



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรค
พืชเศรษฐกิจในภาคเหนือของประเทศไทยในระดับโมเลกุล

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์
ภาควิชาโรคพืช คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พฤศจิกายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ
ในภาคเหนือของประเทศไทยในระดับโมเลกุล

Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* Species Causing
Diseases on Economic Plants in Northern Thailand

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตณันต์

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่ของสำนักงานฯ ตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยให้การสนับสนุน และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาของงานวิจัย

ขอขอบคุณกองทุนมูลนิธิอิชิตาชิ แห่งประเทศญี่ปุ่น ที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือต่างๆ และเงินทุนสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัยมาได้อย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. สายสมร ล้ายอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้ที่สนับสนุนโดยเป็นนักวิจัยที่ปรึกษาให้กับโครงการวิจัย และ Prof. Dr. Susumu Takamatsu แห่งมหาวิทยาลัยมิเอะ ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการทำวิจัยให้การสนับสนุนด้านสารเคมีต่างๆ อีกทั้งยังสนับสนุนในการไปเผยแพร่ผลงานในที่ประชุมนานาชาติๆ และในด้านการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยดีมาตลอด ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานด้านโรคพิษ และการเกษตรของไทยต่อไปในอนาคต



ผศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/47/2542
ชื่อโครงการ: การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ
ในภาคเหนือของประเทศไทยในระดับโมเลกุล
ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตณันต์
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
E-mail Address: agppi006@chiangmai.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2542 – พฤศจิกายน 2547

จากการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพืชเศรษฐกิจในเขตภาคเหนือของไทย 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 ข้าวฟาง ทับทิม มะนาว และส้ม เป็นต้น ส่วนเชื้อราที่สร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นพบเพียงไอโซเลทเดียวคือเชื้อราที่แยกได้จากมะนาว 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 bicolor*, *Citrus reticulata*, *Codiaeum variegatum*, *Diospyros kaki*, *Euphoria longana*, *Limonium* sp., *Lycopersicon*

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 พบว่าเชื้อราที่นำมาทดสอบสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นัลทรานสคริปต์เพเซอร์นี้ 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 ไอโซเลตที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ คือ สตรอเบอร์รี่ 1, สตรอเบอร์รี่ 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 *EcoRI/MseI* เป็น adapter และใช้ *EcoRI-A/MseI-C* เป็น primer ในการทำ PCR ครั้งที่หนึ่ง และใช้ *EcoRI-A/MseI-CAG*, *EcoRI-A/MseI-CAC*, *EcoRI-A/MseI-CAT*, และ *EcoRI-AC/MseI-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 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอร์รี่ 1 และสตรอเบอร์รี่ 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 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จาก

สั้ม 1 และสั้ม 2 โดยที่ผลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ยังพบว่า เชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดเดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟและข้าวฟ่างที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันแต่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าเทคนิค AFLP มีประโยชน์ในการใช้จัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งจัดเป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่และมีความซับซ้อนมากได้ถึงระดับสายพันธุ์ (strains)

คำหลัก: *Colletotrichum* spp., ribosomal DNA (rDNA), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Phyllogeny

Abstract

Project Code: PDF/47/2542

Project Title: Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* Species Causing Diseases on Economic Plants in Northern Thailand

Investigator: Assistant Professor Dr. Chaiwat To-anun
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University

E-mail Address: agppi006@chiangmai.ac.th

Project Period: 1999 – November 2004

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 *EcoRI/MseI* as adapter, *EcoRI-A/MseI-C* as the primers for the 1st PCR and *EcoRI-A/MseI-CAG*, *EcoRI-A/MseI-CAC*, *EcoRI-A/MseI-CAT* and *EcoRI-AC/MseI-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.

Keywords: *Colletotrichum* spp., ribosomal DNA (rDNA), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Phyllogeny

สารบัญ

	หน้า
1. ชื่อโครงการ	1
2. ผู้ดำเนินการวิจัย	1
3. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
4. วัตถุประสงค์ของการศึกษา	16
5. ระเบียบวิธีวิจัย	17
6. ผลการวิจัย	31
7. อภิปรายผลการทดลอง	74
8. สรุปผลการทดลอง	81
9. เอกสารอ้างอิง	83
ภาคผนวก	97
ผลที่ได้รับจากโครงการ ฯ	122

เอกสารสรุปผลงาน

1. ชื่อโครงการ: การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจในภาคเหนือของประเทศไทยในระดับโมเลกุล
2. ผู้ดำเนินการวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตณันต์
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย:

เชื้อราใน Genus *Colletotrichum* พบแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนและกึ่งร้อน ประกอบด้วยกลุ่มของเชื้อราที่ดำรงชีวิตแบบ saprophytes และ parasite (Agrios, 1997) จัดเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญอย่างยิ่งชนิดหนึ่งทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นเชื้อราสาเหตุของโรค anthracnose ของพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เงาะ มะม่วง มะละกอ ขนุน กล้วย องุ่น สตรอเบอร์รี่ และฝรั่ง ฯลฯ สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญ ตั้งแต่ระยะก่อนออกดอก จนถึงหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในไร่ และในโรงเก็บ ส่งผลให้ผลผลิตของพืชเศรษฐกิจเหล่านี้มีปริมาณและคุณภาพลดลง และไม่เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ จัดเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งในการส่งออกของผลไม้ไทย (วิชัย, 2540)

การจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ ทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์ (conidia) การมีหรือไม่มี setae การสร้างส่วนขยายพันธุ์ (sclerotia) ที่ทนต่อสภาพแวดล้อม และลักษณะรูปร่างของ appressoria เป็นต้น โดยสามารถจัดเชื้อรา *Colletotrichum* ไว้ใน Order Melanconiales ซึ่งมีอยู่ Family เดียวคือ Melanconiaceae (Sutton, 1992) อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ยังคงมีความสับสน ทั้งในระยที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่จัดอยู่ใน Genus *Glomerella* และในระยที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งจัดอยู่ใน Genus *Colletotrichum* โดยพบว่ามีความหลากหลายมากถึง 900 species ที่มีผู้รายงาน และอธิบายว่าอยู่ใน *Colletotrichum* นี้ (Sutton, 1992)

จากการศึกษาในการเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อรา *Colletotrichum* พบว่าเชื้อรานี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อการเข้าทำลายพืชอาศัย กล่าวคือเชื้อราแต่ละ species จะเข้าทำลายพืชอาศัยแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไป ในขณะที่เดียวกันพบว่าพืชอาศัยหนึ่ง ๆ อาจถูกเชื้อรามากกว่าหนึ่ง species เข้าทำลาย (Sutton, 1992) โดยเฉพาะในประเทศไทยมีรายงานว่าพบพืชอาศัยของเชื้อราดังกล่าวจำนวนมาก เช่น มะม่วง มะละกอ ขนุน พุริณ เงาะ ชมพู ฝรั่ง กล้วย พุทรา สตรอเบอร์รี่ พริกไทย

หอม กระเทียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ฝ้าย ปอ ยางพารา และอ้อย ฯลฯ (นิพนธ์, 2535; เอียน, 2536; Sontirat และคณะ, 1994) โดยที่พืชอาศัยต่างๆ เหล่านี้หลายชนิดเป็นพืชท้องถิ่นที่พบเฉพาะในประเทศไทยเขตร้อนเท่านั้น เช่น ฝรั่ง เงาะ ทุเรียน พุทรา มังคุด มะละกอ ชมพู ฯลฯ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูง ที่ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ในประเทศไทยน่าจะมี ความหลากหลายของสายพันธุ์มากกว่าในประเทศแถบอื่นๆ ของโลก ซึ่งความหลากหลายของสายพันธุ์ดังกล่าว จะผลกระทบต่อ การวางแผนป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มนี้มากยิ่งขึ้น

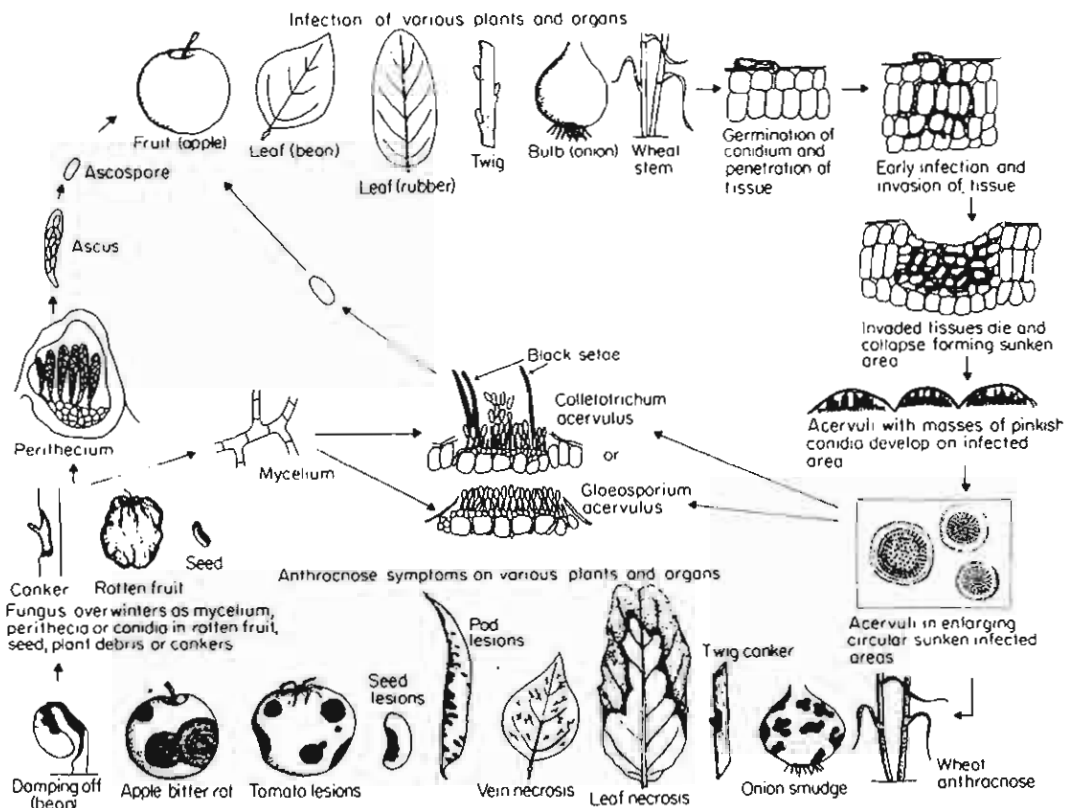
เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum* จัดเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจดังกล่าว จึงมีผู้ให้ความสำคัญศึกษาโดยใช้เป็นแบบ (model system) เพื่อศึกษาขบวนการในการเข้าทำลายพืชอาศัย การกระตุ้นให้พืชสร้างสาร phytoalexins และกลไกในการต้านทานต่อโรคในพืช อีกทั้งยังมีส่วนนำเชื้อมาใช้เป็นสิ่งทดลองในการศึกษาทางด้านชีวเคมี ตลอดจนขบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระดับชีวโมเลกุลอย่างกว้างขวาง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นสมควรเป็นอย่างยิ่งที่จะได้มีการสำรวจ เก็บรวบรวม และจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ในระดับโมเลกุล เพื่อนำมาใช้เป็นสิ่งทดลองในการศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราดังกล่าว เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงวิวัฒนาการ และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรานี้เป็นไปอย่างถูกต้อง ซึ่งใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบการแพร่กระจาย และการปนเปื้อนของเชื้อราที่ติดไปกับผลผลิตทางการเกษตรให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อันจะส่งผลให้การป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นไปอย่างได้ผล อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อราในกลุ่มนี้เป็นอย่างดียิ่งด้วย หากนักวิจัยดังกล่าวทราบถึงข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อราในกลุ่มนี้อย่างถ่องแท้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Colletotrichum*

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* นั้นมีรายงานว่ามีการจัดจำแนกอยู่ใน Sub-division Deuteromycotina, Class Deuteromycetes, Order Melanconiales, Family Melanconiaceae, Genus *Colletotrichum* (Agrios, 1997) โดยเชื้อรา *Colletotrichum* นี้มีลักษณะทั่วไปคือสร้างเส้นใย (mycelium) เจริญดีมีการแตกกิ่งก้าน และมีผนังกัน สีของเส้นใยมีตั้งแต่ไม่มีสีจนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีการสร้าง fruiting body เพื่อให้กำเนิด conidia ที่เรียกว่า conidiomata แบบ acervulus ซึ่งมีสีอ่อนถึงสีน้ำตาล โดย acervulus จะสร้างที่ผิวพืชตรงชั้นของ subcuticle, epidermal, subepidermal หรือ peridermal ของพืช โดยอาจสร้างขึ้นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่มีสีถึงสีน้ำตาลมีผนังกัน ผิวเรียบ แตกกิ่งก้านเฉพาะเซลล์ฐาน โดยที่ conidiophore เกิดจากเซลล์บนสุดของ conidiomata, conidia จะเกิดโดยผนังชั้นในของ conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง จึงเรียกเซลล์นี้ว่า enteroblastic

conidiogenous cell โดย conidiogenous cell ที่สร้างจะมีลักษณะใสไม่มีสี ผนังเรียบ รูปทรงกระบอก ลักษณะของ conidia คือมีเซลล์เดียว ไม่มีสี ไม่มีผนังกัน (ยกเว้นขณะ germination) ลักษณะตรง หรือโค้งงอ มีรูปร่างหลายแบบ appressoria มีสีน้ำตาล ผิวเรียบหรือขรุขระ อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือสร้างหลายอันต่อกัน เมื่อนำเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบางครั้งพบว่าการสร้าง sclerotia สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำเป็นกลุ่มอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจสร้าง setae ใน conidiomata หรือ sclerotia โดย setae ดังกล่าวมีสีน้ำตาล มีผนังกัน ผิวเรียบ บริเวณโคนโป่งออกปลายแหลม ลักษณะที่มี setae เรียกว่า setose การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในสกุลนี้จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* ใน Class Ascomycetes โดยมีวงจรของโรคดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วงจรโรค anthracnose ที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* และ *Colletotrichum* หรือ *Gloeosporium* sp. (Agrios, 1997)

สำหรับประวัติการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* นั้นมีรายงานครั้งแรกโดย Tode ในปี ค.ศ. 1790 ซึ่งในขณะนั้นได้จัดจำแนกไว้ในสกุล *Vermicularia* ต่อมาได้มีการปรับเปลี่ยนชื่ออยู่หลายครั้ง จนในที่สุดจึงแยกออกมาเป็นสกุล *Colletotrichum* โดย Fries ในปี ค.ศ. 1821 (Sutton, 1992) สำหรับการจดจำแนกเชื้อรานี้ในระดับสปีชีส์ ในระยะแรกพบที่มีการจัดจำแนกโดยใช้พืชอาศัยทำให้

มีรายงานการจำแนก species ของเชื้อรา *Colletotrichum* ไว้มากถึง 900 species ต่อมาพบว่าหลักเกณฑ์ดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนก เนื่องจากไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อรารายใน genus ได้ (Sutton, 1992) จึงได้มีความพยายามหาหลักเกณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกใหม่ เช่น Von Arx ในปี ค.ศ. 1957 ได้รายงานการจัดจำแนกเชื้อราไว้ 23 species (ต่อมาเพิ่มเป็น 25 species) Farr และคณะในปี ค.ศ. 1989 ทำการจัดจำแนกได้ 49 species เป็นต้น อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดจึงทำให้ไม่ได้รับการยอมรับเท่าที่ควร โดยการจัดจำแนกที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดคือการจัดจำแนกของ Sutton (1992) ซึ่งจัดจำแนกโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อรานี้ได้เป็น 39 species ดังนี้ คือ *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. caricae*, *C. caudatum*, *C. circinans*, *C. coccodes*, *C. coffeanum*, *C. corchori*, *C. crassipes*, *C. curvatum*, *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. falcatum*, *C. fragariae*, *C. fusarioides*, *C. fuscum*, *C. gloeosporioides*, *C. gloeosporioides* var *minor*, *C. gnaphalii*, *C. graminicola*, *C. helichrysi*, *C. higginsianum*, *C. liliacearum*, *C. lindemuthianum*, *C. linicola*, *C. malvarum*, *C. musae*, *C. nigrum*, *C. nymphaeae*, *C. orbiculare*, *C. paludosum*, *C. phyllachoroides*, *C. psoraleae*, *C. spinaciae*, *C. sublineolum*, *C. trichellum*, *C. trifolii*, *C. truncatum* และ *C. typhae* เป็นต้น อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกดังกล่าวยังไม่จำเป็นว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุด อีกทั้งสภาพแวดล้อมยังมีผลต่อการแสดงออกของ gene ซึ่งควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ทำให้ลักษณะดังกล่าวมีการแสดงออกผิดไปจากเดิม ก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกยิ่งขึ้น (Freeman และคณะ, 1993)

จากข้อจำกัดในการจัดจำแนกข้างต้น ประกอบกับเชื้อรา *Colletotrichum* นับเป็นเชื้อราที่มีพืชอาศัยมากมายหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชอาศัยชนิดหนึ่งๆ อาจถูกเชื้อราเข้าทำลายได้หลาย species อีกด้วย (Bailey และคณะ, 1996) ทำให้ยากต่อการจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุและมีผลต่อเนื่องถึงการวางแผนป้องกันกำจัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งมีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อราในกลุ่มนี้ในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง ส้ม มังคุด กล้วย องุ่น มะละกอ น้อยหน่า ลิ้นจี่ ฝรั่ง ขนุน พุทรา ขิง พริกไทย ขมิ้น (นิพนธ์, 2535; Sontirat และคณะ, 1994) เป็นต้น จึงนับว่าไทยเป็นแหล่งที่มีความผันแปรของเชื้อรา *Colletotrichum* สูงมากแห่งหนึ่ง โดยพืชอาศัยบางชนิดไม่พบในส่วนอื่นๆ ของโลก ดังนั้นการหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เช่น การนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยา มาศึกษาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อช่วยในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราในกลุ่มนี้ จึงน่าจะเป็นประโยชน์ และนำไปสู่การวางแผนป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มนี้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อรา

Phylogeny หมายถึงความสัมพันธ์ และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิต หรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เป็นเพียงการประเมิน (estimate) โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme หรือ restriction sites หรือ DNA sequence โดยนำมาเปรียบเทียบ และหาความสัมพันธ์ภายใน หรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สำหรับในเชื้อรา นั้น เทคนิคทางอณูชีววิทยามีส่วนช่วยให้การศึกษาเกี่ยวกับ phylogeny ของเชื้อราดังกล่าวได้สะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเป็นเครื่องมือในการศึกษา (Takamatsu, 1998) แต่การนำเอนไซม์ และโปรตีนมาใช้ในการศึกษาพบว่า มีข้อจำกัดมากเนื่องจากเอนไซม์ และโปรตีนเป็นผลจากการแสดงกิจกรรมของยีน ซึ่งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้รับมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง จึงนิยมทำการศึกษาหรือตรวจสอบที่ลำดับของดีเอ็นเอโดยตรง

Phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากลำดับเบสของยีนหนึ่งๆ สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์ และสามารถตอบคำถามเกี่ยวกับระยะเวลาที่เกิดการวิวัฒนาการ และปัญหาทางนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นได้ (Page และ Holmes, 1996) โดย phylogenetic distance ระหว่างสิ่งมีชีวิตสามารถคำนวณได้จากจำนวนการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นในยีน ซึ่งมีรหัสในการสร้างโปรตีน หรือ ribonucleic acid (RNA) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะปรากฏในลำดับนิวคลีโอไทด์ (ลำดับเบส) ของยีน (Watson และคณะ, 1987)

การศึกษาด้านอณูชีววิทยา

ในปัจจุบันวิทยาการด้านอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษา และวินิจฉัยโรคพืชอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้มากขึ้นเป็นลำดับ อาทิ เช่น มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ตลอดจนพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโครงสร้างประชากรของเชื้อสาเหตุมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวางแผน และการควบคุมโรคที่เหมาะสม รวมทั้งการกักกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเทคนิคด้านอณูชีววิทยาที่นิยมนำมาใช้ในงานด้านการศึกษาและวินิจฉัยโรคพืชคือ "ดีเอ็นเอเครื่องหมาย"

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ถือเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้หาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำและชัดเจน เนื่องจากการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับพันธุกรรมซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ทำให้สามารถตรวจสอบบรรพบุรุษร่วมได้ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในชื่อที่รู้จักกันว่า

"ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) โดยเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้อย่างมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) การระบาดวิทยา (epidemiology) ของเชื้อรา (Weising และคณะ, 1995) ดีเอ็นเอเครื่องหมายถูกนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างดังนี้

1. การเพิ่ม หรือสูญเสียไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่
2. เกิดการแทรกเข้ามาหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะจดจำหรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่
3. จำนวนของดีเอ็นเอที่มีความซ้ำซ้อนต่อเนื่องแตกต่างกัน ตรงบริเวณระหว่างตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่
4. การเรียงลำดับเบสบนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการของ Polymerase Chain Reaction (PCR) เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Simple Sequence Repeat (SSR) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Weising และคณะ, 1995) เป็นต้น โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายต่าง ๆ มีหลักการพอสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. Simple Sequence Repeat (SSR)

SSR เป็น oligonucleotide ที่ประกอบด้วย simple sequence repeat ซึ่งเป็นลำดับเบสสั้น ๆ ที่มี nucleotide ซ้ำ ๆ กันประมาณ 2, 3, 4 และ 5 nucleotide เช่น (CA)_n (n=10-60) พบกระจายทั่วไปบน eukaryotic genome และใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยนำมาใช้เป็น probe และ primer ใน hybridization fingerprinting และ RCR fingerprinting ตามลำดับ (Weising และคณะ, 1995)

2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม ได้แก่ Williams และคณะ (1990) และ Welsh และ McClelland (1990) โดยใช้ random primer (arbitrary primer) เพียงชนิดเดียวเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใด ๆ

primer ที่ใช้มีขนาดสั้นกว่าปกติ คือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ในกรณีที่จีโนมมีการเรียงตัวของเบสซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ primer หลายบริเวณที่อยู่ใกล้กันมากๆ หรือมีทิศทางเดียวกันแม้จะมี primer เข้าไปจับก็จะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้า primer เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กัน และมีทิศทางเข้าหากัน จะทำให้เกิดผลผลิตของ PCR เมื่อนำผลผลิตของ PCR ดังกล่าวมาแยกโดย electrophoresis ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Weising และคณะ, 1995)

3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

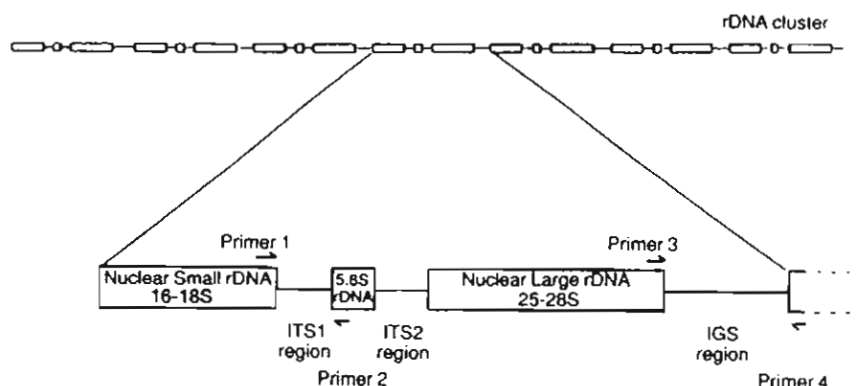
RFLP เป็นวิธีการศึกษาในระดับอนุชีววิทยา โดยทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสแบบจำเพาะ โดยจะตัดในตำแหน่งจดจำ (recognition site) เท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอในบริเวณตัดจำเพาะถูกตัดออกจะทำให้ได้ชิ้นของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน และหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสในบริเวณจุดตัดจำเพาะเกิดขึ้น ไม่ว่าด้วยสาเหตุใดๆ จะส่งผลทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดและรูปแบบเปลี่ยนไป (Weising และคณะ, 1995)

4. DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion, transition, silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide bias โดยที่ผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ หรือจาก nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น National Center for Biotechnology Information (GenBank), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) และ DNA Database of Japan (DDBJ) (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราหลายๆ ชนิดซึ่งเป็นการศึกษาหรือตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอโดยตรง ที่ให้ผลการตรวจสอบหรือการศึกษาใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

Nuclear rRNA genes (rDNA): ลำดับเบสของ nuclear rRNA genes ใช้ในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่พบโดยทั่วไป

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและมีบทบาทสำคัญในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน rDNA อาจเป็นผลที่เกิดจากการเกิดการวิวัฒนาการของจีโนมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต (Edel, 1997) กลุ่มของ rDNA พบได้ใน nuclei และ mitochondria ประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable สำหรับ nuclear rRNA genes ของเชื้อรา มีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงซ้ำๆ ต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งในส่วนของ subunits นี้ได้มีการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ Orders และ Kindoms ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes (Duncan และคณะ, 1998) และลำดับเบสส่วนที่มีความผันแปรคือ ตำแหน่ง spacer region ซึ่งส่วนที่อยู่ระหว่าง subunits จะเรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) และที่อยู่ระหว่างกลุ่มยีน (gene clusters) จะเรียกว่า Intergenic Spacer (IGS) (ภาพที่ 2) ซึ่งใน ส่วน spacers เหล่านี้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ genera และ sub-species ได้ (Duncan และคณะ, 1998)



ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงหน่วยของ rDNA repeat units โดย ITS คือ Internal Transcribed Spacer และ IGS คือ Intergenic Spacer (Mills และคณะ, 1992)

ปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลลำดับเบสของ rDNA ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิดเช่น *Neurospora* (Taylor และคณะ, 1991 อ้างโดย Bruns และคณะ, 1991), *Fusarium* (Waalwijk และคณะ, 1996), Powdery Mildew (Takamatsu และคณะ, 1999) รวมทั้งเชื้อรา *Colletotrichum* (Freeman และคณะ, 2000) โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณของ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส และเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree และนอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunits และได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ (Bridge และ Arora, 1998)

และ/หรือ ระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ (Hirata และ Takamatsu, 1996; White และคณะ, 1990; Peterson, 1991)

Internal Transcribed Spacer หรือ ITS region (Bridge และ Arora, 1998): ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะพบอยู่ในหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของ rRNA (ภาพที่ 2) โดยพบอยู่ระหว่าง highly conserved small subunit rRNA gene, 5.8S subunit rRNA gene และ large subunit rRNA gene พบว่ามีการนำเอาลำดับเบสในบริเวณ ITS มาทำการเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิดเนื่องจาก

1. มีขนาดเล็ก (500–800 bp) ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ (amplified) ได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer เพียงชุดเดียวก็สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ตรงตำแหน่ง ITS และตำแหน่งที่เป็น conserved regions ของ rRNA subunits gene เพื่อนำมาหาลำดับเบสได้

2. มีอยู่หลายร้อยชุดในหนึ่งเซลล์ ทำให้ง่ายในการเพิ่มปริมาณ โดยที่แม้จะมีตัวอย่าง DNA จำนวนน้อย หรือมีตัวอย่างเซลล์ที่จะนำมาสกัด DNA น้อย ก็ยังสามารถนำมาศึกษาได้

3. ลำดับเบสของ gene ตรงตำแหน่ง ITS ของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ หรือต่างสปีชีส์กัน จะมีความผันแปรที่สูง หรือมากพอที่จะสามารถใช้ในการคาดเดา (estimate) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจัดแบ่งกลุ่ม รวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้

4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็ว โดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจากตำแหน่ง ITS นี้เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน และต่างกันในช่วงสปีชีส์ของเชื้อรา

การวิเคราะห์ลำดับเบสบน ribosomal DNA (rDNA) ในเชื้อรามีจุดประสงค์ที่สำคัญดังนี้ คือ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา และนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่นๆ ต่อไป

5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดของ genome ไม่ใหญ่ และซับซ้อนมากนัก จนถึงสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความซับซ้อนของ genome สูง เช่น สัตว์ พืช มนุษย์ โดยไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับเบสของ nucleotide มาก่อน (สุรศักดิ์, 2540) AFLP เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos ในปี 1993 เป็นการผสมผสานระหว่างเทคนิค RFLP และ RAPD ซึ่ง polymorphism ที่ได้จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับการเรียงตัวของเบสบริเวณที่ถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ และ additional base

เหมือนกับ RFLP และทำการตรวจสอบผลที่ได้ด้วย PCR เช่นเดียวกับ RAPD ความยาวและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ตลอดจน condition ที่เหมาะสมของ PCR ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ โดยขั้นตอนในการทำ AFLP มี 3 ขั้นตอน (Vos และคณะ, 1995)

1. ทำการตัด genomic DNA ด้วย restriction enzyme และต่อขึ้นดีเอ็นเอด้วย adapter
2. เลือก amplified ดีเอ็นเอบางชิ้นอย่างจำเพาะเจาะจงโดยใช้ primer ที่มี selection nucleotide เป็นตัวคัดเลือก
3. นำไปทำ electrophoresis วิเคราะห์ polymorphic band ที่เกิดขึ้น

Enzyme: การตัด genomic DNA ในเทคนิค AFLP นิยมใช้ restriction endonuclease 2 ชนิดในการตัดคือ ชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง (frequent cutter) และชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง (rare cutter) เนื่องจากการตัดด้วย enzyme สองชนิดจะให้ขึ้นดีเอ็นเอมากกว่าชนิดเดียว การใช้ enzyme ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 เนื่องจากการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง จะให้ขึ้นดีเอ็นเอที่มีจำนวนมาก และมีขนาดเล็กเหมาะที่จะนำไปตรวจแยกโดย polyacrylamide gel electrophoresis แต่ในกรณีที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอมากเกินไปอาจจะก่อให้เกิดความสับสนในการพิจารณาข้อมูล และอาจจะทำให้เกิด smear band ขึ้น จึงต้องใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่งเพื่อช่วยลดจำนวนขึ้นดีเอ็นเอให้ง่ายต่อการพิจารณาข้อมูล (Vos และคณะ, 1995)

Adapter: adapter ที่นำมาต่อกับขึ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดด้วย enzyme เป็น specific single-strand oligonucleotide adapter ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง เป็นเบสคู่สมกับการเรียงตัวของเบสในตำแหน่ง restriction site ของ enzyme ที่ใช้ตัด adapter จะถูกนำมาต่อกับขึ้นดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นตำแหน่งให้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงเข้ามาจับ การ design เบสที่จะนำมาใช้เป็น adapter จะมีความสัมพันธ์กับ condition reaction ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (Vos และคณะ, 1995)

Primer: การเลือก amplified เฉพาะบาง fragment ในเทคนิค AFLP ทำได้โดยใช้ primer ที่มี selection nucleotide เป็นตัวคัดเลือก Vos และคณะ (1995) ได้อธิบายส่วนประกอบของ AFLP-primer โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (ภาพที่ 3) คือ

	CORE	ENZ	EXT
EcoRI	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
MseI	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของ AFLP-primer

1. Core sequence (CORE): เป็นส่วนที่อยู่ทางด้าน 5'-end ของ primer เป็นตำแหน่งที่มีเบสคู่สมกับ adapter ทำให้ primer สามารถเข้าไปจับและทวีจำนวนอย่างจำเพาะเจาะจง
2. Enzyme specific sequence (ENZ): เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางของ primer เป็นตำแหน่งที่มีเบสคู่สมกับตำแหน่งตัดของ enzyme ที่ใช้ตัด genomic DNA
3. Selective extension (EXT): เป็นส่วนที่อยู่ทางด้าน 3'-end ของ primer เป็นตำแหน่งที่มีการเพิ่ม selection nucleotide เพื่อเลือก amplified เฉพาะดีเอ็นเอบางชิ้น การเลือกเพิ่ม nucleotide นิยมเพิ่ม 1-3 เบส ขึ้นอยู่กับขนาดของ genome ของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยการเติม nucleotide หนึ่งตัวจะสามารถลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ 4 เท่าตัว ในกรณีที่ตัวอย่างมี genome ขนาดเล็กมาก การเติม nucleotide เพียงหนึ่งตัวในแต่ละ primer ก็เพียงพอที่จะแสดงความแตกต่างได้ แต่ในกรณีที่ตัวอย่างมี genome ขนาดใหญ่อาจต้องเพิ่ม nucleotide ถึง 3 เบสในแต่ละ primer

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาสายสัมพันธ์เอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา, สัตว์ (Arthropode และ Vertebrates) และพืช มากขึ้นเป็นลำดับ (Mueller และ Wolfenbarger, 1999) เนื่องจากเหตุผลต่างๆ ดังนี้

1. AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรสูงได้ทั้งภายใน และระหว่างสปีชีส์ (inter- and intraspecific) (Majer และคณะ 1996)
2. AFLP เป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือ มีความผิดพลาดน้อย เมื่อทำการทดลองซ้ำจะพบว่ามี ความคลาดเคลื่อนเนื่องจาก mispriming และ scoring error น้อยกว่า 2% Jones และคณะในปี ค.ศ. 1997 (อ้างโดย Muller และ Wolfenbarger, 1999) ทำการทดลองซ้ำใน 8 ห้องปฏิบัติการ ในประเทศแถบยุโรป พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 172 แถบ ดังนั้น AFLP marker จึงเป็นเทคนิคที่มีความผิดพลาดเนื่องจากการทดลองคนละสถานที่ (Between-laboratory error) น้อยกว่า 0.6%
3. AFLP จัดเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างในปริมาณน้อยมาก ซึ่งจากการทดลองของ Rosendahl และ Taylor (1997) พบว่าสามารถใช้ดีเอ็นเอจากหนึ่ง spore ของ mycorrhizal (ซึ่งมีดีเอ็นเอประมาณ 0.1-0.5 ng) นำมาทำให้เกิดสายสัมพันธ์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP ได้ (อ้างโดย Mueller และ Wolfenbarger, 1999)
4. AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการทำน้อย เนื่องจากให้ polymorphic band มากในแต่ละการทดลอง

สำหรับความเหมาะสมในการเลือกใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น Weising และคณะ (1995) ได้เปรียบเทียบเทคนิคทางอนุชีววิทยาในการศึกษาสายพันธุ์เอ็นเอต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเหมาะสมของเทคนิคทางอนุชีววิทยาในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับต่างๆ (Weising และคณะ, 1995)

Technique	Genus	Genus/Species	Species
Sequence conserved genes	+	+/-	-
cpDNA (RFLP)	+	++	-(+)
rDNA (RFLP)	+/-	+	+
Sequencing variable sequence	+/-	+	+/-
Nuclear DNA (RFLP)	-	+	+
Allozymes	-	+	+
PCR-based fingerprinting	-	+/-	++
Hybridization-base fingerprinting	-	+/-	++

หมายเหตุ: ++ เหมาะสมที่สุด; + เหมาะสม; +/- เหมาะสมบางกรณี; - ไม่เหมาะสม

จากประสิทธิภาพของเทคนิคเอ็นเอเครื่องหมายดังที่ได้กล่าวมานี้ จึงทำให้มีผู้นำมาใช้ในงานด้านอนุกรมวิธานและจัดจำแนกเชื้อราอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะกับเชื้อราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน เช่น เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* นอกจากนั้นยังนำมาใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมโรค เช่น การวางแผนในการป้องกันกำจัด และการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน เป็นต้น (McDonald, 1997)

สำหรับการศึกษาในเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค DNA เครื่องหมายนั้นมีรายงานพอสรุปได้ดังนี้

Johnson และคณะ (1997) ทำการศึกษา *Colletotrichum* sp. สาเหตุของโรคแอนแทรก-โนสในต้น yellow water-lily (*Nuphar luteum* subsp. *polysepalum*) ในอเมริกา เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. nymphaeae* ที่แยกได้จาก *Nymphaea alba* และ *Nuphar luerum* ในประเทศแถบยุโรปโดยใช้เทคนิค RAPD เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อราที่เคยจัดจำแนกทั้งหมด จึงตั้งให้เป็นสปีชีส์ใหม่คือ *C. nupharicola* นอกจากนี้ Sicard และคณะ (1997) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. lindemuthianum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสใน *Phaseolus vulgaris* พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2

กลุ่มตามแหล่งกำเนิดคือ *Andean centre* และ *Mesoamerica centre* โดยทั้งสองกลุ่มจะมีความสามารถในการเข้าทำลายแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกัน

รายงานการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค RFLP เช่น Sreenivasaprasad และคณะ (1993) ศึกษา ribosomal DNA (rDNA) และ mitochondria DNA (mtDNA) ของเชื้อรา *C. kahawae* สาเหตุของโรค coffee berry diseases ในแอฟริกา และเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากกาแฟ, กล้วย, มะม่วงในหลายประเทศ โดยใช้เทคนิค RFLP พบว่าเชื้อรา *C. kahawae* จากกาแฟในแอฟริกา แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากกาแฟที่แยกได้ในประเทศอื่น แต่กลับแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. gloeosporioides* จากกล้วยในประเทศนิวซีแลนด์ คาดว่า *C. kahawae* จากกาแฟในแอฟริกา อาจเกิดจากเชื้อราซึ่งเดิมเข้าทำลายพืชอาศัยชนิดอื่น และต่อมา มีการปรับตัวจนกระทั่งเข้าทำลายกาแฟได้ในที่สุด ในขณะที่ Hondson และคณะ (1993) ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากกล้วย, มะละกอ และมะม่วง ที่แยกได้ในแหล่งต่างๆ ทั่วโลก จากการนำส่วน rDNA และ mtDNA มาทำ RFLP พบว่า เชื้อราจากพืชต่างชนิดกันจะมี rDNA และ mtDNA ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้ต่างกัน และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากขึ้นในเชื้อราที่เกิดมาจากพืชเดียวกันและที่มาจากแหล่งเดียวกัน ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอของ rDNA banding pattern เหมือนกัน และมี mtDNA banding pattern ที่คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกัน (genetically uniform) ทำให้คาดว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงทั้งหมดน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน (single source) ซึ่งต่อมาได้แพร่กระจายไปทั่วโลก

เทคนิค AFLP มีผู้นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ดังนี้ Folkestma และคณะ (1996) ใช้เทคนิค AFLP ตรวจสอบลักษณะประชากรของ potato cyst nematode พบว่าสามารถจำแนกได้ 987 marker loci โดยใช้ primer 12 คู่ Qi และคณะ (1999) ใช้เทคนิค AFLP ศึกษาแผนที่ gene ของข้าวบาร์เลย์สายพันธุ์ RIL ซึ่งมี gene QTL ด้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Puccinia hordei* isolates 1.2.1 พบว่า gene QTL3 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นกล้า และ gene QTL 5 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นโต จึงนำความรู้ที่ได้มาสร้างพืชต้านทานต่อโรค O'Neil และคณะ (1997) ใช้เทคนิค AFLP จำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในอัลฟัลฟา เนื่องจากไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เพราะมีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* พบว่า Arl-Nw และ 57RR คือ *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* ตามลำดับ และในปีเดียวกัน Gonzalez และคณะ (1997) ได้จำแนก *C. lindemuthianum* ในประเทศเม็กซิโก โดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP เปรียบเทียบกัน พบว่าเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพมากกว่า โดยเกิด polymorphic มากกว่าและสามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ดีกว่า เมื่อนำ

ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปหาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ พบว่าเชื้อที่เก็บมาจากพื้นที่เดียว และพืชอาศัยพันธุ์เดียวกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าที่เก็บมาจากต่างพื้นที่ หรือจากต่างพันธุ์

สำหรับรายงานการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้แก่ Sreenivasaprad และคณะ (1992) ศึกษาความผันแปรในการเรียงตัวของลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1 และความสัมพันธ์ระหว่าง เชื้อรา *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* และ *C. acutatum* โดยเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในสตรอเบอรี่ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีลักษณะ conidia และ appressorium คล้ายกัน แต่มีลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง setae และการเข้าทำลายพืชอาศัยต่างกัน เมื่อพิจารณาจากลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้คาดว่าลักษณะความแตกต่างที่พบในเชื้อราทั้งสองสปีชีส์ อาจเป็นเพียงลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์เท่านั้น จึงทำการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ในตำแหน่งที่ 1 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีการเรียงตัวต่างกันเพียง 3-7 เบส และเมื่อนำเชื้อราทั้งสองสปีชีส์ไปเปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. acutatum* พบว่ามีการเรียงตัวของเบสต่างออกไปถึง 36-37 เบส เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อรา *C. fragariae* น่าจะถูกจัดให้เป็นเพียง subspecies หนึ่งในสปีชีส์ *C. gloeosporioides* เท่านั้น ในขณะที่ Brown และคณะ (1996) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากส้ม ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันไป โดยสามารถแยกได้ 3 กลุ่มคือ Fast-Growing Orange (FGO), Slow-Growing Orange (SGO) และ Key Lime Anthracnose (KLA) โดยใช้การเรียงตัวของเบสในตำแหน่ง ITS1 เปรียบเทียบกับเชื้อราอื่นๆ ในสกุล *Colletotrichum* พบว่า FGO ถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides*, ส่วน SGO และ KLA ถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งแตกต่างจากเดิมที่ได้จัดจำแนกเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มเป็น *C. gloeosporioides* ทั้งหมด

Sherriff และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA internally transcribed spacer 2 (ITS-2) ของเชื้อรา *Colletotrichum graminicola* ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพด, ข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อราคนละชนิด ผลจากการทดลองพบว่า ในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพด กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวฟ่าง และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับ *Rottboellia* มีความเหมือนกันสูง (98-100%) ขณะที่ความเหมือนกันระหว่างกลุ่มของสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็น 92% และเมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* อื่นมาทำการเปรียบเทียบร่วมพบว่า สายพันธุ์ที่ได้จากข้าวโพดมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่มาจากข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางพันธุศาสตร์ที่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงสรุปได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดน่าจะเป็น *C. graminicola* ขณะที่สายพันธุ์ที่มาจากข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* เป็น *C. sublineolum*

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง ITS เพื่อจัดจำแนก และศึกษา phylogeny ของเชื้อราอื่น ๆ ดังนี้

Ospina-Giraldo และคณะ (1998) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS-1, ITS-2 และ 5.8S rDNA ของ *Trichoderma* spp. 15 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี 6 สายพันธุ์ที่ศึกษาเป็น *T. harzianum* รวม 4 biotypes (Th1, Th2, Th3 และ Th4) จากการศึกษาพบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกัน กลุ่มแรกประกอบด้วย biotype Th1, Th2 และ Th4 ขณะที่อีกกลุ่มประกอบด้วย biotypes Th3 และ สายพันธุ์อื่นของ *T. harzianum* / *atroviride* (sect. *Trichoderma*) จากแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลก Th3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. harzianum* / *atroviride* ซึ่งสองสปีชีส์นี้เมื่อดูจากลักษณะของ conidia แล้ว *T. atroviride* และ *T. harzianum* มีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้จำแนกผิดพลาดเสมอ จากการวิเคราะห์ข้อมูลระดับโมเลกุลแล้ว biotype Th3 ควรจัดอยู่ใน *T. atroviride* มากกว่าที่จะเป็น *T. harzianum*

Anderson และคณะ (1998) จำแนกเชื้อราและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ spore-cyst ของเชื้อรา *Ascosphaera* spp. 20 species โดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของเชื้อรา ในตำแหน่ง ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด ซึ่งมีลำดับเบส 20 เบส แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่า สามารถแบ่ง *Ascosphaera* เป็น 4 กลุ่ม คือ *A. apis*, *A. aggregata*, *A. atra* และ *A. acerosa* เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อราเหล่านี้ พบว่า *A. acerosa* และ *A. asterophora* มีความเหมือนกัน 98-100%, *A. atra* และ *A. duoformis* เหมือนกัน 100%, *A. aggregata*, *A. subcuticulata*, *A. proliperda*, *A. solina* เหมือนกัน 32-69% และ *A. apis*, *A. colubrina*, *A. flava*, *A. larvis*, *A. major*, *A. variegata* และ *A. calarrima* เหมือนกัน 44-61 %

Kiss (1997) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Ampelomyces* ซึ่งเป็น hyperparasite ของราแป้งจำนวน 46 isolates ด้วยการใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) วิเคราะห์ตรงตำแหน่ง ITS โดยทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี PCR แล้วนำผลผลิต PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 20 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราเหล่านี้ได้เป็น 7 กลุ่ม โดย isolates ที่อยู่ใน RFLP group ต่างกันอาจพบในสถานที่เดียวกันได้ และพบบนเชื้อราแป้งใน species เดียวกันของ Family Erysiphaceae ที่เข้าทำลายบน host เดียวกัน ซึ่งการตรวจสอบหาความแตกต่างด้านพันธุกรรมนี้ ช่วยให้สามารถจำแนกเชื้อรา isolates ต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้าน biocontrol ต่อไป

Jasalavich และคณะ (1995) ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง 18S rRNA, 5.8S rRNA และ internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) ของเชื้อรา *Alternaria* ที่เป็น

สาเหตุโรคของพืชตระกูล crucifers ซึ่งประกอบด้วย *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. raphani*, *A. alternata* และเชื้อรา *Pleospora herbarum* พบว่าลำดับเบสในตำแหน่ง 5.8S rDNA ของเชื้อรา *Alternaria* ทั้ง 4 ชนิดมีความเหมือนกัน และเมื่อเทียบกับเชื้อรา *P. herbarum* พบว่ามีลำดับเบสเพียง 1 เบสที่ต่างกัน สำหรับลำดับเบสในตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer โดยเฉพาะ ITS1 พบว่ามีความผันแปรสูงทั้งลำดับเบสและความยาว ลำดับเบสในตำแหน่ง 18S rDNA ที่เป็นยีนอนุรักษ์ที่มีความคงตัวสูง (highly conserved) แต่ก็มีความแตกต่างอย่างชัดเจนใน genus ที่ต่างกัน สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic analysis) โดยใช้วิธีการ parsimony และ maximum like lihood พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของ genus และ species ได้อย่างชัดเจน ผลจากการทดลองสรุปว่า เชื้อรา *Alternaria* ทั้งหมดที่ทำการศึกษามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และพบว่าเชื้อราใน genus *Pleospora* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ genus *Alternaria* มากกว่า genus *Leptosphaeria*

