิคหนึ่งคือ เทคนิค ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่รวมข้อดีของเทคนิค RAPD, AFLP และ SSR เข้าไว้ด้วยกัน อีกทั้งประสิทธิภาพในการทำซ้ำยังดีกว่า RAPD และการตรวจผลใช้เวลาสั้นกว่า AFLP นอกจากนี้ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อนอีกด้วย และข้อดีอีกประการหนึ่งของเทคนิค ISSR คือ ขั้นตอนการทำให้ยุ่งยาก และใช้เวลาไม่นาน ซึ่งหลักการโดยทั่วไปคล้ายกับเทคนิค RAPD แต่ต่างกันที่การใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับ

เบสซ้ำ ๆ กันแบบไมโครแซทเทลไลต์ และมีขนาดที่ยาวกว่า จึงทำให้มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่า (อรรธรณ, 2547)

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้เทคนิค ISSR

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ทำการแยกเชื้อราจากพืชอาศัย โดยฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Csox 10% วางชิ้นพืชบนอาหาร PDA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญจนสังเกตเห็นกลุ่มของ conidia (mass) จึงทำการแยกสปอร์เดี่ยว โดยเทคนิคการ streak plate และเลี้ยงบนอาหาร PDA

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 5 ซ้ำ ทุกวันที่ 3, 5 และ 7 และทำการบันทึกลักษณะของ colony รวมถึงการสร้างหรือไม่มีสร้าง setae และ sclerotia ด้วย จากนั้นศึกษารูปร่างและรูปร่างของ conidia และ appressoria อย่างละ 30 ตัวอย่าง โดยการเลี้ยงเชื้อราแบบ slide culture (Smith and Black, 1990) แล้วย้อมด้วย lactophenol cotton blue และจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7 วัน กรองเส้นใยผ่านเครื่องกรองแบบสูญญากาศ และสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของพัทรา (2543) โดยเริ่มจากบดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลว ตักใส่หลอด Eppendorf 1.5 มิลลิลิตรประมาณครึ่งหลอด เติมหอยสกัด buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS)

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก ดูดของเหลวใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า แล้วปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้น ดูดของเหลวด้านล่างใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ice-cold absolute alcohol (ต้องเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที) ปริมาตร 2 เท่า จากนั้นล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งและเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) เพื่อละลายตะกอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำอิมพลูเมนต์ในอะกาโรสเจล 1% ด้วย 0.5xTBE buffer เทียบกับ 100 นาโนกรัมมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 10 นาที ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้อยู่ในระดับ 10-100 นาโนกรัม

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR นั้น ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากไพรเมอร์ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์ โดยการทำ PCR มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template ความเข้มข้น 10-100 ng, 10x buffer, 10 μ M dNTP, 5U/ μ l Taq DNA Polymerase, 25 mM MgCl₂, 20 μ M primer และ sterile dH₂O และทำ PCR แบบ touchdown-PCR โดยการเพิ่มอุณหภูมิเริ่มต้นในขั้น annealing (คำนวณจาก %GC content) 4 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ ลดลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส จนอุณหภูมิในขั้น annealing ต่ำกว่าที่คำนวณไว้ 1 องศาเซลเซียส จึงทำซ้ำที่ระดับอุณหภูมินี้อีก 30 รอบ การทำ PCR เริ่มจาก initial-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ขั้น denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้น annealing ที่ 49-72 องศาเซลเซียส และขั้น extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้ว hold ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเก็บในตู้เย็น ตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีอิมพลูเมนต์ในอะกาโรสเจล 1.5% (ขนาด 10x15 เซนติเมตร) ที่ผสมเอทิลเดียมโบรไมด์ 7

ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 100 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ 0.5xTBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง และเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb ladder ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGENE; Gene Genius Bio Imaging System) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยเปลี่ยนข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏให้อยู่ในระบบ binary matrix โดยให้ค่าเป็น + เมื่อมีแถบดีเอ็นเอ และเป็น - เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอบนตำแหน่งนั้น ๆ จากนั้นจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้โปรแกรม Phylip และสร้าง dendrogram เพื่อจัดกลุ่มด้วยวิธี Neighbour-joining