จากที่กล่าวมา จะเห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลำดับเบสในตำแหน่ง ITS โดยวิธีการต่างๆ ในหลายๆ การทดลองนั้น มีความเหมาะสมสามารถใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนก รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของเชื้อราต่างๆ ได้เป็นอย่างดี และยังสามารถใช้ร่วมกับการศึกษากับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่นๆ ได้ ทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับของทุกฝ่าย ซึ่งในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้นำเทคนิคการหาลำดับเบสในตำแหน่ง ITS ร่วมกับเทคนิค AFLP เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืชเศรษฐกิจต่างๆ ในเขตภาคเหนือของไทย เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มเชื้อราดังกล่าว

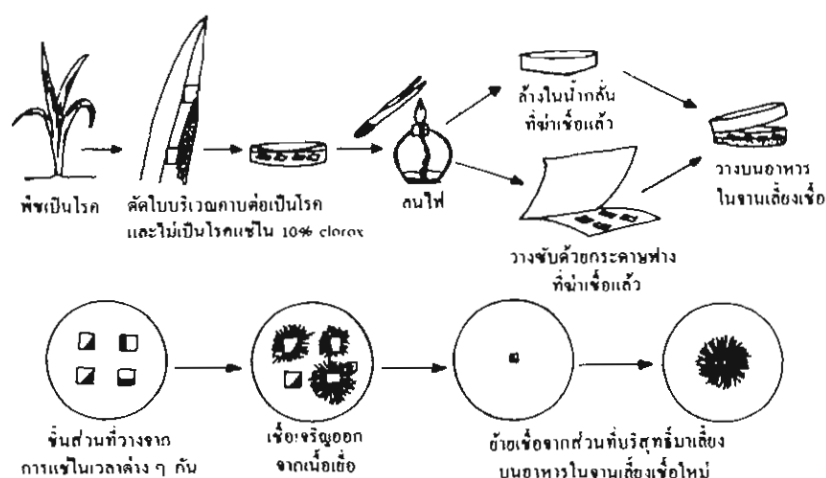
4. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เก็บรวบรวม แยกเชื้อบริสุทธิ์ และจัดจำแนกชนิดเพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในเขตจังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราใน Genus *Colletotrichum* โดยเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง internal transcribed spacers ITS ของ rDNA ร่วมกับเทคนิค AFLP เพื่อหาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มเชื้อราดังกล่าว และจัดจำแนกโดยการสร้าง Phylogenetic tree

5. ระเบียบวิธีวิจัย

5.1. การเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยนำส่วนต่างๆ ของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคมานำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ดังแสดงในภาพที่ 4 (Agrios, 1987) เมื่อได้เชื้อราสาเหตุโรคมานำมาทำ single spore isolation อีกครั้งแล้วจึงเก็บไว้เป็น stock culture ต่อไป นอกจากนี้ยังได้ติดต่อขอเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากสถาบันในต่างประเทศเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำเชื้อราแต่ละ isolates ที่รวบรวมได้มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (ca. 27–30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน วัดอัตราการเจริญเติบโต และบันทึกลักษณะโคโลนี สำหรับการศึกษาขนาด และลักษณะของ conidia ตลอดจน appressorium ทำการศึกษานบน slide culture โดยใช้อาหาร Potato Carrot Agar (PCA) ตามวิธีการของ Sutton (1980)



ภาพที่ 4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากพืชที่เป็นโรค (Agrios, 1978)

5.2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอนุชีววิทยา

5.2.1. การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้

5.2.1.1. การเลี้ยงเส้นใยเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อราแต่ละ isolates มาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Both (PDB) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรภายในบรรจุอาหาร PDB ประมาณ 10 มิลลิลิตร (สูงจากก้น flask ประมาณ 0.3 เซนติเมตร) เป็นเวลา 1–2 วัน (หากใช้เส้นใยอายุมากกว่านี้จะทำให้สกัดดีเอ็นเอได้

ยาก) ทำการเก็บรวบรวมเส้นใยของเชื้อราโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น (ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว) หลายๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าเส้นใยสะอาดไม่มีอาหารปะปนอยู่ ทั้งไว้นเส้นใยแห้ง ใช้ forceps คีบเส้นใยมาบดในโกร่ง เพื่อสกัดดีเอ็นเอทันทีหรือเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป (สามารถเก็บได้ประมาณ 1 เดือน)

5.2.1.2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่เก็บรวบรวมได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ To-anun และคณะ (1999) โดยใช้ buffer 2X CTAB (1.4M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0) ในการสกัดดีเอ็นเอนี้มีหลักการคือ ในขั้นแรกจะต้องทำให้เซลล์เชื้อราแตกเพื่อให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมา ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้โดยการบดเส้นใยร่วมกับในโตรเจนเหลวหรือน้ำแข็งแห้ง หลังจากนั้นจะทำการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารซักฟอก CTAB เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลาย buffer ที่มีสาร EDTA ที่จะช่วยป้องกันดีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ endonuclease ซึ่ง EDTA นี้เป็นสาร chelating agent ที่จะเข้าจับกับ Mg^{2+} ที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ nuclease ดังกล่าวและมีผลทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นจึงสกัดโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอ โดยใช้ chloroform หรือ phenol จากหลักการดังกล่าวนี้สามารถสรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

1. ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเชื้อราที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ (ca. 0.08-0.3 กรัม)
2. นำเส้นใยใส่โกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติม liquid nitrogen เพื่อให้เซลล์ของเส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียด
3. ตั้งโกร่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อตัวอย่างเริ่มหลอมละลายจึงเติม 2X CTAB buffer (เติมปริมาณ 10 เท่าของน้ำหนักเส้นใย)
4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน (เส้นใยของเชื้อราที่บดละเอียดแล้วกับ buffer) ถ่ายใส่หลอด centrifuge (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-30 นาที
5. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม buffer 10% CTAB ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นเติม

- chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมของเหลวส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน ซึ่งชั้นนี้ดีเอ็นเอจะตกตะกอน
 9. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
 10. เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 70% ETOH (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
 11. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 12. เทของเหลวส่วนบนทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูทิ้งไว้ให้แห้ง
 13. เติม TE buffer เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายยาก หรือไม่ละลายให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่หลอด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปตรวจสอบต่อไป

5.2.1.3. ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

A. การเตรียมแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel)

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายใน microwave จนผงอะกาโรสละลายจนหมดปล่อยให้อะกาโรสเย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) แล้วจึงเทลงในภาตเจลที่มีความหนาประมาณ 0.4 เซนติเมตร จากนั้นจึงใส่หัวที่ปลายข้างหนึ่งของภาตเจลเพื่อให้เกิดช่องเล็ก (well) เพื่อใส่ตัวอย่าง เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงดึงหัวออกแล้วนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

B. การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

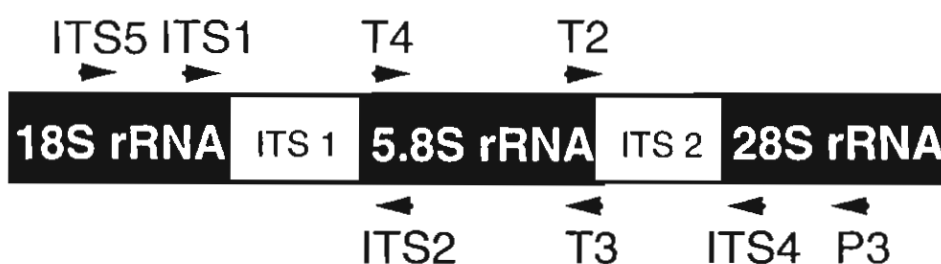
นำแผ่นอะกาโรสที่เตรียมไว้วางลงในกล่องอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ลงในกล่องให้ท่วมแผ่นอะกาโรส (ให้ผิวของอะกาโรสอยู่ใต้ 1X TAE buffer ประมาณ 1-3 มิลลิเมตร) ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับ ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรแล้วใช้ micropipet ดูดสารละลายค่อยๆ ใส่ลงในช่องตัวอย่างของอะกาโรสที่เตรียมไว้ ปิดฝากล่องและเปิดสวิตช์เครื่อง ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเจลจากขั้วลบไป

ข้าวบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายของแผ่นอะกาโรสจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นอะกาโรสเจลไปตรวจดู แถบดีเอ็นเอ โดยย้อมสี ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV transilluminator แถบดีเอ็นเอจะเรืองแสงเป็นแถบสว่าง ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเทียบกับ Lamda DNA marker ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

5.2.2. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี rDNA sequence analysis

5.2.2.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR

ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ primer 2 ชนิดคือ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG3') และ P3 (5'-GCCGCTTCATCGCCGTTAC3') ดังแสดงในภาพที่ 5 (สำหรับ primer อื่นๆ ในภาพนี้ใช้สำหรับการหาลำดับเบสของ DNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ซึ่งได้แก่ primer ITS1, T4, ITS4 และ T3)



Primer	Nucleotide sequence	Source (reference No.)
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al., (9)
ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	White et al., (9)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., (9)
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG-3'	White et al., (9)
P3	5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTAC-3'	Kusaba and Tsuge, (7)
T2	5'-GGGCATGCCTGTTGAGCGT-3'	Hirata and Takamatsu, (5)
T3	5'-ACGCTCGAACAGGCATGCCC-3'	Hirata and Takamatsu, (5)
T4	5'-TCAACAACGGATCTCTTGGC-3'	Hirata and Takamatsu, (5)

ภาพที่ 5 แผนที่แสดงตำแหน่งของ rDNA ที่ประกอบด้วย ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA gene และลำดับเบสของ primer ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน rDNA และ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส (Hirata and Takamatsu, 1996)

A. การเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (reaction mix)

ใช้หลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เติมส่วนผสมของสารตามลำดับต่อไปนี้

	<u>ปริมาตร (ไมโครลิตร)</u>
น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว	37.8
10X PCR buffer	5.0
dNTP mix (2.5 mM)	4.0
Primer ITS5 (20 pmol/μl)	1.0
Primer P3 (20 pmol/μl)	1.0
DNA template	1.0
Taq DNA polymerase	<u>0.2</u>
ปริมาตรรวม	<u>50.0</u>

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว เติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตรปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของ reaction mixture นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไป incubate ในเครื่อง thermal cycler รุ่น PC-700 (ASTEC) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอนที่ 2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
- ขั้นตอนที่ 3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ต่อไป

B. ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนในการตรวจสอบทำเหมือนกับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอในข้อ 2.3 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของอะกาโรสเจลเป็น 1.5% เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.75 กรัม ผสม 1X

buffer TAE 50 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม ethidium bromide 50 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปเทลงภาตเจลดต่อไป

5.2.2.2. การแยกผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 640 คู่เบส จากนั้นจึงทำการตัดเจลในส่วนที่มีการเรืองแสง (ขนาดประมาณ 640 คู่เบส) แล้วนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ JET SORB kit (Genomed) โดยดำเนินการตามคู่มือที่แนบมากับ kit ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1. ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดมาได้ แล้วทำการละลายเจลด้วย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (w/v) จากนั้นผสม Jetsorb ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายเจล และให้ดีเอ็นเอมาจับกับอนุภาคของ Jetsorb จากนั้นจึงปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป ทำการล้างตะกอนด้วยสารละลาย A1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง

ขั้นตอนที่ 2. ล้างตะกอนด้วย low salt buffer โดยเติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อได้ตะกอนแล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วทำการล้างตะกอนอีกครั้งด้วย A2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง

ขั้นตอนที่ 3. การแยกดีเอ็นเอออกจาก Jetsorb ทำได้โดยเติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ไว้ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนนี้ สามารถนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการหาลำดับเบสในขั้นต่อไป โดยนำไปปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับการปรับค่าความเข้มข้นนี้ จะใช้เครื่อง Spectrophotometer ในการคำนวณหาความเข้มข้น แล้วจึงปรับค่าให้ได้ตามต้องการ

5.2.2.3. การหาลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2

A. การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้หาลำดับเบส

เตรียมตัวอย่างเพื่อใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan ซึ่งการหาลำดับเบสนี้จะใช้ primer 4 ชนิดคือ ITS1 (5'TCCGTAGGTGAA-CCTGCGG 3') P3, T3 (5'ACGCTCGAACAGGCATGCCG3') และ T4 (5'TCAACAA-CGGATCTCTTGGC3') ซึ่ง primer ทั้งสี่นี้จะใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตามตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยนำผลผลิตของ PCR (ดีเอ็นเอ) ที่เตรียมได้ในข้อ 2.2.2 ของเชอร์ราแต่ละสายพันธุ์มาหาลำดับเบสโดยผสมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหาลำดับเบส

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. Reagent Mix A	4
2. Reagent Mix B	4
3. DNA (100 ng)	1
4. Primer (5 pmol)	1
5. ddH ₂ O	<u>10</u>
ปริมาตรรวม	<u>20</u>

เมื่อผสมส่วนผสมทุกอย่างแล้วเติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย จากนั้นนำหลอด PCR ไป incubate ในเครื่อง thermal cycler รุ่น PC-700 (ASTECH) โดยกำหนดอุณหภูมิ และระยะเวลา แต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
ในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ

ขั้นตอนที่ 3. หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วดูดสารละลายทั้งหมด (ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ย้ายไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วทำการตกตะกอนด้วย 70% EtOH (-20 องศาเซลเซียส)

ปริมาตร 75 ไมโครลิตร โดยผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที เทของเหลวบนทิ้ง นำตะกอนไป dry ใน vacuum แล้วเก็บตะกอนเพื่อนำไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป

หมายเหตุ: ขณะปฏิบัติงานในข้อ 5.2.2.3(A) นี้ ควรให้สารต่างๆ ถูกแสงน้อยที่สุดเนื่องจากสารเหล่านี้ไวต่อแสง และจะเสื่อมสภาพได้ง่ายหากโดนแสงสว่าง ดังนั้นควรใช้อลูมิเนียมฟลอยด์ห่อหุ้มหลอดทดลอง

B. การทำ electrophoresis บน polyacrylamide gel

ประกอบชุดแผ่นกระจก จากนั้นทำการเตรียมสารละลายโฟลโอะคีลามายด์ โดยเริ่มจากการชั่ง urea 25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเจล Long Ranger (r) (polyacrylamide gel) ปริมาตร 5.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (อาจใช้ hot plate ช่วยในการละลาย) หลังจากนั้นเติม 10X TBE (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายไปตั้งฟองอากาศออกด้วยเครื่อง vacuum ประมาณ 17 นาที เติม 10% APS (ภาคผนวก) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม TEMED ปริมาตร 21.5 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันดี แล้วนำสารละลายที่ได้เทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ทั้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เจลจะแข็งตัว จากนั้นนำแผ่นกระจกที่ได้ไปล้างทำความสะอาด แล้วนำแผ่นกระจกนี้ไปประกอบเข้าเครื่อง Applied Biosystem 373A Sequencer เติม running buffer (1XTBE) ลงใน chamber จากนั้นจึงนำตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2.2.3(A) มาละลายด้วย loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบส โดยหยอดลงในเจลที่เตรียมไว้ ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทช์ให้เครื่องทำงาน เป็นเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ โดยเช็คเครื่องตามคู่มือที่ติดมากับเครื่องและข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์

5.2.2.4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ GENETYX-MAC (Software Development) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก the DAN Databank of Japan (DDBJ) (ตารางที่ 2) ด้วยโปรแกรม Clustal V (Higgins et al., 1992) และสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยโปรแกรม PAUP version 4.0 (D. Swofford, Smithsonian Institution, Washinton D.C.) ซึ่งการวิเคราะห์หา tree จะใช้หลักการของ Distance method

โดยวิธีการ neighbor-joining และหาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณ bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณค่า distance coefficient โดยใช้โปรแกรม PAUP version 3.1 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ตารางที่ 2 ข้อมูลจาก the DNA Databank of Japan (DDBJ) ที่นำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ

เชื้อรา (สปีชีส์)	ไอโซเลต	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	Accession ^e
<i>C. acutatum</i>	379 ^a	<i>Fragaria x ananassa</i>	USA	Z 32915
<i>C. capsici</i>	223 ^b	<i>Vigna unguiculata</i>	Nigeria	Z 32934
<i>C. coccodes</i>	527.77 ^c	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Bulgaria	Z 32930
<i>C. dematium</i>	288810 ^c	<i>Dianthus</i> sp.	UK	Z 32938
<i>C. destructivum</i>	157.83 ^c	<i>Medicago sativa</i>	Yugoslavia	Z 32939
<i>C. fragariae</i>	63-1 ^a	<i>Fragaria x ananassa</i>	USA	Z 32943
<i>C. fuscum</i>	120 ^b	<i>Digitalis lanata</i>	Cuba	Z 32944
<i>C. gloeosporioides</i>	SAS 1 ^c	<i>Citrus paradisi</i>	Barbados	Z 32945
<i>C. gloeosporioides</i>	SAS 8 ^c	<i>Diorcorea</i> sp.	Barbados	Z 32963
<i>C. gloeosporioides</i>	203 ^b	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	Z 32947
<i>C. gloeosporioides</i>	NT 44 ^c	<i>Stylosanthes</i> sp.	Australia	Z 32951
<i>C. gloeosporioides</i>	498/150.28 ^c	<i>Zizyphus jujuba</i>	-	Z 32955
<i>C. gloeosporioides</i>	501 ^c	<i>Mangifera indica</i>	Malaysia	Z 32957
<i>C. gloeosporioides</i>	502 ^c	<i>Hevea brasiliensis</i>	Indonesia	Z 32958
<i>C. gloeosporioides</i>	503 ^c	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	Z 32959
<i>C. gloeosporioides</i>	AV3/1 ^c	<i>Persea americana</i>	Sri Lanka	Z 32965
<i>C. gloeosporioides</i>	CG cof C ^a	<i>Coffea arabica</i>	Sri Lanka	Z 32966
<i>C. gloeosporioides</i>	P2/10 ^c	<i>Carica papaya</i>	Sri Lanka	Z 32970
<i>C. graminicola</i>	84032 ^c	<i>Zea mays</i>	Zimbabwe	Z 32981
<i>C. kahawae</i>	319406 ^a	<i>Coffea arabica</i>	Kenya	Z 32983
<i>C. lindemuthianum</i>	559 ^b	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	Z 32989
<i>C. linicola</i>	172.59 ^c	<i>Linum usitatissimum</i>	Netherlands	Z 32985
<i>C. musae</i>	CMG ^c	<i>Musa</i> sp.	Australia	Z 32995
<i>C. orbiculare</i>	172.59 ^c	<i>Cucumis sativus</i>	Netherlands	Z 33379
<i>C. sublineolum</i>	790416 ^c	<i>Sorghum</i> sp.	Nigeria	Z 33380
<i>C. trichellum</i>	84989 ^c	<i>Hedera helix</i>	U.K.	Z 33003
<i>C. trifolii</i>	164 ^b	<i>Medicago</i> sp.	USA	Z 33004
<i>Nurospora crassa</i>	- ^d	-	-	M 13906

ตารางที่ 2 (ต่อ)

เชื้อรา (สปีชีส์)	ไอโซเลต	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	Accession ^c
<i>G. acutata</i>	MAFF 306282 ^f	-	Japan	AB 042300
<i>G. acutata</i>	MAFF 306406 ^f	-	Japan	AB 042301
<i>C. higginsianum</i>	MAFF 305635 ^f	-	Japan	AB 042302
<i>C. candatum</i>	MAFF 305700 ^f	-	Japan	AB 042304
<i>C. orbiculare</i>	MAFF 306518 ^g	<i>Cucumis sativus</i>	Japan	AB 042308
<i>C. dematium</i>	MAFF 305982 ^f	-	Japan	AB 042310
<i>C. dematium</i>	IMI-2888102 ^h	-	Japan	AB 046607
<i>C. dematium</i>	IMI-080025 ⁱ	-	Japan	AB 046608
<i>C. linicola</i>	CBS 172.51 ^j	<i>Linum usitatissimum</i>	Japan	AB 046609
<i>G. glycines</i>	IF 07384 ^f	-	Japan	AB 057435
<i>G. graminicola</i>	MAFF 511343 ^f	<i>Zea mays</i>	Japan	AB 057436
<i>C. linicola</i>	IMI 103844 ^f	<i>Linum usitatissimum</i>	Japan	AB 057437
<i>C. sublineolum</i>	MAFF 305360 ^f	-	Japan	AB 057438
<i>G. cingulata</i>	MAFF 306173 ^f	-	Japan	AB 087217
<i>G. cingulata</i>	MAFF 306429 ^f	-	Japan	AB 087218
<i>G. cingulata</i>	MAFF 306553 ^g	-	Japan	AB 087219
<i>C. musae</i>	MAFF 305595 ^g	-	Japan	AB 087220
<i>C. fragariae</i>	MAFF 744017 ^g	<i>Fragaria x ananassa</i>	Japan	AB 087221
<i>C. lindemuthianum</i>	MAFF 305390 ^g	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Japan	AB 087222
<i>C. trifolii</i>	MAFF 510847 ^g	<i>Medicago</i> sp.	Japan	AB 087223
<i>C. graminicola</i>	DRI ^k	<i>Poa annua</i>	Ottawa	AF 059676
<i>C. gloeosporioides</i>	AVO-37-4B ^l	-	Israel	AF 200792
<i>C. acutatum</i>	US-ALM-4 ^j	-	USA	AF 200793
<i>C. acutatum</i>	TUT-5954 ^l	-	Israel	AF 200749
<i>G. cingulata</i>	IMI 383016 ^m	<i>Hevea</i> sp.	India	AF 448777
<i>G. acutata</i>	IMI 383015 ⁿ	<i>Hevea</i> sp.	India	AF 448778

^a รายงานโดย Sreenivasaprasad et al., 1992, 1993, 1994;

^b รายงานโดย Sherriff et al., 1994;

^c รายงานโดย Sreenivasaprasad et al., 1996;

^d รายงานโดย Chambers et al., 1986;

^e รหัสแสดงลำดับเบสที่รวบรวมข้อมูลไว้โดย the DAN Databank of Japan (DDBJ);

^f รายงานโดย Moriwaki et al., 2002;

^g รายงานโดย Moriwaki et al., 2003;

^h รายงานโดย Moriwaki and Tsukiboshi.2000a;

ⁱ รายงานโดย Moriwaki and Tsukiboshi.2000b;

j รายงานโดย Moriwaki and Tsukiboshi 2000c;

k รายงานโดย Travanty et al., 1998;

l รายงานโดย Freeman et al., 2000;

m รายงานโดย Saha et al., 2002a;

n รายงานโดย Saha et al., 2002b.

5.2.3. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP

5.2.3.1. Restriction and ligation of DNA

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 5.2.1.2 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตรมาเติม restriction buffer 35 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ EcoRI (5 unit) และ MseI (5 unit) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ 10X buffer A อีก 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม ligation buffer 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย 5 pmol EcoRI adapter และ 20 pmol MseI adapter อย่างละ 1 ไมโครลิตร (โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter ดังแสดงในตารางที่ 3), T4 DNA ligation (1 unit) 1 ไมโครลิตร, 1mM ATP 1 ไมโครลิตร และ 10X buffer A 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ DNA ที่ผ่านการ digest และ ligate แล้วมาทำเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวด เพื่อให้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป (Vos และคณะ, 1995)

ตารางที่ 3 ลำดับ nucleotide ของ adapter ที่ใช้ในการ ligation

Adapter	ลำดับ nucleotide
EcoRI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
MseI adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'

5.2.3.2. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

ทำ PCR ครั้งแรก (pre-amplification) โดยนำ DNA template 5 ไมโครลิตร มาเติม reaction mix 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 5 ไมโครลิตร, dNTP mix (1mM) 10 ไมโครลิตร, primer EcoRI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และ primer MseI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase

(5 unit) 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั้ง 2 ชนิด จะมีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 เบส คือ EcoRI-A /MseI-C สำหรับลำดับ nucleotide ของ primer ที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับ nucleotide ของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

primer	ลำดับการเรียงตัวของ nucleotide		
<u>PCR ครั้งที่หนึ่ง</u>			
EcoRI-A/MseI-C	EcoRI primer	5'-GACTGCGTACC AATTC	A-3'
	MseI primer	5'-GATGAGTCCTGAG TAA	C-3'
<u>PCR ครั้งที่สอง</u>			
EcoRI-A/MseI-CAG	EcoRI primer	5'-GACTGCGTACC AATTC	A-3'
	MseI primer	5'-GATGAGTCCTGAG TAA	CAG-3'
EcoRI-A/MseI-CAC	EcoRI primer	5'-GACTGCGTACC AATTC	A-3'
	MseI primer	5'-GATGAGTCCTGAG TAA	CAC-3'
EcoRI-A/MseI-CAT	EcoRI primer	5'-GACTGCGTACC AATTC	A-3'
	MseI primer	5'-GATGAGTCCTGAG TAA	CAT-3'
EcoRI-AC/MseI-C	EcoRI primer	5'-GACTGCGTACC AATTC	AC-3'
	MseI primer	5'-GATGAGTCCTGAG TAA	C-3'

เมื่อนำสารต่างๆ ผสมกันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (PCR™ MJ Research, Inc.) จำนวน 30 รอบ โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้

denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

polymerizing ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง (selective amplification) จะใช้ผลผลิตจาก PCR ครั้งที่หนึ่ง นำมาทำเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ และใช้เป็น template โดยนำ DNA

template 5 ไมโครลิตร มาเติม reaction mix 20 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 5 ไมโครลิตร, dNTP mix (1mM) 10 ไมโครลิตร, primer EcoRI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และ primer MseI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 unit) 0.2 ไมโครลิตร, โดยในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สองจะใช้ primer 4 คู่ ซึ่งมีลำดับเบสเหมือน primer คู่แรกที่ใช้ใน PCR ครั้งที่ 1 แต่มีความยาวเพิ่มขึ้น 1-2 เบส คือ EcoRI-A/MseI-CAG, EcoRI-A/MseI-CAC, EcoRI-A/MseI-CAT และ EcoRI-AC/MseI-C โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิในรอบที่ 1 ดังนี้

denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

polymerizing ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

จากนั้นปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียสในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิ ลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบ (Vos และคณะ, 1995) นำผลผลิตจาก PCR ในครั้งที่สองไปตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยวิธี silver stain

5.2.3.3. การวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel Electrophoresis

A. การเตรียมกระจก

นำกระจกที่ใช้เตรียมเจลมาล้าง และเช็ดทำความสะอาด กระจกที่ใช้มี 2 แผ่นประกบกัน (กระจกแผ่นหนึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าอีกแผ่นหนึ่ง) จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้ง เตรียมกระจกแผ่นเล็กโดยใช้ 95% alcohol เช็ดทั่วกระจก 3 ครั้ง จากนั้นจึงใส่ clear view เช็ดด้วยกระดาษคิมวาทให้ทั่ว เสร็จแล้วจึงเตรียมกระจกแผ่นใหญ่โดยใช้ 95% alcohol เช็ดให้ทั่ว แล้วจึงเช็ดด้วย Bind Saline 2 ครั้ง ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร (ใช้กระดาษคิมวาท) และเช็ดด้วย 95% alcohol อีกครั้ง วางกระจกทั้งสองแผ่นประกบกันโดยใช้ spacer หนา 0.3 มิลลิเมตร กันด้านข้างทั้งสองด้าน ใช้ที่หนีบกระดาษ หนีบด้านข้างไว้ทั้งสองด้าน เพื่อรอการเทเจลในขั้นต่อไป

B. การเตรียมเจล

ตวง 4.5 % acrylamide 50 มิลลิลิตร รินลงในขวดสำหรับผสมเจล เติม 10% ammonium persulphate (APS) 300 มิลลิลิตร ตามด้วย TEMED 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงในกระจกที่เตรียมไว้ โดยค่อยๆ เทให้เจลเข้าไปในกระจก อย่าให้ขาดตอน ถ้าเจลไหลลงไม่เท่ากันค่อยๆ ใช้มือเคาะกระจกเพื่อให้เจลไหลลงมาพร้อมกันจนเจลไหลไป

ถึงด้านล่างของกระจก เสียบหัวใส่ด้านบนของกระจก โดยใช้ด้านเรียบเสียบลงไป ใช้ตัวหนีบ กระจกหนีบกระจกทั้งด้านบนและล่าง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว (ประมาณ 2 ชั่วโมง)

C. การ run gel (electrophoresis)

นำกระจกที่เตรียมไว้มาประกอบลงบนเครื่อง Sequencing gel electrophoresis (giBco BRL Sequencing System) เติม 1X TBE buffer ต่อหัวไฟฟ้าและเปิดสวิตช์เครื่องจ่าย กระแสไฟฟ้า (power supply) จากนั้นทำ pre-run เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำ PCR product มาเติม formamide loading buffer 10 ไมโครลิตร นำไป denature ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมา load ลงบนเจลในกระจก โดยใช้ 100 bp. marker เป็นตัวเปรียบเทียบ ขนาดของดีเอ็นเอ ใช้เวลาในการ run ประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย silver staining

D. Silver staining

นำเจลที่ติดอยู่บนกระจกมาแช่ใน 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ย้อมสีด้วย silver staining เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาล้างผ่านน้ำ 1 ครั้ง จึงเติม developer 1 ลิตร เขย่าจนกระทั่งปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid และล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 2 นาที โดยเขย่าบน rotary shaker ทุกขั้นตอน

5.2.3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละ แถบ ดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏ แถบ ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy system (NTSYS) version 2.0 เปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group method by arithmetic mean (UPGMA) ด้วย โปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering method) และวิเคราะห์ค่า Bootstrap (1000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) เพื่อ สร้าง Tree

6. ผลการวิจัย

6.1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

จากการสำรวจ ตรวจหา และแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรครวม 54 ชนิด สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้รวมทั้งสิ้น 90 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้ยังได้รวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากสถาบัน และมหาวิทยาลัยต่างๆ รวม 17 ไอโซเลต ดังนี้คือ *atramentarium* (4 ไอโซเลต), *coccodes* (1 ไอโซเลต), *fragariae* (1 ไอโซเลต), *gloeosporioides* (2 ไอโซเลต), *graminicola* (2 ไอโซเลต), *higginsianum* (1 ไอโซเลต), *lagenarium* (3 ไอโซเลต), *lindemuthianum* (2 ไอโซเลต) และ *trifolii* (1 ไอโซเลต) โดยเชื้อราทุกไอโซเลตที่เก็บรวบรวมได้นี้ นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งโดยการทำ single spore isolation จากนั้นจึงเก็บไว้เป็น stock culture ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. นั้น ทำโดยนำเชื้อราเหล่านี้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อตรวจดูลักษณะของโคโลนี และตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการทำให้ slide culture พบว่าเชื้อราที่แยกได้สร้างโคโลนีที่มีสีแตกต่างกันไป ตั้งแต่สีขาว ส้ม เขียว จนถึงเทา (ภาพที่ 6) จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่จะสร้าง conidia รูปทรงกระบอกตรง มีขนาดตั้งแต่ $3.00-4.68 \times 12.38-14.60$ ไมโครเมตร (ภาพที่ 7) สร้าง appressoria ทั้งแบบผิวเรียบ และผิวขรุขระ มีขนาดตั้งแต่ $5.58-8.22 \times 9.09-13.73$ ไมโครเมตร (ภาพที่ 8) เชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่มีการสร้าง setae ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับ sclerotia จะพบในเชื้อราบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น ในเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไม้ ข้าวฟ่าง ทับทิม มะนาว และส้ม เป็นต้น ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย พบว่ามีแตกต่างกันไปตั้งแต่ 0.82 ถึง 1.72 เซนติเมตรต่อวัน เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพืษาคัยมาจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราแต่ละ isolate โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบเชื้อราส่วนใหญ่จะถูกจัดไว้ในสปีชีส์ *gloeosporioides* (ตารางที่ 5) โดยพบมีมากถึง 49 isolates จากพืษาคัย 20 ชนิด สำหรับเชื้อราในสปีชีส์อื่นๆ ที่พบ ได้แก่ *capsici* (2 ไอโซเลต), *coccodes* (2 ไอโซเลต), *graminicola* (1 ไอโซเลต) และ *lagenarium* (2 ไอโซเลต) เป็นต้น ส่วนเชื้อราที่เหลือยังไม่อาจจัดจำแนกได้ (unknown species) เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงระหว่างสปีชีส์ ด้วยเหตุนี้เพื่อไม่ให้เกิดการสับสน การกล่าวถึงเชื้อราในกลุ่มนี้จะเรียกตามชื่อพืษาคัยของเชื้อราอื่นๆ แทนการเรียกชื่อสปีชีส์

ตารางที่ 5. เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เก็บรวบรวมได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ รวม 54 ชนิดพืช (90 isolates)

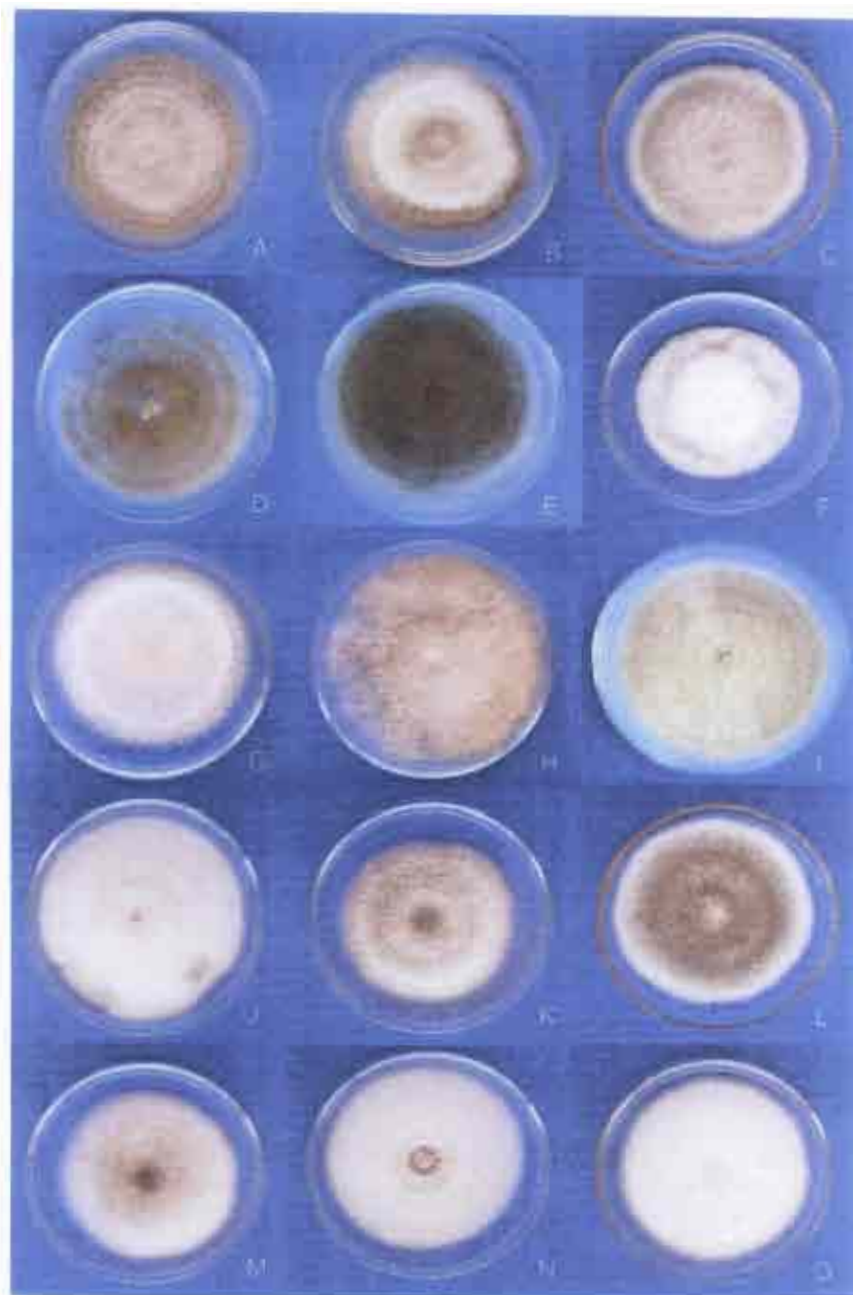
ชื่อพืชอาศัย (Host name)	ชื่อวิทยาศาสตร์	Host family	ชื่อเชื้อรา (No. of Isolates)
1. กระเจียว (Curcuma)	<i>Curcuma</i> sp.	Zingiberaceae	<i>Colletotrichum capsici</i> (1)
2. กระถิน (White popinac)	<i>Leucaena leucophala</i> (Lamk.) de Wit	Leguminosae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
3.กล้วยน้ำว้า (Banana)	<i>Musa sapientum</i> Linn	Musaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
4. กล้วยหอม (Banana)	<i>Musa sapientum</i> Linn	Musaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
5. กล้วยไม้ (Orchid)	<i>Orchids</i> sp.	Orchidaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
6. กาแฟ (Coffee)	<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
7. โกสน (Garden croton)	<i>Codiaeum variegatum</i> (L.) Blume	Euphorbiaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
8. ข้าวโพด (Corn)	<i>Zea mays</i> L.	Gramineae	<i>Colletotrichum graminicola</i> (1)
9. ข้าวฟ่าง (Sorghum)	<i>Sorghum vulgare</i> Pers.	Gramineae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
10. เหยี่ยวหมื่นปี (Evergreen plant)	<i>Aglaonema</i> sp.	Araceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
11. เข็มเศรษฐี (West Indian jasmine)	<i>Irora macrothyrsa</i> . Teysm & Binn.	Rubiaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
12. ชมพู (Malay apple)	<i>Eugenia malaccensis</i> L.	Myrtaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
13. ชบา (Chinese rose)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.	Malvaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
14. ชาทอง (Chaathong)	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
15. ช้าพลู (Chaaphluu)	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb ex. Hunter	Piperaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
16. ดอกแก้ว (Orange jasmine)	<i>Murraya paniculata</i> Jacq.	Rutaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
17. แตงโม (Water melon)	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad	Cucurbitaceae	<i>Colletotrichum lagenarium</i> (1)
18. ถั่วเหลือง (soybean)	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Leguminosae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)

ตารางที่ 5. (ต่อ)

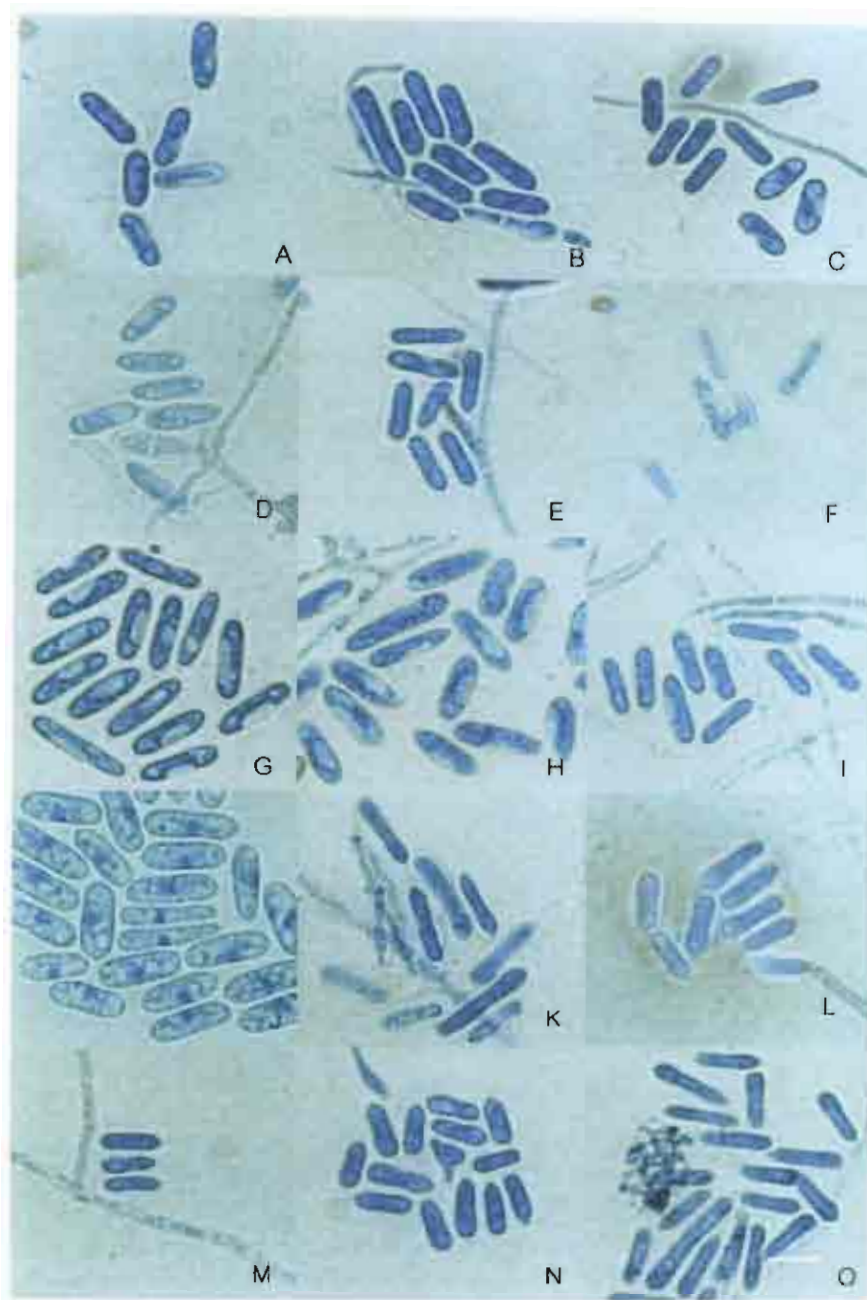
ชื่อพืชอาศัย (Host name)	ชื่อวิทยาศาสตร์	Host family	ชื่อเชื้อรา (No. of Isolates)
19. ถั่วฝักยาว (yardlong bean)	<i>Vigna sesquipedalis</i>	Leguminosae	<i>Colletotrichum capsici</i> (1)
20. ทับทิม (pomegranate)	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
21. นุ่น (kapok)	<i>Ceiba pentandra</i>	Bombacaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
22. น้อยหน่า (custard apple)	<i>Annona squamosa</i> L.	Annonaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
23. บานไม่รู้โรย (Globeamaranth)	<i>Gomphrena globosa</i> L.	Amaranthaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
24. บอนสี (caladium)	<i>Caladium bicolor</i> Vent	Araceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1) <i>Colletotrichum capsici</i> (1)
25. บีโกเนีย (begonia)	<i>Begonia</i> sp.	Begoniaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (3)
26. เบญจมาศ (chrysanthemum)	<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat	Compositae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
27. ปาล์ม (African oilpalm)	<i>Elaeis guineensis</i>	Palmae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
28. เปี้ยเทียน (Crown of thorns)	<i>Euphobia milii</i>	Eupobiaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
29. ผักกาดเขียว (Chinese cabbage)	<i>Brassica chinensis</i> L.	Cruciferae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
30. ฝ้าย (Cotton)	<i>Gossypium</i> sp.	Malvaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
31. ฝรั่ง (Guava)	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
32. พุดซ้อน (Gardenia)	<i>Gardenia jasminoides</i>	Rubiaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
33. พุทธรักษา (Gonna plant)	<i>Canna indica</i>	Cannaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
34. พุทรา (Jujube)	<i>Zizyphus jujuba</i> Lam.	Rhamnaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (2)
35. พริก (Chili)	<i>Capsicum</i> sp.	Solanaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (5)
36. พริกไทย (Black pepper)	<i>Piper nigrum</i> L.	Piperaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)

ตารางที่ 5. (ต่อ)

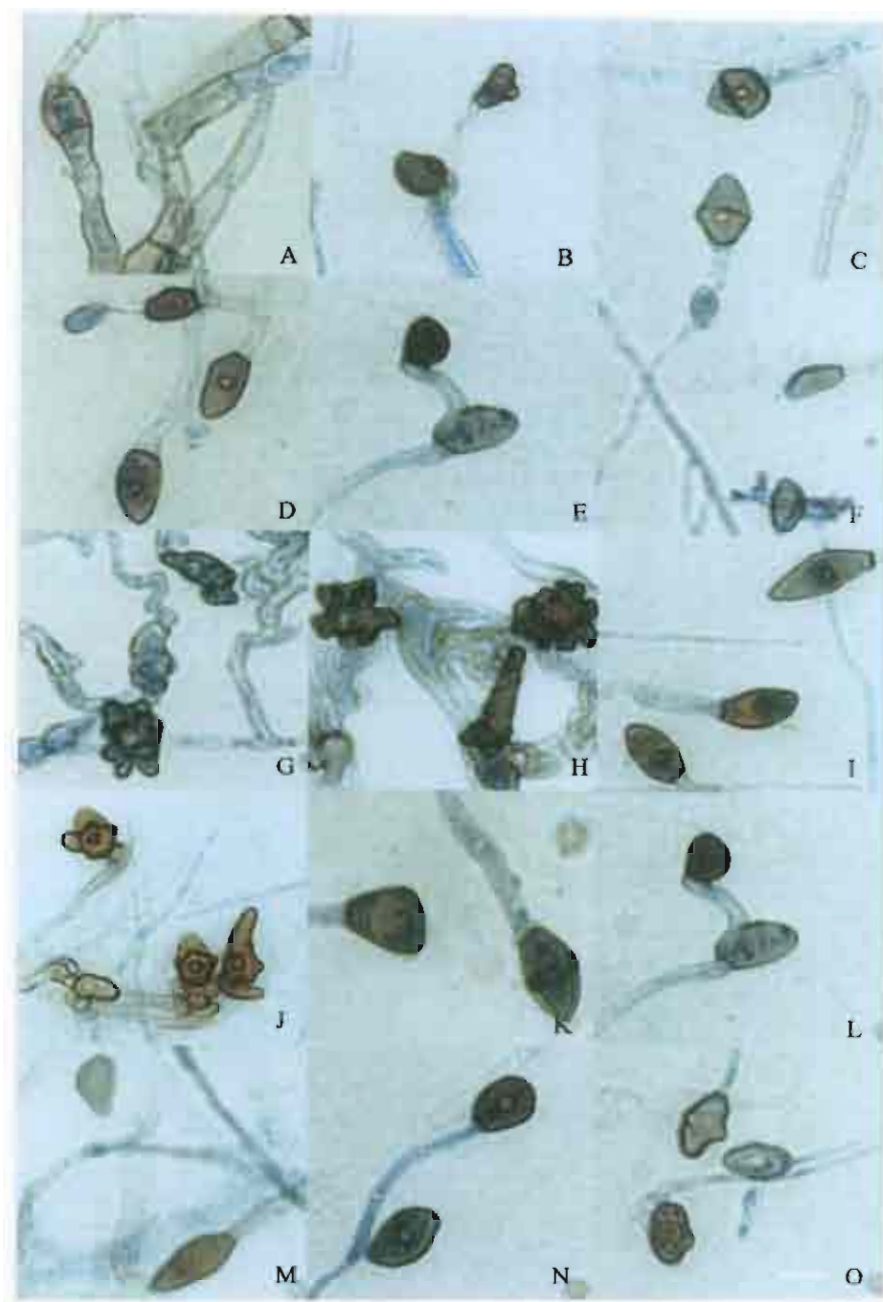
ชื่อพืชอาศัย (Host name)	ชื่อวิทยาศาสตร์	Host family	ชื่อเชื้อรา (No. of Isolates)
37. พริกหวาน (Chili)	<i>Capsicum annuum</i> L.	Solanaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
38. พลัม (Persimmon)	<i>Diospyros kaki</i> Linn.	Ebenaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
39. พลัมพลิงแดง	<i>Crinum amabile</i> Donn.	Amaryllidaceae	<i>Colletotrichum lagenarium</i> (1)
40. ฟิโลเดนดรอน (Philodendron)	<i>Philodendron</i> sp.	Araceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1) <i>Colletotrichum capsici</i> (1)
41. เฟื่องฟ้า (Bougainvillea)	<i>Bougainvillea</i> spp.	Nyctaginaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
42. เฟิร์น (Fern)	<i>Polypodium</i> sp.	Polypodiaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
43. เฟิร์น (Table Fern)	<i>Pteris</i> sp.	Polypodiaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
44. มะเขือเทศ (Tomato)	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	<i>Colletotrichum coccodes</i> (2)
45. มะเขือพวง (Devil's Fig)	<i>Solanum torvum</i> Sw.	Solanaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
46. มะม่วง (Mango)	<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (23)
47. มะนาว (Lime)	<i>Citrus aurantifolia</i> Swing	Rutaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
48. มะละกอลูก (Papaya)	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1)
49. ลำไย (Longan)	<i>Euphoria longana</i> Lamk.	Sapindaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (2)
50. วาสนา (Dracaena)	<i>Dracaena fragrans</i> Lindenii	Agavaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)
51. ส้ม (Orange)	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (2)
52. สตรอเบอร์รี่ (Strawberry)	<i>Fragaria chiloensis</i> Duchesne.	Rosaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (2)
53. สแนททิส (Statice)	<i>Limonium</i> sp.	Plumbaginaceae	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (2)
54. แอฟริกันไวโอเล็ต	<i>Saintpaulia hybrid</i>	Gesneriaceae	<i>Colletotrichum</i> sp. (1)



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ; A = स्ट्रोเบอรี่ 1, B = स्ट्रोเบอรี่ 2, C = ทับทิม, D = ส้ม 1, E = ส้ม 2, F = ฝรั่ง, G = กล้วยหอม, H = กล้วยน้ำว้า, I = ลำไย, J = พลับ, K = กาแฟ, L = กล้วยไม้, M = ข้าวฟ่าง, N = มะนาว และ O = พริก



ภาพที่ 7 ลักษณะ conidia ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ; A = สโตรเบอร์รี่ 1, B = สโตรเบอร์รี่ 2, C = ทับทิม, D = ส้ม 1, E = ส้ม 2, F = ฝรั่ง, G = กล้วยหอม, H = กล้วยน้ำว้า, I = ลำไย, J = พลับ, K = กาแฟ, L = กล้วยไม้, M = ข้าวฟ่าง, N = มะนาว และ O = พริก

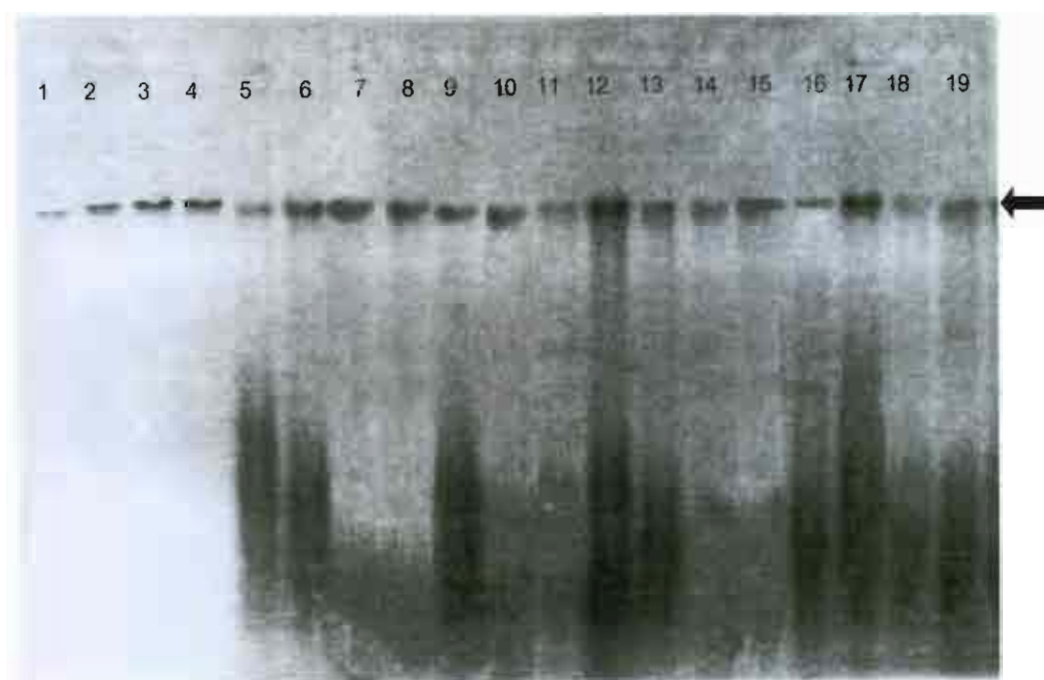


ภาพที่ 8 ลักษณะ appressoria ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ; A = स्ट्रोเบอรี่ 1, B = स्ट्रोเบอรี่ 2, C = ทับทิม, D = ส้ม 1, E = ส้ม 2, F = ฝรั่ง, G = กล้วยหอม, H = กล้วยน้ำว้า, I = ลำไย, J = พลับ, K = กาแฟ, L = กล้วยไม้, M = ข้าวฟ่าง, N = มะนาว และ O = พริก

6.2. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอนุชีววิทยา

6.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้

เมื่อนำเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (อายุ 1-2 วัน) ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ To-anun และคณะ (1999) พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วงตั้งแต่ 35-250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 9) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ หรือนำไปหาลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA ได้ จึงเก็บรวบรวมไว้ในช่องแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

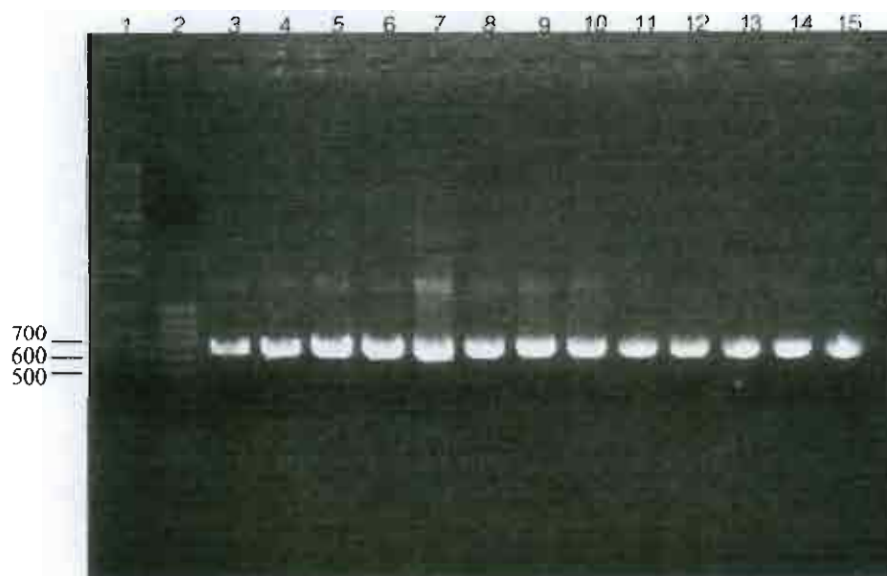


ภาพที่ 9 ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ; จากภาพ lane ที่ 1-4 คือ Lambda DNA marker ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ lane ที่ 5-19 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราที่แยกได้จากพืชต่อไปนี้คือ กาแฟ, โกสน, ถั่วลิสง, ถั่วลิสงน้ำ, ถั่วลิสงหอม, ข้าวฟ่าง, ทุเรียน, บั๊กนึ่ง, ฝรั่ง, พริก, พริก, มะนาว, ลำไย, ส้ม และสตอร์เบอรี่ตามลำดับ (ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอ)

6.2.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rDNA sequence analysis

6.2.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการแยกสกัดผลผลิตดีเอ็นเอจากเจล

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ P3 พบว่า จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราทุก isolates สามารถให้ผลผลิต PCR ได้ โดยมีขนาดประมาณ 640 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 10 และเพื่อให้ได้ปริมาณของผลผลิตดีเอ็นเอที่มากพอที่จะนำไปหาลำดับเบส จึงทำการเพิ่มปริมาณผลผลิตอีก 4 หลอด แล้วรวบรวมนำมาตกตะกอนและนำมาแยกขนาดใน agarose gel จากนั้นจึงทำการสกัดดีเอ็นเอดังกล่าวจาก agarose gel ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 13 ไอโซเลท (ภายหลังต่อมาสามารถหาลำดับเบสได้รวมทั้งสิ้น 38 ไอโซเลท) มาหาลำดับเบส และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในขั้นต่อไป



ภาพที่ 10 PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของ gene ตรงตำแหน่ง rDNA ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิดที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ; จากภาพ lane ที่ 1 และ 2 คือ Molecular size marker (1 Kb และ 100 bp ladder ตามลำดับ), lane ที่ 3-15 คือ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากพืชต่อไปนี้คือ กาแฟ, โกสน, กล้วยไม้, กล้วยน้ำว่า, ข้าวฟ่าง, ทับทิม, บีโกเนีย, ฝรั่ง, พริก, พลับ, มะนาว, ลำไย และส้ม ตามลำดับ

6.2.2.2 การหาลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA และการเปรียบเทียบความสัมพันธ์

จากตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัย 54 ชนิด รวม 90 ไอโซเลท ในเบื้องต้นทดลองหาลำดับเบสเชื้อราดังกล่าวมา 13 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ ข้าว ฟาง บีโกเนีย ลำไย พลับ ส้ม สแตติส บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก) โกสน กล้วยน้ำว่า บอนสี (สปอร์รูปเคียว) กระเจียว และมะเขือเทศ เพื่อตรวจสอบวิธีการต่างๆ ในการหาลำดับเบสตรงตำแหน่ง rDNA (ซึ่งเดิม protocol ที่นำมาใช้เป็น protocol ที่ใช้หาลำดับเบสของเชื้อราแ่งซึ่งมีปริมาณ DNA ที่ใช้แตกต่างกันมาก) โดยพบว่าวิธีการที่ใช้หาลำดับเบสในเชื้อราแ่งสามารถนำมาใช้กับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้เป็นอย่างดี เพียงแต่ปรับเปลี่ยนวิธีการเพิ่มปริมาณ rDNA ด้วยเทคนิค PCR จากสองครั้ง (ใช้ nested primer) มาเป็นเพียง 1 ครั้ง ก็สามารถได้ปริมาณ rDNA เพียงพอที่จะนำมาหาลำดับเบสได้แล้ว โดยพบว่า เชื้อราที่นำมาศึกษาชุดแรกนี้มีลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 gene (ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA) อยู่ในช่วง 639 ถึง 645 คู่เบส โดย gene ตรงตำแหน่ง ITS1 มีขนาด 171-177 คู่เบส และ ITS2 มีขนาด 160-162 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ได้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ G+C content ในตำแหน่ง ITS1 อยู่ในช่วง 59.32-63.22 % และในตำแหน่ง ITS2 มีค่าในช่วง 53.13-56.17 % เมื่อเปรียบเทียบขนาดลำดับเบสที่ได้ในตำแหน่งต่างๆ พบว่า ลำดับเบสตรงตำแหน่งของยีน 5.8S มีขนาดคงที่กล่าวคือมีขนาด 154 คู่เบส และมีเปอร์เซ็นต์ G+C content ในช่วง 47.40-48.05 % จากข้อมูลลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS นี้พบว่ามีเป็นเปอร์เซ็นต์ความผันแปรสูงสุดเท่ากับ 14.08 % โดยในตำแหน่ง ITS1 มีความผันแปรมากที่สุด (27.07 %) เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่ง ITS2 (11.73 %) และตำแหน่งของยีน 5.8S (0.65 %) (ภาพที่ 11)

สำหรับการศึกษาลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. อื่นๆ ที่เหลือ สามารถหาได้รวมทั้งสิ้น 38 ไอโซเลท (ดังแสดงในภาคผนวก) จึงนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในลำดับต่อไป (ในหัวข้อ 6.2.4)

6.2.2.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการจากลำดับเบส

จากลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชทั้ง 13 ไอโซเลทดังกล่าว สามารถนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* สปีชีส์ต่างๆ ที่มีรายงานใน the DNA databank of Japan (DDBJ) จากนั้นวิเคราะห์หาค่า distance coefficient และทำการสร้าง neighbor-joining tree โดยใช้ distance method เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มเชื้อราดังกล่าว ได้ผลดังนี้คือ

[	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
[										
	18S → ITS1									
	AAGTAAAGTCGTACAAAGTCTCCGGTTGGTGAACAGCGAGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTGCAACCCCTTTGTGAACATACCTATACTGTTGC									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT*****									
	*****AC*****AT									

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 13 ไอโซเลท กับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 17 สปีชีส์ (ข้อมูลจาก DDBJ; Sreenivasprasad และคณะ, 1996) โดยมีเชื้อรา *Nurospora crassa* เป็น out group (ภาพที่ 12) พบความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยมีค่า distance coefficient ตั้งแต่ 0.0 ถึง 19.1 % (ตารางที่ 6) สำหรับค่า distance coefficient น้อยที่สุด (0.0 %) พบในกลุ่มของเชื้อราสามกลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จาก กาแฟ และข้าวฟ่าง กลุ่มที่สองประกอบด้วยเชื้อรา *C. fuscum* และ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จาก บีโกเนีย ลำไย และพลับ และกลุ่มที่สามประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จาก บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก) และโกสน สำหรับกลุ่มของเชื้อราที่มีค่า distance coefficient สูงสุดคือ เชื้อรา *C. sublineolum* และ *C. acutatum* (19.1 %) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. กับเชื้อรา *N. crassa* พบว่ามีค่า distance coefficient ระหว่าง 31.2 ถึง 41.4 % เมื่อพิจารณา tree ที่ได้ (ภาพที่ 13) จะพบความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ โดยสามารถแบ่งเชื้อราทั้ง 13 ไอโซเลทได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. รวม 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้า บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก) โกสน บีโกเนีย พลับ ลำไย กาแฟ ข้าวฟ่าง ส้ม และสแตติส จะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. musae*, *C. gloeosporioides*, *C. kahawae* และ *C. fuscum* โดยมีค่า bootstrap สนับสนุน 67 % กลุ่มที่สองประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จากบอนสี (สปอร์รูปเดียว) กระเจียว และ *C. capsici* (ค่า bootstrap 88 %) และกลุ่มที่สามประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศ และ *C. linicola*, *C. destructivum*, *C. dematium* และ *C. coccodes* (56 % bootstrap)

เมื่อนำลำดับเบสจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ รวม 12 ไอโซเลท (จากภาพที่ 12 เชื้อราที่แยกได้จากรากมะเขือเทศจะมีความแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยอื่นๆ จึงตัดเชื่อนี้ออกไป ทำให้ได้เชื้อราที่นำมาเปรียบเทียบเหลือเพียง 12 ไอโซเลท) มาศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ข้อมูลจาก DDBJ) อีก 13 ไอโซเลท (รวมจำนวนเชื้อราทั้งสิ้น 25 ไอโซเลท) โดยกำหนดให้เชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลท 223 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกระเจียว และบอนสี (สปอร์รูปเดียว) เป็น out group (ภาพที่ 14) พบว่าค่า distance coefficient ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 มีค่าตั้งแต่ 0.0 ถึง 5.9 % (ตารางที่ 7) โดยค่า distance coefficient น้อยที่สุด (0.0 %) พบในกลุ่มของเชื้อราสี่กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท 203 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง กลุ่มที่สองประกอบด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท 502 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จากบีโกเนีย ลำไย และพลับ กลุ่มที่สามประกอบด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท CGcofC และ 498/150.28 กลุ่มที่สี่ประกอบด้วยเชื้อรา *C.*

	10	20	30	40	50
[	.	-	.	-	.)
<i>C. graminicola</i>	CTGAGTT---	ACCGCTCTATAACCCCTTTGTGAA-	CATACCT--	AACTGTT	[44]
<i>C. sublineolum</i>	*****	-----	-----	-----	[44]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กาแฟ)	*****T--*	*****	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ข้าวฟ่าง)	*****T--*	*****	*****AT*	*****	[46]
<i>C. fuscum</i>	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ถั่วลิสง)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พริก)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>C. gloeosporioides</i>	*****T--*	*****	*****AT*	*****	[46]
<i>C. fragariae</i>	*****T--*	*****C*	*****AC*	*****	[46]
<i>C. kahawae</i>	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (สปอร์รูปวงแหวน))	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โสม)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ส้ม)	*****T--*	*****C*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วยน้ำว้า)	*****T--*	*****GC*	*****AT*	*****	[46]
<i>C. musae</i>	*****T--*	*****GC*	*****AT*	*****	[46]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****	-----	-----C*	*****	[45]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (สปอร์รูปไข่))	*****	-----	-----T*	*****	[45]
<i>C. capsici</i>	*****	-----ATC*	-----T*	*****	[45]
<i>C. destructivum</i>	*****	-----C*	-----T*	*****	[45]
<i>C. linicola</i>	*****	-----C*	-----T*	*****	[45]
<i>C. trichellum</i>	*****	-----C*	-----	*****	[44]
<i>C. dematium</i>	*****	-----	-----	*****	[44]
<i>C. coccodes</i>	*****	-----	-----	*****	[44]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****	-----	-----	*****	[44]
<i>C. trifolii</i>	*****T--*	*****C*	*****C*	*****	[44]
<i>C. lindemuthianum</i>	*****T--*	*****	-----A**C*	*****	[44]
<i>C. orbiculare</i>	*****T--*	A*	*****C*	*****	[45]
<i>C. acutatum</i>	*****	-----	-----C*	*****	[44]
<i>Nurospora crassa</i>	*A*****	GCA*AACTC*C*C*	ACCAT**C**T*	CGT*-*G**	[49]

ภาพที่ 12 ความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 30 ไอโซเลท (เชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ ในประเทศไทย 13 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับเชื้อราที่ได้ข้อมูลมาจาก DDBJ อีก 17 ไอโซเลท)

เครื่องหมาย * แสดงลำดับเบสที่คล้ายกันกับเชื้อรา *C. graminicola*
และเครื่องหมาย - แสดงตำแหน่ง gap

	60	70	80	90	100
[					.]
<i>C. graminicola</i>	GCTTCGGCGGGTTAGGGG----	GTCCCCCGGGG--	ACGCCCTCCCGGC		[87]
<i>C. sublineolum</i>	*****	*****T*****	C*		[67]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กาแฟ)	*****AG*	*****T*	*****CG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ข้าวโพด)	*****AG*	*****T*	*****CG*		[81]
<i>C. fuscum</i>	*****AG*	*****T*	*****GCG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มันฝรั่ง)	*****AG*	*****T*	*****GCG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ลำไย)	*****AG*	*****T*	*****GCG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พริก)	*****AG*	*****T*	*****GCG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****AG*	*****T*	*****GCG*		[81]
<i>C. gloeosporioides</i>	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>C. fragariae</i>	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>C. kahawae</i>	*****CAG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บองได (สายพันธุ์พริกหวาน))	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โสม)	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ส้ม)	*****AG*	*****TT*	*****GGG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วยน้ำว้า)	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>C. musae</i>	*****AG*	*****T*	*****GTG*		[81]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	*****AGT-----	C*****TGAAAAGG***	T*****		[87]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บองได (สายพันธุ์เขียว))	*****AG*	*****T*****TGAAAAGG***	T*****		[87]
<i>C. capsici</i>	*****AGC*T-----	C*****TAAAAAGG***	T*****		[87]
<i>C. destructivum</i>	*****CAG*A**ACAACCC***	T***GGG*-GGTC***CT*			[92]
<i>C. linicola</i>	*****CAG*A**ACAACCC***	T***GGG*-GGTC***CT*			[94]
<i>C. trichellum</i>	*****CAG*A**-----	TC*****GG*-CT*			[81]
<i>C. dematium</i>	*****CAG*A**-----	TC***T***GG*-CT*			[81]
<i>C. coccodes</i>	*****CAG*A**-----	T*C*G**T---CGG*-C***CT*			[63]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****CAG*A**-----	T*C*G**T---CGG*-C***CT*			[83]
<i>C. trifolii</i>	*****CGG*A*-----	*****G*-----CT**CC*			[74]
<i>C. lindemuthianum</i>	*****CGG*A*-----	*****G*-----CT**CC*			[74]
<i>C. orbiculare</i>	*****CGG*A*-----	*****G*-----CT**CC*			[73]
<i>C. acutatum</i>	*****CAG*A**-----	AAG-*TCTC*CGGG*-----CT*			[84]
<i>Nurospora crassa</i>	**C*****-C*GGC**TCCGGAAGG*	TT--CGGG*CT**CGGATC*			[95]

ภาพที่ 12 (ต่อ)

	110	120	130	140	150
<i>C. graminicola</i>	CGCGCCCTCCTCCTCCGGGAGGGGTCGCGGCGCCCGCCGAGGATAA---				[134]
<i>C. sublineolum</i>	G*****				[134]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กนฬ)	----*T*C*GC*-----*GC*****				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (จักพิน)	----*T*C*GC*-----*GC*****				[120]
<i>C. fuscum</i>	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[119]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บัลแกเรีย)	----*T*C*GC*-----*GC*****				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ลำไย)	----*T*C*GC*-----*GC*****				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พริก)	----*T*C*GC*-----*GC*****				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>C. gloeosporioides</i>	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>C. fragariae</i>	----*T*C*GC*-----*C*CC*GC*****				[121]
<i>C. kahawae</i>	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ (สายพันธุ์พริกไทย))	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โสม)	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ส้ม)	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วยไม้)	----*T*C*GC*-----*C*G-----				[120]
<i>C. musae</i>	----*T*C*GC*-----*C*G*GC*---*A*---				[119]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	----*T*CT*C*G*---*GT*C*G*---*C*G*G*---				[126]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ (สายพันธุ์พริกไทย))	----*T*CT*C*G*---*GT*C*G*---*C*G*G*---				[126]
<i>C. capsici</i>	----*T*CT*C*G*---*C*GGT*---				[126]
<i>C. destructivum</i>	*CG***GCG*C*T*---*C*C*---*T*---				[132]
<i>C. linicola</i>	*CG***GCG*C*T*---*C*C*---*T*---				[134]
<i>C. trichellum</i>	*CG***CG*C*TC*---*GCA*---*GA*---				[121]
<i>C. dematium</i>	*CG***CG*C*T*---*CGC*---*G*A*---				[123]
<i>C. coccodes</i>	*CG***G*C*T*---*C*C*---*GA*---				[123]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*CG***G*C*T*---*C*C*---*GA*---				[123]
<i>C. trifolii</i>	*CG***CG*---*G*---*GC*---*A*---C				[110]
<i>C. lindemuthianum</i>	*G***CG*---*G*---*GC*---*A*---				[108]
<i>C. orbiculare</i>	*CG***CG*---*G*---*GC*---*A*---*A*---				[111]
<i>C. acutatum</i>	*CG*G*CGGC*---*C*ACCAC*---*A*G*---				[130]
<i>Nurospora crassa</i>	TCG*GTC*---*C*G*---*CTC*---*G*CT*---*TGCCGAAA				[135]

ภาพที่ 12 (ต่อ)

	160	170	180	190	200
<i>C. graminicola</i>	CCAAACTCT-GATT---AACGACGTTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA-				[180]
<i>C. sublineolum</i>	*****				[180]
<i>Colletotrichum</i> sp. (นูน)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (จักพิน)	*****T*****				[166]
<i>C. fuscum</i>	*****T*****				[165]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ปัดน้ำ)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ดำ)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พยับ)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (สนิม)	*****T*****				[166]
<i>C. gloeosporioides</i>	*****T*****				[166]
<i>C. fragariae</i>	*****T*****				[167]
<i>C. kahawae</i>	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บนผิวเปลือกมะม่วง)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ใบส้ม)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ส้ม)	*****T*****				[166]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วยน้ำว้า)	*****T*****				[166]
<i>C. musae</i>	*****G*****T*****				[165]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	*****A*****				[172]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บนผิวเปลือกส้ม)	*****A*****				[172]
<i>C. capsici</i>	*****A*****				[172]
<i>C. destructivum</i>	*****ACTCT-***T*****				[179]
<i>C. linicola</i>	*****CTCT-***T*****				[180]
<i>C. trichellum</i>	*****T-***TTT*G*****				[170]
<i>C. dematium</i>	*****CTCT-***T*****				[169]
<i>C. coccodes</i>	*****CTCT-***T*****				[169]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	*****T*****				[169]
<i>C. trifolii</i>	**C*****T***T*****C*****				[157]
<i>C. lindemuthianum</i>	**C*****T*****C*****				[154]
<i>C. orbiculare</i>	**C*****T*****C*****				[158]
<i>C. acutatum</i>	*****A-C*****C*****				[176]
<i>Nurospora crassa</i>	*T*****T***TT-----*T*C*-AA*TTTT*				[178]

ภาพที่ 12 (ต่อ)

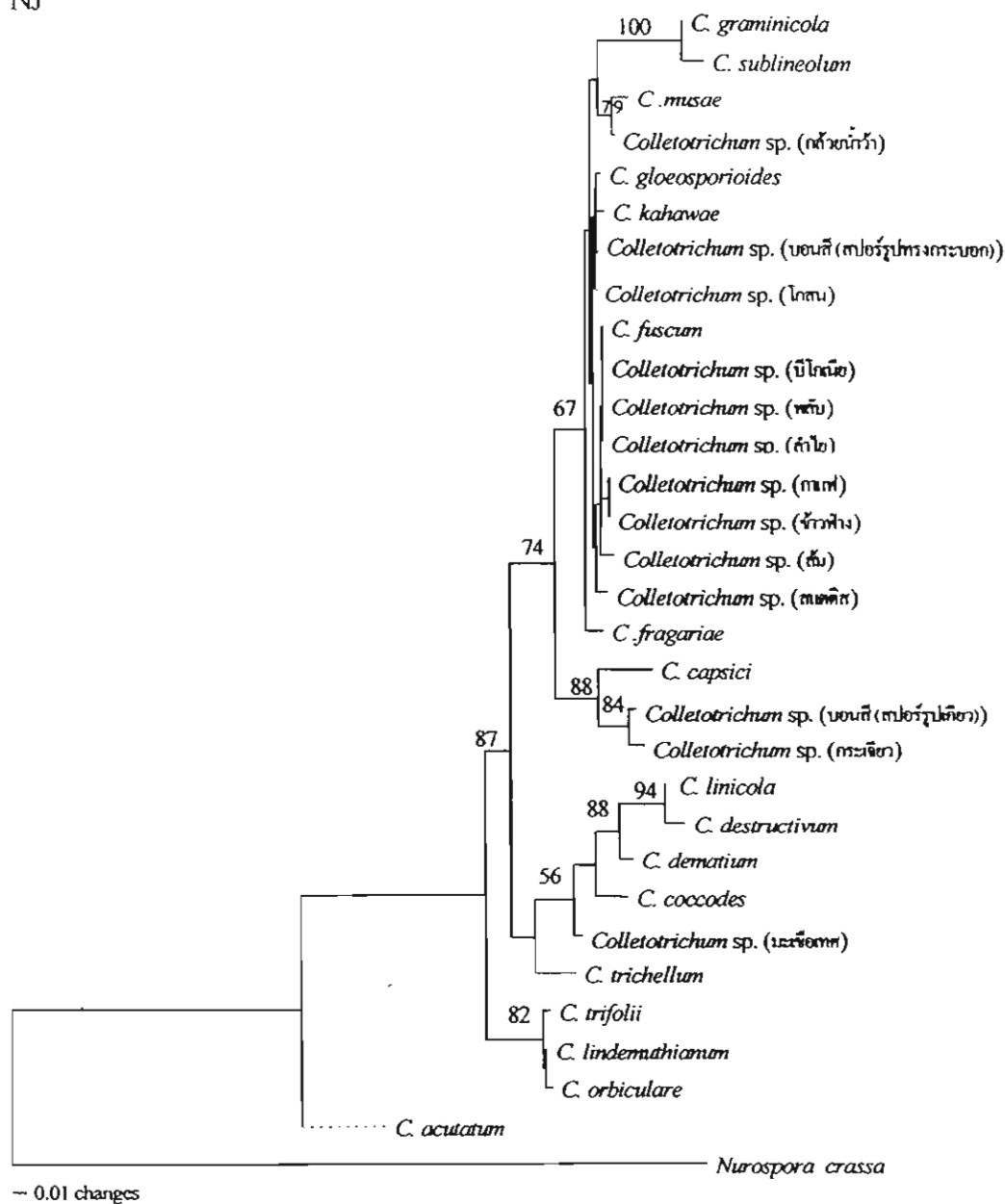
:	206]
[	.
<i>C. graminicola</i>	AA-TTA [185]
<i>C. sublineolum</i>	**-*C* [185]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วย)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ข้าวโพด)	**-*C* [171]
<i>C. fuscum</i>	**-*C* [170]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ลำไย)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พลับ)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะขาม)	**-*C* [171]
<i>C. gloeosporioides</i>	**-*C* [171]
<i>C. fragariae</i>	**-*C* [172]
<i>C. kahawae</i>	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (พันธุ์รูปทรงระฆัง))	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โสม)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ส้ม)	**-*C* [171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กล้วยน้ำว้า)	**-*C* [171]
<i>C. musae</i>	**-*C* [170]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือ)	**-*C* [177]
<i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (พันธุ์รูปทรงยาว))	**-*C* [177]
<i>C. capsici</i>	**-*C* [177]
<i>C. destructivum</i>	**-*C* [184]
<i>C. linicola</i>	**-*C* [185]
<i>C. trichellum</i>	**-*C* [175]
<i>C. dematium</i>	**-*C* [174]
<i>C. coccodes</i>	**-*C* [174]
<i>Colletotrichum</i> sp. (มะเขือเทศ)	**-*C* [174]
<i>C. trifolii</i>	**-*C* [162]
<i>C. lindemuthianum</i>	*-G*C* [159]
<i>C. orbiculare</i>	**-*C* [163]
<i>C. acutatum</i>	**-*C* [181]
<i>Nurospora crassa</i>	**G*C* [184]

ภาพที่ 12 (ต่อ)

ตารางที่ 6 Genetic distance ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 30 ไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อรา *Neurospora crassa* (ครึ่งแถวล่างเป็นจำนวนเบสที่แตกต่างกัน และครึ่งแถวบนแสดงค่า distance coefficient)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 <i>C. graminicola</i>		0.016	0.066	0.066	0.073	0.072	0.072	0.072	0.084	0.072	0.084	0.084	0.078	0.078	0.078	0.072
2 <i>C. sublineolum</i>	3		0.078	0.078	0.085	0.084	0.084	0.084	0.096	0.084	0.096	0.096	0.090	0.090	0.090	0.084
3 <i>Colletotrichum</i> sp. (กมส)	11	13		0.000	0.006	0.006	0.006	0.006	0.018	0.012	0.035	0.023	0.018	0.018	0.018	0.035
4 <i>Colletotrichum</i> sp. (จำฬึง)	11	13	0		0.006	0.006	0.006	0.006	0.018	0.012	0.035	0.023	0.018	0.018	0.018	0.035
5 <i>C. fuscum</i>	12	14	1	1		0.000	0.000	0.000	0.012	0.018	0.029	0.018	0.012	0.012	0.012	0.030
6 <i>Colletotrichum</i> sp. (ปีโรน)	12	14	1	1	0		0.000	0.000	0.012	0.018	0.029	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029
7 <i>Colletotrichum</i> sp. (ดำใบ)	12	14	1	1	0	0		0.000	0.012	0.018	0.029	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029
8 <i>Colletotrichum</i> sp. (พัส)	12	14	1	1	0	0	0		0.012	0.018	0.029	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029
9 <i>Colletotrichum</i> sp. (มดลิส)	14	16	3	3	2	2	2	2		0.018	0.029	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029
10 <i>C. gloeosporioides</i>	12	14	2	2	3	3	3	3	3		0.023	0.012	0.006	0.006	0.023	0.023
11 <i>C. fragariae</i>	14	16	6	6	5	5	5	5	5	4		0.023	0.018	0.018	0.035	0.023
12 <i>C. kahawae</i>	14	16	4	4	3	3	3	3	3	2	4		0.006	0.006	0.023	0.023
13 <i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (มดลิส/มดลิส))	13	15	3	3	2	2	2	2	2	1	3	1		0.000	0.018	0.018
14 <i>Colletotrichum</i> sp. (โกล)	13	15	3	3	2	2	2	2	2	1	3	1	0		0.018	0.018
15 <i>Colletotrichum</i> sp. (ตัน)	13	15	3	3	2	2	2	2	2	4	6	4	3	3		0.035
16 <i>Colletotrichum</i> sp. (กิ้งก่า)	12	14	6	6	5	5	5	5	5	4	4	4	3	3	6	
17 <i>C. musae</i>	14	16	8	8	8	7	7	7	7	6	7	6	5	5	8	2
18 <i>Colletotrichum</i> sp. (มะลิ)	21	23	15	15	16	16	16	16	16	15	13	17	16	16	16	15
19 <i>Colletotrichum</i> sp. (บอนสี (มดลิส/มดลิส))	21	23	14	14	15	15	15	15	15	14	14	16	15	15	15	14
20 <i>C. capsici</i>	25	26	16	16	13	15	15	15	15	16	17	17	16	16	15	14
21 <i>C. destructivum</i>	29	29	25	25	24	24	24	24	25	25	24	23	24	24	24	23
22 <i>C. linicola</i>	28	30	23	23	22	22	22	22	23	23	22	21	22	22	22	21
23 <i>C. trichellum</i>	24	26	18	18	16	17	17	17	17	17	15	15	16	16	17	15
24 <i>C. dematium</i>	23	23	19	19	20	20	20	20	22	20	20	20	21	21	20	20
25 <i>C. coccodes</i>	22	24	20	20	21	21	21	21	22	20	21	20	21	21	21	21
26 <i>Colletotrichum</i> sp. (มะลิ)	19	21	17	17	18	18	18	18	19	17	18	17	18	18	18	18
27 <i>C. trifidii</i>	21	22	17	17	18	18	18	18	19	18	18	18	19	19	19	18
28 <i>C. ludemuthianum</i>	19	20	17	17	18	18	18	18	19	18	18	18	19	19	19	18
29 <i>C. orbiculare</i>	22	23	17	17	18	18	18	18	19	18	18	18	19	19	19	18
30 <i>C. actinatum</i>	32	34	24	24	24	25	25	25	25	23	23	23	24	24	24	25
31 <i>Neurospora crassa</i>	65	65	55	55	52	54	54	54	55	55	55	55	54	54	53	56

NJ



ภาพที่ 13 Neighbor-joining tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS 1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. รวม 30 ไอโซเลต (เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ ในไทย 13 ไอโซเลต และเป็นเชื้อราที่มีรายงานใน DDBJ อีก 17 ไอโซเลต) โดยมี *Nurospora crassa* เป็น out group

แถบด้านใต้ tree แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (0.01 = มีการเปลี่ยนแปลงเบส 1 เบสใน 100 ตำแหน่งของลำดับเบส)

	10	20	30	40	50	
<i>C. gloeosporioides</i> (AV3/1)	CTGAGTTTA-CGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT					[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (203)						[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(กนฬ)						[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(จีทฟีน)						[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (502)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(นิโคเนีย)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(ล่าโ)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(พธ)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(สนลิส)	C.....					[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS8)						[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (CGcofC)						[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (498/150.28)						[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (503)						[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (NT44)	C.....AC					[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (P2/10)	C.....AC					[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (501)	C.....					[50]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS1)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เบนนี(สปอร์รูปทรงระบด))	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(โชน)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(สัน)	C.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(ก้นน้ำรี)	GC.....					[50]
<i>C. musae</i> (CMG)	GC.....					[50]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เกรฟ)	C.....C.....					[49]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เบนนี(สปอร์รูปรี))	C.....					[49]
<i>C. capsici</i> (223)	C.....ATC.....					[49]
	60	70	80	90	100	
<i>C. gloeosporioides</i> (AV3/1)	CGGTGGGTAGG-GTCTCC----GCGAC-CCTCCCGGCTCCCGCTCCGG					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (203)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(กนฬ)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(จีทฟีน)	..C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (502)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(นิโคเนีย)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(ล่าโ)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(พธ)	..C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(สนลิส)	..C.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS8)	..C..G.....G.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (CGcofC)	..C.....T.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (498/150.28)	..C.....T.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (503)	..C.....T.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (NT44)	..C.....C.....T.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (P2/10)	..C.....C.....T.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (501)	..C.....A.....C.....					[94]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS1)	..C.....T.....C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เบนนี(สปอร์รูปทรงระบด))	..C.....T.....C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(โชน)	..C.....T.....C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(สัน)	..C.....T.....G.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(ก้นน้ำรี)	..C.....C.....T.....C.....C.....					[94]
<i>C. musae</i> (CMG)	..C.....C.....T.....C.....C.....					[94]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เกรฟ)	..C.....TC..C..TGAAAAG..GT.....C..TC..GT..C..					[100]
<i>Colletotrichum</i> sp.(เบนนี(สปอร์รูปรี))	..C.....C..C..TGAAAAG..GT.....CT..TC..GT..C..					[100]
<i>C. capsici</i> (223)	..C.....C..C..TAAAAAG..GT.....CT..TC..GT..C..					[100]

ภาพที่ 14 ความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา

Colletotrichum spp จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย
เทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ข้อมูลจาก DDBJ) จำนวน 13 ไอโซเลท

เครื่องหมาย * แสดงลำดับเบสที่คล้ายกันกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท
AV3/1 และเครื่องหมาย - แสดงตำแหน่ง gap

	110	120	130	140	150]
[					.)
[					
<i>C. gloeosporioides</i> (AV3/1)	GCGGGTCGGCGCCGCCGGAGGATAACCAAACTCTGATTAAACGACGTTT				[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (203)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กนพล)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (จักรพันธ์)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (502)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (นิโพน)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (อ่าโ)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พล)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (สมคิด)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS8)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (CGcofC)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (498/150.28)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (503)	G.....				[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (NT44)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (P2/10)					[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (501)	G.....				[144]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS1)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (เบอนี (สายพันธุ์พารานอร์ม))					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โชน)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (สัน)					[144]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ณัฏฐ์)					[144]
<i>C. musae</i> (CMG)	*-C-A-.....G.....				[143]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กระเทียม)	CG**TGG*.....				[150]
<i>Colletotrichum</i> sp. (เบอนี (สายพันธุ์ปัสคา))	CG**TGG*.....				[150]
<i>C. capsici</i> (223)	CG**TGG*.....				[150]
	160	170	179]		
[					.)
[					
<i>C. gloeosporioides</i> (AV3/1)	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCA				[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (203)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กนพล)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (จักรพันธ์)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (502)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (นิโพน)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (อ่าโ)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (พล)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (สมคิด)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS8)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (CGcofC)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (498/150.28)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (503)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (NT44)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (P2/10)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (501)					[171]
<i>C. gloeosporioides</i> (SAS1)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (เบอนี (สายพันธุ์พารานอร์ม))					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (โชน)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (สัน)					[171]
<i>Colletotrichum</i> sp. (ณัฏฐ์)					[171]
<i>C. musae</i> (CMG)					[170]
<i>Colletotrichum</i> sp. (กระเทียม)	AC.....				[177]
<i>Colletotrichum</i> sp. (เบอนี (สายพันธุ์ปัสคา))	AC.....				[177]
<i>C. capsici</i> (223)	AC.....				[177]

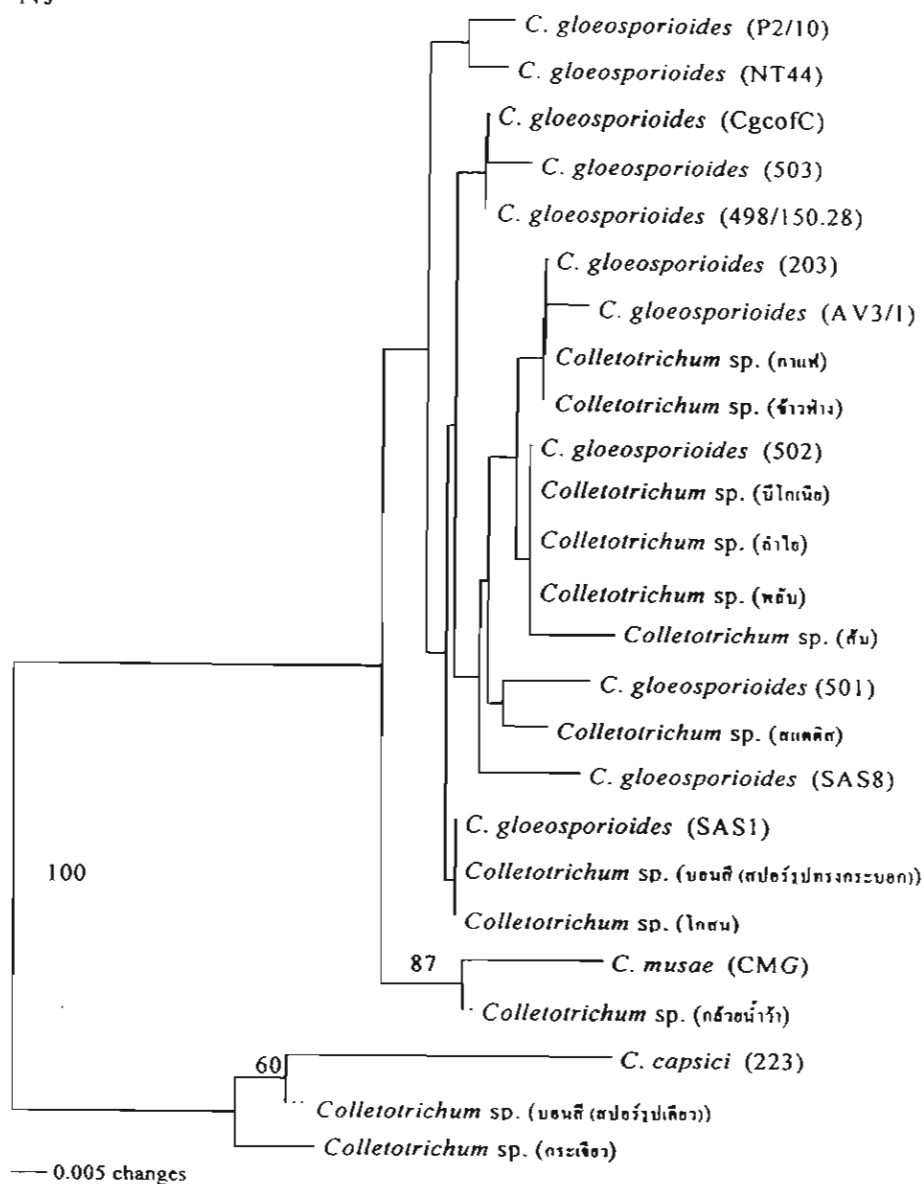
ภาพที่ 14 (ต่อ)

ตารางที่ 7 Genetic distance ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae* และ *C. capsici* เทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 12 ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในประเทศไทย (ครึ่งแถวล่างเป็นจำนวนเบสที่แตกต่างกัน และครึ่งแถวบนแสดงค่า distance coefficient)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 <i>C. gloeosporioides</i> (AV31/1)	0.006	0.006	0.006	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.023	0.023	0.018	0.018	0.023	0.035	0.035	0.029	0.023	0.023	0.023	0.041	0.059	0.118	0.112	0.130	
2 <i>C. gloeosporioides</i> (203)	1	0.000	0.000	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.018	0.018	0.012	0.012	0.018	0.029	0.029	0.023	0.018	0.018	0.018	0.035	0.053	0.112	0.107	0.124	
3 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	1	0	0.000	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.018	0.018	0.012	0.012	0.018	0.029	0.029	0.023	0.018	0.018	0.018	0.035	0.053	0.112	0.107	0.124	
4 <i>Colletotrichum</i> sp. (ศรีน)	1	0	0	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.018	0.018	0.012	0.012	0.018	0.029	0.029	0.023	0.018	0.018	0.018	0.035	0.053	0.112	0.107	0.124	
5 <i>C. gloeosporioides</i> (502)	2	1	1	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.023	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029	0.047	0.118	0.112	0.118	
6 <i>Colletotrichum</i> sp. (อิน)	2	1	1	1	0	0.000	0.000	0.000	0.012	0.023	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029	0.047	0.118	0.112	0.118	
7 <i>Colletotrichum</i> sp. (อิน)	2	1	1	1	0	0	0.000	0.000	0.012	0.023	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029	0.047	0.118	0.112	0.118	
8 <i>Colletotrichum</i> sp. (อิน)	2	1	1	1	0	0	0	0.000	0.012	0.023	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029	0.047	0.118	0.112	0.118	
9 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	4	3	3	3	2	2	2	2	0.023	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.023	0.018	0.012	0.012	0.012	0.029	0.047	0.112	0.107	0.112	
10 <i>C. gloeosporioides</i> (SAS8)	4	3	3	3	4	4	4	4	4	0.018	0.018	0.023	0.035	0.035	0.029	0.023	0.023	0.023	0.035	0.053	0.118	0.112	0.130		
11 <i>C. gloeosporioides</i> (C'GeolC)	3	2	2	2	3	3	3	3	3	0.000	0.006	0.006	0.018	0.018	0.023	0.006	0.006	0.006	0.006	0.023	0.023	0.041	0.112	0.107	
12 <i>C. gloeosporioides</i> (498/150.28)	3	2	2	2	3	3	3	3	3	0	0.006	0.006	0.018	0.018	0.023	0.006	0.006	0.006	0.006	0.023	0.023	0.041	0.112	0.107	
13 <i>C. gloeosporioides</i> (S03)	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	1	1	0.023	0.023	0.023	0.029	0.012	0.012	0.012	0.029	0.029	0.047	0.118	0.112	
14 <i>C. gloeosporioides</i> (NT44)	6	5	5	5	4	4	4	4	4	6	3	3	4	2	0.029	0.012	0.012	0.012	0.012	0.029	0.029	0.047	0.118	0.124	
15 <i>C. gloeosporioides</i> (P2/10)	6	5	5	5	4	4	4	4	4	6	3	3	4	2	0.029	0.012	0.012	0.012	0.012	0.029	0.029	0.047	0.118	0.124	
16 <i>C. gloeosporioides</i> (S01)	5	4	4	4	3	3	3	3	3	5	4	4	5	5	5	0.018	0.018	0.018	0.018	0.029	0.035	0.053	0.124	0.118	
17 <i>C. gloeosporioides</i> (SAS1)	4	3	3	3	2	2	2	2	2	4	1	1	2	2	2	3	0.000	0.000	0.018	0.018	0.035	0.118	0.112	0.118	
18 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	4	3	3	3	2	2	2	2	2	4	1	1	2	2	2	3	0	0.000	0.018	0.018	0.035	0.118	0.112	0.118	
19 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	4	3	3	3	2	2	2	2	2	4	1	1	2	2	2	3	0	0	0.018	0.018	0.035	0.118	0.112	0.118	
20 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	4	3	3	3	2	2	2	2	2	4	4	4	5	5	5	5	3	3	3	0.035	0.053	0.118	0.112	0.118	
21 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	7	6	6	6	5	5	5	5	5	6	4	4	5	5	5	6	3	3	3	6	0.018	0.112	0.107	0.107	
22 <i>C. musae</i> (CMG)	10	9	9	9	8	8	8	8	8	9	7	7	8	6	8	9	6	6	6	9	3	0.119	0.113	0.113	
23 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	20	19	19	19	20	20	20	20	20	19	19	19	20	18	20	21	20	20	20	20	19	20	0.117	0.040	
24 <i>Colletotrichum</i> sp. (นาม)	19	18	18	18	19	19	19	19	18	19	18	18	19	19	19	21	20	19	19	19	18	19	3	0.023	
25 <i>C. capsici</i> (223)	22	21	21	21	20	20	20	20	19	22	21	21	22	20	22	22	21	20	20	20	18	19	7	4	

gloeosporioides ไอโซเลท SAS1 และ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากบอนสีที่มีสปอร์รูปทรงกระบอก และโกสน สำหรับค่า distance coefficient มากที่สุดพบในกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท AV3/1 และ *C. musae* ไอโซเลท CMG (5.9 %) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อราทั้งหมดกับเชื้อราที่ใช้เป็น out group พบว่ามีค่า distance coefficient ตั้งแต่ 10.7 ถึง 13.0 % จาก tree ที่ได้ (ภาพที่ 15) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท ซึ่งเดิม tree ในภาพที่ 13 ได้จัดไว้อยู่ในกลุ่มเดียวกันออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกาแฟ ข้าวฟ่าง บีโกเนีย ลำไย พลับ ส้ม สแตติส บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก) และโกสน ซึ่งจัดรวมอยู่กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 5 ไอโซเลท (203, AV3/1, 502, 501 และ SAS1) กลุ่มที่สองประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้า และเชื้อรา *C. musae* (CMG) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ นี้ น่าจะจัดรวมอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