ผลการทดลองและวิจารณ์

การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เชื้อราที่แยกออกมาได้มีจำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลทจากพืช 35 ชนิด ได้แก่ ไม้ผล 12 ชนิด ไม้ดอกไม้ประดับ 17 ชนิด พืชไร่และวัชพืชอีก 6 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) สามารถจำแนกได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อรา *C. musae* จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า เชื้อรา *C. acutatum* จำนวน 3 ไอโซเลท แยกได้จากพริกขี้หนู สตรอเบอรี่ และแอปเปิล เชื้อรา *C. capsici* จำนวน 3 ไอโซเลท แยกได้จากเศรษฐีไซ่ง่อน แอปฟริกกันไวโอเล็ต และผักโขม ส่วน 33 ไอโซเลทที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า conidia ของ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. musae* เป็นแบบทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เหมือนกัน แต่ conidia ของ เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีขนาดสม่ำเสมอมากกว่าเมื่อเทียบกับ conidia ของ *C. musae* ที่มีขนาดเล็กบ้าง ใหญ่บ้าง นอกจากนี้ colony ของเชื้อรา *C. musae* จะบางกว่า และเจริญเร็วกว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* อีกทั้งรูปร่าง appressorium ของเชื้อรา *C. musae* เป็นแบบไม่สม่ำเสมอ (irregular) ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides*

เป็นแบบกระบอง (clavate) ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* นั้น conidia รูปร่างแบบหัวท้ายแหลม (fusiform) และ colony ละเอียดคล้ายกำมะหยี่สีเทา ไม่สร้าง setae และ sclerotia มี appressorium แบบกระบอง (clavate) และเชื้อรา *C. capsici* มี conidia รูปร่างโค้งเป็นวงเสี้ยว พระจันทร์และหัวท้ายแหลม (falcate) มี appressorium แบบกระบอง (clavate) ส่วน colony ค่อนข้างหยาบ มีการสร้าง setae จำนวนมากและขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1)

จากผลการจัดจำแนกสปีชีส์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพัชรา (2543) ศรีบุญญา (2544) และเฮอร์ (2544) แต่เชื้อที่แยกได้จากกล้วยของรายงานทั้ง 3 ฉบับนี้ ถูกจัดจำแนกให้เป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้จำแนกได้เป็นเชื้อรา *C. musae* เนื่องจาก colony ของเชื้อราเจริญเร็วและรูปร่าง appressorium เป็นแบบ ไม่สม่ำเสมอ (irregular) สอดคล้องกับรายงานของ Sutton (1980) ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ เป็นเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรกคโนสได้เหมือนกัน แต่ยังเป็นข้อถกเถียงในการแยกความแตกต่างระหว่าง 2 เชื้อ ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (เฮอร์, 2544) สำหรับเชื้อรา *C. capsici* ที่แยกได้จากผักโขมหัดนั้น มีรายงานของพัฒนาและคณะ (2534) ที่จัดจำแนกให้เป็นเชื้อรา *C. truncatum* ซึ่งตามรายงานของ Sutton (1992) กล่าวถึงความแตกต่างระหว่างของทั้ง 2 เชื้อนี้ไว้ว่า เชื้อรา *C. capsici* ไม่สร้าง sclerotia แต่เชื้อรา *C. truncatum* สร้าง sclerotia ลักษณะดังกล่าวนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีสภาพแวดล้อมต่างกัน และในการศึกษาครั้งนี้เชื้อราไม่สร้าง sclerotia ดังนั้นจึงจัดจำแนกให้เป็นเชื้อรา *C. capsici*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

จากไพรเมอร์ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ 6 ชนิด ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อราออกมาได้ ได้แก่ (GCC)₅, (CA)₈CT, (CA)₉G, (GTG)₅, (GACA)₄ และ (GAC)₅ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 161 แถบ (ภาพที่ 2) และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโปรแกรม

Phylyp และจัดกลุ่มด้วยวิธี Neighbour-joining พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และแบ่งกลุ่มใหญ่ได้เป็น 12 กลุ่มย่อย (ภาพที่ 3)