NJ



ภาพที่ 15 Neighbor-joining tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย เทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ข้อมูลจาก DDBJ) จำนวน 13 ไอโซเลท

แถบเส้นใต้ tree แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (0.005 หมายถึงมีการเปลี่ยนแปลงเบส 1 เบสใน 1,000 ตำแหน่งของลำดับเบส)

6.2.2.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่าง ๆ

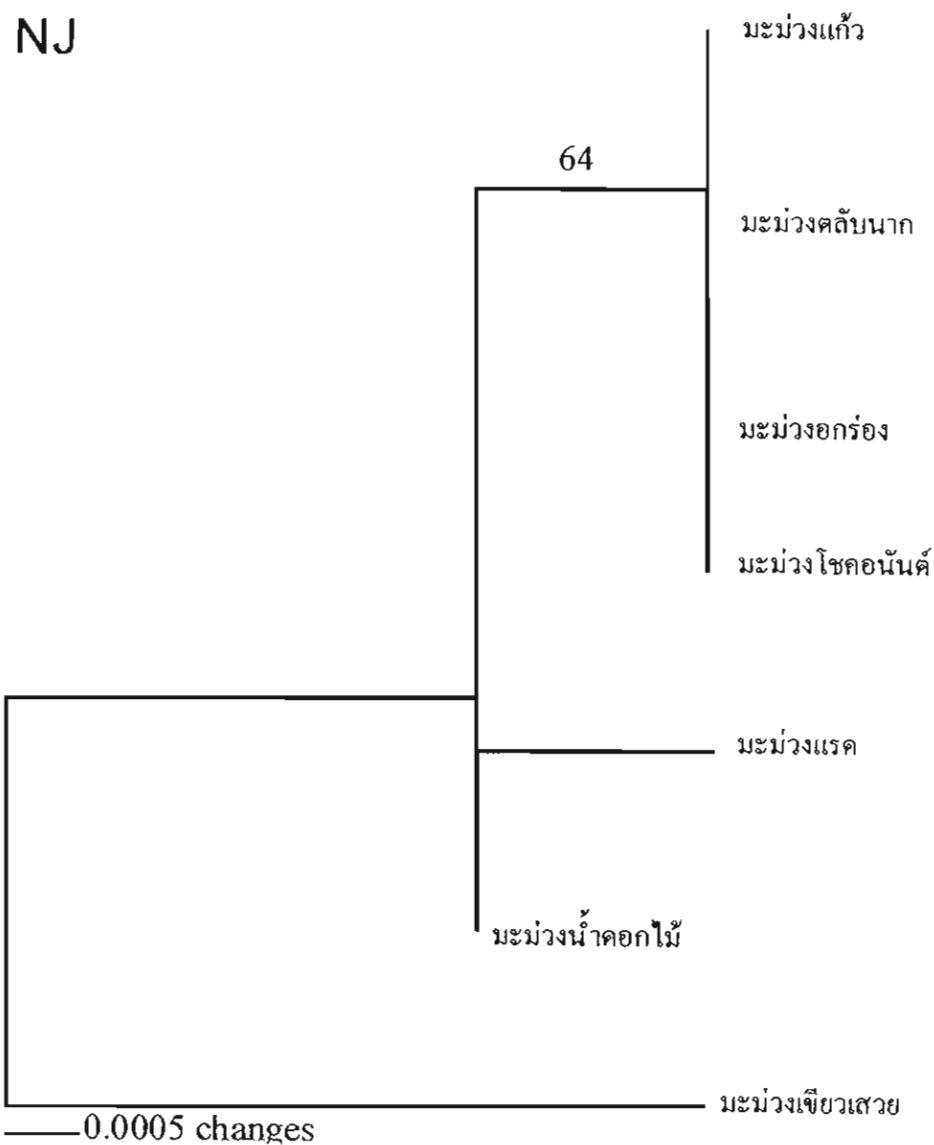
จากการรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วง 7 สายพันธุ์คือ มะม่วง แก้ว แรด ตลับนาค โชคอนันต์ เขียวเสวย อกร่อง และน้ำดอกไม้ นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเขป พบว่า มีลักษณะของโคโลนี เส้นใย ลักษณะและขนาดของ conidia ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนี เส้นใย และโคนิเดียของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่าง ๆ

ลำดับที่	พันธุ์มะม่วง	ลักษณะของเชื้อราที่แยกได้	ขนาดของสปอร์ (μm)
1	แก้ว	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยหยาบ	3.85 x 13.80
2	ตลับนาค	โคโลนีสีเทา พู เส้นใยหยาบ	2.82 x 12.50
3	โชคอนันต์ 2	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยหยาบ	3.10 x 15.17
4	โชคอนันต์ 3	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยหยาบ	3.42 x 12.55
5	โชคอนันต์ 4	โคโลนีสีเทาเข้ม พู เส้นใยหยาบ สร้าง mass สีส้ม	4.30 x 12.23
6	เขียวเสวย 1	โคโลนีสีขาว พู เส้นใยละเอียด	2.50 x 10.95
7	เขียวเสวย 2	โคโลนีสีขาวปนเทา พู เส้นใยหยาบ	3.12 x 11.92
8	อกร่อง 1	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยหยาบ	4.02 x 11.25
9	อกร่อง 2	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยละเอียด	4.37 x 12.00
10	อกร่อง 3	โคโลนีสีขาวปนเทา พู เส้นใยละเอียด	4.42 x 14.25
11	น้ำดอกไม้	โคโลนีสีขาวปนเทา พูเล็กน้อย เส้นใยละเอียด	4.05 x 12.70
12	หนังกลางวัน	โคโลนีสีขาวนวล พู เส้นใยละเอียด	3.20 x 10.25
13	หนองแขง 2	โคโลนีสีเทา พู เส้นใยหยาบ	3.54 x 13.34
14	หนองแขง 3	โคโลนีสีขาวปนเทา พูเล็กน้อย เส้นใยละเอียด	4.50 x 15.25
15	หนองแขง 4	โคโลนีสีขาว พูเล็กน้อย เส้นใยละเอียด	2.92 x 14.82
16	ทองดำ	โคโลนีสีเทาดำ พู เส้นใยหยาบ สร้าง mass สีส้ม	4.36 x 14.52

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เหล่านี้มาสกัดดีเอ็นเอ และนำมาเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ P3 พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 600–700 คู่เบส จึงทำการสกัดแยกนำ PCR products เหล่านี้มาหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Applied Biosystems 373A sequencer และทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม PAUP version 4.0b3 พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความยาวประมาณ 642–643 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบหาค่าความคล้ายคลึงกันโดยใช้โปรแกรม PAUP version 3.1 พบว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. isolates ที่แยกได้จากมะม่วงแก้ว ตลิ่งนาถ อกร่อง และโชคอนันต์มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในช่วงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงแรด 3 คู่เบส แตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้ 3 คู่เบส และแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย 7 คู่เบส สำหรับเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงแรดแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้ 2 คู่เบส และแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย 9 คู่เบส และเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้แตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย 8 คู่เบส เป็นต้น ซึ่งจากลำดับเบสที่ได้ เมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP version 4.0b3 โดยวิธี Distance และวิเคราะห์ค่า distance matrix ด้วยวิธี neighbor-joining โดยทำ bootstrapping จำนวน 1,000 ครั้ง สามารถสร้าง neighbor-joining tree ได้ดังภาพที่ 16

จาก tree ที่ได้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงทั้งเจ็ดพันธุ์ออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงแก้ว ตลิ่งนาถ โชคอนันต์ และอกร่อง โดยมีค่า bootstap สนับสนุน 64 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่สองคือเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงแรด กลุ่มที่สามคือเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้ และกลุ่มที่สี่คือเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย โดยค่า bootstap ที่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จะไม่ปรากฏตัวเลข



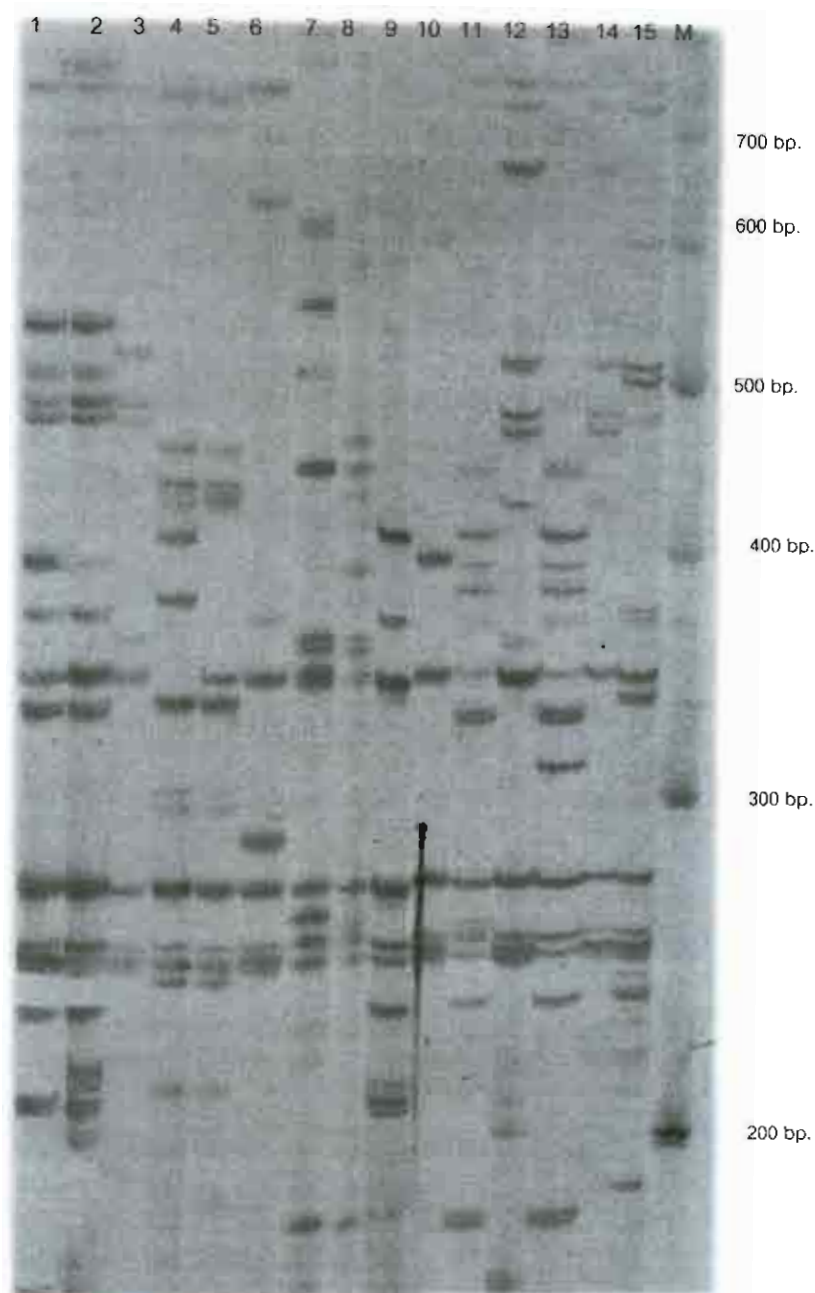
ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 จำนวน 642 คู่เบส ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ 7 สายพันธุ์

สำหรับแถบเส้นใต้ tree แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (0.0005 หมายถึงมีการเปลี่ยนแปลง 5 เบส ต่อ 10,000 ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์)

6.2.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วยเทคนิค AFLP

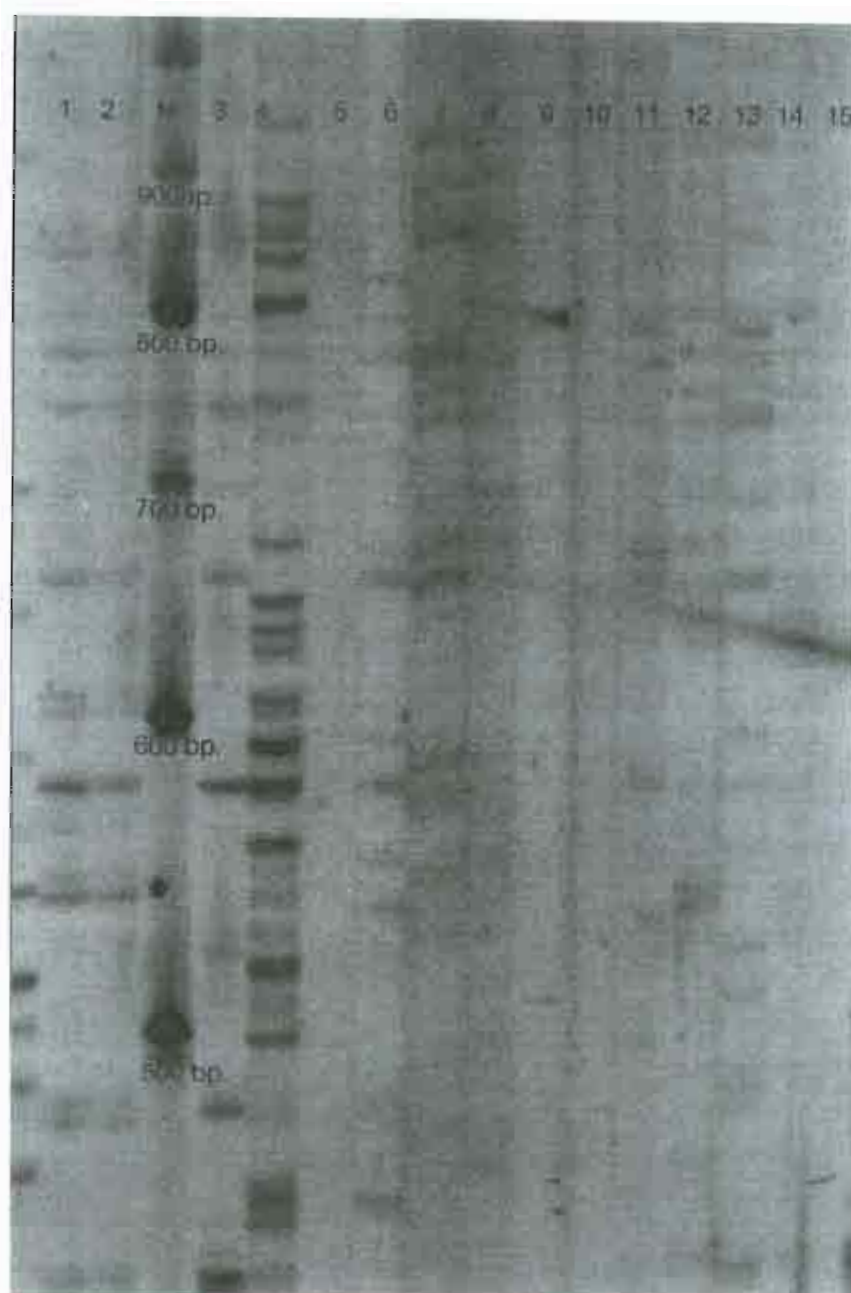
6.2.3.1 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยเทคนิค AFLP

จากการลุ่มนำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ทั้งจากพืชชนิดเดียวกัน เช่น ส้ม และสตอเบอรี่ (อย่างละ 2 ไอโซเลท) และจากพืชต่างชนิดกัน เช่น กาแฟ, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, ทับทิม, ฝรั่ง, มะนาว, ลำไย, พลับ และพริก (อย่างละ 1 ไอโซเลท) จำนวนรวมทั้งสิ้น 15 ไอโซเลท มาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อราเหล่านี้ไอโซเลทละ 500 นาโนกรัมมาย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* (ใช้เอนไซม์อย่างละ 5 unit) โดยเริ่มแรกจะทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยด้วยการลุ่มตรวจ 6 ไอโซเลทจากดีเอ็นเอของเชื้อราตัวอย่างทั้งหมด 15 ไอโซเลท คือ ส้ม 1, ส้ม 2, ทับทิม, กล้วยน้ำว้า, กาแฟ และกล้วยไม้มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถย่อยได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งแสดงว่าดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้มีความเหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไป จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วย enzyme ดังกล่าวทั้ง 15 ไอโซเลท มาเชื่อมต่อกับ adapter ทั้งสองชนิด คือ *EcoRI*-adapter และ *MseI*-adapter แล้วนำไปทำ PCR ครั้งที่หนึ่งโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 คู่เบส คือ *EcoRI*-A/*MseI*-C ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ โดย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วินาที, และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วินาที แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และย้อมสีเจลด้วยวิธี silver stain พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นแถบต่อเนื่องกันเป็นแบนกว้าง (smear band) ที่ไม่สามารถแยกเป็นแบนเดี่ยวๆ หรือนับจำนวนแบนได้ ซึ่งแสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอมีดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ต่อเนื่องกันเป็นจำนวนมากเกินไป จึงต้องนำผลผลิต PCR ครั้งที่หนึ่งมาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยนำมาเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ *EcoRI*-A/*MseI*-CAG, *EcoRI*-A/*MseI*-CAC, *EcoRI*-A/*MseI*-CAT และ *EcoRI*-AC/*MseI*-C โดยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้จะเริ่มต้นที่ 1 รอบของ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที, และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียสในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิลดลงมาที่ 56 องศาเซลเซียส จึงทำปฏิกิริยาต่ออีก 25 รอบ นำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR ครั้งที่ 2 นี้มาตรวจสอบด้วย PAGE อีกครั้ง พบผลผลิตของ PCR ในครั้งที่สองนี้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาวตั้งแต่ 200-1,000 คู่เบส แต่แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจะอยู่ในช่วงความยาวประมาณ 300-800 คู่เบส (ภาพที่ 17-20) ซึ่งสามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทได้



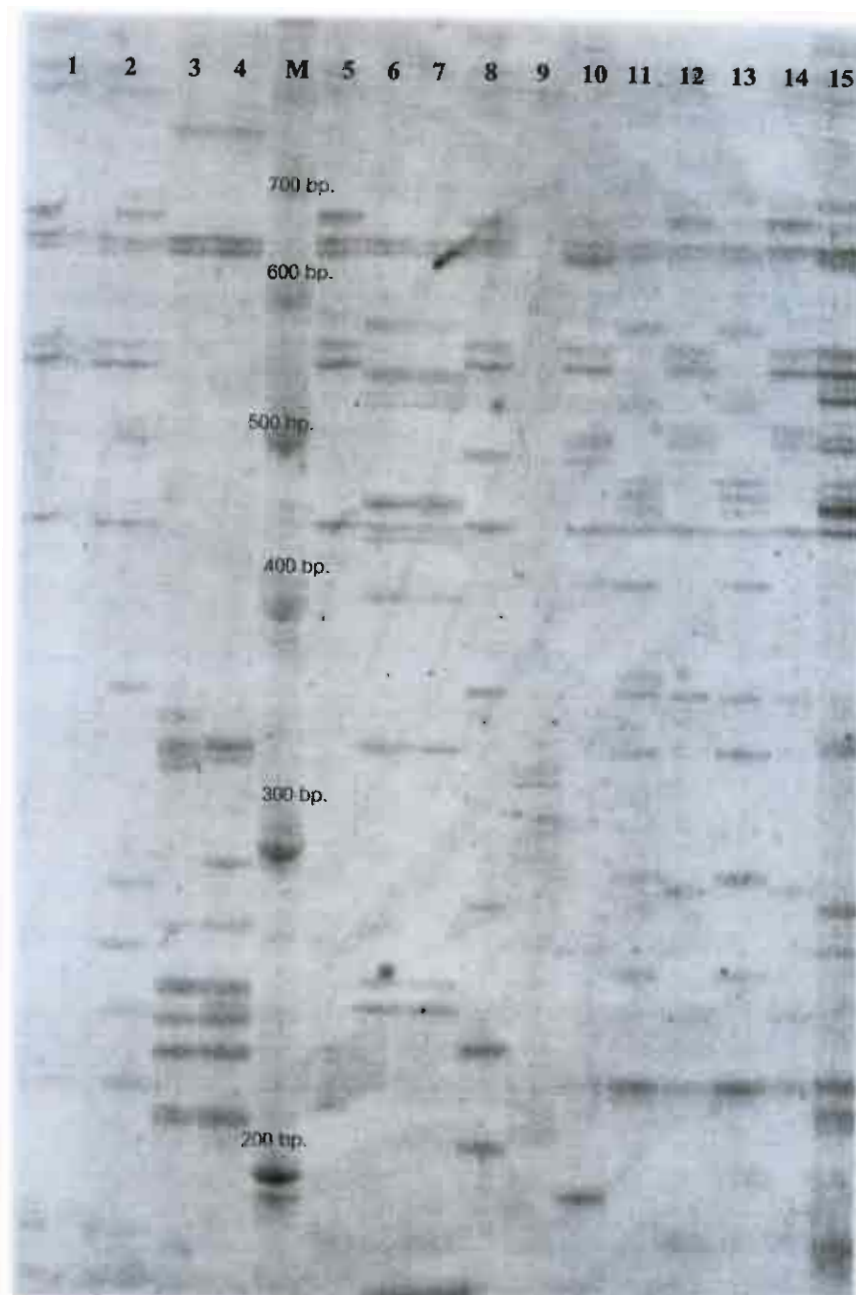
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*-A/*MseI*-CAG

จากภาพ M คือ 100 base pair marker; lane ที่ 1-15 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ 1, สตรอเบอรี่ 2, ทับทิม, ส้ม 1, ส้ม 2, ฝรั่ง, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, ลำไย, พลับ, กาแฟ, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, มะนาว และพริกตามลำดับ



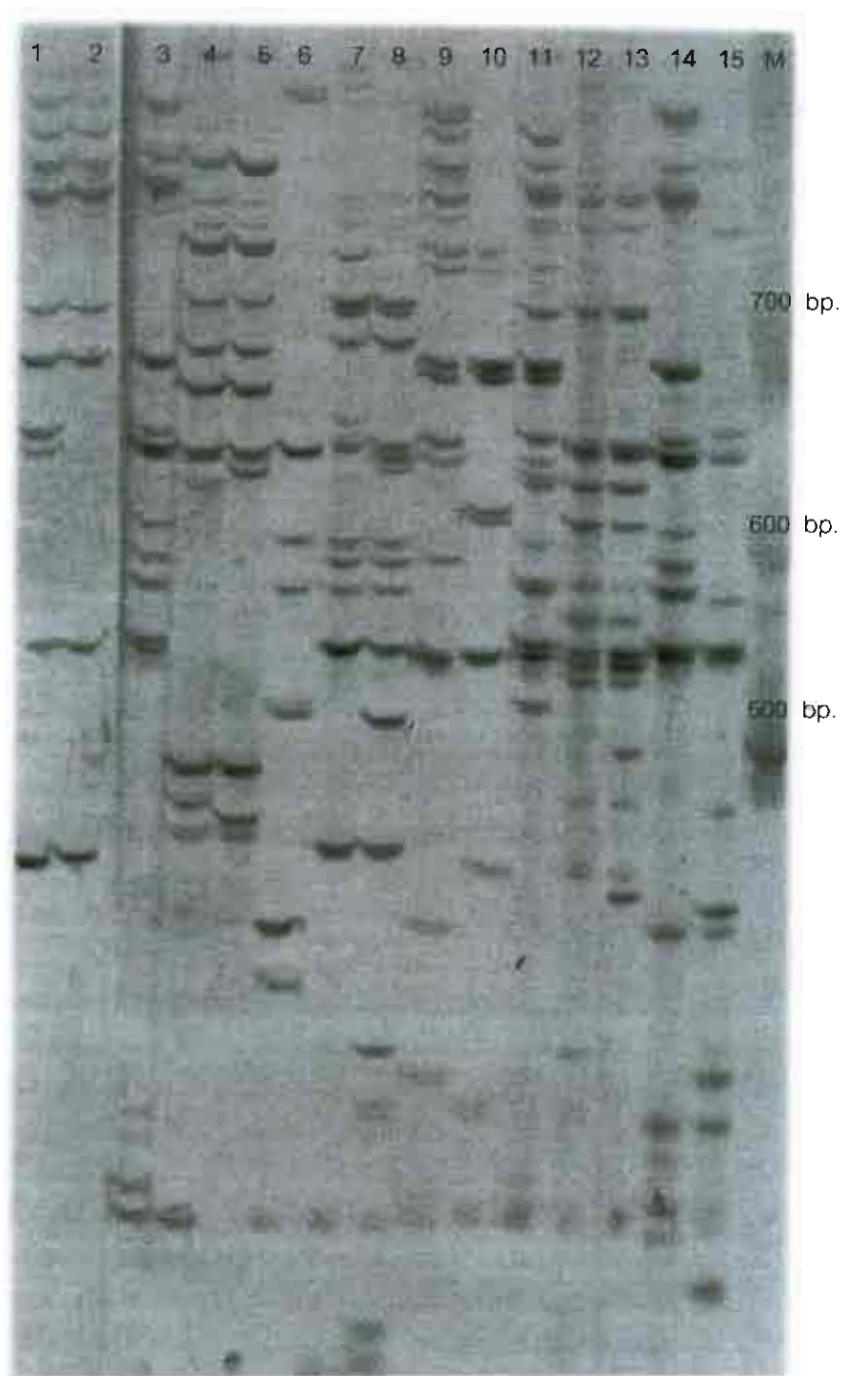
ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*-A/*MseI*-CAC

จากภาพ M คือ 100 base pair marker; lane ที่ 1-15 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากสตอร์เบอร์ 1, สตอร์เบอร์ 2, ทับทิม, ส้ม 1, ส้ม 2, ฝรั่ง, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, ลำไย, พลับ, กาแฟ, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, มะนาว และพริกตามลำดับ



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI-A/MseI-CAT*

จากภาพ M คือ 100 base pair marker; lane ที่ 1-15 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ 1, สตรอเบอรี่ 2, ทับทิม, ส้ม 1, ส้ม 2, ฝรั่ง, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, ลำไย, พลับ, กาแฟ, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, มะนาว และพริกตามลำดับ



ภาพที่ 20 สลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI-AC/MseI-C*

จากภาพ M คือ 100 base pair marker; lane ที่ 1-15 คือสลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอร์ 1, สตรอเบอร์ 2, ทับทิม, ส้ม 1, ส้ม 2, ฝรั่ง, กล้วยหอม, กล้วยน้ำว้า, ลำไย, พลับ, กาแฟ, กล้วยไม้, ข้าวฟ่าง, มะนาว และพริกตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel พบว่าไพรเมอร์แต่ละคู่จะแสดงทั้งแถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์ของสปีชีส์ และที่แสดงความแตกต่างภายในสปีชีส์ โดยที่แถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์ของสปีชีส์ เช่น สายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ *EcoRI*-A/*MseI*-CAC ที่ช่วงความยาวประมาณ 250, 280 และ 350 คู่เบส (ภาพที่ 19) เป็นต้น ส่วนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างภายในสปีชีส์ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ *EcoRI*-A/*MseI*-CAG, *EcoRI*-A/*MseI*-CAC, *EcoRI*-A/*MseI*-CAT และ *EcoRI*-AC/*MseI*-C นั้น จะพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) เป็นจำนวน 48, 27, 50 และ 29 แถบตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1-4) รวมแถบดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างได้ทั้งสิ้น 154 แถบ จึงนำข้อมูลของแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์แต่ละคู่มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc เพื่อจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ต่อไป

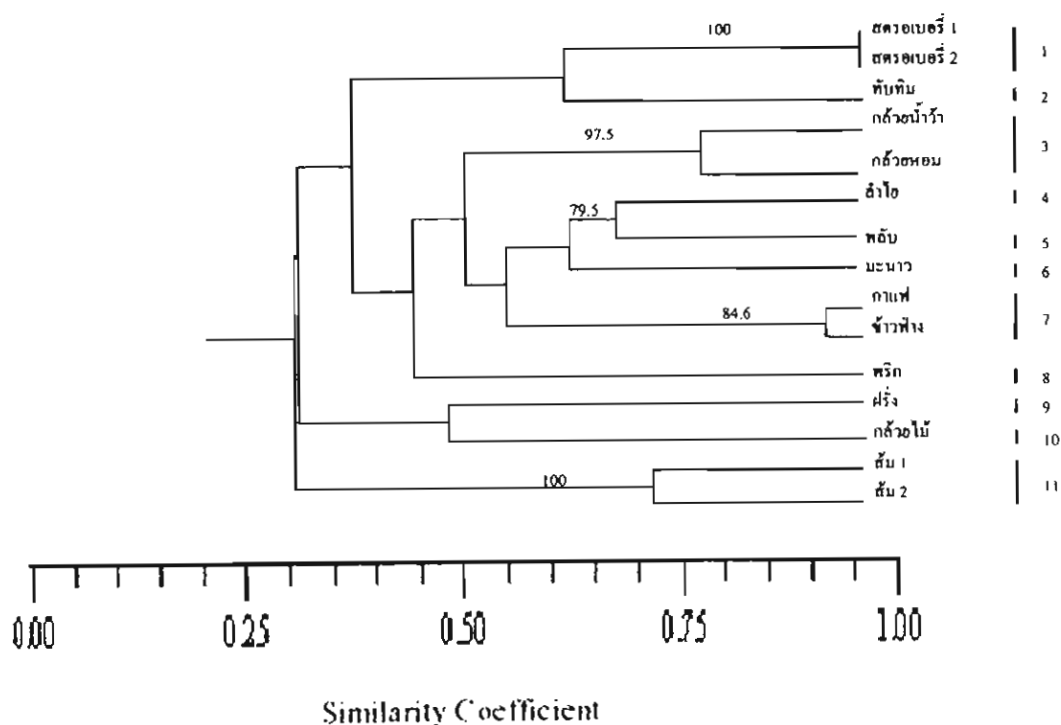
6.2.3.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วยเทคนิค AFLP

จากการนำ polymorphic bands ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่รวมทั้งสิ้น 154 แถบดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทั้ง 15 ไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราดังกล่าวออกได้เป็น 11 กลุ่ม โดยมีค่า similarity เท่ากับ 0.70 ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ของเชื้อรา (อ้างโดยจินตนา, 2543) (ภาพที่ 21) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ 1 และสตรอเบอรี่ 2, กลุ่มที่ 2 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากทับทิม, กลุ่มที่ 3 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า, กลุ่มที่ 4 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากลำไย, กลุ่มที่ 5 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากพลับ, กลุ่มที่ 6 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากมะนาว, กลุ่มที่ 7 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง, กลุ่มที่ 8 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากพริก, กลุ่มที่ 9 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากฝรั่ง, กลุ่มที่ 10 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ และกลุ่มที่ 11 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากส้ม 1 และส้ม 2 ตามลำดับ ซึ่งหากพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดเดียวกัน จะมีความสัมพันธ์กันมากกว่าเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน ยกเว้นในกรณีของเชื้อราที่แยกได้จากข้าวฟ่างและกาแฟ ที่เป็นเชื้อที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกันแต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากจึงถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราต่างกลุ่มทั้ง 11 กลุ่มนั้น พบว่าเชื้อราที่มีความสัมพันธ์แบบ monophytic ได้แก่เชื้อราในกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งแยกได้จากสตรอเบอรี่ และทับทิมตามลำดับ; เชื้อราในกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากลำไย, พลับ และมะนาว ตามลำดับ; เชื้อราในกลุ่มที่ 8 และ 9 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากฝรั่ง และกล้วยไม้ ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากพืชอื่นๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมานี้ ความสัมพันธ์จะเป็นแบบ

paraphytic ดังเช่น ในกรณีของเชื้อราที่แยกได้จากส้มทั้งสองไอโซเลท ที่จาก dendrogram แสดงความสัมพันธ์กับเชื้อราในกลุ่มอื่นๆ เป็นแบบ paraphytic เป็นต้น

นอกจากนี้ จาก dendrogram ที่ได้เมื่อนำไปทำ cluster analysis เพื่อตรวจสอบ goodness of fit โดยใช้โปรแกรม CPH และ MXCOMP พบว่า ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95 ซึ่งแปลความได้ว่า cluster นี้มี goodness of fit ที่ดี หรืออาจกล่าวได้ว่า phylogenetic tree ดังกล่าวนี้น่าจะเป็นที่ยอมรับได้โดยทั่วไป



ภาพที่ 21 Dendrogram การจัดกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ รวม 15 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์หลายพหุมิติเอ็นเอโดยวิธี UPGMA ที่ค่า disc's similarity coefficient เท่ากับ 0.7

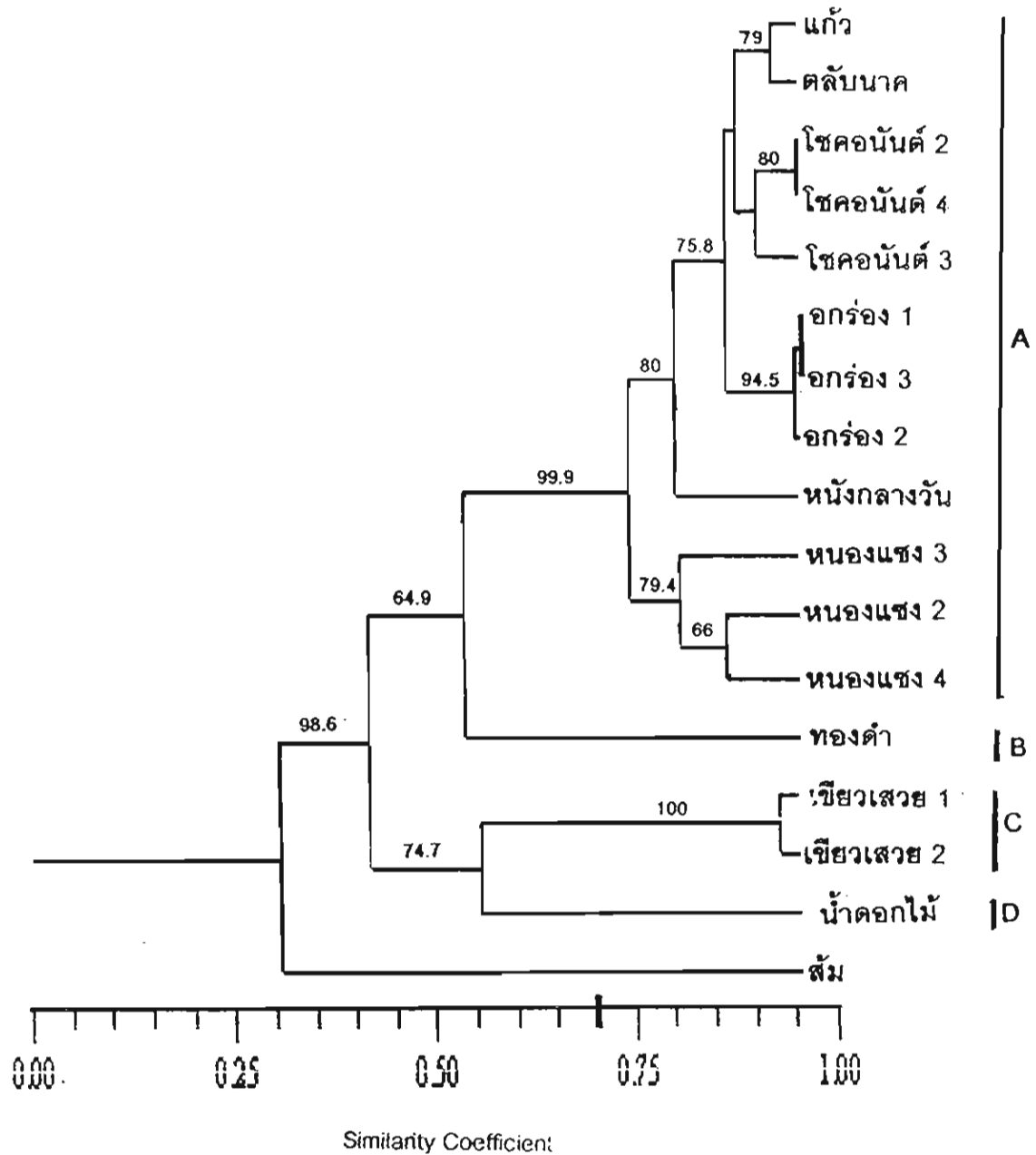
ตัวเลขที่แสดงบน dendrogram คือค่า bootstrap ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Winboot (1,000 ซ้ำ) $r = 0.95$

6.2.3.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วง ด้วยเทคนิค AFLP

จากผลการทดลองที่กล่าวมาพบว่า การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ให้ผลในการจัดจำแนกเชื้อราในระดับสายพันธุ์ได้ ด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อไปนี้ผู้วิจัยจึงทดสอบการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงรวม 16 ไอโซเลท โดยมีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายมะม่วงด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ conditions และไพรเมอร์ต่างๆ ตามแบบอย่างที่ได้วิเคราะห์มาแล้วในหัวข้อ 3.1 และ 3.2 กล่าวคือเริ่มจากนำดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ มาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วย enzyme มาเชื่อมต่อกับ adapter ทั้งสองชนิด คือ *EcoRI*-adapter และ *MseI*-adapter แล้วนำไปทำ PCR ครั้งที่หนึ่งโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ *EcoRI*-A/*MseI*-C ซึ่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ *EcoRI*-A/*MseI*-CAG, *EcoRI*-A/*MseI*-CAC, *EcoRI*-A/*MseI*-CAT และ *EcoRI*-AC/*MseI*-C จากนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR ครั้งที่ 2 นี้มาตรวจสอบด้วย PAGE พบว่าผลผลิตของ PCR ในครั้งที่สองนี้ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 160 แถบ ที่มีลักษณะเป็น polymorphic bands โดยแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสปีชีส์ และยังพบว่าภายในสปีชีส์เดียวกันยังมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่บางส่วนด้วย ซึ่งสามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc

6.2.3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา

เมื่อนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อราในกลุ่มที่เข้าทำลายมะม่วง *C. gloeosporioides* ออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ (ภาพที่ 22) ดังนี้ คือ กลุ่ม A ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากมะม่วงแก้ว, ตลิ่งนาคน, โชคอนันต์, อกร่อง, หนังกกลางวัน และหนองแขง, กลุ่ม B ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงทองคำ, กลุ่ม C ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย และกลุ่ม D ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกจากมะม่วงน้ำดอกไม้ เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยเทคนิค rDNA sequence analysis อีกด้วย



ภาพที่ 22 Dendrogram การจัดกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 16 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี UPGMA ที่ค่า disc's similarity coefficient เท่ากับ 0.7

ตัวเลขที่แสดงบน dendrogram คือค่า bootstrap ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Winboot (1,000 ซ้ำ) $r = 0.9908$

นอกจากนี้ภายหลังจากการหาลำดับเบสของเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ รวมทั้งสิ้น 38 ไอโซเลท (ดังแสดงในภาคผนวก) และนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม พบว่าความสัมพันธ์ของเชื้อราทั้ง 38 ไอโซเลทดังแสดงในภาพที่ 23 โดยสามารถจัดแบ่งเชื้อราทั้ง 38 ไอโซเลทออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้อย่างชัดเจนคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่สร้างสปอร์รูปเคียว หรือพระจันทร์เสี้ยวที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ รวม 7 ชนิดได้แก่ กระเจียว, พริก, เพริน (สปอร์รูปเคียว), แอฟริกกันไวโอเลต, ฟิโลเดนดรอน (สปอร์รูปเคียว), ถั่วเหลือง และบอนสี, กลุ่มที่ 2 นับเป็นกลุ่มเชื้อรากลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบเข้าทำลายพืชอาศัยต่างๆ กันรวมมากถึง 28 ชนิดพืช และเป็นเชื้อราที่สร้างสปอร์รูปไข่ โดยมากสามารถจัดจำแนกได้เป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายพืชต่างๆ ดังนี้ คือ สแตทิส, พริกหวาน, กาแฟ, ข้าวฟ่าง, ลำไย, ดอกแก้ว, กระถิน, บีโกเนีย, พลับ, ฟิโลเดนดรอน (สปอร์รูปไข่), ทับทิม, โกสน, กล้วยไม้, มะม่วง, เพริน (สปอร์รูปไข่), มะม่วงน้ำดอกไม้, มะม่วงเขียวเสวย (isolate 1), มะม่วงโชคอนันต์, มะม่วงตลับนาคร, มะม่วงอกร่อง, สตอร์เบอร์รี่, เบญจมาศ, ส้ม, มะม่วงเขียวเสวย (isolate 2), กล้วยน้ำว้า และกล้วยหอมทอง สำหรับเชื้อราในกลุ่มที่ 3 ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากรากของมะเขือเทศ (*C. coccodes*) และเชื้อรา *C. atramentarium* โดยที่เชื้อราทั้งสองไอโซเลทนี้ต่างก็เข้าทำลายมะเขือเทศในเขตอบอุ่น (แยกได้จากประเทศญี่ปุ่น)

เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ กัน ทั้ง 38 ไอโซเลท มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ใน DDBJ ของประเทศญี่ปุ่นรวม 27 สายพันธุ์ พบว่า ยังคงสามารถจัดแบ่งเชื้อราในประเทศไทยได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ เช่นเดิม ดังแสดงในภาพที่ 24 ซึ่งจากภาพจะพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยในไทยส่วนใหญ่จะแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากประเทศในเขตอบอุ่น (ญี่ปุ่น และอเมริกา)

7. อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ รวม 52 ชนิด 88 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความผันแปรสูงมาก โดยเฉพาะลักษณะโคโลนีซึ่งให้สีตั้งแต่สีขาว ส้ม เขียว หรือเทา และมีการสร้าง conidia ที่มีรูปทรงกระบอกตรง มีขนาดตั้งแต่ 3.00–4.68 (9.89–14.34 ไมครอน สร้าง appressoria ทั้งแบบผิวเรียบและผิวขรุขระ มีขนาดตั้งแต่ 5.70–13.73 ไมครอน โดยเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่มีการสร้าง setae ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นไอโซเลทที่แยกได้จากมะนาวเพียงไอโซเลทเดียว สำหรับ sclerotia พบสร้างเพียงบางไอโซเลทเท่านั้น ซึ่งลักษณะและขนาดของ conidia และ appressoria รวมถึงลักษณะ colony การสร้าง sclerotia และ setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างกัน

สำหรับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่ามีความแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.82–1.72 เซนติเมตรต่อวัน เมื่อมาจัดจำแนกโดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าจากจำนวนเชื้อราทั้งหมด 88 ไอโซเลทที่แยกได้ สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ถึง 54 ไอโซเลทจากพืชอาศัยรวม 22 ชนิด โดยพืชอาศัยที่แยกได้จำนวนเชื้อมากที่สุดคือมะม่วงซึ่งรวมแยกได้ถึง 23 ไอโซเลท นอกจากนี้เป็นเชื้อรา *C. capsici*, *C. coccodes* และ *C. lagenarium* อย่างละ 2 ไอโซเลท, *C. graminicola* 1 ไอโซเลท ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เหลือมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คาบเกี่ยวกันและไม่สามารถจำแนกชนิดได้

สำหรับเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า ที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อรา *C. musae* (Sheriff และคณะ, 1994; Al Zaemey และคณะ, 1993; Sreenivasaprasad และคณะ, 1996) แต่จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ตรวจพบในเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า ในการทดลองนี้พบว่า ทั้งสีของโคโลนี, ขนาด conidia และการสร้าง sclerotia ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเชื้อราที่แยกได้น่าจะเป็นเชื้อ *C. gloeosporioides* อย่างไรก็ตาม Hodson และคณะ (1993) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์กันของเชื้อรา *C. musae* ว่าเป็นความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. gloeosporioides* สูงมาก ซึ่งความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบและการมีพืชอาศัยที่แตกต่างไปอาจจะเป็นเพียงความแตกต่างในระดับ subspecies เท่านั้น ดังนั้นในกรณีของการศึกษาในครั้งนี้จะจำแนกเชื้อราดังกล่าวไว้ใน *C. gloeosporioides* ส่วนในกรณีของเชื้อราซึ่งแยกได้จากข้าวฟ่าง มีรายงานการจัดจำแนกในหลายประเทศว่าเป็นเชื้อ *C. sublineolum* หรือ *C. graminicola* (Sreenivasaprasad และคณะ, 1996; Sheeff และคณะ, 1994) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากเชื้อราในข้าวฟ่างที่นำมาศึกษาอย่างสิ้นเชิง ดังนั้นในเชื้อราที่แยกได้จากข้าวฟ่างในครั้งนี้จะจำแนกไว้เป็นเชื้อ *C. gloeosporioides* ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของพัฒนาและคณะ (2537) สำหรับเชื้อราอื่นๆ นอกนั้นสามารถจำแนกชนิดได้ดังแสดงในตารางที่ 5

สำหรับการศึกษาการแยกสกัดดีเอ็นเอจากการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร PDB เพื่อนำมาสกัดตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจาก Rogers และ Bendich (1988) โดยใช้สาร CTAB พบว่าเส้นใยที่เหมาะสมในการนำมาสกัดดีเอ็นเอควรมีอายุประมาณ 1-2 วัน เนื่องจากเส้นใยยังอ่อน มี polysaccharides น้อย ทำให้การสกัดง่ายและตะกอนดีเอ็นเอที่ได้สามารถละลายได้ง่ายอย่างไร ก็ตามพบว่าในเชื้อราบางไอโซเลท ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ละลายยากแต่ก็สามารถช่วยให้ละลายได้ง่ายขึ้น โดยนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสใน water bath หากดีเอ็นเอยังไม่ละลายอาจแก้ไขโดยเติม buffer ให้มากขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถละลายตะกอนได้หมดทุกตัวอย่าง และสามารถนำมาวิเคราะห์ในลำดับต่อไปได้

การใช้เทคนิค rDNA sequence ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราที่แยกได้นั้น จากการลุ่มนำเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลท มาศึกษาลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS บน rDNA พบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 มีขนาด 171-177 เบส และตำแหน่ง ITS2 มีขนาด 160-162 คู่เบส และที่ตำแหน่ง ITS1 จะมีความผันแปรสูงกว่าตำแหน่ง ITS2 และ 5.8S คือมีความผันแปร ที่ 27.07, 11.73 และ 0.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 จึงน่าจะเหมาะสมในการใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ดีกว่าตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sreenivasaprasad (1996) ที่ได้ศึกษาความคล้ายคลึง (homology) ภายในตำแหน่ง ITS1 ในกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* สปีชีส์ต่างๆพบว่ามีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 58 ถึง 92 เปอร์เซ็นต์ และในการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง สปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อรา *Colletotrichum* และเชื้อรา *N. crassa* ซึ่งทั้งสองจัดอยู่ใน Pyrenomycetes พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 51 ถึง 60 % (Mills และคณะ, 1992a) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ G+C content ในตำแหน่ง ITS1 มีมากกว่าตำแหน่ง ITS2 ซึ่งเปอร์เซ็นต์ G+C นี้มีความสำคัญเพราะสามารถบ่งชี้ความแตกต่างของเชื้อราได้ เช่น Takamatsu และคณะ (1998) รายงานว่าค่าเปอร์เซ็นต์ G+C content ในเชื้อรา *Blumeria graminis* มีค่าน้อยกว่าเชื้อราแป้งพวกที่เป็นปรสิตกับพืชพวกใบเลี้ยงคู่ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *B. graminis* แล้วพบว่า ปกติเชื้อราดังกล่าวมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญต่ำกว่าเชื้อราแป้งอื่น ๆ และเป็นเชื้อรากลุ่มเดียวที่เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แต่ไม่ทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นต้น

ในการวิเคราะห์หาค่า distance coefficient ในตำแหน่ง ITS1 เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยค่า distance coefficient น้อยเท่าไร เชื้อราจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากยิ่งขึ้น จากรายงานที่มีการศึกษาในปัจจุบัน พบว่าในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละสปีชีส์ออกจากกันจะต้องอาศัยค่า distance coefficient ดังแต่

3.6 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Sreenivasaprasad และคณะ, 1996) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *C. linicola* และ *C. destructivum* ควรจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันด้วยมีค่า distance coefficient เพียง 1.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *C. fuscum* และ *C. kahawae* ควรจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเชื้อราทั้งสองสปีชีส์มีความแตกต่างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพียง 0.6 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นต้น ซึ่งจะสอดคล้องกับ Sherriff และคณะ (1994) ที่ได้รายงานการใช้ค่า distance coefficient ที่ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* มาแล้ว

จากการทดลองในครั้งนี้อย่างพบว่า phylogenetic tree ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* 13 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ เทียบกับลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* 17 สปีชีส์ ที่มีรายงานใน DDBJ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราดังกล่าวออกได้เป็นสี่กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบไปด้วยเชื้อรา 9 ไอโซเลทคือ บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก), โกสน, บีโกเนีย, พลับ, ลำไย, กาแฟ, ข้าวฟ่าง, ส้ม และสแตติส ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *C. fuscum*, *C. gloeosporioides* และ *C. kahawae* ด้วยค่า distance coefficient ตั้งแต่ 0.0–3.5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่สองประกอบไปด้วยเชื้อรา *C. musae* และ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้า ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยค่า distance coefficient 1.2 % กลุ่มที่สามประกอบไปด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สองไอโซเลท [คือไอโซเลทที่แยกได้จากบอนสี (สปอร์รูปเคียว) และกระเจียว] และ *C. capsici* โดยมีค่า distance coefficient มากกว่า 3.6 เปอร์เซ็นต์ (คือมีค่า 5.8 และ 7.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) สำหรับค่า distance coefficient ระหว่างเชื้อราไอโซเลทที่แยกได้จากบอนสี และกระเจียวมีค่าเท่ากับ 1.7 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่สี่ประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศ ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C. linicola*, *C. destructivum*, *C. dematium*, และ *C. coccodes* (ค่า distance coefficient เท่ากับ 1.7, 7.6, 8.1 และ 9.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบค่า distance coefficient และผลจาก tree ที่ได้เทียบกับผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบว่า ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ได้ในการทดลองนี้ บางสปีชีส์การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะสอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับเบสที่ได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อราในสปีชีส์ *C. gloeosporioides* ซึ่งเชื้อที่มีการจัดจำแนกอยู่ภายในกลุ่มนี้จะมีค่า distance coefficient ต่ำกว่า 3.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sreenivasaprasad และคณะ (1996) และสอดคล้องกับวิธีการจัดจำแนกโดย Sutton ในปี 1980 ยกเว้นผลจากการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากบอนสี และกระเจียว ซึ่งมีสปอร์รูปลักษณะคล้ายเคียว เมื่อทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลที่ได้คือจัดอยู่ใน *C. capsici* แต่จากค่า distance coefficient ที่ได้มีค่าสูงกว่า 3.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเชื้อ *C. capsici* ที่ใช้อ้างอิง ดังนั้นผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Sreenivasaprasad และคณะ (1996) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการที่เชื้อในสปีชีส์นี้ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดมากนัก และอาจสามารถจัดแบ่ง

ออกจากกันได้อีก (อาจจัดออกเป็นสปีชีส์อื่นๆ ต่างกันไป) ซึ่งเป็นจุดที่น่าจะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต และนอกจากการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วยังมีการนำวิธีการทางโมเลกุลอื่นๆ มาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* เช่น เทคนิค RAPD (Mills และคณะ, 1992) และการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP ตรงตำแหน่ง rDNA และ mtDNA (Hodson และคณะ, 1992; Sreenivasaprasad และคณะ, 1992; 1993) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาจาก tree ที่ได้พบว่า 9 ไอโซเลทของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันถูกจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันคือ *C. gloeosporioides* อย่างไรก็ตามพบว่าภายในสปีชีส์เดียวกันนี้ยังสามารถจัดออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่า เชื้อราในสปีชีส์นี้มีความผันแปรสูง และเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวาง จึงน่าจะมีการจัดแบ่งออกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ (Sreenivasaprasad และคณะ, 1996) ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD ใน 39 ไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถแบ่งเชื้อราเหล่านี้ได้มากกว่า 12 กลุ่ม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับแหล่งของพืชอาศัย และสภาพภูมิประเทศ (Mills และคณะ, 1992) ซึ่งรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ rDNA และ mtDNA ของเชื้อสปีชีส์นี้ด้วยเทคนิค RFLP (Hodson และคณะ, 1992)

เมื่อพิจารณาพืชอาศัยของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp จาก DDBJ พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างตระกูลสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ในขณะที่เชื้อราบางไอโซเลทที่แยกได้จากพืชชนิดเดียวกันอาจแตกต่างกันได้ ดังเช่น เชื้อราที่แยกได้จากกาแฟที่ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท CGcofC ซึ่งแยกได้จากพืชชนิดเดียวกัน แต่กลับไปจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท 203 และ AV3/1 ที่แยกได้จากพืช *Aeschynomene virginica* และ *Persea americana* ตามลำดับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากกาแฟไม่มีความผันแปรมากนักเมื่อเทียบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดอื่นที่พบได้ทั่วไป (Hodson และคณะ, 1992; Sreenivasaprasad และคณะ, 1993) ซึ่งจากการศึกษาโดย Sherriff และคณะ (1994) ได้ทำการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสในตำแหน่ง Domain 1 (D1), D2 และ ITS2 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืช *Aeschynomene virginica*, *Mangifera indica* และ *Malus domestica* สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ อย่างไรก็ตามยังมีรายงานหลายฉบับที่ยืนยันว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันนั้น ส่วนใหญ่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา เช่น การศึกษาถึงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบน rDNA หรือ mtDNA ที่ได้จากเทคนิค RFLP (Hodson และคณะ, 1992) หรือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD (Mills et al., 1992b) จะมีรูปแบบต่างๆ กันไป มีน้อยมากที่จะมีรูปแบบคล้ายกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความผันแปรมากภายในเชื้อรา *C. gloeosporioides* สูงมาก

ในกรณีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมะม่วงรวม 7 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงตลับนาก แรด อกร่อง โชคอนันต์ แก้ว เขียวเสวย และน้ำดอกไม้ มาตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า เมื่อตรวจสอบลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาเชื้อราทั้งเจ็ด isolates จัดเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามวิธีการจัดจำแนกโดย Sutton (1980) เช่นเดียวกับที่มีรายงานในต่างประเทศ (Mills และคณะ, 1992a; Hodson และคณะ, 1993) แต่เนื่องจาก Sutton (1992) ได้รายงานความแตกต่างกันภายในกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยที่การแตกต่างกันนี้มีเพียงเล็กน้อย เช่น ขนาดของสปอร์ เป็นต้น โดยเขาจำแนกเชื้อรานี้ออกเป็นสองกลุ่ม คือ *C. gloeosporioides* (Penz.) และ *C. gloeosporioides* var. *minor* ด้วยเหตุนี้เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ จึงอาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในกลุ่มนี้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง ITS บน rDNA ของเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงทั้งเจ็ดสายพันธุ์ และทำการสร้าง phylogenetic tree พบว่าลำดับเบสที่ได้จากเชื้อราทั้งเจ็ดแบ่งออกเป็นสี่กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างกันของลำดับเบสตั้งแต่ 2-9 คู่เบส โดยเชื้อราที่แยกจากมะม่วงตลับนาก อกร่อง โชคอนันต์ และมะม่วงแก้ว พบว่ามีลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS เหมือนกันทุกประการจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย น้ำดอกไม้ และมะม่วงแรดนั้นพบว่ามีลำดับเบสที่แตกต่างกันไป ทำให้แต่ละ isolates ถูกจำแนกออกไปจากกลุ่มโดยเชื้อราในแต่ละกลุ่มมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันระหว่างกลุ่มตั้งแต่ 93.71 ถึง 98.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาในเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยใช้เทคนิค RFLP แยกความแตกต่างของเชื้อราที่รวบรวมจากพื้นที่ต่างกัน โดยพบว่าจะมีความแตกต่างกันของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบน rDNA และ mtDNA (Mills และคณะ, 1992a; Hodson และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง ITS บน rDNA มาใช้แยกความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดเดียวกัน เช่น *C. acutatum* ที่แยกได้จากสตอร์เบอร์รี่ (Sreenivasaprasad และคณะ, 1992; Freeman และคณะ, 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงต่างสายพันธุ์กันมีลำดับเบสแตกต่างกันไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยาอื่นๆ มาทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมเนื่องจาก rDNA เป็นตำแหน่งของยีนสัณฐาน ซึ่งควรใช้จำแนกชนิดของเชื้อราในระดับ genus และ species ได้ แต่ไม่เหมาะสมในการนำมาทดสอบหาความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบโดยนำเทคนิค AFLP มาศึกษาเปรียบเทียบต่อไป

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* ในครั้งนี้พบว่าสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามในเชื้อรา *Colletotrichum* บางสปีชีส์ เช่น *C. gloeosporioides* นั้นพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ

เชื้อราภายในกลุ่มนี้ได้ และการศึกษาโดยอาศัยเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพียงเทคนิคใดเทคนิคหนึ่งก็ไม่น่าจะเหมาะสมในการที่จะสรุปความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวเพิ่มเติมดังนี้

การใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา

จากการสุ่มนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ รวม 15 ชนิด มาศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer 4 คู่ คือ EcoRI-A/MesI-CAG, EcoRI-A/MesI-CAC, EcoRI-A/MesI-CAT และ EcoRI-AC/MesI-C พบว่าผลผลิตของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดความยาวตั้งแต่ 200–1,000 คู่เบส (base pair) แต่แถบดีเอ็นเอสามารถอ่านได้ชัดเจนจะอยู่ในช่วงความยาว 300–800 คู่เบส และสามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้ จึงทำการตรวจนับแถบดีเอ็นเอโดยพบว่า primer EcoRI-A/MesI-CAG, EcoRI-A/MesI-CAC, EcoRI-A/MesI-CAT และ EcoRI-AC/MesI-C แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) เป็นจำนวนแถบทั้งหมด 48, 27, 50 และ 29 แถบตามลำดับ รวมแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก primer ทั้งสี่ ที่สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างได้ทั้งสิ้น 154 แถบ ซึ่งนับว่าเป็นจำนวนที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานการใช้เทคนิค AFLP ในเชื้อรา *Trichoderma* spp. (จินตนา, 2543) ที่รายงานว่า polymorphic band จำนวนมากกว่า 100 แถบ จะมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อราได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจะเลือกนับเฉพาะดีเอ็นเอที่มีความยาวอยู่ในช่วง 300–800 คู่เบส เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีความชัดเจน อย่างไรก็ตามในกรณีนี้ที่แถบดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันไม่ดี อาจแก้ไขได้โดยใช้ระยะเวลาในการ run มากขึ้น (O' Neil และคณะ, 1997) แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้จำนวน polymorphic band ที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ไม่มีความจำเป็นที่จะเพิ่มระยะเวลาในการ run

ซึ่งจากแถบดีเอ็นเอที่ได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากพืชอาศัยต่างชนิดทั้ง 15 isolates พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวออกได้เป็น 11 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตอเบอรี่ (isolate 1 และ 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 (isolate 1 และ 2) เป็นต้น ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวเห็นได้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* นี้

เป็นเชื้อราที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีความผันแปรภายในสปีชีส์สูง การจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มเชื้อตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจัดจำแนกได้ เมื่อพิจารณาจาก dendrogram พบว่ากลุ่มของเชื้อราที่แสดงความสัมพันธ์เป็นแบบ monophyletic ได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง สตรอเบอร์รี่ และทับทิม และเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม กล้วยน้ำว้า ลำไย และมะนาว ดังนั้นหากพิจารณาในด้านการวางแผนป้องกันกำจัด หรือการคัดพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในพืชทั้งสองกลุ่มควรทดสอบการ cross infection ภายในกลุ่มของเชื้อที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีรายงานการผสมข้ามระหว่างเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากแอลมอนด์ แอปเปิ้ล อโวคาโด มะม่วง pecan (Freeman และ Shabi, 1966) และเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากแอปเปิ้ล พืช pecan โดยพบทุกไอโซเลทที่นำมาทำการทดสอบสามารถผสมข้ามได้ แต่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันไป

สำหรับการนำเทคนิค AFLP มาทดลองใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง 9 สายพันธุ์ รวม 16 ไอโซเลท พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band รวม 160 แถบ ซึ่งสามารถจัดแบ่งเชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลทออกได้เป็น 4 กลุ่ม (cluster analysis ที่ค่า similarity เท่ากับ 0.7) คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงแก้ว (1 ไอโซเลท), ตลิ่งนาคร (1 ไอโซเลท), โชคอนันต์ (3 ไอโซเลท), อกร่อง (3 ไอโซเลท), หนังกวางวัน (1 ไอโซเลท) และหนองแขง (3 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงทองดำ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวย และกลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้ ทั้งนี้จากการสังเกตจากค่า bootstraps ที่สูง และค่า r เท่ากับ 0.9908 ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการจำแนกกลุ่มดังกล่าวสามารถเป็นที่ยอมรับกันได้โดยทั่วไป สอดคล้องกับรายงานของ Gonzalez และคณะ (1997) ที่ได้จัดจำแนกเชื้อรา *C. lindemutianum* ในประเทศเม็กซิโกโดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าเชื้อที่จัดจำแนกได้จากพืชสายพันธุ์เดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และจะแตกต่างจากเชื้อราที่แยกได้จากพืชต่างสายพันธุ์กัน

สำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังไม่แน่ชัด แต่คาดว่า heterokaryosis และ parasexuality อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความผันแปรภายในกลุ่มได้ (Alakakoon และคณะ, 1992) และจากรายงานของ Masel และคณะ (1990) ที่ได้ศึกษาในเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จาก *Stylosanthes* spp. ว่ามีความผันแปรสูง โดยความผันแปรดังกล่าวคาดว่าจะเกิดจาก chromosome rearrangement ระหว่าง somatic growth หรือ parasexual combination และอาจมีผลที่เกิดจาก mutation, insertion หรือ deletion ร่วมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดโครโมโซม และเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการเข้าทำลายพืชอาศัยชนิดหนึ่งๆ ได้สูงขึ้น ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยสูง (อ้างโดย Alakakoon และคณะ, 1992)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเทคนิค AFLP นับเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอในการวิเคราะห์น้อย และผลผลิตของ PCR ให้ผลน่าเชื่อถือ สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อภายในสปีชีส์เดียวกันซึ่งมีพิชอาศัยแตกต่างกันได้

8. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่าง ๆ กันรวม 52 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อราดังกล่าวได้รวม 88 ไอโซเลท โดยจำแนกได้เป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* 54 ไอโซเลท (จากพืชอาศัย 22 ชนิด), เป็นเชื้อรา *C. capsici*, *C. coccodes* และ *C. lagenarium* อย่างละ 2 ไอโซเลท, เป็นเชื้อรา *C. graminicola* 1 ไอโซเลท ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เหลือพบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คาบเกี่ยวกันจึงไม่สามารถจำแนกชนิดได้

เมื่อนำเชื้อราดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการศึกษาด้านอนุชีววิทยา ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Rogers และ Bendich (1988) โดยใช้สาร CTAB พบว่าเส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร PDB ควรที่มีอายุไม่เกิน 2 วัน และผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เหมาะที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค rDNA sequence และ AFLP

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทำการสุ่มมาจำนวน 13 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่เชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ, ข้าวฟ่าง, บีโกเนีย, ลำไย, พลับ, ส้ม, สแตติส, บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก), โกสน, กล้วยน้ำว่า, บอนสี (สปอร์รูปเคียว), กระเจียว และมะเขือเทศ พบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS รวมทั้งบางส่วนของยีนตรงตำแหน่ง 18S และ 28S rDNA มีขนาดประมาณ 639–645 คู่เบส และความผันแปรในตำแหน่ง ITS1 มีมากกว่าในตำแหน่ง ITS2 และ 5.8S (27.07, 11.73 และ 0.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) เมื่อพิจารณา phylogenetic tree ที่ได้ พบว่า เชื้อรา 9 ไอโซเลทที่แยกได้จากกาแฟ, โกสน, ข้าวฟ่าง, บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก), บีโกเนีย, พลับ, ลำไย, สแตติส, และส้ม จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Sutton (1980) และไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วยน้ำว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. musae* แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาได้จัดจำแนกเชื้อราไอโซเลทดังกล่าวอยู่ในเชื้อรา *C. gloeosporioides* สำหรับเชื้อราไอโซเลทที่แยกได้จากบอนสี และกระเจียว ซึ่งมีลักษณะสปอร์คล้ายเคียวถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. capsici* สอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ได้

นอกจากนี้เชื้อไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศจากประเทศญี่ปุ่น พบว่าผลการจัดจำแนกสอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับเบสคือจัดอยู่ในเชื้อรา *C. coccodes*

นอกจากนี้จากการสุ่มนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ รวม 15 ไอโซเลท มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ primer EcoRI-A/MesI-CAG, EcoRI-A/MesI-CAC, EcoRI-A/MesI-CAT และ EcoRI-AC/MesI-C พบว่า primer แต่ละคู่จะให้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอ ที่สามารถใช้บอกความแตกต่างภายในสปีชีส์ และแถบดีเอ็นเอที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสปีชีส์ได้ เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS version 2.0 และนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราในกลุ่มนี้ออกได้เป็น 11 กลุ่ม (ที่ค่า similarity 0.70) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอร์รี่ ไอโซเลทที่ 1 และ 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 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* จัดเป็นเชื้อราที่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำลายพืชอาศัย และมีความผันแปรภายในสปีชีส์สูง ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากข้าวฟ่างและกาแฟ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากและถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเทคนิค AFLP นั้นนับเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสปีชีส์เดียวกันได้ ดังเช่นที่ได้ทดสอบกับเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง 9 สายพันธุ์ดังกล่าวมาแล้ว

9. เอกสารอ้างอิง

- จุลภาค คันทวงศ์. 2541. ดีเอ็นเอเครื่องหมาย: เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สำคัญ, หน้า 6-9. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอนุชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 เรื่อง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช, 12-13 พฤษภาคม 2541. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- จินตนา อิงคินันท์. 2543. การจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 หน้า.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2532. การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการหลักสูตรการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. หน้า 37-41.
- เฉลิมศักดิ์ อังตระกูล. 2534. การจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา และอิเล็กโตรโฟรีซิส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 96 หน้า.
- दनัย บุญเกียรติ และอังสนา อัครพิศาล. 2539. ชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 164 หน้า.
- ทวีสิน กล่อมเกล้า. 2539. การแยกสารต้านเชื้อราในผิวมะม่วง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 65 หน้า.
- ธำนิษฐ์ ภูพัฒน์. 2528. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. อ้างโดย นิศารัตน์ ทวีนุต. 2540. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- นที ขวนสนิท. 2542. สถานการณ์การผลิต-การตลาด มะม่วงปี 42. มะม่วงเพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการส่งออก. หน้า 120-125.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2535. โรคผลเน่าของมะม่วงและวิธีการควบคุมโรค. เคหการเกษตร. 16: 72-75.

นิรมิต ประทุมรัตน์. 2528. เชื้อราสาเหตุโรคพืช. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 96 หน้า.

ประเทือง สง่างศ์. 2538. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่. 764 หน้า.

พรพันธุ์ ภู่อ้อมพันธุ์. 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), น. 39-60. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่อง "การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD" ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 24-28 กรกฎาคม 2538 ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

พิศาล ศิริธร. 2528. โรคแอนแทรคโนสของผลไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*. แก่นเกษตร. 13: 295-300.

พัชรา โพธิ์งาม .2541. การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากข้อมูลระดับโมเลกุล, หน้า 12-22. ในเอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอนุชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 12-13 พฤษภาคม 2541 เรื่อง "การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช" โดยภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชรา โพธิ์งาม. 2541. พันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อราสาเหตุโรคพืช, หน้า 23-30. ในเอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอนุชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 12-13 พฤษภาคม 2541 เรื่อง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

พัฒนา สนธิรัตน์, ประไพศรี พัทธกะไพรวิน, ธนวัฒน์ กำแพงฤทธิรงค์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือ ประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชแห่งประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 156.

เพชรินทร์ สุรฤทธิพงศ์. 2533. อิทธิพลของการใช้ต้นตอพืชตระกูลแตงชนิดต่างๆ ในการเสียบยอดแตงเทศเพื่อป้องกันโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

วิชัย โมศิริรัตน์. 2541. ดีเอ็นเอเครื่องหมายและลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับงานวิจัยด้านโรคพืช, หน้า 1-4. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอนุชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 เรื่อง "การใช้

- เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช" 12-13 พฤษภาคม 2541. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ศศิพันธุ์ ตรีนธิไชย. 2526. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะบางประการในรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 71 หน้า.
- ศุภลักษณ์ หอกระวัด. 2527. เอกสารประกอบการสอนโรคพืชผัก. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 101 หน้า.
- สุชาติ วิจิตรานนท์. 2541. สมุดภาพโรคมะม่วงและการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน. บริษัทเซนเนกาเกษตร เอเชียติ๊กจำกัด, กรุงเทพมหานคร. 30 หน้า.
- สุมิตรา น้อยเอี่ยม. 2540. การควบคุมโรคแอนแทรกโนสมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์โดยวิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 180 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 272 หน้า.
- สุริยวัลย์ เมฆกมล. 2538. ผลของน้ำกรองจากการเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* ที่มีต่อการเจริญของแคลลัสแตงกวา (*Cucumis sativus* Linn.) สามพันธุ์ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 135 หน้า.
- สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. 2540. Advanced Technique of PCR, บทที่ 5. หน้า 14-16. ใน PCR Technology and Application. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เอียน ศิลาอ้อย. 2536. โรคไม้ผล สมุนไพร และการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 263 หน้า.
- เอมอร พงศ์สารักษ์. 2543. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในมะม่วงโดยเทคนิค AFLP. ปัญหาพิเศษปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 35 หน้า.

- Agostini, J. P. 1993. Etiology and epidemiology of postbloom fruit drop of citrus (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Gloeosporium limetticola*; Oreg., Key lime). Plant Pathology 83: 485-490.
- Agostini, J. P. and Timmer, L. W. 1992. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Plant Disease 76: 1176-1178.
- Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology. Academic Press, California.
- Alakakoon, P. W., Brown, A. E. and Sreenivasaprasad, S. 1992. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 44: 93-103.
- Alahakoon, P. W., Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1992. Selection of a genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruits. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 41: 227-240.
- Alexopolous, C. J. 1972. Introductory Mycology. John Wiley Sons. Inc. New York. 613 p.
- Al Zaemey, A. B., Magan, N. and Thompson, A. K. 1993. Studies on the effect of fruit-coating polymers and organic acids on growth of *Colletotrichum musae* in vitro and no post-harvest control of anthracnose of banana. Mycol. Res. 97: 1463-1468.
- Anderson, D. L., Cibbs, A. J and Gibson, N. L. 1998. Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequence. Mycol. Res. 102(5): 541-547.
- Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. pp. 319-399. In: Fusarium: Diseases Biology and Taxonomy. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook (eds). Pennsylvania State University Press, University Park.

- Bailey, J. A. and Jeger, M. J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Patholgy and Control. CAB International, UK.
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J. and Nash, C. 1992. Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. pp. 88–120. *In: Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. J. A. Bailey and M. J. Jeger (eds). CAB International, UK.
- Bailey, J. A., Nash, C., Morgan, L. W., O'Connell, R. J. and TeBust, D. O. 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. *Phytopathology* 86: 1076–1083
- Barnett, H. L. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Co. Minnesota. 241 p.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Macmillan Publishing Co. New York. 218 p.
- Booth, C. 1971. *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycol. Inst. The Eastern Press, Ltd. London. 237 p.
- Booth, C. 1977. *Fusarium: Laboratory Guide to the Identification of the Major Species*. Commonwealth Mycological Institute. England.
- Bridge, P. D. and Arora, D. K. 1998. Interpretation of PCR Methods for Species Definition. pp. 63–84. *In: Application of PCR in Mycology*. P.D. Bridge, D. K. Arora and R. P. Elander (eds.). CAB International. New York.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523–527.
- Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525–564.
- Burks, C. 1997. Molecular Biolgy Databases. pp. 1–30. *In: DNA and Protein Sequences Analysis*. D. Rickwood and B. D. Hames (eds.). Oxford University Press, Oxford.

- Chambers, C., Dutta, S. K. and Crouch, R. J. 1986. *Neurospora crassa* ribosomal DNA: sequence of internal transcribed spacer and comparison with *N. intermedia* and *N. sitophila*. *Gene* 44: 159-164.
- Crowhurst, R. N., King, F. Y., Hawthorne, B. T., Sanderson, F. R. and Choi-Pheng, Y. 1995. RAPD characterization of *Fusarium oxysporum* associated with wilt of angkana (*Pterocarpus indicus*) in Singapore. *Mycol. Res.* 99(1): 14 -18
- Cuba, E. E. and Ames, R. W. 1953. Infection disease of carnation. *in*: Plant Disease. The year of agriculture. Curtis May, Chairman U.S.D.A. Washington, D. C. pp. 583-592.
- Davis, R. D., Boland, R. M. and Howitt, C. J. 1992. Colony description, conidium morphology and the effect of temperature on growing in several countries. *Mycol. Res.* 96: 128-134.
- DNA Database of Japan. 1999. "FASTA searches a protein or DNA sequence data bank version 3.2t 09." (Online). Available <http://www.DDbj.nig.ac.jp> (27 May 2001).
- Duncan, J. M., Cooke, D., Bridge, P. and Toth, R. 1998. Molecular Variability in Sexually Reproducing Fungal Plant Pathogens. pp. 19-39. *In*: Molecular Variability of Fungal Pathogens. P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson (eds.). CAB International, Wallingford, UK.
- Edel, V. 1997. Polymerase Chain Reaction in Mycology: An Overview. pp. 1-20. *In*: Applications of PCR in Mycology. P. D. Bridge, D. K. Arora and R. P. Elander (eds.). CAB International, UK.
- Fabre, J. V., Julien, J., Parisot, D. and Dron, M. 1995. Analysis of diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycol. Res.* 99: 429-435.
- Folkertsma, R. T., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., de Groot, K. E., van Zandvoort, P. M., Schots, A., Gommer, F. J., Helder, J. and Bakker, J. 1996. Gene pool similarities of potato cyst nematode population assaessed by AFLP analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 47-54.

- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M. and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.
- Freeman, S. and Shabi, E. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 395-404.
- Freeman, S., Pham, M. and Rodriguez, R. J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Experimental Mycology* 17: 309-322.
- Gerlach, W. and Nirenberg, H. (ed.). 1982. The Genus *Fusarium* a Pictorial Atlas. Mitteilung Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Fortwirtschaft. Berlin-Dahlem. 209: 1-406.
- Gonzalez, M., Rodriguez, R., Zavala, M. E., Jacobo, J. L., Hernandez, F., Acosta, J., Martinez, O. and Simpson, J. 1997. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 8: 292-299.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F. and Brygoo, Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6: 227-242.
- Gyllenstein, B., Allen, M. and Josefsson, A. 1992. Sequencing of *In Vitro* Amplified DNA. pp. 1-15. In: The PCR Technique: DNA Sequencing. J. Ellingboe (ed.). Eaton Publishing Co., London.
- Hart, L. P. and Endo, R. M. 1981. The effect of time of exposure to inoculum, Plant age, root development, and root wounding on *Fusarium* yellows of celery. *Phytopathology* 71: 77-79.
- Hirata, T. and Takamatsu, S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37: 283-288.

- Hodson, A., Mills, P. R. and Brown, A. E. 1993. Ribosomal and mitochondria DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. Mycol. Res. 97: 329-335.
- Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E. and Seguin-seartz, G. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequence from *Alternaria* species pathogenic to Crucifers. Mycol. Res. 99: 604-614.
- Johnson, D. A., Carris, L. M. and Roger, J. D. 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *C. nupharicola* sp. Nov. on water-lilies (Nymphaea and Nuphar). Mycol. Res. 101: 641-649.
- Kahl, G. 1995. Dictionary of gene technology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 550 p.
- Kiss, L. 1997. Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasite of powdery mildew Fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. Mycol. Res. 101(9): 1073-1080.
- Kraft, J. M. and Huglund, W. A. 1978. A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Phytopathology 68: 273-275.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T. and Kubicek, C. P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycetes *Hypocrea jecorina*. Proc. Natl. Acad.Sci. 93: 7755-7760.
- Kusaba, M. and Tsuga, T. 1995. Phyloeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Curr. Genet. 28: 491-498
- Lipman, D. J. and Pearson, W. R. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441.
- Magie, R. O. and Wilfert, G. L. 1974. Tolerlarncce of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* to benzimidazole fungicides. Plant Disease Reporter 58: 256-259.

- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P. and Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107–1111.
- Manners, J. M., Masel, A., Braithwaite, K. S. and Irwin, J. A. G. 1992. Molecular Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* Pathogenic on the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes*. pp. 250–267. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger (eds). CAB International, UK.
- McDonald, B. A. 1997. The population genetic of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448–453.
- Mills, P. R., Hodson, A. and Brown, A. E. 1992a. Molecular Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates Infecting Tropical Fruits, pp. 269–288. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger (eds). CAB International, UK.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992b. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 137–144.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Muthumeenakshi, S. 1998. Assessing Diversity in *Colletotrichum* and *Trichoderma* species Using Molecular Markers, pp. 105–119. *In: Molecular Variability of Fungal Pathogens*. P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson (eds.). CAB International, Wallingford, UK.
- Moriwaki, J. and Tsukiboshi, T. 2000a *C. dematium* (288810) DNA for ITS (between SSU and LSU rRNA genes). Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AB 046607.
- Moriwaki, J. and Tsukiboshi, T. 2000b *C. dematium* (080025) DNA for ITS (between SSU and LSU rRNA genes). Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AB 046608.

- Moriwaki, J. and Tsukiboshi, T. 2000c *C. linicola* (172.51) DNA for ITS (between SSU and LSU rRNA genes). Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AB 046609.
- Moriwaki, J., Sato, T. and Tsukiboshi, T. 2003 Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience* 44: 47–53.
- Moriwaki, J., Tsukiboshi, T. and Sato, T. 2002 Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 307–320.
- Mueller, U. G. and Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprint. *Tree* 14: 389–393.
- Munaut, F., Hamaide, N., Stappen, J. V., and Maraite, H. 1998. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA marker. *Plant Pathology* 47: 641–648.
- O'Neil, N. R., van Berkum, P., Lin, J. J., Kuo, J., Ude, G. N., Kenworthy, W. and Saunders, J. A. 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology* 87: 745–750.
- Ospina-Giraldo, M. D. 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing Mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* From world-wide sources. *Mycologia* 90: 76–81.
- Page, R. D. M. and Holmes, E. C. 1996. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Ltd, USA.
- Peterson, S. W. 1991. Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequence comparison. *Phytopathology* 81: 1051–1054.
- Ploetz, R. C. 1994. Mango disease caused by fungi, pp. 35–36. *In: Compendium of Tropical Fruit Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota.

- Qi, X., Jiang, G. and Chen, W. 1999. Isolate-Specific QTLs for Partial Resistance to *Puccinia hordei* in Barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 993-996.
- Rehner, S. A. and Samuels, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 98: 625-634.
- Rogers, S. O. and Bendich, A. J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue, pp. 1-10. *In: Plant Molecular Biology Manual A6.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Saha, T., Roy, B. and Nazeer, M. A. 2002a Relationship between *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* infecting Hevea based on rDNA spacer sequences. Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AF448777.
- Saha, T., Roy, B. and Nazeer, M. A. 2002b Relationship between *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* infecting Hevea based on rDNA spacer sequences. Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AF448778.
- Schlick, A., Kuhls, K., Meyer, W., Lieckfeld, E., Borner, T. and Messner, K. 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutation in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 26: 74-78.
- Schumann, G. 1993. Plant disease: their biology and social impact. Van Nostrand Reinhold Press. New York. 350 p.
- Sherriff, C., Whelan, M. J., Arnold, G. M. and Bailey, J. A. 1995. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. *Mycol. Res.* 99: 475-478.
- Sherriff, C., Whelan, J., Arnold G. M., Francois, J. A., Brvgoo, Y. and Bailey, J. A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18: 121-138.

- Sicard, D., Buchet, S., Michalakakis, Y. and Neema, C. 1997. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in wild population of common bean. *Plant Pathology* 46: 355–365.
- Skouboe, P., Frisvad, J. C., Taylor, J. W., Lauvitsen, D., Boysen, M. and Rossen, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequence from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* 103: 873–881.
- Skupski, M. P., Jackson, D. A. and Natvig, D. O. 1997. Phylogenetic analysis of heterothallic *Neurospora* species. *Fungal Genetics and Biology* 21: 153–162.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1992. DNA Sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 265–281.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycol. Res.* 97: 995–1000.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R. and Brown, A. E. 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.* 98: 186–188.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. P., Meehan, B. M. and Brown, A. E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequence. *Genome* 39: 499–512.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes Fungi Imperfect with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Agricultural Bureaux, England.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. pp. 1–26 *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger (eds). CAB International, UK.
- Takamatsu, S. 1998. PCR application in fungal phylogeny, pp. 125–152. *In: Applications of PCR in Mycology*. P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy and R. P. Elander (eds). CAB International, New York.

- Takamatsu, S. 1998. PCR Applications in Fungal Phylogeny. pp. 125–152. *in* : Applications of PCR in Mycology. CAB International. New York.
- Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y. and Nomura, Y. 1999. Phylogenetic relationships of *Microspheara* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Mycoscience* 40: 259–268.
- To-anun, C. Takamatsu, S. and Kunoh, H. (1999) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for fungi, an organism containing high levels of polysaccharide. *Proceedings of The 1st HSA Symposium on Science and Technology*. Chiangmai, Thailand. pp. 117–122.
- Travanty, E. A., Buttonow, L. M., Kane, R. T., Martin, S. B., Gregos, J. S. and Maxwell, D. P. 1998 Application of nuclear rDNA sequences for detection of fungal pathogens of turfgrass. Published Only in DataBase (DDBJ). Accession No. AF 059676
- Vos, P., Hogers, M., Bleeker, M., Van de Lee Reijans, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- Waalwijk, C., de Koning, J. R. A., Baayen, R. P. and Gams, W. 1996. Discordant grouping of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88: 361–368.
- Waller, J. M. 1992. *Colletotrichum* Diseases of Perennial and Other Cash Crops, pp. 167–185. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger (eds). CAB International, UK.
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. and Weiner, A. M. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Co., California.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Queensland.

- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218
- Wheeler, B. E. J. 1972. *An Introduction to Plant Disease*. John Wiley and Sons Ltd. London. 374 p.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds). Academic Press, San Diago.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535
- Williams, P. H. 1981. Fusarium Yellow. *In: Screening Crucifers for Multiple Disease Resistance*. University of Wisconsin, Madison. pp. 124-129.
- Yap, I. and Nelson, R. J. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-based Dendrograms IRRI Discussion Paper Series 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

ภาคผนวก

•
•
•
•



ภาคผนวก

(ก). การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato Carrot Agar (PCA)

มันฝรั่ง	20	กรัม
แครอท	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

มันฝรั่ง และแครอทที่ปอกเปลือกแล้วมาล้างสะอาด จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม จัตุรัสขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุก (อย่าให้ละ) แล้วนำมากรอง ด้วยผ้าขาวบาง เพื่อนำเนื้อมันฝรั่งและแครอทออกไป จากนั้นนำผงวุ้นเทใส่ในน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย แล้วจึงผสมกับน้ำมันฝรั่งและแครอทที่ได้ เติม dextrose คนให้ละลายเข้ากัน ปรับ ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 20 นาที

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Agar	20	กรัม
Dextrose	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือก และล้างให้สะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุก (อย่าให้ละ) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อ มันฝรั่งออก นำผงวุ้นละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร (ต้มจนละลาย) แล้วจึงผสมกับน้ำมันฝรั่งที่เตรียมไว้ จากนั้นเติม dextrose คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

น้ำมันฝรั่งที่ปอกเปลือก และล้างให้สะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุก (อย่าให้ละ) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออก จากนั้นเติม dextrose คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

(ข) การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการทดลอง

1) Ammonium Persulfate 10% (10% APS)

ammonium persulfate	0.03	กรัม
sdH ₂ O	300	มิลลิเมตร

ชั่งสาร ammonium persulfate 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส โดยแช่บนน้ำแข็ง (สารนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ประมาณ 10 นาที)

2) Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1)

Chloroform	24	มิลลิลิตร
Isoamy alcohol	1	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองเข้าด้วยกันและเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหย จากนั้นเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

3) 2X CTAB Buffer

2% CTAB
100 mM Tris (pH 8.0)
20 mM EDTA (pH 8.0)
1.4 M NaCl

นำ CTAB; Cetyltrimethylammonium bromide, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}](\text{CH}_3)_3\text{NBr}$ = 364.46: 2 กรัม, 100 mM Tris (pH 8.0) 10 มิลลิลิตร, 20 mM EDTA (pH 8.0) 4 มิลลิลิตร และ 1.4 M NaCl 28 มิลลิลิตร มาผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, 30 min.)

4) 10X CTAB Buffer

CTAB	10	กรัม
100 mM Tris (pH 8.0)	50	มิลลิลิตร
20 mM EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

1.4 M NaCl

140 มิลลิลิตร

นำ CTAB; Cetyltrimethylammonium bromide, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}](\text{CH}_3)_3\text{NBr}$ = 364.46: 10 กรัม, 100 mM Tris (pH 8.0) 50 มิลลิลิตร, 20 mM EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร, และ 1.4 M NaCl 140 มิลลิลิตร มาผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, 30 min.)

5) 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Dissodium Ethylenediamine Tetraacetate. $2\text{H}_2\text{O}$ 136.1 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย NaOH ให้ได้ pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, 30 min.)