จาก dendrogram ที่ได้ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้จำนวน 4 กลุ่มใหญ่ และ 12 กลุ่มย่อย โดยแยกกลุ่มเชื้อราตามสปีชีส์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยกลุ่มย่อยที่ 3 เป็นเชื้อรา *C. musae* กลุ่มย่อยที่ 4 เป็นเชื้อรา *C. acutatum* กลุ่มย่อยที่ 5 เป็นเชื้อรา *C. capsici* และกลุ่มย่อยที่เหลือเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการจัดจำแนกของพืชแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ส่วนใหญ่สามารถแยกออกจากเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้อย่างชัดเจน แต่มีบาง ไอโซเลทที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. musae* จากกล้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์นี้ และมีอีก 3 ไอโซเลทคือ เชื้อราจากน้อยหน่า ชมพูทับทิมจันทร์ และฝรั่ง ที่แยกออกมาจากกลุ่มใหญ่ รวมแล้วสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เป็น 10 กลุ่มย่อย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก เชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็น species complex ซึ่งมีความผันแปรภายในสปีชีส์ค่อนข้างสูง และสามารถจัดแบ่งเชื้อรานี้ ออกได้เป็น 6 form species (Freeman *et al.*, 1998) นอกจากนี้ Sutton (1992) ยังตั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* var. *minus* Simmonds เป็นสปีชีส์ใหม่ ในจำนวนทั้งหมด 39 สปีชีส์อีกด้วย และมีรายงานอีกหลายฉบับที่พบว่ามีความซับซ้อนค่อนข้างสูงภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากเทคนิค ISSR นี้ เช่น Freeman and Shabi (1996), Ureña-Padilla *et al.* (2002) และ Abang *et al.* (2006) เป็นต้น

สรุป

ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนก สปีชีส์ได้ทั้งหมด 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* และ *C. capsici* เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากเทคนิค ISSR ด้วยโปรแกรม Phylyp พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

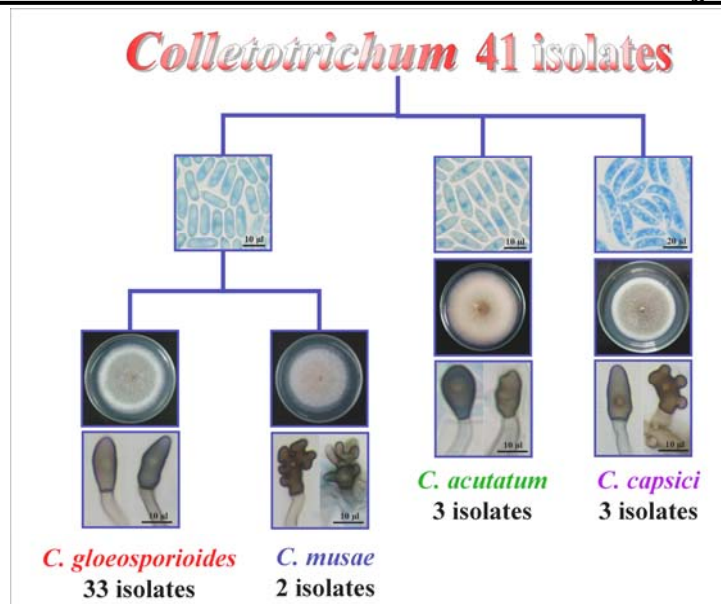


Figure 1 Identification of *Colletotrichum* spp. 41 isolates based on morphological characteristic.