6) Ethanol

70% Ethanol:

100% ethanol	70	มิลลิลิตร
dH ₂ O	30	มิลลิลิตร

75% Ethanol:

100% ethanol	75	มิลลิลิตร
dH ₂ O	25	มิลลิลิตร

100% Ethanol

เจือจาง ethanol ด้วยน้ำกลั่นตามอัตราที่ใช้ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7) Ethidium bromide (10mg/ml)

Ethidium bromide 1 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ใส่ในภาชนะทึบแสง หรือใช้แผ่น aluminum foil หุ้มภาชนะ ปิดให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: ในการเตรียมสารนี้จะต้องใส่ถุงมือและระวังไม่หายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

8) JETSORB Kit (GENOMED, Japan)

A1 solution: มีองค์ประกอบดังนี้ คือ NaClO₄, TBE solubilizer, Sodium acetate

A2 solution: มีองค์ประกอบดังนี้ คือ Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl

9) 6× Loading Buffer

Sucrose	40%
Bromophenol blue	0.25%

Xylene cyanol 0.25%

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10) Loading Dye

Deionized formamide 95 %

Bromophenol blue 0.1 %

EDTA (pH 8.0) 10 มิลลิโมลาร์

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11) 5 M NaCl

NaCl 292.2 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12) 10X Standard PCR Buffer

Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์

KCl 500 มิลลิโมลาร์

MgCl₂ 15 มิลลิโมลาร์

Twin-20 1%

NP-40 0.1%

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

13) 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

Tris 121.2 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

14) 50X Tris-Acetate Buffer (50X TAE buffer)

Tris base 242 กรัม

Glacial acetic acid 57.1 กรัม

0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

15) 10X Tris-Borate Buffer (10X TBE Buffer)

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

16) 5X Tris-Borate Buffer (5X TBE buffer)

Tris base	54	กรัม
boric acid	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

17) TE Buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.02	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

18) 3M Sodium Acetate (pH 5.2)

sodium acetate.3H ₂ O	408.1	กรัม
----------------------------------	-------	------

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย glacial acetic acid และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

19) standard PCR buffer (10X)

- 100 mM Tris-HCl (pH 8.3, 25 องศาเซลเซียส)
- 500 mM KCl
- 15 mM MgCl₂
- 1% Twin-20
- 0.1% NP-40

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

20) 4.5% polyacrylamide gel

* การเตรียม 4.5% polyacrylamide gel stock solution

- acrylamide	76	กรัม
--------------	----	------

- bisacrylamide 4 กรัม

ละลายโดยปั่นบน hot plate แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 ml. นำใส่ขวดสีชาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

* การเตรียม denaturing 4.5% polyacrylamide gel

- 4.5% polyacrylamide stock 5.625 มิลลิลิตร
- 10X TBE 5 มิลลิลิตร
- Urea 21 กรัม
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- 10% Ammonium persulfate 300 ไมโครลิตร
- TEMED 100 ไมโครลิตร

21) Silver staining

- AgNO₃ 1 กรัม
- dH₂O 1 ลิตร
- Formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร

22) Developer

- Sodium carbonate 30 กรัม
- Sodium thiosulphate 0.01 กรัม
- Formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร

23) Sequencing dye

- 98% formaldehyde
- 10 mM EDTA (pH=8.0)
- 0.3% xylene FF.
- 0.3% bromophenol blue

(ค) ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1–5.8S–ITS2 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ

1. กระเจียว (*Curcuma*) (645 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTCAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGTCGTC
CCCTGAAAAGGACGTCTCCCGGCCCCCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCGGAGG
ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
CTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT
GGTGTGTTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGA
GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTCTGCTCTCGCATTGGGATTTCGGAGGGACTCTTGCCGT
AAAACCCCCAATTTATCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
TGAAGCG

2. กระถิน (*White popinac*) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

3.กล้วยน้ำว้า (*Banana cv. numwa*) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTGCAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
CCCGTGACCCTCCCGGCCCCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
GGGGCCCTACAGCAGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

4. กล้วยหอม (*Banana*) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTGCAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
CCCGTGACCCTCCCGGCCCCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT

GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGTTGTT
GGGGCCCTACAGCAGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

5. กล้ายไม้ (Orchid) (640 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGTTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

6. กาแฟ (Coffee) (640 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGTTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

7. โกศน (Garden Croton) (639 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTT
TACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCT
CCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACCA
AACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAA
CAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCA
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGTTGTTG
GGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCT
TTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCC
CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCAAGTGAAGCG

8. ข้าวฟ่าง (Sorghum) (640 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC

TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
 CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
 TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCCAGTGAAG
 CG

9. ดอกนํ้า (Orange Jasmine) Dogkaew (639 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
 ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCCAGTGAAGCG

10. ถั่วเหลือง Soybean (645 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TACCGCTCATCAACCCTTTGTGAACATACCTTAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGCTC
 CCTGAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGG
 ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
 CTTTTAACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT
 GGTGTTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGA
 GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTCTGTCTCGCATTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGT
 AAAACCCCAATTTTACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
 AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
 TGAAGCG

11. พืชทับทิม (Pomegranate) (640 base pairs)

AAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
 TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCCAGTGAAG
 CG

12. บอนสี (สเปิร์มเลีย) (Caladium) (645 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TACCGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTTAAGTGTGCTTCGGCGGGTAGGGCTC
 CCCTGAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGG
 ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
 CTTTTAACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT
 GGTGTTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGA
 GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTTCGTCTCGCATTTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGT
 AAAACCCCAATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
 AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
 TGAAGCG

13. บอนสี (สเปิร์มเลีย) (Caladium) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGCAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGTGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
 CCCCATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
 TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
 CG

14. บีโกเนีย (Begonia) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCCTCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
 ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

15. เบญจมาศ (Chrysanthemum) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGTGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC

CCCAATTCTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

16. พริก (Chili) (645 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCATCAACCCTTTGTGAACATACCTTAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGCGTC
CCCTAAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGG
ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
CTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT
GGTGTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGA
GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTTCGTCTCGCATTTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGT
AAAACCCCCAATTTTACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
TGAAGCG

17. พริกหวาน (Sweet-chili) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCCGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

18. พลัม (Persimmon) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCCGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

19. ฟิโลเดนดรอน (สปรูแปเคีย) (Philodendron) (645 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCATCAACCCTTTGTGAACATACCTTAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGCGTC
CCCTAAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGG
ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
CTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT

GGTGTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGA
GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTTCGTCTCGCATTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGT
AAAACCCCAATTTTACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
TGAAGCG

20. ฟิโลเดนดรอน (สปรูปไข่) (Philodendron) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCTCCCGGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

21. มะเขือเทศ (Tomato) (641 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTAACTGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGGTG
CCGCTGCGGACCCCCCTCCCGGCCCTGCCCTCACGGGCGGAGCGCCCGCCGAGGAT
ACCAAACCTCTATTTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCC
AGCATTTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGT
GTTGGGGCCCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCC
TCCTTTGCGTAGTAACCTAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAA
CCCCAAAATTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAA
GCG

22. มะม่วง (Mango) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

23. มะม่วงเขียวเสวย (Mango) isolate #1 (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCCGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA

ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTCTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

24. มะม่วงเขียวเสวย (Mango) isolate #2 (640 base pairs)

AAGTAAAAGTGGTAACAAGGTGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAG
TTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATCACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT
CTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAAA
CAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTT
AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAG
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
TGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTC
CTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAAC
CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

25. มะม่วงโชคอนันต์ (Mango) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTCTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

26. มะม่วงดลันนาค (Mango) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCAATTCTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

27. มะม่วงน้ำดอกไม้ (Mango) (641 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC

AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAA
GCG

28. มะม่วงทอง (Mango) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

29. มะนาว (Lime) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

30. ลำไย (Longan) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGCGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
AAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCC
TTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACC
CCCCAATTTTCCAAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

31. ส้ม (Orange) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTT
 TCCGGGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCCGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA
 TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
 CG

32. สตรอเบอรี่ (Strawberry) (639 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGTGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCAT
 ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

33. สแตทิส (Statice) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TTACGCTCTACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
 TCCGCGACCCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTGGGCGCCCGCCGGAGGATAACC
 AAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGC
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
 GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
 TTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAAACC
 CCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA
 TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
 CG

34. แอฟริกันไวโอเล็ต (สปรูว์เซีย) (Africanviolet) (645 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
 TACCGCTCATCAACCCCTTTGTGAACATACCTTAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGCGTC
 CCTAAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGGGCGCCCGCCGGAGG
 ATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATAATCAAAA
 CTTTTAACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 GCCAGCATTTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTT
 GGTGTTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGA
 GCCTCCTTTGCGTAGTAACATTTCTGCTCTCGCATTGGGATTCGGAGGGACTCTAGCCGT
 AAAACCCCCAATTTTACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTT

AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAG
TGAAGCG

35. เฟิร์น (Firn) (640 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC
TCCGTGACCCTCCCGGCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCCGCGGAGGATAACC
AACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGC
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCC
TTTGCCTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAACC
CCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
CG

37. *Colletotrichum atramentarium* (641 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTAACTGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGGTG
CCGCCTGCGGACCCCCCTCCCGGCCCTGCCCTCACGGGCGGAGCGCCCCGCCGAGGAT
ACCAAACCTCTATTTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCC
AGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGT
GTTGGGGCCCTACGGTTGACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCC
TCCTTTGCGTAGTAACCTAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAA
CCCCCAAATTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGC
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAA
GCG

38. *Colletotrichum lagenarium* (633 base pairs)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGGAGGTC
CGCCTCCCCCCCCGGCCCCGCTCGCGGGGAGCCCGCGGAGGAAAAACCAACTCTTAT
TTTAACGACGTCCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTTCTGGCG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCTTCC
ACGGCTGACGTGGGCCCTCAAAGACAGTGGCGGACCCTCGCGGAGCCTCCTTTGCGTA
GTAACATACCACCTCGCACCGGGACCCGCAGGGCACTCCTGCCGTAAACCCCCCAAT
TTTTACAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCG

(ง) รายชื่อศูนย์เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

DDBJ

Address: DDBJ, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411 Japan

World Wide Web: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

EMBL

Address: European Bioinformatics Institute,

Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK

World Wide Web: <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank

Address: National Center for Biotechnology Information,

National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bldg 38A,

Room 8N-803, Bethesda, MD 20894, USA.

World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov//>

GSDB

Address: GSDB, National Center for Genome Resources,

1800 Old Pecos Trail, Santa Fe, NM 87505, USA

World Wide Web: <http://www.ncgr.org/gsdb>

(จ) ตารางผนวก

ตารางผนวกที่ 1 AFLP data ของสายพันธุ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ได้จาก primer *EcoRI*-A/*MseI*-CAG โดยให้แถบ polymorphic band 48 แถบ

การ บอริ	ตรวจ บอริ2	พัน พัน	พัน1	พัน2	พัน3	พัน4	พัน5	พัน6	พัน7	พัน8	พัน9	พัน10	พัน11	พัน12	พัน13
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ศตวรรษที่ 10 ค.ศ. 1000	ศตวรรษที่ 11 ค.ศ. 1100	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วย หอม	กล้วย น้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 2 AFLP data ของสายพันธุ์เห็ดเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ได้จาก primer *EcoRI-A/MseI-CAC* โดยให้แถบ polymorphic band 27 แถบ

แถวที่ บน	แถวที่ ล่าง	ทับทิม	ส้ม	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วย หอม	กล้วย น้ำทิ	กล้วย	พริก	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวโพด	มะนาว	พริก
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1

ตารางผนวกที่ 3 AFLP data ของสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ได้จาก primer *EcoRI-A/MseI-CAT* โดยให้แถบ polymorphic band 50 แถบ

แถว เบอร์ 1	แถว เบอร์ 2	ทับทิม	ส้ม 1	ส้ม 2	ฝรั่ง	กล้วย หอม	กล้วย น้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1

ตารางผนวกที่ 4 AFLP data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ได้จาก primer *EcoRI*-AC/*MseI*-C โดยให้แถบ polymorphic band 29 แถบ

[illegible]

ผลที่ได้รับจากโครงการ ฯ

(Output)

ผลที่ได้รับจากโครงการ (Output)

จากการศึกษา "การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจในภาคเหนือของประเทศไทยในระดับโมเลกุล" ดังกล่าวข้างต้น ถึงแม้ว่าผลงานการศึกษาจะได้ผลดีในระดับหนึ่งก็ตาม แต่หากจะนำผลดังกล่าวไปตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ในวารสารต่างประเทศแล้ว ยังคงต้องการข้อมูลด้าน rDNA sequence ของเชื้อราใน genus *Colletotrichum* อื่นๆ ประกอบเพิ่มเติม หรืออาจต้องรวมข้อมูลทั้ง rDNA และ AFLP เข้าด้วยกัน (ยังรอโอกาสที่จะนำผลมาวิเคราะห์เพิ่มเติม ซึ่งอาจจะทำได้ในอนาคตอันใกล้ ทั้งนี้ในขณะนี้ผู้วิจัยต้องเร่งตีพิมพ์ผลงานของเชื้อราแป้งและราสนิม เนื่องจากมีข้อมูลมากพอ) อย่างไรก็ตาม ยังนับว่าโชคดีประการหนึ่งที่ทางผู้วิจัยได้ขอความร่วมมือในการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของ rDNA ของเชื้อรา *Colletotrichum* จาก Prof. Dr. Susumu Takamatsu, Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu 514-8507, Japan ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญด้าน Phylogenetic ของเชื้อราแป้ง ด้วยเหตุนี้จึงได้รับการชักชวนให้เริ่มงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราแป้งในประเทศไทย

ควบคู่ไปกับการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* ด้วย ทำให้ในระหว่างการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* นั้นผู้วิจัยก็ได้เก็บรวบรวมและศึกษาเชื้อราแป้งควบคู่กันไปด้วย และด้วยเหตุนี้ผลงานวิจัยด้านเชื้อราแป้งจึงนับเป็นส่วนหนึ่งที่ได้ใช้งบประมาณจากทางสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประกอบกับทาง Prof. Dr. Takamatsu ซึ่งนับเป็นผู้เชี่ยวชาญด้านเชื้อราแป้งของโลก จึงทำให้มีข้อมูลของเชื้อราแป้งทั่วทุกภูมิภาคของโลก ส่งผลทำให้ผลงานด้านเชื้อราแป้งของไทยสามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อราแป้งอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ทำให้ทราบว่าเชื้อราใดน่าสนใจ หรือเป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน ทำให้สามารถนำผลมาตีพิมพ์เผยแพร่ได้รวดเร็วกว่าผลการศึกษาของเชื้อรา *Colletotrichum* นอกจากนี้ ทาง Prof. Takamatsu ยังได้ให้สนับสนุนอย่างแข็งขันในการขอทุนวิจัยเพิ่มเติมจากมูลนิธิ Hitachi แห่งประเทศญี่ปุ่น จึงทำให้การศึกษาในครั้งนี้ดำเนินมาได้ด้วยดีตลอด ซึ่งผลงานส่วนหนึ่งของการศึกษาเชื้อราแป้งนี้ ยังจะนำไปสัมนาในการประชุมนานาชาติด้านเชื้อราแป้ง (2nd International Conference on Powdery Mildew) ที่ Asilomar Conference Center, UC Davis, 800 Asilomar Boulevard, Pacific Grove, CA 93950, USA. ในระหว่างวันที่ 10-14 ตุลาคม 2547 [หมายเหตุ: งานประชุมดังกล่าวถูกเลื่อนไปจัดในปี 2005] นอกจากผลงานของเชื้อราแป้งดังกล่าวแล้ว ผู้วิจัยยังได้รับเชิญจาก Prof. Dr. Makoto Kakishima, Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN ให้เข้าร่วมในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นๆ อีกด้วย (ภายใต้การสนับสนุนจากทุน JSPS, ประเทศญี่ปุ่น, ดังเอกสารงานวิจัยที่ตีพิมพ์หมายเลข 3 เรื่อง First Report of *Plumeria* Rust, Caused by *Coleosporium plumeriae*, in Thailand). นอกจากนี้ในฐานะที่ Prof. Kakishima เป็นผู้ร่วมจัดการสัมนาเชื้อราแห่งเอเชีย (Asia

Mycological Congress) ที่จะจัดขึ้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 14-19 พฤศจิกายน 2547 จึงได้เชิญให้ผู่วิจัยได้มีโอกาสดำเนินการร่วมสัมมนาในครั้งนี้ด้วย

สำหรับผลงานการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในครั้งนี้ออกรูปได้ดังนี้

I. งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

1. To-anun, C., Limkaisang, S., Fangfuk, W., Sato, Y., Braun, U. and Takamatsu, S. 2003. A new species of *Barsiliomyces* (Erysiphaceae) on *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* from Thailand. *Mycosciences* 44: 447-451.
2. To-anun, C., Engkhaninun, J. and Kakishima, M. 2004. First Report of *Plumeria* Rust, Caused by *Coleosporium plumeriae*, in Thailand. *Natural History J. of Chulalongkorn University* 4(1): 41-46.
3. To-anun, C., Kom-un, S., Sato, Y. and Takamatsu, S. 2005. A new subgenus, *Microidium*, of *Oidium* (Erysiphaceae) on *Phyllanthus* spp. *Mycosciences* 46: 1-8.

II. งานวิจัยที่ได้ไปเผยแพร่ในที่ประชุมนานาชาติ (International Conferences)

1. To-anun, C., Limkaisang, S., Khom-un, S. and Takamatsu, S. 2000. New *Barsiliomyces* species on *Dalbergia cultrata* Grah. ex. Bth. var. *cultrata* in Thailand. *Proceedings of the First Asian Conference on Plant Pathology*, Beijing, China, p. 86.
2. To-anun, C., Sunawan, A., Limkaisang, S., Khom-un, S., Sato, Y. and Takamatsu, S. 2002. New germination type of conidia of powdery mildews found on *Phyllanthus* spp. *Summary of the First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases*, Chiang Mai, Thailand. p. 108.
3. To-anun, C., Fangfuk, W., Khom-un, S., Sato, Y. and Takamatsu, S. 2003. Molecular phylogenetic study of *Brasiliomyces* newly found in Thailand. *Proceeding of the 10th. Tri-University International Joint Seminar & Symposium 2003. Role of Asia in the World, Population, Food, Energy and Environment*. p. 403-408

4. Sato, H. and To-anun, C. 2004. A species of *Leidyomyces* collected from Chiang Mai, Thailand. Abstract of Papers Presented at the 48th. Annual Meeting of the Mycological Society of Japan (MSJ 2004). May 29–30, 2004. Nagasaki, Japan. p. 52.
5. Hakariya, M., Tokumasu, S. and To-anun, C. 2004. Three species of *Haptoglossa* isolated from the samples collected in Thailand. Abstract of Papers Presented at the 48th. Annual Meeting of the Mycological Society of Japan (MSJ 2004). May 29–30, 2004. Nagasaki, Japan. p. 58.
6. Sato, H. and To-anun, C. 2004. Fungus derived from hindgut of passalid beetle. The International Congress of Entomology, August 16–20, 2004. Brisben, Australia. Section 4.
7. To-anun, C., Sunawan, A. and Takamatsu, S. 2004. Powdery mildews of Thailand in the genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium*: Integrated analyses of morphological and molecular characteristics. Proceedings of the 1st. KMITL International Conference on Integration of Science & Technology of Sustainable Development. August 25–26, 2004. Bangkok, Thailand. p. 17–19.
8. Yamaoka, Y., Masuya, H., Chung, W.-H., Goto, H., To-anun, C. and Tokumasu, S. 2004. Two species of *Leptographium* isolated from blue-stained sapwood of *Pinus kesiya* and bark beetle galleries in Thailand. Abstract of Papers, Asia Mycological Congress. November 14–19, 2004., Chiang Mai, Thailand. p. 10.
9. To-anun, C., Kom-un, S. and Takamatsu S. 2004. Powdery Mildews of Thailand: Integrated analyses of morphological and molecular characteristics. Abstract of Papers, Asia Mycological Congress. November 14–19, 2004., Chiang Mai, Thailand. p. 81.
10. Sato, H. and To-anun, C. 2004. Entomogenous fungi collected in Chiang Mai, Thailand. Abstract of Papers, Asia Mycological Congress. November 14–19, 2004., Chiang Mai, Thailand. p. 182.

งานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

FULL PAPER

Chaiwat To-anun · Saranya Limkaisang
Wanwisa Fangfuk · Yukio Sato · Uwe Braun
Susumu Takamatsu

A new species of *Brasiliomyces* (Erysiphaceae) on *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* from Thailand

Received: May 19, 2003 / Accepted: September 4, 2003

Abstract A powdery mildew fungus on leaves of *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* (Fabaceae) collected at the Queen Sirikit Botanical Garden in northern Thailand is proven to be a new species of the genus *Brasiliomyces* and is described as *B. chiangmaiensis* sp. nov. with light and SEM micrographs. Differences in known *Brasiliomyces* species are discussed, and a key to species of this genus is provided.

Key words *Brasiliomyces chiangmaiensis* · *Dalbergia cultrata* · Powdery mildew · Taxonomy

Introduction

The genus *Brasiliomyces* Viégas was first established because of its absence of ascomatal appendages (Viégas 1944). Zheng (1984) reexamined type collections of species of this genus and found scarce, rudimentary appendages, at least in some ascomata. Braun (1987) also examined type collections of *Brasiliomyces* species (excluding *B. setosus*) to confirm that rudimentary ascomatal appendages were present. He distinguished *Brasiliomyces* from *Erysiphe* DC. by its thin-walled (one-layered) peridium, and provided the following circumscription:

"Mycelium superficial, conidial state unknown. Erysiphaceous cleistothecia globoid to depressed-globose, usually fairly small, about 45–80 µm in diam, peridium very thin, composed of only one conspicuous layer, wall yellowish to light brown, semitransparent, appendages very sparsely developed, mycelioid, few, often nearly absent or even lacking, asci more than 1, 2–8-spored."

Only six species of the *Brasiliomyces*, viz., *B. trina* (Harkn.) R.Y. Zheng (North America), *B. entadae* Marasas & Rabie (South Africa), *B. malachrae* (Seaver) Boesew. (South America), *B. setosus* Hodges (Hawaii), *B. cyclobalanopsidis* K.C. Kuo, W.H. Hsieh & L.S. Liu (Taiwan), and *B. kumaonensis* N. Ahmad, A.K. Sarbhoy & Kamal (Northern India), have so far been described (Braun 1987; Hodges 1985; Kou et al. 1992; Ahmad et al. 1998).

In 1999, a species of *Brasiliomyces* was found on leaves of *Dalbergia cultrata* Graham ex Benth var. *cultrata*. This fungus agrees well with the general characteristics of the genus *Brasiliomyces* and is easily distinguishable from the other six species of *Brasiliomyces* by having smaller ascomata and very few asci. *Brasiliomyces chiangmaiensis* C. To-anun & S. Takamatsu sp. nov. is proposed to accommodate this fungus. This is the first record of *Brasiliomyces* species from Southeast Asia. Molecular phylogenetic studies based on rDNA sequence data of this fungus will be reported elsewhere.

Materials and methods

Sample sources

The leaves of *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* with *Brasiliomyces* sp. were collected at the Queen Sirikit Botanical Garden in northern Thailand and examined as fresh material. For comparison, herbarium samples of *B. trina*, *B. malachrae*, and *B. entadae* (IMI 124287) were also examined.

C. To-anun (✉) · S. Limkaisang · W. Fangfuk
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiangmai 50200, Thailand
Tel. +66-53-944021; Fax +66-53-944666
e-mail: agppi006@chiangmai.ac.th

Y. Sato
College of Technology, Toyama Prefectural University, Toyama, Japan

U. Braun
Martin-Luther-Universität, FB. Biologie, Institut für Geobotanik und Botanischer Garten, Herbarium, Halle/Saale, Germany

S. Takamatsu
Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Japan

Light microscopy

Hyphae, ascomata, appendages, asci, and ascospores of the fungal collections were stripped off from the leaf surfaces with a clean needle, mounted on a microscope slide, and examined in water using a light microscope with phase contrast 20 $\times$, 40 $\times$, and 100 $\times$ oil immersion objectives. The following information was noted during the examination of the fresh specimens: size and shape of ascomata, presence or absence of appendages, structure and size of peridial cells, number of asci per ascus, number of ascospores per ascus, size and shape of asci and ascospores, and shape and position of hyphal appressoria. Thirty ascomata were measured per sample.

Observation of ascospore germ tubes was conducted by the method described by Hirata (1942). The inner surface cell layer of onion scales was cut with a razor to a size of 1 cm² and stripped off by a clean forceps. The cell layer was kept in 80% ethanol for more than 2 weeks and rinsed with tap water for 30 min before use. The cell layer was put on a microscope slide, followed by removing the excess water with a filter paper, and inoculated with ascospores. The inoculated cell layer was floated on distilled water in a petri dish and incubated at 20 $^{\circ}$ –25 $^{\circ}$ C for 24 h until microscopic observation.

Scanning electron microscopy

Small pieces of leaf specimens were placed on a glass slide. The leaves were fixed with OsO₄ vaporized from 1% solution in a watch glass at the bottom of a glass box until the specimens were darkened. The glass box was tightly sealed with Parafilm during fixation. The lid of the box was slightly opened to allow the vapor to be released and also the specimens to be dried in a chemical hood. The specimens were attached to an aluminium stub with silver paste and coated with gold using an ion-sputter (model E-1010; Hitachi, Tokyo, Japan). They were observed with a scanning electron microscope (model S-4000; Hitachi) at accelerating voltage 15 kV.

Results and discussion

Taxonomy

Brasiliomyces Chiangmaiensis C. To-anun & S. Takamatsu, sp. nov.

Mycelium amphigenum, plerumque epiphyllum, persistens, maculis irregularibus, albidis formans; hyphae 3–4 μ m latae; appressoria papillata vel oblongato-clavata; conidiophora et conidia incognita; ascomata sparsa vel gregaria, globosa, (35–)38–45(–48) μ m diam., tenuitunicata, peridio flavido vel pallide brunneo, sublucido, ex cellulis daedaleoidibus (10–)15–20 μ m latis composito; appendices 2–6, simplices, mycelioides, saepe ramosae, tenuitunicatae, non septatae, hyalinae, ad basim brunneae, 5–30 $\times$ 3–5 μ m; asci 2, claviformes, 33–40(–45) $\times$ 27–35 μ m; ascospores 6, ellipso-

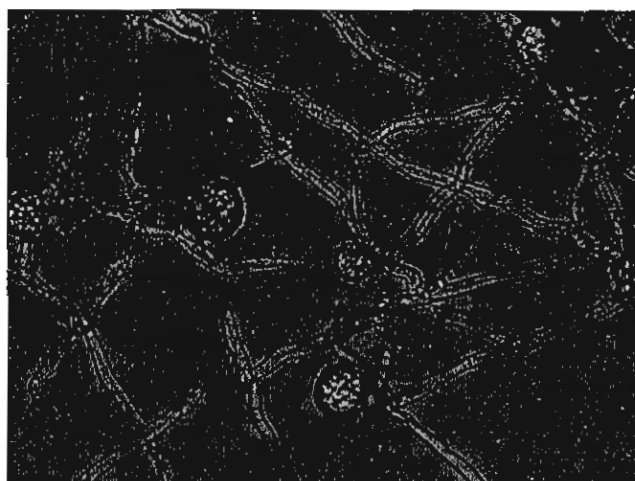


Fig. 1. Mycelia, appressoria, and young ascomata of *Brasiliomyces Chiangmaiensis*. Bar 20 μ m

ideae vel ovoideae, olivaceae vel pallide viridulae, guttulate, laeves, 15.5–18.2 $\times$ 8.5–10.5 μ m.

Holotype: on *Dalbergia cultrata* Graham ex Benth var. *cultrata* (Fabaceae), northern Thailand, Queen Sirikit Botanical Garden, 1999, C. To-anun (HAL1741). Isotype: MUMH 1487.

Mycelium amphigenous, mainly epiphyllous, persistent, forming irregular white patches. Hyphae hyaline, superficial, almost straight to somewhat undulate, 3–4 μ m wide, branching at right or narrow angles. Appressoria well-developed, nipple- (Fig. 1) to oblong club-shaped (Fig. 2), single or occasionally opposite in pairs. Conidiophores and conidia unknown. Ascomata scattered to gregarious, (35–)38–45(–48) μ m diameter (average, 41.4 μ m); cells of the wall daedaleoid when mature, (10–)15–20 μ m diameter; peridium thin, one-layered, yellowish to light brown, semi-transparent, with few basal appendages (2–6, sometimes lacking), mycelioid, thin-walled, hyaline, sometimes pale brown near the base, aseptate, often branched, coral-like, almost uniform in width, shorter than the ascum diameter, 5–30 $\times$ 3–5 μ m. Asci two, sessile or short-stalked, thin-walled, 33–40(–45) $\times$ 27–35 μ m (average, 38.1 $\times$ 31.5 μ m), 6-spored. Ascospores ellipsoid-ovoid, olivaceous to pale greenish due to oil drops, 15.5–18.2 $\times$ 8.5–10.5 μ m (average, 17.5 $\times$ 9.3 μ m).

The colonies of *B. Chiangmaiensis* can be found on both sides of leaves of *D. cultrata*, but they are more abundant on the upper leaf surface, which is similar to the other species of *Brasiliomyces* (Braun 1987) except *B. setosus* (Hodges 1985). They are at first whitish, and later turn brownish during the formation of ascumata, which often cover the entire surface of the leaves. Lacking the conidial state is very characteristic for *Brasiliomyces*. At present, there are only two genera of powdery mildews without any conidial states, *Brasiliomyces* and *Typhulochaeta*. *Brasiliomyces* is unique among the genera of powdery mildews in producing abundant ascumata without any conidial state in tropical climates (Hanlin and Tortolero 1984), whereas most other

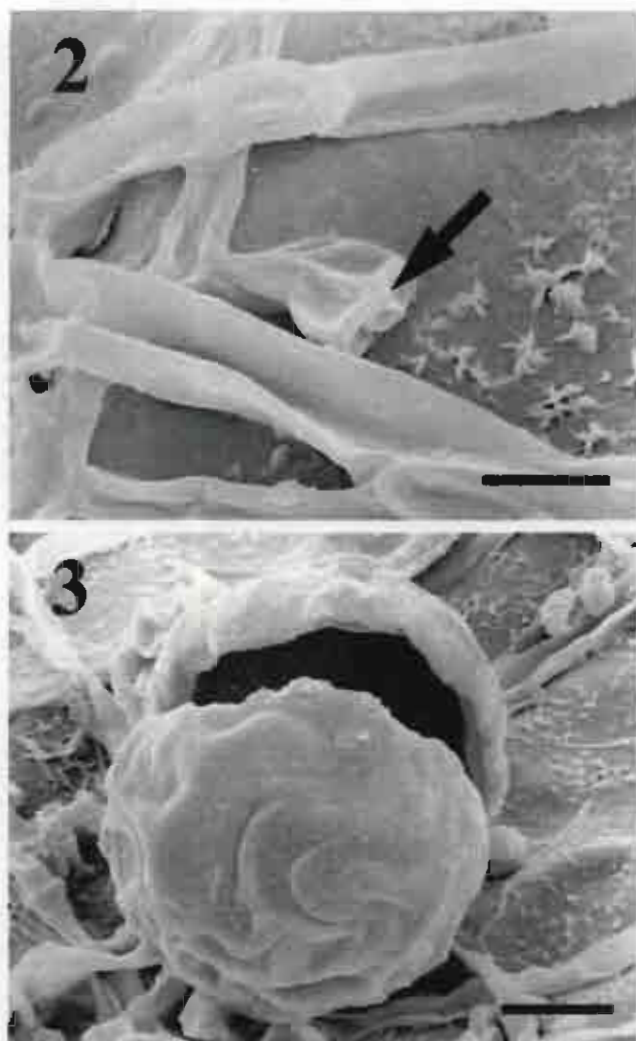


Fig. 2. Scanning electron micrograph of an appressorium, oblong club-shaped (arrow), of *Brasiliomyces chiangmaiensis*. Bar 5 μ m

Fig. 3. Scanning electron micrograph of an ascoma of *Brasiliomyces chiangmaiensis*. Bar 10 μ m

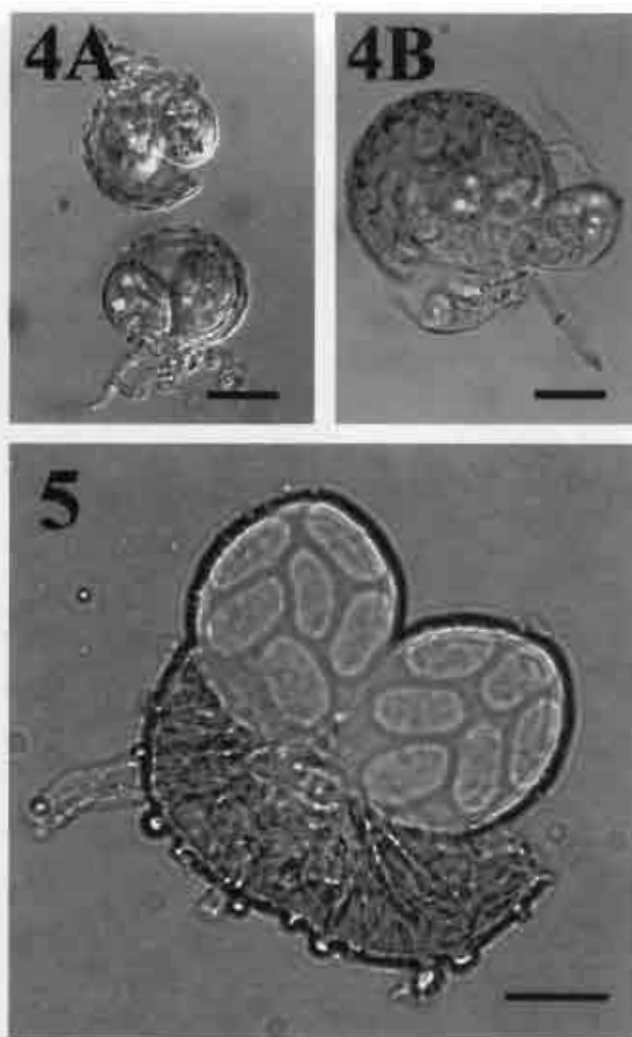


Fig. 4. Ascomata and asci of *Brasiliomyces chiangmaiensis* (A) and *B. entadae* (B). Bars 20 μ m

Fig. 5. Asci and ascospores of *Brasiliomyces chiangmaiensis*. Bar 10 μ m

powdery mildews in this area form only conidia without ascomata (Boesewinkel 1980).

The ascomata (Figs. 3, 4A) of *B. chiangmaiensis* are globose and very small, 38–45 μ m (48 μ m, maximum) diameter. These very small ascomata are unique compared with the hitherto known species of the genus *Brasiliomyces*, in which the size of ascomata ranges from 50 to 70 μ m (Braun 1987; Hodges 1985). Furthermore, *B. chiangmaiensis* differs from the other species of *Brasiliomyces* in having only two asci containing six ascospores per ascoma (Fig. 5).

Characteristics of the present fungus indicate that this fungus belongs in the genus *Brasiliomyces*, and it distinctly differs from the six *Brasiliomyces* species in its size of ascomata and number of asci. *Brasiliomyces chiangmaiensis* is close to *B. entadae* Marasas & Rabie (IMI 124287), which

is also reported to occur on a legume (Fabaceae). Therefore, the differences between the two fungi have been examined in detail; the results are shown in Table 1.

At present, *Brasiliomyces* comprises seven species, i.e., *B. setosus*, *B. trina*, *B. malachrae*, *B. entadae*, *B. cyclobalanopsidis*, *B. kumaonensis*, and *B. chiangmaiensis*, which can be distinguished as follows.

Key to the species of *Brasiliomyces*

1. Mycelium hypophyllous, with a large number of setae produced along the upper sides of hyphae, usually three asci per ascoma, asci (4–)5–6-spored, parasitic on Sapindaceae (*Sapindus oahuensis*), Hawaii *B. setosus*
- 1'. Mycelium mainly epiphyllous, without setae on hyphae 2

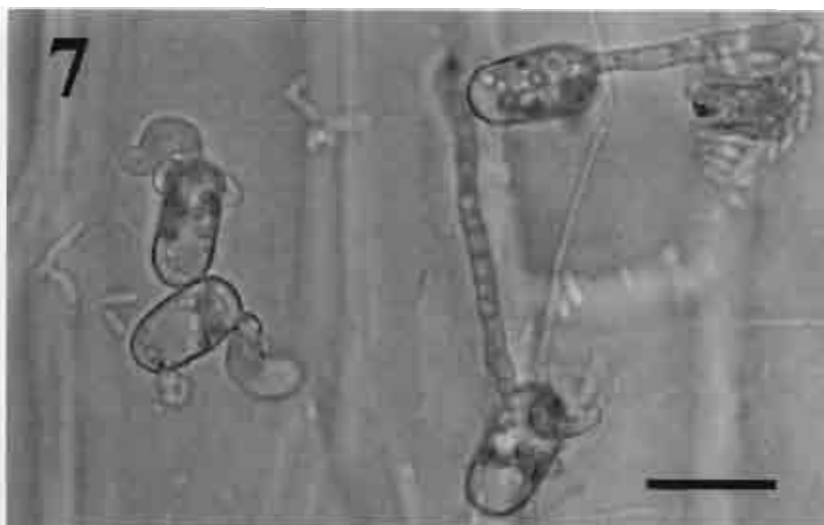
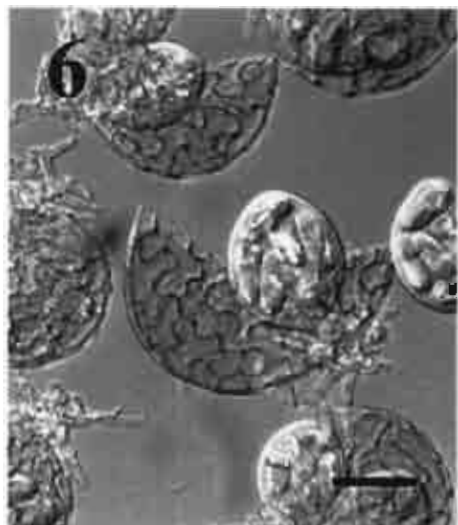


Fig. 6. Peridium cells of ascoma of *Brasiliomyces chiangmaiensis*. Bar 20 µm

Fig. 7. Germination of ascospores of *Brasiliomyces chiangmaiensis* on onion epidermal cells. Bar 20 µm

Table 1. Characteristics of *Brasiliomyces entadae* (IMI 124287) and *B. chiangmaiensis*

Main characteristics	<i>B. entadae</i>	<i>B. chiangmaiensis</i>
Diameter of ascomata	(45–) 50–75 (–80) µm	(35–) 38–45 (–48) µm
Number of asci	(3–) 4–5	2
Size of asci	45–55 (–65) × 30–40 µm	33–40 (–45) × 27–35 µm
Host family/subfamily and species	Fabaceae/Mimosoideae (<i>Entada spicata</i>)	Fabaceae/Faboideae (<i>Dalbergia cultrata</i>)
Distribution	South Africa	Southeast Asia (Thailand)

2. Ascomata small, 26–45(–48) µm diameter, containing only 2 asci 3
- 2'. Ascomata 45–95 µm diameter, containing (2–)3–5 asci 4
3. Appendages none, perithecial wall composed of flattened cells with short protuberances on the surface of ascoma, asci 8-spored, parasitic on Fagaceae (*Cyclobalanopsis glauca*), Taiwan *B. cyclobalanopsidis*
- 3'. Appendages 2–6, cell of perithecial wall daedaleoid, asci 6-spored, parasitic on Faboideae (*Dalbergia cultrata* var. *cultrata*), Southeast Asia (North Thailand) *B. chiangmaiensis*
4. Parasitic on Fagaceae 5
- 4'. Parasitic on host families other than Fagaceae 6
5. Ascomata comparatively large, 80–90(–95) µm diameter, asci 4–6-spored, parasitic on *Quercus* sp., North India *B. kumaonensis*
- 5'. Ascomata smaller, 50–70 µm diameter, asci 2-spored, ascospores large, up to 40 µm in length, parasitic on *Quercus agrifolia*, North America *B. trina*
6. Asci (2–)4–5-spored, cells of ascomatal wall irregularly polygonal, parasitic on Malvaceae, South America *B. malachrae*

- 6'. Asci 5–8-spored, ascomatal wall daedaleoid, parasitic on Mimosoideae (*Entada spicata*), South Africa *B. entadae*

Acknowledgments This work was financially supported by the Hitachi Scholarship Foundation, the Thailand Research Fund (PDF/47/2542), and a grant-in-Aid for Scientific Research (Nos. 13660047, 14255004, and 15405021) from Ministry of Education, Science and Culture of Japan. The authors wish to thank Dr. John C. David, manager of the Identification Service & Herbarium, CABI Bioscience UK, Centre-Egham, UK, for his kind support for the sample of *Brasiliomyces entadae* (IMI 124287). We are indebted to Prof. Dr. Hitoshi Kunoh for his kind advice on preparation of the sample for the SEM studied. Special thanks are due to Mr. Masafumi Shimizu and Ms Akane Meguro for technical training on the SEM facilities.

References

- Ahmad N, Sarbhoy AK, Kamal (1998) A new variety and two new species of powdery mildews from India. *Mycol Res* 102:30–32
- Boesewinkel HJ (1980) The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). *Bot Rev (Lancaster)* 46:167–224
- Braun U (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beih Nova Hedwigia* 89:1–700

- Hanlin RT, Tortolero O (1984) An unusual tropical powdery mildew. *Mycologia* 76:439-442
- Hirata K (1942) On the shape of the germ tubes of Erysipheae. *Bull Chiba Coll Hortic* 5:34-49
- Hodges CS Jr (1985) Hawaiian forest fungi. VI. A new species of *Brasiliomyces* on *Sapindus oahuensis*. *Mycologia* 77:977-981
- Kuo KC, Hsieh WH, Leu LS (1992) *Brasiliomyces cyclobalanopsidis* sp. nov., a new powdery mildew on *Cyclobalanopsis glauca*. *Mycol Res* 96:702-703
- Viégas AP (1944) Algas fungos do Brasil. II. Ascomycetos. *Bragantia* 4:1-392
- Zheng RY (1984) The genus *Brasiliomyces* (Erysiphaceae). *Mycotaxon* 19:281-289

First Report of Plumeria Rust, Caused by *Coleosporium plumeriae*, in Thailand

CHAIWAT TO-ANUN¹*, NIPHON VISARATHANONTH²,
JINTANA ENKGHANINUN³ AND MAKOTO KAKISHIMA³

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiangmai 50200, THAILAND

² Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900, THAILAND

³ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, JAPAN

ABSTRACT.—*Coleosporium plumeriae* Pat. is a rust fungus (Melampsoraceae) found on *Plumeria* species. The disease is characterized by the formation of powdery, bright yellow-orange, erumpent, hypophyllous, punctiform uredinia on the abaxial portion of the leaf. The spermagonial and aecial states are unknown. Urediniospores are subglobose to angular, catenulate, coarsely verrucose with bluntly capitate, annulate tubercles, germ pores un conspicuous, two or four, scattered. Lesions on the adaxial surface consist of minute spots with yellow color turning brown with age. This is the first report of a rust disease attacking leaves of *Plumeria acuminata* Ait. in Thailand.

KEY WORDS: rust; *Coleosporium plumeriae*; *Plumeria acuminata*

INTRODUCTION

Plants belonging to the genus *Plumeria* originated from West Indies and Central and South America, but they are widely cultivated in tropical and subtropical regions as an ornamental plant and can be seen grown in greenhouses. In Hawaii, the flowers are used to make wreath, and for this purpose many cultivars of *Plumeria* are being grown (Kakishima et al., 1995). In Thailand, *Plumeria* is one of the most popular and favorite ornamental trees that commonly found in parks, home gardens and landscaped establishments over the country. Its big, stout branches

enhanced by its colorful and fragrant flowers and big showy leaves (Fig. 1) provide any landscape a pleasing aesthetic scenery the whole year round.

Coleosporium plumeriae Pat. has been reported to cause rust in *Plumeria*, but for a long time period its distribution has been limited in the places of origin, West Indies and Central and North America. However, around 1989, there were successive reports of confirmed occurrences of rust caused by *C. plumeriae* in Hawaii (Ogata and Gardner, 1992), South Pacific Islands and Indonesia (Bali) (Kobayashi et al., 1994a, b), Japan (Kakishima et al., 1995), Philippines (Tanganon and Quebral, 1992) (Fig. 2). There had been no report of rust attacking *Plumeria* in Thailand (Sontirat et al., 1994). Hence, this study aimed to determine the etiology of rust attacking *Plumeria*, thereby describe its characteristic

* Corresponding author.

Tel: (665) 3944021

Fax: (665) 3944666

E-mail: agppi006@chiangmai.ac.th



symptom and issuance of a warning is therefore deemed necessary.

For electron microscopy, air-dried uredinia and leaf tissues were mounted on metal stubs, ion sputter coated with platinum-palladium and observed in a Hitachi scanning electron microscope (S-4200).

For light microscopy, uredinia and telia were cut from diseased leaves of *Plumeria rubra* L. growing in the greenhouse of the Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. Thin sections of uredinial and telial sori and urediniospores obtained from uredinia were mounted in 5% KOH or Lactophenol solution. Dry herbarium specimens have been deposited in Herbaria: Mycological Herbarium, Graduate school of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba (TSH).

Signs and symptoms

Rust uredinia emerge as small, yellow to yellow-brown powdery sori on the lower leaf surface (Fig. 3), which then spread to the entire leaf surface and cause defoliation when



FIGURE 2. Distribution of *Plumeria Rust*. Previous area of distribution is enclosed in dotted lines. Occurrences in the Pacific and other areas confirmed through reports and herbarium specimens are indicated by name of locality, year and month recorded.

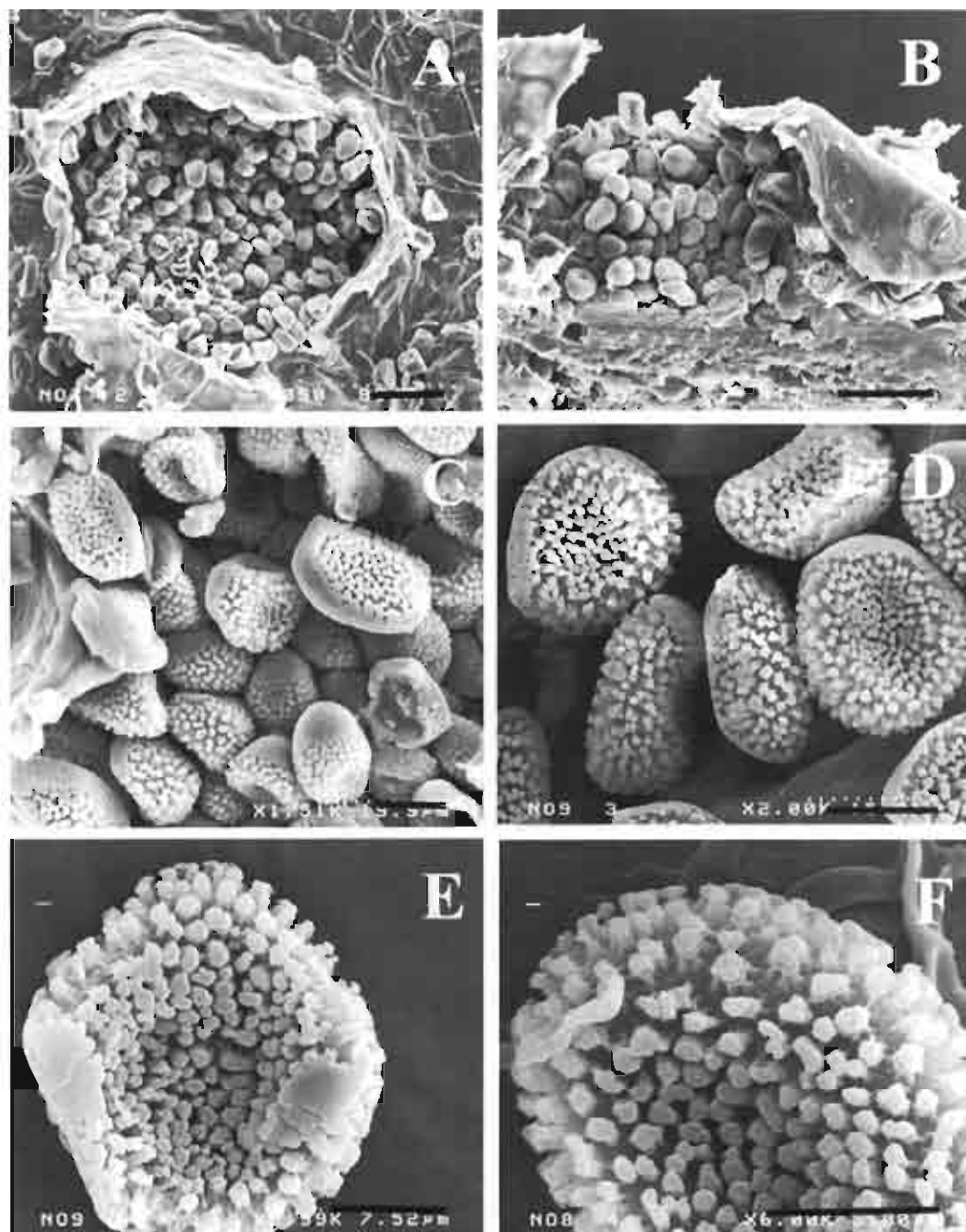


Figure 5. Scanning electron micrograph of urediniospores of *Coleosporium plumeriae*; uredinia (A and B, Bar = 50 µm), verrucose urediniospores with annulate tubercles (C and D, Bar = 10 µm) and blunty capitate tubercles (E and F, Bar = 5 µm).



FIGURE 3. Plumeria Rust, *Coleosporium plumeriae*, uredinia on *Plumeria rubra* collected from Chiang Mai, Thailand.

infections are severe. There are causes when the entire tree becomes defoliated and the trunk and stems wither. Numerous urediniospores are produced within uredinia and these may serve as sources of infection responsible for the

spread of the disease. Along with the uredinia, glossy wax-like telia are also produced (Traquair and Kokko, 1980; Ogata and Gardner, 1992).

Morphology and taxonomy

Results of examination of specimens collected from Chiang Mai (TSH-R4314) and those from Bangkok, Thailand (TSH-R4315, 4316, 4317) showed that uredinia are produced beneath the epidermis but the latter is broken and opened up to release urediniospores upon maturity of the uredinia. Urediniospores are single-celled (Fig. 4), produced in chains, obovoid, ellipsoid or oblong-ellipsoid, and $25.2\text{--}36.4 \times 13.9\text{--}18.9 \mu\text{m}$ in size. The walls are hyaline, ca. $1.5 \mu\text{m}$ thick and the surface has big verrucae (Fig. 5). Peridial cells are seen around the uredinia. Only uredinia were found in all of the specimens, except in a specimen

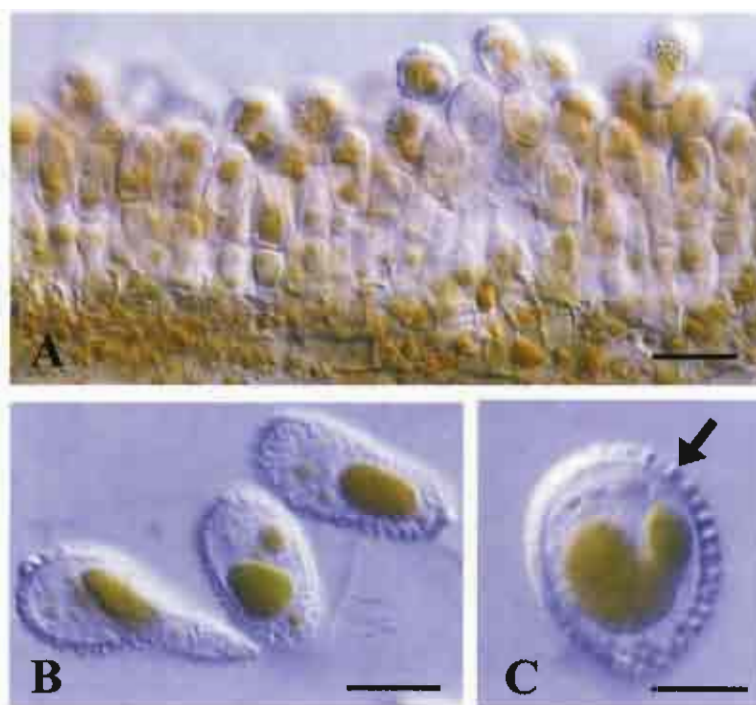


Figure 4. Uredinium and urediniospores of *Coleosporium plumeriae*: A = cross section of uredinium (Bar = $30 \mu\text{m}$), B = urediniospores (Bar = $15 \mu\text{m}$), and C = verrucose urediniospores with annulate tubercles (arrow) (Bar = $10 \mu\text{m}$).

collected in in Cook Island (PDD 57192) where few telia were observed. Teliospores are clavate with thin hyaline walls. Germination probably takes place immediately after maturation of teliospores since in many cases structures which were already four-celled were also observed. Spermatogonial and aecial stages are however not yet known.

The above morphological features strongly coincides with descriptions of *Coleosporium plumeriae* Pat (Patouillard, 1902; Saccardo, 1905; Arthur, 1907; Sydow and Sydow, 1915; Gallegos and Cummins, 1981). However, *C. plumeriae* found in a greenhouse in Canada (Traquair and Kokko, 1980) was reported to have urediniospores $25-27 \times 16-24 \mu\text{m}$ in size, slightly smaller than in the other descriptions.

Coleosporium plumeriae was originally described by Patouillard (1902) based on a rust specimen bearing uredinia and telia on *Plumeria alba* L. collected in Guadalupe Is., West Indies. On the other hand, basing on a rust specimen collected by Berkeley on a species of *Plumeria* (probably *P. rubra* L.) in Santo Domingo Is., West Indies and using *Uredo domingensis* Berk. (Sydow and Sydow, 1924) as the type, Arthur (1918) established a new combination, *Coleosporium domingensis* (Berk.) Arthur considered *C. plumeriae* as its synonym (Arthur, 1924, 1934). Likewise, the rust *Uredo plumiericola* Hennings described by Hennings (1904) from a species of *Plumeria* collected in Peru, S. America was also considered as an identical species. However, since the type species of Arthur (1918) did not have the telial but only the uredinal stage, establishing *Coleosporium* sp. upon this is considered invalid based on nomenclatural rules (Farr et al., 1989). Thus, it is more appropriate to use *C. plumeriae* as the scientific name of the rust of *Plumeria*, and *U. domingensis* and *C. domingensis* must be considered as its synonyms. However, in the case of *Uredo plumiericola* described in Peru, there is a need to examine the type specimen and clarify the difference from *C. plumeriae*, since its description indicates that it has slightly smaller urediniospores than *C. plumeriae*.

TABLE 1. Host plants of the Plumeria Rust, *Coleosporium plumeriae*.

<i>Plumeria acutifolia</i> Poir.
<i>P. alba</i> L.
<i>P. emarginata</i> Griseb.
<i>P. krugii</i> Urban.
<i>P. lutea</i> Ruiz et Pav.
<i>P. obtusa</i> Bert. et A. DC.
<i>P. rosea</i>
<i>P. rubra</i> L.

Locality and hosts

As mentioned previously, the rust of *Plumeria* was first described on *P. alba* in Guadalupe Is., West Indies in the 1900's (Patouillard, 1902), and within a period of around 90 years after that, it was reported in a relatively limited distribution. Its occurrences were reported in West Indies, Central America, South America (Colombia, Venezuela), and the United States of America (Florida, Texas) on woody plants in the family Apocynaceae (Table 1) that 8 species of *Plumeria* were recorded as hosts (Arthur, 1907, 1915, 1916, 1918, 1924, 1927, 1934; Farr et al., 1989; Gallegos and Cummins, 1981; Kern and Chardon, 1927; Saccardo, 1905; Sydow and Sydow, 1915, 1924). Starting with a confirmation of its occurrence in Tahiti, South Pacific (PDD 15101) in 1989, it was then confirmed and reported in succession in South Pacific Islands (Rarotonga: PDD 57192, Aitutiki: PDD 57638, Cook Island: PDD 61892, Fiji: PDD 59355, 59356, 60079, West Samoa: PDD 62972, New Caledonia: Kohler and Pellegrin, 1992), Hawaii Islands (Oahu, Kawaii) (Ogata and Gardner, 1992), Golden Coast, Australia (PDD 63804 = TSH-R1471) and Bali Is., Indonesia (Kobayashi et al., 1994a, b; TSH-R1406, 1407). Most of these occurrences were reported on cultivated *P. rubra*, although it was also reported in *P. acutifolia* (PDD 56101) in Tahiti, in *P. alba* in New Caledonia, and in *P. obtusa* in Hawaii. And, quite exceptionally, it was also reported in *P. rubra* grown in greenhouses in Alberta, Canada (Traquair and Kokko, 1980).

Although this recent and sudden spread of *Plumeria* Rust in the Pacific is now confirmed, its cause is still unclear. From now on, it is predicted to spread to Southeast Asia and neighboring countries. Considering the severe damage it can cause on the widely cultivated *P. rubra* due to defoliation and eventual death, issuance of a warning and the development of precautionary measures against its spread are therefore deemed necessary. Particularly it is considered necessary to take precaution in transport of infection seedlings and of wreath made from *Plumeria* flowers.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Hitachi Scholarship Foundation, the Thailand Research Fund (PDF/47/2542), JICA (ATRACT), and a grant-in-Aid for Scientific Research (No. 14255004) from Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

LITERATURE CITED

- Arthur, J. C. 1907. North American Flora, 7: 87.
- Arthur, J. C. 1915. Uredinales of Porto Rico based on collections by F. L. Stevens. Mycologia, 7: 168-196.
- Arthur, J. C. 1916. Uredinales of Porto Rico based on collection by H. H. Whetzel and E. E. Olive. Mycologia, 8: 55-104.
- Arthur, J. C. 1918. Uredinales of Guatemala based on collection by E. W. D. Holway. American Journal of Botany, 5: 325-336.
- Arthur, J. C. 1924. North American Flora, 7: 652.
- Arthur, J. C. 1927. North American Flora, 7: 815.
- Arthur, J. C. 1934. Manual of the rusts in United States and Canada reprinted with a supplement by G. B. Cummins, 1962. Hafner, New York. 438 pp.
- Dennis, R. W. G. 1970. Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. Royal Botanic Gardens, Kew, 531 pp.
- Farr, D. F., G. F. Billa, G. P. Chamuris and A. Y. Rossmann. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul. 1,252 pp.
- Gallegos, M. I. and G. B. Cummins. 1981. Uredinales (Rozas) de Mexico, Vol. II. INIA, Culiacan, 429 pp.
- Hennings, P. 1904. Fungi amazonici I. Hedwigia, 43: 154-186.
- Kakishima, M., T. Kobayashi and E. H. C. McKenzie. 1995. A warning against invasion of Japan by the rust fungus, *Coleosporium plumeriae*, on *Plumeria*. Forest Pests, 44: 144-147.
- Kern, F. D. and C. E. Chardon. 1927. Notes on some rusts of Colombia. Mycologia, 19: 268-276.
- Kobayashi, T., M. Kakishima, K. Katumoto, M. Oniki and A. Nurawan. 1994 a. Diseases on forest and ornamental trees observed in Indonesia (I). Forest Pests, 43: 43-47.
- Kobayashi, T., M. Kakishima, K. Katumoto, M. Oniki and A. Nurawan. 1994 b. Diseases on forest and ornamental trees observed in Indonesia (II). Forest Pests 43: 65-69.
- Kohler, F. and F. Pellegrini. 1992. Pathologie des vegetaux cultives. Nouvelle-Calédonie, Polynésie Française et Wallis et Futuna, ORSTOM. Paris. 171 pp.
- Ogata, D. Y. and D. E. Gardner. 1992. First report of *Plumeria* rust, caused by *Coleosporium plumeriae*, in Hawaii. Plant Disease, 76: 942.
- Patouillard, N. 1902. Champignons de la Guadeloupe. Bulletin Société Mycologique de France, 18: 171-186.
- Saccardo, P. A. 1905. Syllonge Fungorum, 17: 898.
- Sontirat, P., P. Pitakpaivan, T. Khamhangridthirong, W. Choobamroong and U. Kueprakone. 1994. Host Index of Plant Diseases in Thailand (Third Edition). Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.
- Sydow, P. and H. Sydow. 1915. Monographia Uredinearum Vol. III. Fratres Borntraeger, Lipsiae. 726 pp.
- Sydow, P. and H. Sydow. 1924. Monographia Uredinearum Vol. IV. Fratres Borntraeger, Lipsiae. 671 pp.
- Tangonan, N. G. and F. C. Quebral. 1992. Host index of plant diseases in the Philippines. 2nd Ed., 273 pp.
- Traquair, J. A. and E. G. Kokko. 1980. Spore morphology in *Coleosporium plumeriae*. Canadian Journal Botany, 58: 2454-2458.

Received: 20 May 2004

Accepted: 23 August 2004

FULL PAPER

Chaiwat To-anun · Sawwanee Kom-un
Aumpaiwan Sunawan · Wanwisa Fangfuk · Yukio Sato
Susumu Takamatsu

A new subgenus, *Microidium*, of *Oidium* (Erysiphaceae) on *Phyllanthus* spp.

Received: April 23, 2004 / Accepted: August 16, 2004

Abstract Powdery mildew fungi found on leaves, shoots, and stems of *Phyllanthus acidus*, *P. amarus*, and *P. reticulatus* proved to be a fungus having morphology unique in the Erysiphaceae. Light micrographs of a new germination pattern are added to discuss differences to other four germination patterns of the powdery mildews. The rDNA sequences (28S and 18S regions) of the fungi found on *Phyllanthus* spp. form a distinct monophyletic clade strongly supported by bootstrap (100%) in 18S + 28S trees, which indicates that the fungus is an isolated fungal group among the Erysiphaceae in tribal level. Because we cannot find the teleomorphic state of this fungus, a new subgenus *Microidium* of anamorphic genus *Oidium* is proposed to accommodate this organism.

Key words Euphorbiaceae · Molecular phylogeny · *Oidium phyllanthi* · Powdery mildew fungi · rDNA

Introduction

Powdery mildew fungi occur in both anamorphic and teleomorphic forms. The characteristics of all structures of these fungi can be of taxonomic value. Especially among the earlier authors, the opinion was widely distributed that only a limited number of features should generally be used in erysiphacean taxonomy (Braun 1987). Salmon (1900) stressed that the conidial stages should not be used for

systematic purposes, and he ignored the taxonomic value of the anamorphs entirely. Thus, he came to a very wide species concept and numerous authors followed him in neglecting the anamorphs.

The first systematic trial to identify the conidial states of powdery mildews at species level was made by Ferraris (1910), who grouped species of *Oidium* according to the size and shape of their conidia and created a key to its species. Foex (1913), Jaczewski (1927), and Brundza (1934) contributed to the classification of the conidiophore types in the genus *Oidium*. Jaczewski (1927) introduced the terms *Euoidium* and *Pseudoidium* for *Oidium* states with catenate and solitary conidia, respectively. Hirata (1942, 1955) provided comprehensive germination experiments with Japanese species of powdery mildews. Golovin (1956) reported extensive study on the anamorphs of the genus *Leveillula*. A survey on the Erysiphaceae, including the anamorphs, was given by Yarwood (1957). Boesewinkel (1977, 1980) provided the first real key based on a combination of more than 12 morphological characteristics observed on conidia, conidiophores, appressoria, haustoria, fibrosin bodies, and mycelium. Shin and La (1993) and Shin and Zheng (1998) introduced some new morphological features of taxonomic relevance.

A progressive report was provided by the work of Cook et al. (1997), who examined surface of conidia by scanning electron microscopy (SEM) and separated genus *Oidium* into eight subgenera. Braun (1999) discussed the classification of the Erysiphaceae proposed by Cook et al. (1997) and introduced some corrections and alterations. Comprehensive examinations of nucleotide sequences of the rDNA internal transcribed spacer (ITS) region of powdery mildew fungi have also been carried out (Takamatsu et al. 1998, 1999, 2000; Saenz and Taylor 1999; Mori et al. 2000). Because the results of these studies provided numerous molecular data as well as new SEM examinations (Cook et al. 1997), it was possible to rearrange the classification of the Erysiphaceae (Braun 1999; Braun and Takamatsu 2000). Recently, Braun et al. (2002) reported that the characteristics of the anamorphs are the base for the generic taxonomy of the Erysiphales and reflect the phylogeny in this fungal

C. To-anun (✉) · S. Kom-un · A. Sunawan · W. Fangfuk
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiangmai 50200, Thailand
Tel. +66-53-944021; Fax +66-53-944666
e-mail: agppi006@chiangmai.ac.th

Y. Sato
College of Technology, Toyama Prefectural University, Toyama, Japan

S. Takamatsu
Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Japan

group. The teleomorphs are less important for the generic taxonomy but provide useful features on the species level. Thus, it is possible to classify the powdery mildews in which the teleomorphic state generally is not found or rarely occurs, as in most of the powdery mildews in Thailand (Sontirat et al. 1994).

During 1999 to 2002, 73 powdery mildews in Thailand were collected and the morphology of conidial germ tubes was observed using the method described by Hirata (1942). rDNA sequence analysis of these powdery mildews was also carried out to classify the unidentified fungi. During the study, we found a unique fungus, *Oidium phyllanthi* J.M. Yen, isolated from three species of *Phyllanthus*, i.e., *P. acidus* Skeels, *P. amarus* Schum. & Thonn., and *P. reticulatus* Poir., that produces a new type of conidial germination. The germination type is designated as microidium-type (To-anun et al. 2002). The molecular characteristic supports the morphological result that *O. phyllanthi* on *Phyllanthus* spp. is a unique fungus. This is the first report of *O. phyllanthi* on *Phyllanthus* spp. in Thailand. Moreover, this is the first record of *O. phyllanthi* on *P. acidus* in the world. In this article, we present morphological and molecular characteristics of *O. phyllanthi* on *Phyllanthus* spp. collected in Thailand to propose a new subgenus *Microidium* for this fungus.

Materials and methods

Light microscopy of fresh material

Hyphae, conidiophores, and conidia of fresh materials were stripped off the leaf surfaces with clear adhesive tape, mounted on a microscope slide with the fungal mycelium uppermost, and examined in water using light microscopy with phase contrast using 20 $\times$, 40 $\times$, and 100 $\times$ oil immersion objectives. The following information was noted during the examination of the fresh specimens: size and shape of conidia, presence or absence of fibrosin bodies, nature of conidiogenesis, characteristics of the conidiophore, e.g., size and shape of foot cell, position of the basal septum, shape and position of hyphal appressoria, position of germ tubes, and shape of appressoria on germ tubes of conidia. Thirty conidia were measured for each specimen examined.

Observation of conidial germ tubes was carried out using the method of Hirata (1942). The inner surface cell layer of onion scales was cut with a razor in a size of 1 cm² and stripped off by a clean forceps. The cell layer was kept in 80% ethanol for more than 2 weeks and rinsed with tap water for 30 min before use. The cell layer was put on a microscope slide, followed by removing excess water with filter paper, and inoculated with the conidia. The inoculated cell layer was floated on distilled water in a Petri dish and incubated at 20–25°C for 24 h until microscopic observation.

DNA extraction and PCR amplification

Whole-cell DNA was isolated from fresh fungal specimens or herbarium specimens by the chelex method (Walsh et al. 1991; Hirata and Takamatsu 1996). The nuclear rDNA region was amplified twice or three times by the polymerase chain reaction (PCR) using nested primer sets. The following thermal cycling conditions were performed in a PCR thermal cycler SP (Takara, Kyoto, Japan): an initial denaturing step at 95°C for 2 min; thermocycling for 30 cycles, where each cycle consisted of 30 s at 95°C followed by 30 s at 52°C for annealing, and 30 s at 72°C for extension; and a final extension cycle of 7 min at 72°C. A negative control lacking template DNA was included for each set of reactions. The PCR product was subjected to preparative electrophoresis in 1.5% agarose gel in TAE buffer. The DNA product of each amplification was then excised from the ethidium-stained gel and purified using the Jetsorb kit (Genomed, Löhne, Germany) following the manufacturer's instructions.

The oligonucleotide primers used in this study were as follows. The nucleotide sequences of NS1, NS2, NS3, NS6, NS7, and NS8 were obtained from White et al. (1990) and that of p3 from Kusaba and Tsuge (1995). The nucleotide sequence of TW14 was kindly provided by Dr. G.S. Saenz. The primers P1, P2, P3, P4, P6, P7, P8, NL1, NL2, and NL3 were designed by Mori et al. (2000) for the nucleotide sequences of the 18S rDNA region of the powdery mildew fungi. For amplification of the 18S rDNA, primer set T3/NS1 was used for the first amplification. Partial nested primer sets ITS2/NS1 and NS8/NS1 were then used for the second and third amplifications. The set of PM5/TW14, T4/TW14, and T2/TW14 was similarly used for amplification of the 5'-end of the 28S rDNA including D1 and D2 regions.

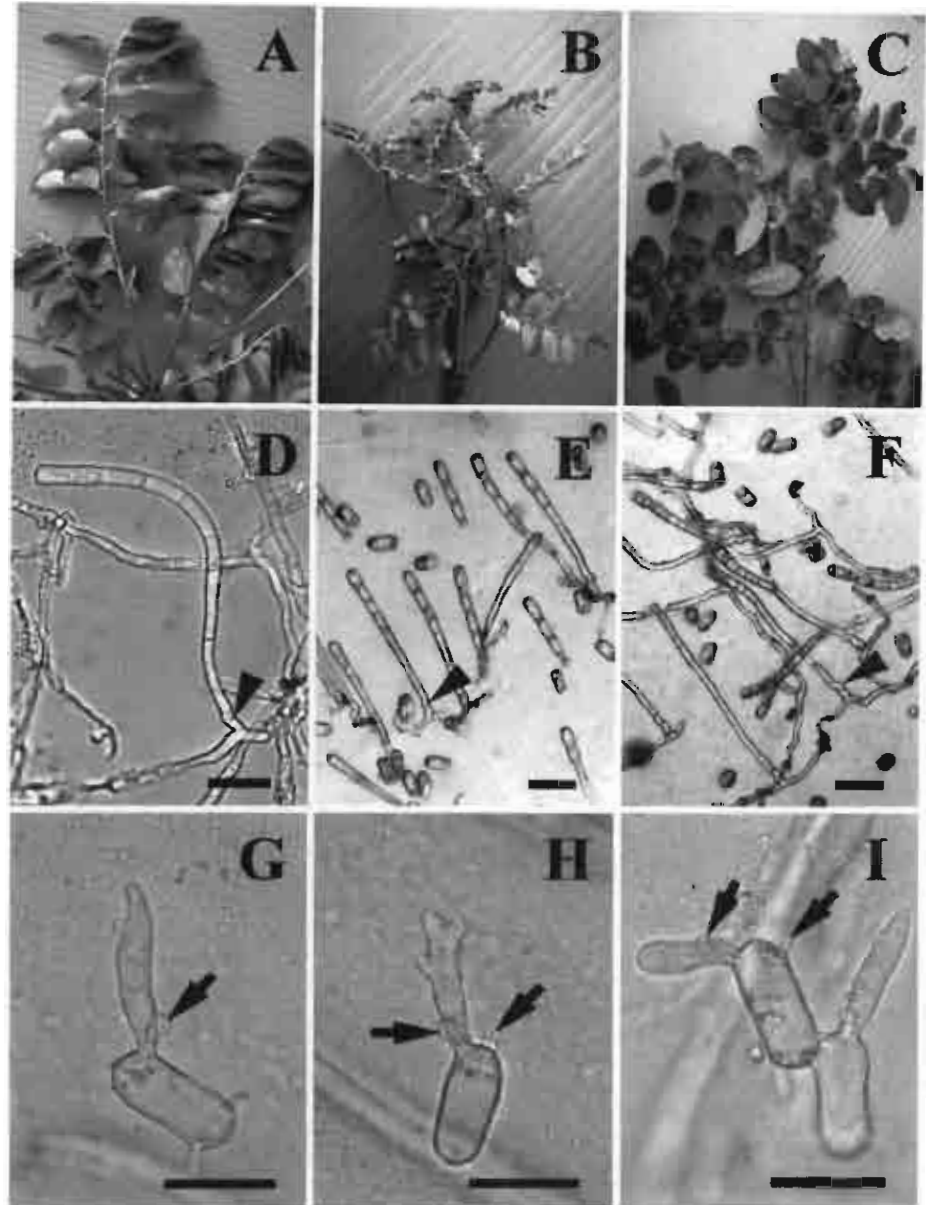
DNA sequencing

Nucleotide sequences of the PCR products were obtained for both strands using direct sequencing in an Applied Biosystems 373A sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequence reactions were conducted using the PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The primers P1, P2, P3, P4, P6, P7, P8, NS1, NS2, NS3, NS6, NS7, and NS8 were used for the sequencing of the 18S rDNA in both directions. Similarly, NL1, NL2, NL3, and TW14 were used for the sequencing of the 28S rDNA, respectively. The thermocycling was conducted for 30 cycles, where each cycle consisted of 20 s at 96°C, followed by 20 s at 50°C for annealing, and 4 min at 60°C for extension.

Phylogenetic analysis

The obtained sequences were initially aligned using the Clustal V package (Higgins et al. 1992). The alignment was then defined visually with a word processing program with color-coded nucleotides. Phylogenetic trees were obtained

Fig 1. Symptom, conidiophore and conidia, and germ tubes of the powdery mildew *Oidium* (subgen. *Microidium*) *phyllanthi*, found on *Phyllanthus acidus* (A, D, G), *P. amarus* (B, E, H) and *P. reticulatus* (C, F, I), respectively. The fungus produces conidia in chains (D, E, F); foot-cell flexuous or spiral twisted at the base (arrows). Conidia produced germ tubes on the shoulder (G, H, I), germ tubes broad club-shaped, terminating in nipple or lobed appressoria with hyaline germ tubes (arrows). Bars D, G–I 20µm; E, F 30µm



from the data using maximum-likelihood (ML), distance, and parsimony methods. For ML and distance analyses, the most appropriate evolutionary model was determined for a given data set using PAUP* 4.0b8 (Swofford 2001) and Modeltest 3.06 (Posada and Crandall 1998). A starting tree was obtained with the neighbor-joining method. With this tree, likelihood scores were calculated for 56 alternative models of evolution by PAUP*. The output file was then imported to Modeltest to compare the models by using Akaike's (1974) information criterion (AIC). Once a model of evolution was chosen, it was used to construct phylogenetic trees with the ML and neighbor-joining (NJ) methods using PAUP*.

For the parsimony analysis, we used the maximum-parsimony (MP) method with a heuristic search using

PAUP*. This search was repeated 100 times with different random starting points, using the stepwise addition option to increase the likelihood of finding the most parsimonious tree. Transversions and transitions were treated as equal weight. All sites were treated as unordered, with gaps treated as missing data. The branch-swapping algorithm was tree bisection-reconnection (TBR), the MULPARS option was in effect, and zero-length branches were collapsed.

The strength of the internal branches from the resulting trees was tested by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) using 1000 replications. The partition homogeneity test (Farris et al. 1995) was conducted by PAUP* to determine whether the 18S and 28S data sets were in conflict, with 1000 replicates.

Results

Morphological observation

The colonies of powdery mildews found on *Phyllanthus acidus*, *P. amarus*, and *P. reticulatus* are whitish, covering the entire surface of the leaves, young shoots, and young stems (Fig. 1A–C). The fungus is characterized by forming catenate conidia (Fig. 1D–F). Conidia produce broad club-shaped germ tubes (Fig. 1G–I), without fibrosin bodies but containing oil drop granules (Fig. 2A–C), and foot-cells of the conidiophores are flexuous or spirally twisted (Figs. 1D–F, 2C). Details of the main characteristic of the fungus on *Phyllanthus acidus* (MUMH1778) follow.

Mycelium amphigenous, white, effuse, confluent, forming irregular white patches or covering the whole leaf surface and on young stems, hyphae hyaline, branched, septate, 3.5–5 µm wide; appressoria well-developed, multi-lobed, opposite in pairs or single; conidiophores single on a hyphal cell, arising from the upper part of mother cells, position mostly central, 85–195 × 5–6 µm (average, 134 × 5.6 µm), with a long foot-cell, cylindrical, straight, twisted at the base, 20–90 × 4–6 µm (average, 61 × 4.9 µm), producing 3–9 conidia in chains, with a basal septum near the branching point of the mycelium or up to 15 µm away from it; conidia small, cylindrical to barrel-cylindrical, (20–)23–26 (–28) × (8–)9–10.5 (–11) µm (average, 22.8 × 9.5 µm), with oil drop-like inclusion bodies but without conspicuous fibrosin bodies, producing germ tubes on the shoulder, germ tubes broad club-shaped, terminating in nipple or lobed appressoria with or without two to three small hyaline germ tubes at both ends (Fig. 1G).

Characteristics of the other two fungi on *P. amarus* and *P. reticulatus* are almost the same as the fungus on *P. acidus*, excepting for the size of the conidia, conidiophore, foot cells and the shape of appressorium.

Phylogenetic analysis

To clarify the phylogenetic placement of *O. phyllanthi*, complete nucleotide sequences of the 18S rDNA (~1.8-kb length) and the D1 and D2 regions of 28S rDNA (~800-bp) from 19 taxa covering all five tribes of the Erysiphaceae were used for the phylogenetic analysis. The data of the fungi and their accession numbers are listed in Table 1. Of these, nine complete sequences of the 18S rDNA and three sequences of the D1 and D2 regions of the 28S rDNA were newly determined in this study, in which three isolates of *O. phyllanthi* from different host species are included. Because the result of the partition homogeneity test showed no direct conflict between the 18S and 28S rDNA data, we combined these data into a single data set. *Byssosaurus striatosporus* (G.L. Barron & C. Booth) Arx (18S: AB015776; 28S: U17912) was used as the outgroup taxon based on the result of Mori et al. (2000). The resulting large data set composed of 2526 sites was used to obtain phylogenetic trees. The alignment was deposited in TreeBASE

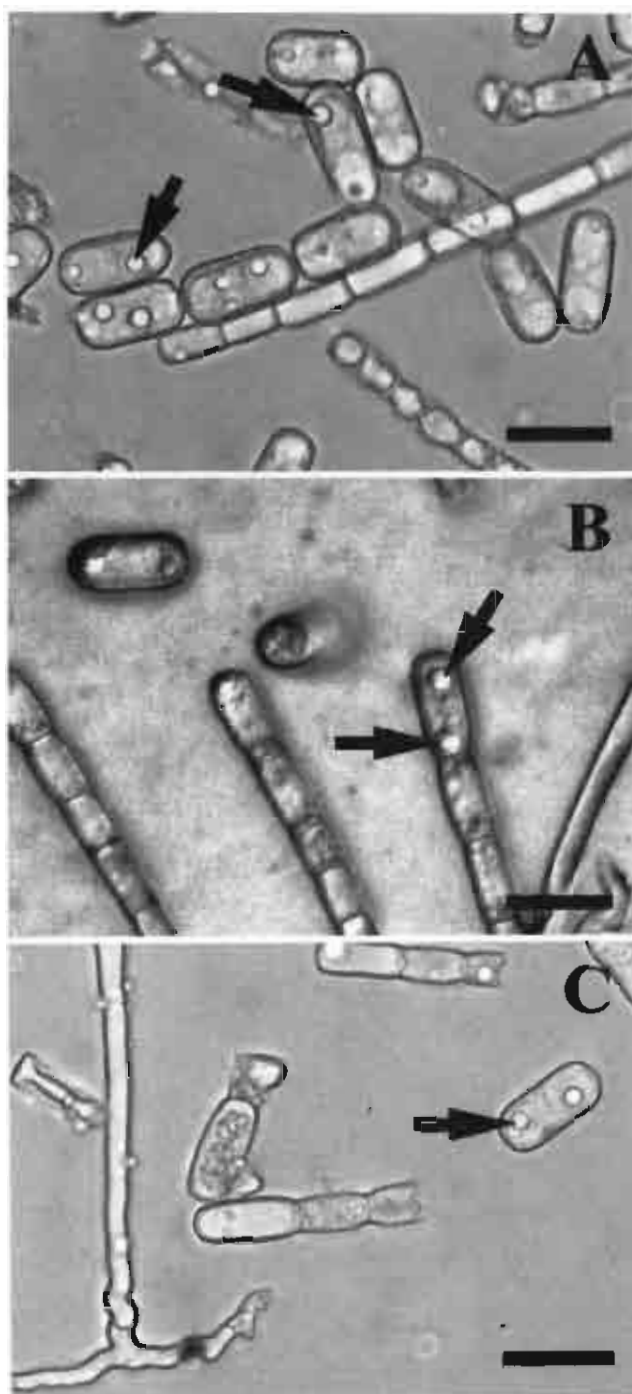


Fig 2. Conidia of *Oidium* (subgen. *Microoidium*) *phyllanthi* found on *Phyllanthus acidus* (A), *P. amarus* (B), and *P. reticulatus* (C). The conidia of this fungus are small, cylindrical to barrel-cylindrical, with oil drop-like inclusion bodies (arrows) but without conspicuous fibrosin bodies. Bars 20 µm

(<http://www.treebase.org/>) under the study accession number of S1129 and matrix number of M1936.

Using Modeltest (Posada and Crandall 1998) under the AIC, we concluded that the general time-reversible (GTR) model (Rodriguez et al. 1990), with unequal base frequen-

Table 1. List of the species of Erysiphales used for molecular phylogenetic analysis

Fungal species ^a	Host plants	Voucher collection and locations ^b	Database accession no. ^c 18S rDNA / 28S rDNA
<i>Arthrocladiella mougeotii</i> (Lév.) Vassilkov	<i>Lycium chinense</i> Mill.	MUMH135, Ibaraki, Japan	AB033477, AB022379
<i>Blumeria graminis</i> (DC.) Speer f. sp. <i>bromi</i>	<i>Bromus catharticus</i> Vahl	MUMH117, Mie, Japan	AB033475, AB022362
<i>B. graminis</i> (DC.) Speer f. sp. <i>hordei</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. (Barley)	L.I. ^d	AB033480, AB022399
<i>Cystotheca wrightii</i> Berk. & M.A. Curtis	<i>Quercus glauca</i> Thunb. ex Murray	MUMH137, Mie, Japan	AB120747, AB022355
<i>Erysiphe friesii</i> Lév. var. <i>dahurica</i>	<i>Rhamnus japonica</i> Maxim. var. <i>decipiens</i> Maxim.	MUMH6, Mie, Japan	AB033478, AB022382
(U. Braun) U. Braun & S. Takam.			
<i>E. glycines</i> F.L. Tai em. Zheng var. <i>glycines</i>	<i>Desmodium podocarpum</i> DC. subsp. <i>oxyphyllum</i> (DC.) H. Ohashi	MUMH52, Nara, Japan	AB120748, AB022397
<i>E. mori</i> (I. Miyake) U. Braun & S. Takam.	<i>Morus australis</i> Poir. (Mulberry)	MUMH577, Toyama, Japan	AB033484, AB022418
<i>Golovinomyces orontii</i> (Castagne) V.P. Gelyuta	<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Tobacco)	L.I. ^d	AB033483, AB022412
<i>Leveillula taurica</i> (Lév.) G. Arnaud	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>grossum</i> Sendtn.	MUMH124, Kochi, Japan	AB033479, AB022387
<i>Neoerysiphe galeopsidis</i> (DC.) U. Braun	<i>Chelonopsis moschata</i> Miq.	MUMHS132, Toyama, Japan	AB120749, AB022369
<i>Oidium phyllanthi</i> J.M. Yen	<i>Phyllanthus acidus</i> Skeels	MUMH1778, Nan, Thailand	AB120753, AB120754
<i>O. phyllanthi</i>	<i>P. amarus</i> Schum. & Thonn.	MUMH1782, Chiang Mai, Thailand	AB120756, AB120755
<i>O. phyllanthi</i>	<i>P. reticulatus</i> Poir.	MUMH1761, Nan, Thailand	AB120757, AB120758
<i>Phyllactinia moricola</i> (Henn.) Homma	<i>Morus australis</i> Poir. (Mulberry)	MUMH35, Mie, Japan	AB033481, AB022401
<i>Pleochaeta shiraiana</i> (Henn.) Kimbr. & Korf	<i>Celtis sinensis</i> Pers. var. <i>japonica</i> (Planch.) Nakai	MUMH36, Mie, Japan	AB120750, AB022403
<i>Podosphaera longiseta</i> Sawada	<i>Prunus grayana</i> Maxim.	MUMH70, Kanagawa, Japan	AB120751, AB022423
<i>P. xanthii</i> (Castagne) U. Braun & Shishkoff	<i>Melothria japonica</i> (Thunb.) Maxim. ex Cogn.	MUMH68, Mie, Japan	AB033482, AB022410
<i>Sawadea polyfida</i> (C.T. Wei) R.Y. Zheng & G.Q. Chen var. <i>japonica</i> U. Braun & Tanda	<i>Acer palmatum</i> Thunb.	MUMH47, Mie, Japan	AB033476, AB022364
<i>Typhulochaeta japonica</i> S. Ito & Hara	<i>Quercus mongolica</i> Fish. ex Turcz. var. <i>crispula</i> (Blume) H. Ohashi	MUMH576, Toyama, Japan	AB120752, AB022415

^a Fungi were identified using Braun (1987) and Nomura (1997)^b MUMH, Mie University Mycological Herbarium^c The nucleotide sequence data will appear in the DDBJ, EMBL, and GenBank Database under the respective accession number^d Isolate maintained as a living fungus in the Laboratory of Plant Pathology, Mie University^e Sequence newly determined in this study

cies, a gamma-distributed rate heterogeneity model (four rate categories, $G = 0.6037$; Yang 1994), and an estimated proportion of invariant sites (0.7632) was the most appropriate model of evolution for this data set. A NJ tree generated by using the data set and the evolution model is shown in Fig. 3. The ML analysis found a ML tree with a log-likelihood score of -7038.8210 (tree not shown). MP analysis found a single MP tree of 626 steps and six trees of 627 steps belonging to two different islands. A total of the seven trees were subjected to the Kishino–Hasegawa test (Kishino and Hasegawa 1989) using the above evolution model to select the tree with the highest likelihood. As a result, a tree having 627 step with a log-likelihood score of -7032.1216 was selected as the best MP tree [consistency index (CI) = 0.6204; retention index (RI) = 0.6722; rescaled consistency index (RC) = 0.4170; tree not shown].

All three tree-constructing methods with different algorithms resulted in similar tree topologies. We thus show only the NJ tree in Fig. 3, and indicate only bootstrap values of the three analyses on the tree. All five tribes recognized in the Erysiphaceae (Cook et al. 1997; Braun 1999; Braun and Takamatsu 2000) are again supported as the respective monophyletic groups in the NJ analysis (Fig. 3). In the ML and MP analyses, although the tribes Erysipheae, Phyllactiniaee, Cystothecae, and Blumeriaceae are also supported as monophyletic groups, the tribe Golovinomycetaceae becomes paraphyletic. Three isolates of *Oidium phyllanthi* from *Phyllanthus* spp., i.e., *P. acidus*, *P. amarus*, and *P. reticulatus*, formed a distinctive clade with a bootstrap support of 100% in all three tree-constructing methods. The *O. phyllanthi* clade is not included in any of the five

tribes. The present molecular characteristic supports the morphological result that *O. phyllanthi* on *Phyllanthus* spp. is a unique fungal group. Moreover, the present phylogenetic analysis indicates that *O. phyllanthi* is an isolated group among the Erysiphaceae in tribal level.

Discussion and taxonomy

According to the aforementioned characters, the fungus found on three species of *Phyllanthus* is in accord with those of *Oidium phyllanthi* reported by Yen (1967). He first established *O. phyllanthi* on *Phyllanthus urinaria* L. (Euphorbiaceae) collected in Taiwan in 1966. In his description, he provided a drawing and described two types of conidia and conidiophores: a primary conidiophore producing primary conidia as well as a secondary conidiophore producing secondary conidia. The primary conidium is oval, cylindrical to oval, whereas the secondary conidium is cylindrical. Narayanswamy and Ramakrishnan (1969) reported *O. phyllanthi* on *P. niruri* collected in India. Unfortunately, they did not provide a drawing or measurements; only the size of the conidia ($14.5\text{--}20 \times 2.2\text{--}9.1\text{ }\mu\text{m}$) was provided in their description. Braun (1987) commented in his monograph that these slender conidia are very unusual for powdery mildews. In the same paper, Braun (1987) described this fungus as follows: mycelium amphigenous, white, effuse, confluent, hyphae hyaline, branched, septate, $3.6\text{--}4.2\text{ }\mu\text{m}$ wide, appressoria lobed, conidiophores erect, $3\text{--}8$ -septate, cylindrical, flexuous below, $93.4\text{--}156 \times 7.2\text{--}8.4\text{ }\mu\text{m}$.

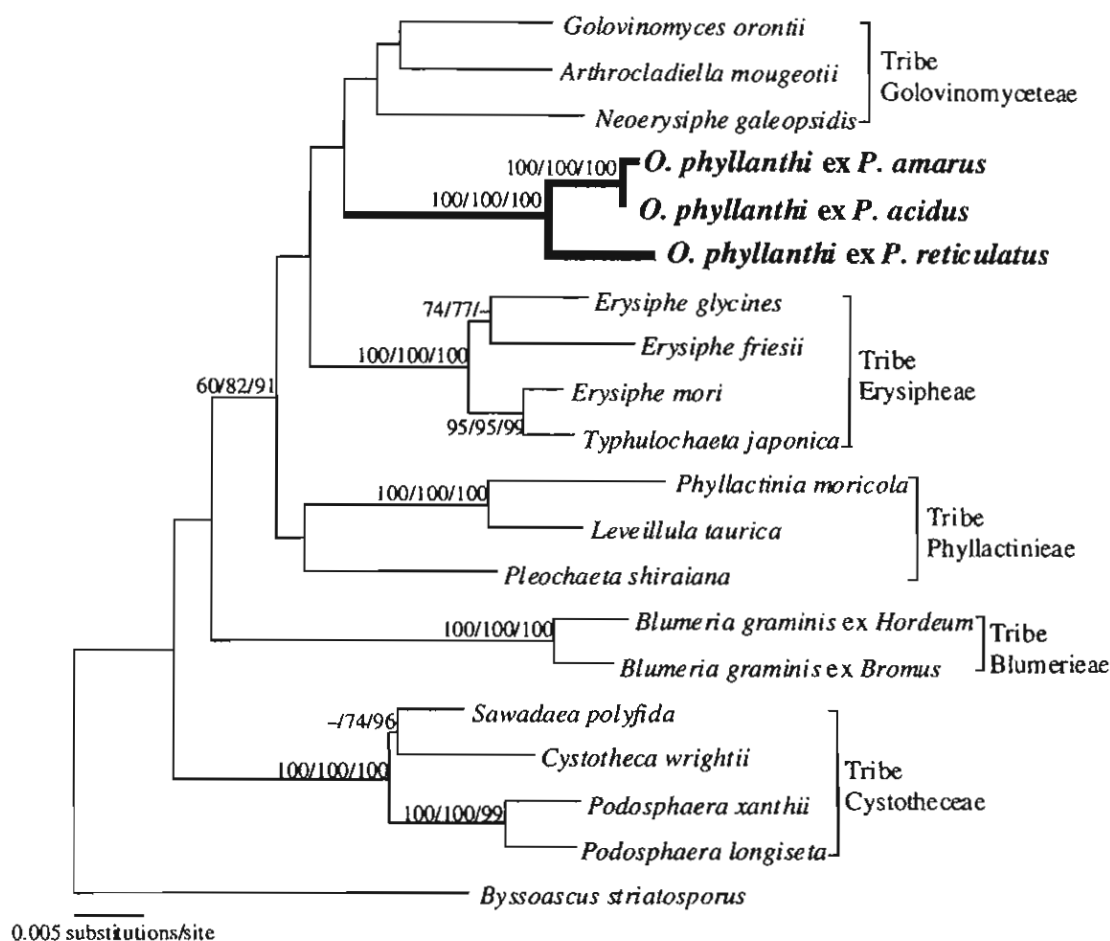


Fig 3. A neighbor-joining (NJ) tree based on the combined data of the 18S and 28S rDNA (D1 and D2 regions) sequences for three isolates of *Oidium* (subgen. *Microidium*) *phyllanthi*, 15 taxa of the Erysiphaceae covering all known tribes, and an outgroup taxon. Model parameters: unequal base frequencies with rate heterogeneity; gamma shape parameter = 0.5574; proportion of invariable sites = 0.7553; six

rate categories; general time-reversible (GTR) model (Rodriguez et al. 1990) with transformation parameters [A-C] = 1.0000, [A-G] = 2.2991, [A-T] = 0.5279, [C-G] = 0.5279, [C-T] = 5.1365, [G-T] = 1.0000. Bootstrap values (>50%) for NJ/maximum likelihood (ML)/maximum-parsimony (MP) analyses are given above nodes

foot-cell cylindrical, 72–103 × 5–6 μm, conidia in chains, 3–8 conidia, ovoid to cylindric-ovoid or cylindrical, 20–28 × 7–10 μm. The other records of this fungus were also found on *P. amarus* from Ghana, on *P. niruri* from Ceylon, Ghana, Java, and Mauritius, on *P. reticulatus* from Ceylon, and on *P. rheedii* Wight from India. Five powdery mildews, *Oidium* sp., *O. phyllanthi*, *G. cichoracearum* (DC.) V.P. Gelyuta, *Erysiphe* sp., and *E. phyllanthi* (Tanda & U. Braun) U. Braun & S. Takam., have been recorded on 12 species of *Phyllanthus* in the world (Amano 1986). The morphological characteristics of powdery mildew on *Phyllanthus* spp. in Thailand are in good agreement with *O. phyllanthi*. Therefore, the fungus on *Phyllanthus* spp. should be identified as *O. phyllanthi*. The corresponding teleomorphic state has not been recorded.

Cook et al. (1997) examined the surface of conidia by SEM and separated genus *Oidium* into eight subgenera. The characteristics of *O. phyllanthi* differ from those of the eight subgenera. Interestingly, the fungus on *Phyllanthus* spp. has some unique characters, i.e., cylindrical to barrel-

cylindrical conidia, conidium initials gradually developing into conidia, conidium initials and conidia hardly separable, and mature conidia containing two oil drop-like inclusion bodies but without conspicuous fibrosin bodies. Moreover, further studies of the conidial germ tube revealed that the powdery mildew on *Phyllanthus* spp. produces a unique germination type, the microidium type (To-anun et al. 2002), in which the conidia produce germ tubes on the shoulder or at the end of conidia, germ tube short, ~0.8–1.2 times as long as conidial length, terminating in a broad club-shaped, with nipple-shaped swelling, or a slightly lobed apressoria, with or without two or three smaller germ tubes at the end of conidia. This germination type is not identical to those of any other powdery mildews reported by Hirata (1955) and Braun (1987). Therefore, this fungus should be introduced into a new subgenus of *Oidium* on the basis of these unique characteristics.

Molecular phylogenetic analysis based on the 18S and 28S rDNA sequences supported the morphological uniqueness of *O. phyllanthi*. The fungus formed a distinct clade

and did not belong to any of the five tribes recognized in the Erysiphaceae (Braun et al. 2002). The result strongly suggests that this fungus should be placed in a new genus and new tribe of the Erysiphaceae. However, because of lacking teleomorph, it is impossible to propose new meiosporic genus for this fungus. We thus propose a new subgenus *Microidium* of mitosporic genus *Oidium* to accommodate this organism.

Taxonomy

Oidium subgenus *Microidium* C. To-anun & S. Takamatsu, subgen. nov.

Mycelio albo, effuso, confluenti; hyphis repentibus, tortuosis, ramosis, septatis, hyalinis; appressoriis lobatis; conidiophoris ex hyphis oriundis, erectis, rigidioribus, cylindraceis, hyalinis, cellula pedis cylindracea, inferne tortili praeditis; conidiis aliquot catenulatis, hyalinis, membrana levi, unicellularibus, cylindraceis vel doliiformibus, apice utrinque rotundatis vel leviter truncatis, cum corporibus guttae oreis similibus, sine corporibus fibrosaceis; tubis geminalibus e partibus humeli utrinque vel e apicibus conidii nascentibus, brevibus, cum tumore late clavati mammifori vel appressoriis leviter lobatis ferentibus.

Type species: *Oidium phyllanthi* J.M. Yen.

Description: Mycelium amphigenous, appressoria multilobed, conidiophores erect, simple, foot-cells long, straight, slightly twisted at the base. Conidia small, unicellular, hyaline, cylindrical to barrel-cylindrical, with oil drop-like inclusion bodies, without fibrosin bodies, producing germ tubes on the shoulder, germ tubes broad club-shaped, terminating in nipple-shaped or lobed appressoria (microidium type).