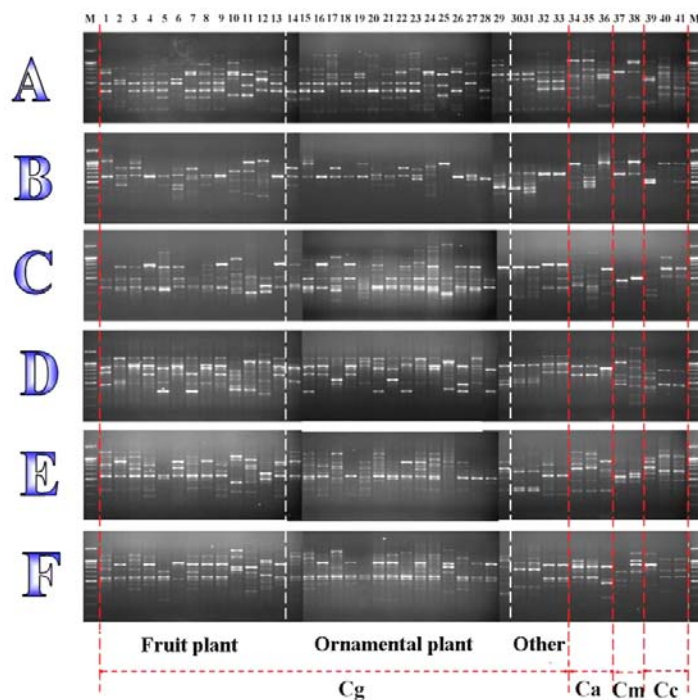


Figure 2 DNA fingerprinting of *Colletotrichum* spp. 41 isolates by 6 ISSR primer; A. (GCC)₅ primer, B. (CA)₈CT primer, C. (CA)₈G primer, D. (GACA)₄ primer, E. (GTG)₅ primer and F. (GAC)₅ primer. Cg = *C. gloeosporioides*, Ca = *C. acutatum*, Cm = *C. musae* และ Cc = *C. capsici*

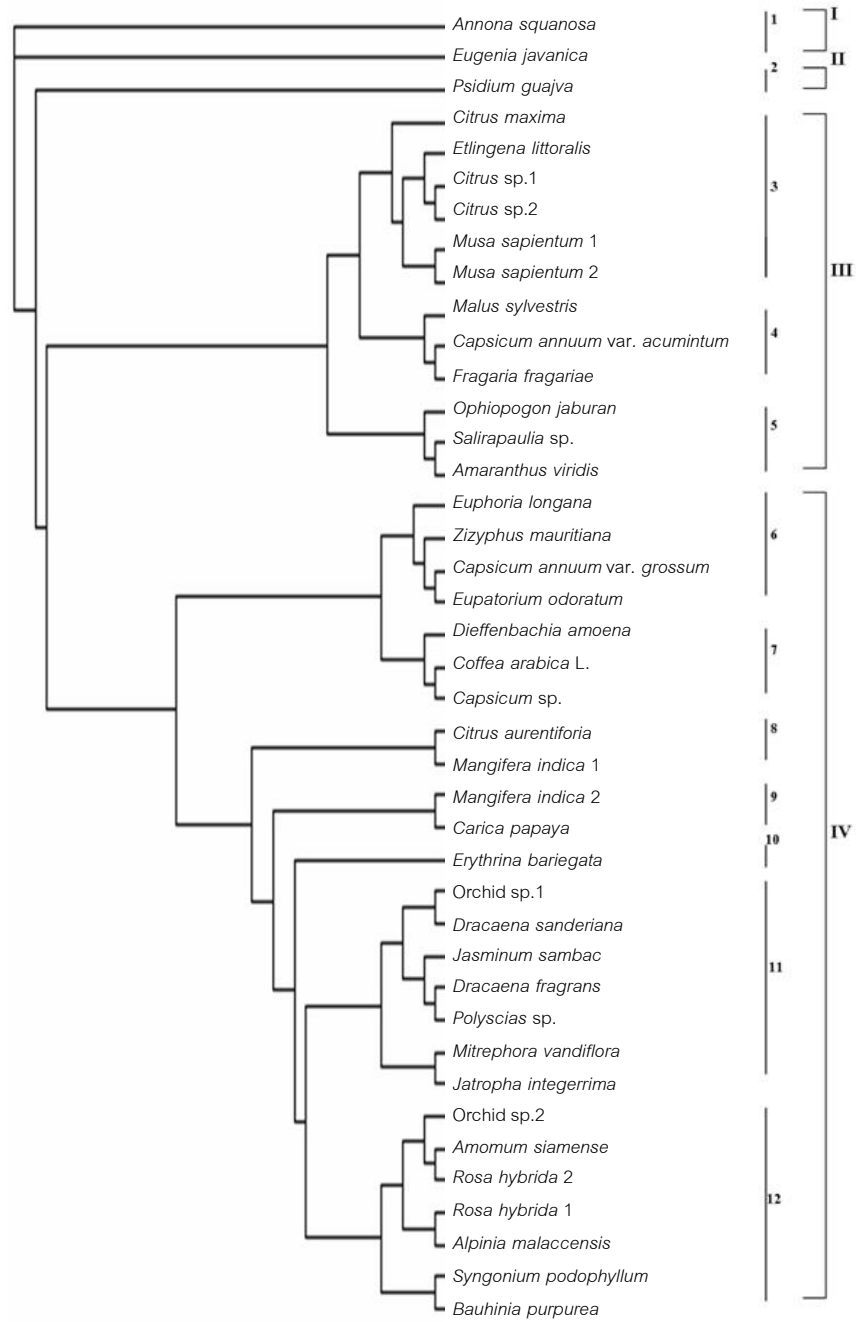


Figure 3 Dendrogram of *Colletotrichum* spp. 41 isolates were analysed by Phylip.

กลุ่มของเชื้อรา *C. acutatum* กลุ่มของเชื้อรา *C. capsici* กลุ่มของเชื้อรา *C. musae* และที่เหลือเป็นกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยพบว่ากลุ่มของเชื้อรา *C. musae* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* และผลการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นในการศึกษครั้งนี้ พอสรุปได้ว่าการอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้เทคนิค ISSR สามารถช่วยให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนของประชากรเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ได้ถูกต้องและแน่นอนมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ มีความแตกต่างกันสูงมากจนเกินไป อาจทำให้การแปรข้อมูลผิดพลาดได้ ดังนั้นการใช้เทคนิค ISSR ให้เกิดประสิทธิภาพมากขึ้น จึงควรทดสอบกับตัวอย่างที่ค่อนข้างมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง หรืออาจเป็นเชื้อที่แยกได้จากพืชอาศัยเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น หากต้องการทดสอบกับตัวอย่างที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ควรใช้เทคนิคที่ได้แถบดีเอ็นเอออกมาไม่มากนัก ทำให้ง่ายต่อการแปลผล นอกจากนี้ควรใช้เทคนิคอื่น ๆ เช่น การหาลำดับเบส หรือ PCR-RFLP มาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเทคนิค ISSR นั้น สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ของเชื้อได้เพียงอย่างเดียว แต่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราออกมาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2535. โรคผลเน่าของมะม่วงและวิธีการควบคุมโรค. เคหะการเกษตร 16: 72-75.
พัชรา โพธิ์งาม. 2543. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแนวโน้มในการเข้าทำลายพืชอาศัยอื่นและการสืบพันธุ์แบบใช้เพศของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จากไม้ผล. รายงานวิจัยฉบับ

สมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 24 หน้า.

พัฒนา สนิธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และวิรัช ชูบำรุง. 2534. รายงานโรคพืชเกิดจากเชื้อรา ชุดที่ 2. วารสารโรคพืช 11(3-4): 65-72.

วิชัย โฉมรัตน์. 2541. ดีเอ็นเอเครื่องหมายและลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับงานวิจัยด้านโรคพืช. หน้า 1-4. ใน: เอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอนุชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 เรื่อง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช 12-13 พฤษภาคม 2541. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ศรัญญา ลิ้มไขแสง. 2544. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นิวคลีอไทด์สเปเซอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

อรวรรณ ชลวานิชย์. 2547. การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เอมอร พงศ์สารรักษ์. 2544. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดโดยเทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Abang, M. M., R. Asiedu, P. Hoffmann, G. A. Wolf, H. D. Mignouna and S. Winter. 2006. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Phytopathology* 154: 51-61.

Bailey, J. A., and M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford.

- Cano, J., J. Guarro and J. Gene. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42(6): 2450-2454.
- Freeman, S. and E. Shabi. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 395-404.
- Freeman, S., T. Katan and E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease* 82(6): 596-605.
- Smith, B. J. and L. L. Black. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 pp.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1-26. In: J. A. Bailey and M. J. Jeger, (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford.
- Ureña-Padilla, A. R., S. J. MacKenzie, B. W. Brown and D. E. Legard. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92: 1245-1252.
-