Acknowledgments This work was financially supported by the Hitachi Scholarship Foundation, the Thailand Research Fund (PDF/47/2542), JICA (ATRACT), and a Grant-in-Aid for Scientific Research (Nos. 13660047, 14255004, and 15405021) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identifications. *IEEE Trans Automat Control* AC-19:716–723
- Amano (Hirata) K (1986) Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. Japan Scientific Societies Press, Tokyo
- Boesewinkel HJ (1977) Identification of Erysiphaceae by conidial characteristics. *Rev Mycol* 41:493–507
- Boesewinkel HJ (1980) The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). *Bot Rev (Lancaster)* 46:167–224
- Braun U (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beih Nova Hedwigia* 89:1–700
- Braun U (1999) Some critical notes on the classification and generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3:49–55
- Braun U, Takamatsu S (2000) Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysiphaceae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences: some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4:1–33
- Braun U, Cook RTA, Inman AJ, Shin HD (2002) The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW (eds) *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul, pp 13–55
- Brundza K (1934) Beiträge zur Kenntnis der Erysiphaceen. *Litauens Z U Akad Metras* 2:107–197
- Cook RTA, Inman AJ, Billings C (1997) Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycol Res* 101:975–1002
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Ferraris T (1910) *Flora Italica Cryptogama*, part I Fungi. Rocca San Casciano, Florence, Italy, pp 591–916
- Foex E (1913) Recherches sur *Oidiopsis taurica* (Lév.). *Ann Bull Soc Mycol Fr* 29:577–588
- Golovin PN (1956) Morfologiceskij obsor roda *Leveillula* Arnaud (mucnist-rosjanye gribysem Erysiphaceae). *Tr Bot Inst VL Komarova An SSSR Ser II* 10:193–308
- Higgins DG, Bleaby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 8:189–191
- Hirata K (1942) On the shape of the germ tubes of Erysipheae. *Bull Chiba Coll Hort* 5:34–49
- Hirata K (1955) On the shape of the germ tubes of Erysipheae (II). *Bull Fac Agric Niigata Univ* 7:24–36
- Hirata T, Takamatsu S (1996) Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacer extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37:265–270
- Jaczewski A (1927) Karmannyj opredelitel' gribov 2. Mucnist-rosjanye Griby, Leningrad
- Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J Mol Evol* 29:170–179
- Kusaba M, Tsuge T (1995) Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr Genet* 28:491–498
- Mori Y, Sato Y, Takamatsu S (2000) Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi (Erysiphales) using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 92:74–93
- Narayanawame P, Ramakrishnan K (1969) Powdery mildews of Coimbatore, Madras State. *Madras Univ J* 38:84–99
- Nomura Y (1997) Taxonomical study of Erysiphaceae of Japan. Yokendo, Tokyo
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Rodriguez F, Oliver JL, Martin A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* 142:485–501
- Saenz GS, Taylor JW (1999) Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer (ITS) ribosomal DNA sequences. *Can J Bot* 77:150–169
- Salmon E (1900) A monograph of the Erysiphaceae. *Mem Torrey Bot Club* 9:1–292
- Shin HD, La YJ (1993) Morphology of edge lines of chained immature conidia on conidiophores in powdery mildew fungi and their taxonomic significance. *Mycotaxon* 26:445–451
- Shin HD, Zheng RY (1998) Anamorphic morphology of *Uncinula* and allied genera (I). *Mycotaxon* 66:243–266
- Sontirat P, Pitakpaivan P, Khamhangridthirong T, Choobamroong W, Kueprakone U (1994) Host index of plant diseases in Thailand, 3rd edn. Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand
- Swofford DL (2001) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0b8. Sinauer, Sunderland, MA
- Takamatsu S, Hirata T, Sato Y (1998) Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience* 39:441–453
- Takamatsu S, Hirata T, Sato Y, Nomura Y (1999) Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* sect. *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Mycoscience* 40:259–268
- Takamatsu S, Hirata T, Sato Y (2000) A parasitic transition from trees to herbs occurred at least two times in tribus Cystothecae (Erysiphaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA. *Mycol Res* 104:1304–1311

- To-anun C, Sunawan A, Limkaisang S, Khom-un S, Sato Y, Takamatsu S (2002) New germination type of conidia of powdery mildews found on *Phyllanthus* spp. In: Summary of the first international conference on tropical and subtropical plant diseases (TPS 2002), November 5–8, 2002. Chiang Mai, Thailand
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–513
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322
- Yang Z (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* 39:306–314
- Yarwood CE (1957) Powdery mildews. *Bot Rev* 13:235–301
- Yen JM (1967) Etude sur les champignons parasites du Sud-Est asiatique. VIII. Quelques especes d'*Oidium* de Formose. *Cah Pac* 11:75–116

งานวิจัยที่ได้เผยแพร่ในที่ประชุมนานาชาติ



ACPP
BEIJING CHINA 2000

Proceedings

The First Asian Conference On Plant Pathology

Beijing, China August 25-28, 2000

President:

Prof. Shi-Mai Zeng

Vice Presidents:

Prof. Bong Koo Chung

Prof. Seiji Ouchi

Dr. Ir. Susanto Somowiyarjo

Organized by:

Chinese Society for
Plant Pathology

Co-organizers:

The Phytopathological
Society of Japan

Korean Society of
Plant Pathology

Hosted by:

China International
Conference Center for
Science and Technology



China Agricultural Sciencetech Press

2.2.15 NEW BRASILIOMYCES SPECIES ON *DALBERGIA CULTRATA* GRAH. EX. BTH VAR. *CULTRATA* IN THAILAND

Chaiwat To-anun ^A, Saranya Limkaisang ^A, Sawwanee Khom-un ^A and Susumu Takamatsu ^B

^A Dept. of Plant Pathology, Fac. of Agriculture, Chiang Mai Univ. 50200, Thailand

^B Lab. of Plant Pathology, Fac. of Bioresources, Mie University, Japan

INTRODUCTION

Member of the Erysiphaceae have been recorded in Thailand (Giatgong, 1980) but no comprehensive taxonomic assessment of those powdery mildew fungi, which occur in Thailand has previously been made. In this investigation collections of the powdery mildews were made in December of 1999 an attempt to identify and record locally occurring members of the group. A new *Brasiliomyces* species of the current taxonomic has been found and was investigated by light microscope and SEM comparison with the known *Brasiliomyces* species including type specimens of *B. entadae*.

MATERIALS AND METHODS

The *Brasiliomyces* species found on leaves of *Dalbergia cultrata* Grah. ex Bth. var. *cultrata* was collected and examined. Cleistothecia and hyphae were removed from the host surface by pressing the latter against Scotch tape stuck to a microscope slide. After the cleistothecia have been crushed, the number of asci, and the shape, size and number of spores in each ascus were determined. For comparison, we examined the known *Brasiliomyces* species including type specimens of *B. entadae*, and compared them with the present fungus under light microscope and SEM.

RESULTS AND DISCUSSION

The *Brasiliomyces* species found on leaves of *Dalbergia cultrata* Grah. ex Bth. var. *cultrata* has no conidial state. Mycelia are amphigenous, mainly epiphyllous. Cleistothecia scattered, ca (35-) 40-50 (-55) μ m in diameter. Peridium consists of thin, one conspicuous layer, yellowish to light brown, and semitransparent. A few appendages are found in the basal part of cleistothecia, very

short, and often branched and rather coral-like. Usually two asci are included in a cleistothecia, sessile or shortly stalked, (min 25 μ m) 27-31 μ m x 35-43 μ m (max 50 μ m) in size. Number of ascospore is usually six, ellipsoid-ovoid, hyaline or yellowish, 8.5-11 μ m x 15-19 μ m in size. According to the above characters, the fungus was identified as a *Brasiliomyces* species. This is the first record of *Brasiliomyces* in Asia. Only three species of *Brasiliomyces* have been described in the world (Braun, 1987). We examined the known *Brasiliomyces* species including type specimens of *B. entadae*, and compared them with the present fungus. The fungus on *D. cultrata* is clearly distinguished from all of the other species of *Brasiliomyces* by the smaller ascomata with only two asci. This fungus will be report as a new species of *Brasiliomyces* elsewhere.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (PDF/47/2542). The authors wish to thank Prof. Dr. Hitoshi Kunoh for his kind advice on preparation of the sample for the SEM studied. Special thanks to Masafumi Shimizu and Akane Meguro for technical training on the SEM facilities.

REFERENCES

1. Braun, U. 1987. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). Beiheft zur Nova Hedwigia 89 : 1-700
2. Giatgong, P. 1980. Host Index of Plant Diseases in Thailand. Mycology Branch, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture Bangkok Thailand 118 pp
3. Zheng, R. 1984. The Genus *Brasiliomyces* (Erysiphaceae). Mycotaxon. 19 : 281-289.

Summary

The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases

November 5-8; 2002
The Imperial Mae Ping Hotel
Chiang Mai, Thailand

Organized by



New Germination Type of Conidia of Powdery Mildews Found on *Phyllanthus* spp.

C. To-Anun¹, A. Sunawan¹, S. Linkaisang¹, S. Khom-un¹, Y. Sato² and S. Takamatsu³

¹Department of Plant Pathology, Chaingmai University, THAILAND, ²College of Technology, Toyama Prefectural University, Toyama, JAPAN, ³Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Bioresources, Mie University, JAPAN

Introduction

Powdery mildew fungi occur in both anamorphic and teleomorphic forms. However, teleomorphic state, which is necessary for critical identification, rarely occurs or has not been found in most of the Thai powdery mildews. In recent years several workers have attempted to identify powdery mildews based on conidial characters (Boesewinkel, 1980; Cook et al. 1997; Shin and La, 1993). Since each species of powdery mildew produces a distinctive germ tube shape from specific locations on the conidia, special germination types are connected with particular powdery mildew genera or sections. Hence, the germ tubes and germination patterns provide good, useful diagnostic and taxonomic characteristics for the Erysiphaceae. Braun (1987) agreed with Hirata (1955) that the germination patterns are divided into four types, Polygoni, Cichoracearum, Pannosa and Fuliginea. Here we report a new germination type, Microidium-type, in *Oidium phyllanthi* isolated from three species of *Phyllanthus*.

Materials and Methods

Powdery mildews were collected in Thailand between 2001 and 2002 from 73 different plant species. Observation of conidial germ tubes was conducted according to Hirata (1942) described as follow; the inner surface cell layer of onion scales was cut with a razor in a size of 1 cm² and was stripped off by a clean forceps. The cell layer was kept in 80% ethanol in a close chamber for more than two weeks and rinsed with tap water for 30 minute before used. The cell layer was put on a microscope slide followed by removing of the excess water with a filter paper, and inoculated with the fungal conidia. The inoculated cell layer was floated on distilled water in a petri dish, and incubated at 25-30 °C for 24 hours until microscopic observation.

Results and Discussion

Morphology of conidial germ tubes was observed for 73 powdery mildews collected in Thailand using the method described by Hirata (1942). During the observation, we found a new germination type (Fig. 1) in *Oidium phyllanthi* isolated from three species of *Phyllanthus*, *P. acidus*, *P. amarus* and *P. reticulatus*. The germination type is designated as Microidium-type. Germ tubes terminating in a broad club-shaped appressorium with nipple-shaped swelling at the end, or a slightly lobed appressorium, short, ca. 0.8 - 1.2 times as long as conidial length, with or without another small germ tubes at the end of conidia. This type of conidia contains oil-drop like inclusion bodies. This fungus will be reported as a new subgenus of *Oidium* elsewhere.

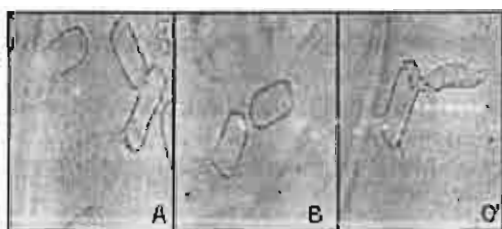


Fig 1. Conidial germ-tubes, Microidium type, of *Oidium phyllanthi*, isolated from A) *P. acidus*, B) *P. amarus* and C) *P. reticulatus*.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (PDF/47/2542), The Hitachi Scholarship Foundation and a grant-in-Aid for Scientific Research (No. 13660047) from Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

References

1. Boesewinkel, H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). Bot. Rev. 46: 167-224.
2. Braun, U. 1987. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). Nova Hedvigia 89: 1-700.
3. Cook, R. T. A., Inman, A. J. and Billings, C. 1997. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. Mycol. Res. 101(8): 975-1002.
4. Hirata, K. 1942. On the shape of the germ tubes of Erysiphaceae. Bull. Chiba Coll. Hort. 5: 34-49.
5. Hirata, K. 1955. On the shape of the germ tubes of Erysiphaceae (II). Bull. Fac. Agr. Niigata Univ. 7: 24-36.
6. Shin, H. and La, Y. 1993. Morphology of edge lines of chained immature conidia on conidiophores in powdery mildew fungi and their taxonomic significance. Mycotaxon 26: 445-451.

TRI-UNIV2003

เอกสารหมายเลข 9

**Proceedings
of
The 10th Tri-University International
Joint Seminar & Symposium 2003**



Role of Asia in The World

- Population, Food, Energy and Environment -

THAILAND : Chiang Mai Univ. ,Kasetsart Univ. ,Khon Kaen Univ. ,Suranaree Univ.
CHINA : Jiangsu Univ. ,Guangxi Univ. ,Inner Mongolia Polytechnic Univ. ,
Shanghai Fisheries Univ. ,Southern Yangtze Univ. ,Xi'an Univ. of Technology
INDONESIA : Institut Pertanian Bogor
KOREA : Dongguk Univ. ,Ewha Womans Univ.
PHILIPPINE : Leyte State Univ.
JAPAN : Mie Univ.

MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDY OF BRASILICOMYCES NEWLY FOUND IN THAILAND

Chaiwat To-anun
Wanwisa Fangfuk
Sawwanee Khom-un
Faculty of Agriculture
Chiang Mai University, Thailand

Yukio Sato
College of Technology
Toyama Prefectural University, Japan

Sumumu Takamatsu
Faculty of Bioresources
Mie University, Japan

ABSTRACT The genus *Brasiliomyces* is a unique powdery mildew having a single layer of peridium cells of ascoma. Production of conidia is not found. All six species described in this genus are disjunctively distributed in (sub) tropical regions such as South Africa, Hawaii, California (North America), India, Taiwan and South America. We conducted phylogenetic analysis of *B. trina* isolated from *Quercus agrifolia* in California using the nucleotide sequences of the 18S, 28S rDNA and ITS regions. The result indicated that the fungus is closely related to *Erysiphe gracilis* and *Typhulochaeta japonica*, both of which are parasitic to *Quercus* and endemic to East Asia, in spite of its unique morphology. The three powdery mildew species belong to *Erysiphe* sect. *Uncinula* in their phylogeny, which was unexpected from their morphological characteristics. We found a new species of *Brasiliomyces*, *B. chiangmaiensis*, on *Dalbergia* in Northern Thailand several years ago. The nucleotide sequence of the rDNA revealed that the fungus is distantly related to *B. trina*. This suggests that these two *Brasiliomyces* species do not share a common ancestor, and diverged independently from different ancestors. Because the powdery mildew fungi is considered to be originated in temperate region of Northern Hemisphere, the fungi distributed in (sub) tropical regions may be introduced from temperate regions. Most of them lose the ability of ascomatal (teleomorph) formation and produce only conidia in their life cycle. On the other hand, completing life cycle only by ascospores (sexual spore) could be more adaptive than producing conidia in a certain condition. *Brasiliomyces* may be an instance of such kind of evolution, in which they diverged independently in the respective region as a result of parallel evolution. We will propose a possible hypothesis on the evolution of *Brasiliomyces*.

1. INTRODUCTION

Powdery mildew fungi are important pathogens belong to the order Erysiphales of the phylum Ascomycota (Hawksworth et al., 1995). They are a group of obligately parasitic fungi of plants which cannot be cultured on artificial media (Takamatsu et al., 1999) and cause powdery mildew diseases on the leaves, stems, fruits and flowers of a wide range of about 10,000 angiosperm species (Amano, 1986). With the exception of the dormant stage, their life cycle completely depends on living hosts, from which they obtain nutrients without killing the host cells and without which they are unable to survive (Matsuda and Takamatsu, 2003). To maintain the obligate parasitic life cycle, Erysiphaceae have developed highly specific and sophisticated mechanisms to avoid the resistance system of the host, to obtain nutrient resources from the host without injuring the host cells, to synchronize their life cycle parameters to those of the host, etc. (Aist and Bushnell, 1991; Bushnell and Gay, 1978; Giese et al., 1997). As a natural outcome, most species of the Erysiphaceae show strict host specificity, in which a given species or race can infect and utilize a narrow

range of host plants, or sometimes only a particular species of host (Schmitt, 1955).

Generally, powdery mildew fungi have been classified mainly on the basis of their teleomorphic characters, but there are many species whose teleomorphic stages have not been found, or are rarely found. Lack of a teleomorphic state makes it difficult to discuss the phylogenetic relationships between anamorphic species and teleomorphic species (Hirata and Takamatsu, 1996). Recent advances in molecular techniques such as DNA-DNA hybridization, RFLP, RAPD-PCR, DNA sequencing and electrophoretic karyotyping, have made it possible to investigate the phylogeny of a variety of organisms at the molecular level (Bruns et al., 1991). However, most of these techniques are not applicable to powdery mildew fungi, because these obligately parasitic fungi cannot grow on artificial media and thus the amount of DNA obtainable from the target fungi often insufficient for analysis using these techniques (Hirata and Takamatsu, 1996). Among the molecular techniques, ribosomal DNA (rDNA) amplification and the direct sequencing of the PCR product developed by White et al. (1990) seem to be the best for phylogenetic

studies of powdery mildew fungi, because DNA sequences can be analyzed using only a small amount of fungal material. Therefore, current taxonomic research in powdery mildews is characterized by new morphological and molecular characteristics.

During 1999-2002, a survey of Erysiphales in Northern part of Thailand was conducted. Previously, there were some records of powdery mildew in Thailand, in which 37 host plant species covering 17 families have been recorded. In this study, 73 fungal taxa from 109 specimens were examined, of which 70 taxa consist of only anamorphic state. Teleomorphic state can be found on only 3 host plant species which one of them is identified as a new species of *Brasiliomyces* found on leaves of *Dalbergia cultrata* var. *cultrata*. This fungus agrees well with the general characteristics of the genus *Brasiliomyces*, and is easily distinguishable from the other six species of *Brasiliomyces* by having smaller ascumata and very few asci. *Brasiliomyces chiangmaiensis* To-anun & Takamatsu is proposed to accommodate this fungus (To-anun et al., 2003). Molecular phylogenetic studies based on rDNA sequence data of this fungus was conducted and compared with *B. trina*. This is the first comprehensive study of powdery mildews in Thailand by comparing morphological characteristics with phylogenetic analyses of the rDNA nucleotide sequences.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Morphological Observation:

The leaves of *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* with *Brasiliomyces chiangmaiensis* were collected at the Queen Sirikit Botanical Garden in northern Thailand and examined as fresh material. For comparison, herbarium samples of *B. trina*, *B. malachrae* and *B. entadae* (IMI 124287) were also examined. Hyphae, ascumata, appendages, asci and ascospores of each fungal collection was stripped off from the leaf surfaces with a clean needle, mounted on a microscope slide and examined in water using light microscope with phase contrast 20x, 40x and 100x oil immersion objectives. The following information was noted during the examination of the fresh specimens: size and shape of ascumata, presence or absence of appendages, structure and size of peridial cells, number of asci per ascus, number of ascospores per asci, size and shape of asci and ascospores, shape and position of hyphal appressoria. Thirty ascumata were measured per sample.

2.2 DNA extraction and rDNA amplification:

Fungal DNA was extracted by the method of Hirata and Takamatsu (1996). Twenty cleistothecia of *B. chiangmaiensis* and *B. trina* were added to 300 µl of 5% Chelex (Bio-Rad) in a 1.5-ml microcentrifuge tube and incubated at 56°C for several hours. After mixing vigorously, the extract was incubated in a boiling water

bath for 8 min. The extract was mixed vigorously again, and then centrifuged at 15,000 x g for 5 min.

The nuclear rDNA regions, i.e., the 18S rDNA, ITS region including the 5.8S rRNA gene, and the 28S rDNA, were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using nest primers sets. PCR reactions were conducted in a total reaction of 50 µl, including the following reagents: H₂O 28.8 µl, 10 x PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 µl; 2.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate 4 µl; two primer set (20 pmol/µl) 1 µl, Taq DNA polymerase (5 unit/µl) 0.2 µl, and DNA 10 µl. A negative control-lacking template DNA was included for each set of reactions. The following thermal cycling conditions were performed in a PCR thermal cycler SP, an initial denaturing step at 95°C for 1.5 min; thermocycling for 30 cycles, where each cycle consisted of 30 sec at 95°C followed by 30 sec at 52°C for annealing, and 30 sec at 72°C for extension; and a final extension cycle of 6.5 min at 72°C. One microliter of the first reaction mixture was used for the second amplification with the partial nested primer set. Components of the reaction mixture and the thermal cycle conditions for the PCR product from the second amplification were the same as for the first PCR. The PCR product was subjected to preparative electrophoresis in 1.5% agarose gel in TAE buffer. The DNA product of each amplification was then excised from the ethidium-stained gel and purified using the JETSORB kit (GENOMED, Germany) following the manufacturer's protocol.

2.3 DNA Sequencing and data analysis:

Nucleotide sequences of the PCR products were obtained for both strands using direct sequencing in an Applied Biosystems 373A sequencer. The sequence reactions were conducted using the PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The primers P1, P2, P3, P4, P6, P7, P8, NS1, NS2, NS3, NS6, NS7 and NS8 were used for the sequencing of the 18S rDNA in both directions. Similarly, NL1, NL2, NL3 and TW14 were used for the sequencing of the 28S rDNA, respectively. The thermocycling was conducted for 30 cycles, where each cycle consisted of 20 sec at 96°C followed by 20 sec at 50°C for annealing, and 4 min at 60 °C for extension.

The sequences were initially aligned using the CLUSTAL X package (Higgins et al. 1996). The alignment was then visually refined with a word processing program, using color-coded nucleotides. Phylogenetic trees were obtained from the data using parsimony and distance methods. For the parsimony analysis, we used the Parsimony Ratchet method (PAUPRat) (Nixon, 1999). This using the stepwise addition option to increase the likelihood of finding the most parsimonious tree with a heuristic search using PAUP version 4.0b8 (Swofford, 2001). Gaps in the

aligned sequences were treated as missing data. The strength of the internal branches from the resulting trees were tested by bootstrap analysis using 1000 replications (Felsenstein, 1985).

For distance analysis, PAUP version 4.0b8 (Swofford, 2001) was used to obtain a distance matrix using Kimura two-parameter algorithm (Kimura, 1980). A neighbor-joining tree was constructed (Saitou and Nei, 1987). The strength of internal branches from the resulting trees was tested by bootstrap analysis (Felsenstein, 1985).

3. RESULTS

The teleomorphic characteristics of the powdery mildew on *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* are as follows; mycelium amphigenous, mainly epiphyllous, persistent, forming irregular white patches, Hyphae hyaline, superficial, almost straight to somewhat undulate, 3-4 μm wide, branching at right or narrow angles. Appressoria well-developed, nipple to oblong club-shaped, single or occasionally opposite in pairs. Conidiophores and conidia unknown. Ascomata scattered to gregarious, (35-)38-45(-48) μm diam (average 41.4 μm); cells of the wall daedaleoid when mature, (10-)15-20 μm diam; peridium thin, one layered, yellowish to light brown, semitransparent, with few basal appendages (2-6, sometimes lacking), mycelioid, thin walled, hyaline, sometimes pale brown near the base, aseptate, often branched, coral-like, almost uniform in width, shorter than the ascomatal diameter, 5-30 x 3-5 μm . Asci two, sessile or short-stalked, thin walled, 33-40(-45) x 27-35 μm (average 38.1 x 31.5 μm), 6-spored (Fig. 1). Ascospores ellipsoid-ovoid, olivaceous to pale greenish due to oil drops, 15.5-18.2 x 8.5-10.5 μm (average 17.5 x 9.3 μm). This fungus agrees well with the general characteristics of the genus *Brasiliomyces*, therefore, *Brasiliomyces Chiangmaiensis* C. To-anun & S. Takamatsu is proposed to accommodate this fungus (To-anun *et al.*, 2003). This is the first record of *Brasiliomyces* species from Southeast Asia.

Molecular phylogenetic studies based on rDNA sequence data of *B. Chiangmaiensis* was conducted and compared with *B. trina* and other powdery mildews. A neighbor-joining tree based on the 28S rDNA sequences showed that *B. Chiangmaiensis* was placed at the basal position of the tree, and was distant from *B. trina* that grouped in the *Erysiphe* clade. A neighbor-joining tree based on the 18S rDNA sequences indicated that *B. Chiangmaiensis* formed a clade with *Erysiphe* clade including *B. trina*, but it had long independent branch supported by bootstrap value 100%. Neighbor-joining trees constructed by the combined data sets of 18S+28S rDNA and 18S+28S+5.8S rDNA showed that *B. Chiangmaiensis* was the sister of the *Erysiphe* clade. However, it was distantly related with *B. trina*. The position in the phylogenetic tree and the difference in morphological

characteristics between *B. Chiangmaiensis* and *B. trina* indicate that the two fungi are not conspecific. This suggests that these two *Brasiliomyces* species do not share a common ancestor, and diverged independently from different ancestors. Because the powdery mildew fungi is considered to be originated in temperate region of Northern Hemisphere, the fungi distributed in (sub) tropical regions may be introduced from temperate regions. Most of them lose the ability of ascomatal (teleomorph) formation and produce only conidia in their life cycle. On the other hand, completing life cycle only by ascospores (sexual spore) could be more adaptive than producing conidia in a certain condition. *Brasiliomyces* may be an instance of such kind of evolution, in which they diverged independently in the respective region as a result of parallel evolution.

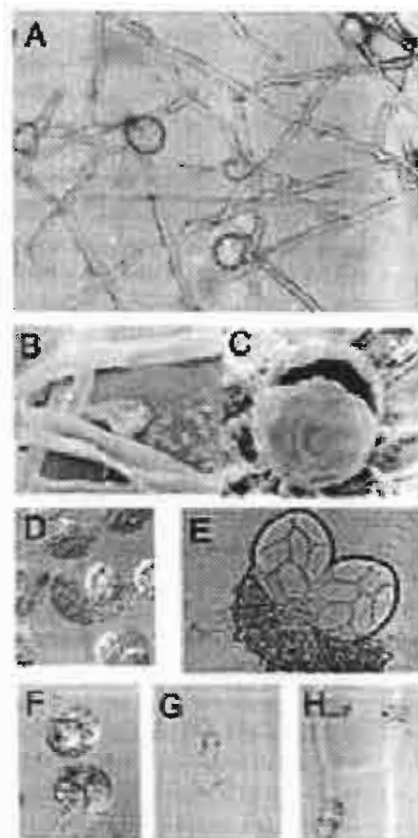


Figure 1: Mycelia, appressoria and young ascomata of *Brasiliomyces Chiangmaiensis* (A): scanning electron micrograph of an appressorium, oblong club-shaped (B); ascoma (C); light micrograph of peridium cells (D); asci (E); ascospores with appendages (F); and germination of ascospores on onion epidermal cells (G and H).

4. DISCUSSION

Brasiliomyces is a little-known genus of powdery mildew which having a single layer of peridium cells of ascoma. It is characterized by hyaline or light-colored, non-ostiolate, thin-walled ascocarps and lacking appendages (Hodges, 1985). First species of *Brasiliomyces* was established on account of the absence of ascomatal appendages by Viégas in 1944 named as *B. malvastri*. This fungus was found on *Malvastrum coromandelianum* in South America. He suggests that non-appendage is an important character of this genus. In 1964, Blumer and Muller gave a new genus *Salmonia* for *Erysiphe malachrae* Seaver. *Salmonia malachrae* is parasitic to *Gossypium hirsutum*. Later, *B. entadae* on *Entada spicata* from South Africa was described by Marasas in 1966. Semitransparent ascocarp without appendage is important characters of *B. entadae*. In addition, they studied comparison of characters of *B. malvastri*, *Salmonia malachrae* and *B. entadae*. They also represented three distinct species of *Brasiliomyces*. In 1980, Boesewinkel transferred *E. malachrae* to *Brasiliomyces malachrae*. Therefore, genus *Salmonia* became a synonym of *Brasiliomyces*. Braun (1981) published a new genus *Californiomyces*, *Californiomyces trina* for *Erysiphe trina* Harkness. He suggested that two ascospores of *Erysiphe trina* should be belonged to *Leveillula*, *Phyllactinia* and *Pleochaeta* but not *Erysiphe* or *Brasiliomyces*. He used characters of two ascospores and sizes of ascospore as a criterion to erect genus *Californiomyces*. Zheng (1984) re-examined characters of *B. malvastri*, *B. entadae*, *B. malachrae*, and *C. trina*. She suggested that all specimens agree with their original description excepted she found scarce, rudimentary appendages, at least in some ascomata. She further suggested that there is no difference between *C. trina* and *Brasiliomyces*, and proposed to transfer *C. trina* into *Brasiliomyces*. Therefore, the genus *Californiomyces* became a synonym of *Brasiliomyces*. Additionally, she observed and compared characters of *B. malvastri* and *B. malachrae*, and concluded that the two species are conspecific. Later, Hodges (1985) erected new species of *Brasiliomyces*, *B. setosus* on *Sapindus oahuensis* found in Hawaiian Island. He examined most of the specimens observed by Zheng (1984) except *B. trina*. His observation showed that *B. setosus* shared the same characteristic, thin-walled ascocarp and lack of appendage with other *Brasiliomyces*. However, morphological characteristic of *Brasiliomyces setosus* was distinguished from other species of *Brasiliomyces*, in which *B. setosus* has the dense layer of setae covering the superficial hyphae. Braun (1987) also examined type collections of *Brasiliomyces* species to confirm that rudimentary ascomatal appendages were present. He distinguished *Brasiliomyces* from *Erysiphe* by its thin-walled (one layered) peridium. Furthermore, *B. cyclobalanopsidis* was report found on *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan (Kuo et al., 1992)

and *B. kumaonensis* was report found on *Quercus* sp. in Northern India (Ahmad et al., 1998)..

Morphologically, a powdery mildew found on leaves of *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* in Thailand is characterized by having thin-walled, semitransparent ascocarp with few basal mycelioid appendages (aseptate, often branched and coral-like) or sometimes lacking. The teleomorphic characteristics of this fungus agrees well with the general characteristics of the genus *Brasiliomyces* and it was proposed as *Brasiliomyces chiangmaiensis* (To-anun et al., 2003). Based on this observation, *B. chiangmaiensis* differs from other species of *Brasiliomyces* by its smaller size of ascomata which are very small, 38-45 μ m (48 μ m, max) diam. These very small ascomata are unique compared with the hitherto known species of the genus *Brasiliomyces*, in which the size of ascomata ranges from 50 to 70 μ m (Braun 1987; Hodges 1985). Not only size of ascocarp, size of ascus and ascospore is smaller than other species except *B. cyclobalanopsidis* having nearly same size with *B. chiangmaiensis*. However, they are different in number of asci and ascospore. *B. chiangmaiensis* has only 2 asci containing 6 ascospores. While *B. cyclobalanopsidis* has 2 asci containing 8 ascospores, *B. entadae* has 3-5 asci containing 5-8 ascospores, *B. malachrae* has 2-4 asci containing 4-5 ascospores, *B. setosus* has 3 asci containing 5-6 ascospores, *B. trina* has 3 asci containing 2 ascospores, and *B. kumaonensis* has 3-5 asci containing 4-6 ascospores. Therefore, the genus *Brasiliomyces* has currently seven species, *B. trina* (North America), *B. entadae* (South Africa), *B. malachrae* (South America), *B. setosus* (Hawaii), *B. cyclobalanopsidis* (Taiwan), *B. kumaonensis* (Northern India) and *B. chiangmaiensis* (Northern Thailand) (Braun 1987; Hodges 1985; Kou et al., 1992; Ahmad et al. 1998; To-anun et al., 2003). All of seven species of this genus are disjunctively distributed in (sub) tropical regions.

There is no report of anamorphic state in *Brasiliomyces* except for *B. malvastri*, in which anamorph was reported by Viégas in 1944. He described that conidia formed in chains without fibrosin bodies occurred with teleomorph state of *B. malvastri*. However, Hodges (1985) suggested that conidial state of *Oidiopsis gossypii* sometime occur simultaneously with *B. malachrae* in Peru and Venezuela. Anamorphic state of this genus has no been reported in other species.

Phylogenetic trees of whole powdery mildew have been reported by Mori et al. (2000) based on the sequences of 18S, 28S, and combined 18S, 28S, and 5.8S using different tree-building methods (parsimony and neighbor-joining methods). The phylogenetic trees placed *B. trina* in the *Pseudoidium* lineage. In this lineage, powdery mildews on *Quercus* species, *B. trina* and *E. gracilis* grouped together. Additionally, they constructed a constraint tree based on a hypothesis that *Erysiphe* (section *Erysiphe*) and *Brasiliomyces* should be monophyletic. Kishino-Hasegawa test showed that

the hypothetical tree was significant rejected, indicating that *Erysiphe* (section *Erysiphe*) and *Brasiliomyces* are not monophyletic. The present study revealed that DNA sequences of the ITS, 18S, and 28S of *B. chiangmaiensis* are unique compared with *B. trina* and other powdery mildew, which supported that *B. chiangmaiensis* is a new species. The ITS sequences (ITS1 and ITS2) are too variable to construct a phylogenetic tree. However, 28S and 18S include the good amount of information for constructing phylogenetic trees. A 28S phylogenetic tree showed that *B. chiangmaiensis* does not group with *Erysiphe* species (including *B. trina*). The phylogenetic tree showed that *B. chiangmaiensis* placed at the basal position of the tree. In the 18S tree, *B. chiangmaiensis* formed a clade with *Erysiphe* clade including *B. trina* but it had long independent branch. Because 28S and 18S showed conflicted positions, combined trees of 28S+18S and 28S+18S+5.8S were constructed to compare with 18S or 28S data alone. Both 28S+18S and 28S+18S+5.8S phylogenetic tree shows that *B. chiangmaiensis* was the sister of *Erysiphe* clade. However, *B. chiangmaiensis* was distantly related with *B. trina* and placed at unique position. In conclusion, based on the morphological and molecular data, we described *B. chiangmaiensis* which causes a powdery mildew on *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* as a new species of *Brasiliomyces*. No close relationship has been found with other described *Brasiliomyces* species. This may be because this species occurs in Asia where is distant from the origin of other *Brasiliomyces* species, i.e., South America in *B. malacharae*, South Africa in *B. entadae*, North America in *B. trina*, and Hawaii in *B. setosus*. Furthermore, *B. chiangmaiensis* is the first report of powdery mildew genus *Brasiliomyces* in Thailand and also in Southeast Asia.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Hitachi Scholarship Foundation and the Thailand Research Fund (PDF/47/2542).

6. REFERENCE

- Ahmad N, Sarbhoy AK, Kamal (1998) A new variety and two new species of powdery mildews from India. *Mycol Res* 102:30-32.
- Aist JR, Bushnell WR (1991) Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of resistance. In: Cole GT, Hoch HC. (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, New York, pp. 321-345.
- Amano K (1986) Host Range and Geographical Distribution of the Powdery Mildew Fungi. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Blumer S, Muller E (1964) Über zwei Mehltauarten auf Baumwolle in Peru. *Phytopathol. Z.* 50:379-385.
- Boesewinkel HJ (1980) The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). *Bot Rev (Lancaster)* 46:167-224.
- Braun U (1981) Taxonomic studies in the genus *Erysiphe* 1. Generic delimitation and position in the system of the Erysiphaceae. *Nova Hedwigia* 34:679-719.
- Braun U (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beih Nova Hedwigia* 89:1-700.
- Braun U (1995) *The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe*. Gustav Fischer Verlag, New York.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW (1991) Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22:525-564.
- Bushnell WR, Gay J (1978) Accumulation of solutes in relation to the structure and function of haustoria in powdery mildews. In: Spencer DM (Ed.), *The Powdery Mildews*. Academic Press, New York, pp 183-235.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Giese H, Hippe-Sanwald S, Somerville WJ (1997) *Erysiphe graminis*. In: Carroll GC, Tudzynski P (Eds.), *The Mycota V Plant Relationships Part B*. Springer, Berlin, pp. 55-78.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995) *Aninsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. 7th ed. Kew, UK: CAB International. 616 p.
- Higgins DG, Bleaby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 8:189-191.
- Hirata T, Takamatsu S (1996) Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37:283-288.
- Hodges Jr. CS (1985) Hawaiian forest fungi VI. A new species of *Brasiliomyces* on *Sapindus oahuensis*. *Mycologia* 77:977-981.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16:11-120.
- Kuo KC, Hsieh WH, Leu LS (1992) *Brasiliomyces cyclobalanopsidis* sp. nov., a new powdery mildew on *Cyclobalanopsis glauca*. *Mycol Res* 96:702-703.
- Marasas WFO (1966) New species of Ascomycetes and a new genus of Sphaeropsidaceae from Transvaal. *Bothalia* 9:203-215.
- Matsuda S, Takamatsu S (2003) Evolution of host-parasite relationships of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27:314-327.

- Nixon KC (1999) The parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schmitt JA (1955) The host specialization of *Erysiphe cichoracearum* from zinnia, phlox and cucurbits. *Mycologia* 47:688-701.
- Shin HD (2000) Erysiphaceae of Korea. Nat Inst Agric Sci Tech, Suwon, Korea.
- Swofford DL (2001) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) 4.0b8. Sinauer, Sunderland, MA.
- Takamatsu S, Hirata T, Sato Y, Nomura Y (1999) Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Mycoscience* 40:259-268.
- To-anun C, Fangfuk W, Khom-un S, Sato Y, Takamatsu S (1996) A new species of *Brasiliomyces* (Erysiphaceae) on *Dalbergia cultrata* var. *cultrata* from Thailand. *Mycoscience* (in press).
- Viégas AP (1944) Algos fungos do Brasil. II. Ascomycetos. *Bragantia* 4:1-392.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: PCR Protocols, (ed. By Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. J. and White, T. J.), pp. 315-322. Academic press, San Diego, California.
- Zheng RY (1984) The Genus *Brasiliomyces* (Erysiphaceae). *Mycotaxon* 19:281-289.



Dr. Chaiwat To-Anun

Data of birth: 26/07/1960
Associate Professor
Field of research:
Fungal Phylogenetic and
Molecular Plant –
Microbe Interaction
Laboratory of Molecular Plant
Pathology
Department of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture
Chiang Mai University
Thailand



Wanwisa Fangfuk

Data of birth: 10/05/1979
Master Student
Field of research:
Fungal Phylogenetic and
Molecular Plant –
Microbe Interaction
Laboratory of Molecular Plant
Pathology
Department of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture
Chiang Mai University
Thailand

日本菌学会第48回大会 講演要旨集

Abstracts of Papers Presented at the 48th Annual Meeting
of the Mycological Society of Japan

2004年5月29日(土)・30日(日)

県立長崎シーボルト大学

主催 日本菌学会

May 29–30, 2004

Nagasaki, Japan

The Mycological Society of Japan

- B-2903 タイ国チェンマイで採集された *Leidyomyces* 属の 1 種について
佐藤大樹¹⁾・Chaiwat To-anun²⁾ (¹⁾ 森林総研; ²⁾ チェンマイ大学)
A species of *Leidyomyces* collected from Chiang Mai, Thailand
By H. Sato¹⁾, C. To-anun²⁾
(¹⁾ Forestry and Forest Products Res. Inst., ²⁾ Chiang Mai Univ.)

タイ北部チェンマイにおいて、クロツヤムシの一種 (*Aceraius helferi*) の後腸から、*Leidyomyces* 属の 1 種を発見した。クロツヤムシは腐朽した倒木の樹皮下より 2 頭採集した。腹部背面側から解剖し、後腸を摘出した。腸内容物を蒸留水で洗浄した後、ラクトフェノールで封入して腸壁を観察したところ、1 つの付着器 (ホールドファスト) を共有する複数の菌体が観察された。また、この菌は後腸の前部のみに存在していた。付着器は、細胞からの分泌物が硬化したものと考えられた。菌体は単独で存在する場合から 15 本以上の菌体が付着器を共有する場合があった。菌体が増加する過程は不明である。サイズは、付着部位の直径が 11-25 μm 、高さは 11-32 μm であった。付着器の特徴と菌の存在部位により、本菌は *Leidyomyces* 属と同定された。試料の菌体は分枝せず、長さは 750 μm に達した。菌体内部には縦 1 列に第 1 感染孢子嚢胞子を形成していた。この孢子は孢子嚢内で円筒形であり、長さ $\times$ 幅 = 26-41 $\times$ 14.5-18 (μm)、平均 33.5 $\times$ 15.8 (μm)、(N=16) であった。*Leidyomyces* 属は、1 属 1 種 *L. attenuatus* から成る。*L. attenuatus* の孢子嚢胞子と比較し、本菌の孢子嚢胞子は大型であった。

- B-2904 ケカビ目 *Umbelopsis ramanniana* の形態的変異と ITS 領域における塩基配列の関連
小川吉夫¹⁾・水吉達治²⁾・岩本 晋³⁾・徳増征二²⁾ (¹⁾ 日本大学薬学部、²⁾ 筑波大学菅平高原実験センター、³⁾ 協和発酵工業 (株))
The relationship between morphological variations of *Umbelopsis ramanniana* and its ITS sequences. (Y. Ogawa¹⁾, T. Mizuyoshi²⁾, S. Iwamoto³⁾ and S. Tokumasu²⁾
(¹⁾ College of Pharmacy, Nihon Univ. ²⁾ Sugadaira Mon. Res. Cent., Univ. Tsukuba.
³⁾ Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.)

Umbelopsis 属は、i) 直立した孢子嚢柄の厚い層から成るビロード状のコロニーを形成すること、ii) この属のほとんどの種がピンクないしは黄土色の孢子を有すること、および、iii) 柱軸を欠くか、わずかに凸状に湾曲した隔壁ないしは小型の柱軸を有することから他のケカビ目に属する菌から区別される。これら *Umbelopsis* 属菌の中でも *U. ramanniana* は最も普通に存在する同属の種のひとつで、極地方から赤道にいたる様々な気候帯の種々の基質に生育する。その孢子嚢胞子の形態には、2.5 - 5.5 $\times$ 1.5 - 3 μm の卵円型、腎臓型から長楕円形に至るまでの著しいしかも連続した変異のあることが知られている。Sugiyama et al. (2003) は新種として記載した *U. gibbeispora* の同属内における他の近縁種との類縁関係を 28S rDNA の塩基配列に基づいて解析した際、用いられた 4 株の *U. ramanniana* が 3 つの異なる subclade を形成したことを示した。また、Meyer & Gams (2003) は、ケカビ目内における *Umbelopsis* 属の分類学的位置づけを ITS1 領域の塩基配列に基づいて検討した際に、形態的には *U. ramanniana* に類似するが、塩基配列でわずかに異なる未記載種の存在を示した。これらの事実は、*U. ramanniana* には、形態的に識別することが容易ではないが、遺伝子的には区別することが出来るいくつかの分類群が含まれることを示唆している。本研究では、もう一度詳細な形態観察に立ち返り、SEM によって観察される孢子嚢胞子の形態と ITS1、5.8S rDNA および ITS2 の塩基配列の変異の関連を明らかにすることを試みた。その結果、一見連続して変異しているように見える孢子の形態において、卵円形、楕円形、長楕円形の孢子を形成する菌株がそれぞれ異なる clade に属することが明らかとなった。

関本訓士¹⁾・横尾一成¹⁾・川村嘉広²⁾・本多大輔¹⁾ (¹⁾ 甲南大理工生物; ²⁾ 佐育水振セ)The ultrastructural analysis of the endoparasite on cultivated Nori, *Porphyra* spp.by S. Sekimoto¹⁾, K. Yokoo²⁾, Y. Kawamura²⁾ and D. Honda¹⁾(¹⁾ Dept of Biol., Fac of Sci and Eng., Konan Univ., ²⁾ Saga Pref. Ariake Fish Res. and Devl. Cent.)

我々は昨年の本学会大会で *Porphyra* spp. に細胞内寄生する壺状菌が卵菌綱の *Olpidiopsis* sp. と同定されること、18S rRNA 遺伝子の部分長の分子系統解析の結果から壺状菌が卵菌綱内で初期に分岐したことを発表した。しかし、これら全実性、細胞内寄生性卵菌の形態は宿主細胞の形態に依存することが考えられ、光学顕微鏡レベルの形態形質が系統を反映しているかについては疑わしい。また、*Olpidiopsis* 属の基準種、*O. saprolegniae* を含む淡水産 *Olpidiopsis* は有性生殖を行い卵胞子を形成するのに対し壺状菌は有性生殖を行わないことから、同じく有性生殖を行わない他の海産全実性卵菌類との類似性が指摘されている。我々は壺状菌が淡水産 *Olpidiopsis* と海産全実性卵菌類のどちらに近縁かを調べるためには微細構造学的特徴の比較が必要であると考え、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微細構造解析を行った。観察の結果、壺状菌が宿主細胞内に挿入管を伸長し、細胞質を分解しながら発達していく過程が観察された。また、細胞壁形成及び遊走子嚢分化は宿主細胞が全て分解吸収された後に起こることが分かった。遊走子嚢内での細胞分裂様式、遊走子細胞質内のミトコンドリアの位置は淡水産ミズカビ寄生性 *Olpidiopsis varians* よりも海産紅藻寄生性全実性卵菌、*Petersenia palmariae* と類似性が高かった。しかし、壺状菌遊走子の細胞質内には明瞭な K-body (kinetosome associated organelle) が存在した。K-body とは鞭毛基部の近傍に局在する特殊な小胞であり、卵菌綱内ではこれまで糸状・分実性のミズカビ卵菌類 (ミズカビ目、フシミズカビ目) と *Olpidiopsis saprolegniae* で存在が確認されている。一方、海産全実性卵菌類にはその報告がない。調査された生物も少なく全体的な系統関係を考察するには情報が不足しているが、少なくとも K-body を壺状菌と淡水産ミズカビ寄生性 *Olpidiopsis saprolegniae* の両者が持つことはそれらが近縁であることを示唆するものであった。

B-3011 タイから出現した *Haptoglossa* 3 種について計屋昌輝¹⁾・徳増征二¹⁾・To-Anum Chaiwat²⁾ (¹⁾ 筑大管セ; ²⁾ Dept. Pl. Pathol., Chiang Mai Univ.)Three species of *Haptoglossa* isolated from the samples collected in Thailand by M. Hakariya¹⁾, S. Tokumasu¹⁾ and C. To-Anum²⁾(¹⁾ Sugadaira Mont. Res. Cent., Univ. Tsukuba; ²⁾ Dept. Pl. Pathol., Chiang Mai Univ.)

Haptoglossa はセンチュウ・ワムシ・クマムシに感染する寄生性の卵菌として知られている。その感染方法はガンセルと呼ばれる感染細胞を用いて、それに触れた宿主に対して sporidium という小胞子を約 0.3 秒というごく短時間で撃ち込むという特殊なものである。sporidium は宿主の体内で肥大伸長して遊走子嚢となり、遊走子嚢は宿主の体外に放出管を伸ばし種によって遊走子や不動胞子を放出する。タイ北部で 2003 年 9 月に採取した 100 サンプルの土壌やリターを約 1g ずつ WA 培地に接種し、室温で培養したところ、そのうちの 5 つのサンプルから 1 株ずつ、計 5 株の *Haptoglossa* が得られた。出現サンプルは全て植物園や実験用の畑など、人工的な環境で採取されたものであった。この 5 株は全てセンチュウの体内に遊走子嚢を形成している状態で発見され、遊走子性の *H. zoospora* が 1 株、不動胞子性の *H. heterospora* が 3 株、それに未記載種 1 株であった。これらの菌について、微細構造及び宿主に対する特異性に関する研究結果について述べる。

Entomology

Strength in Diversity

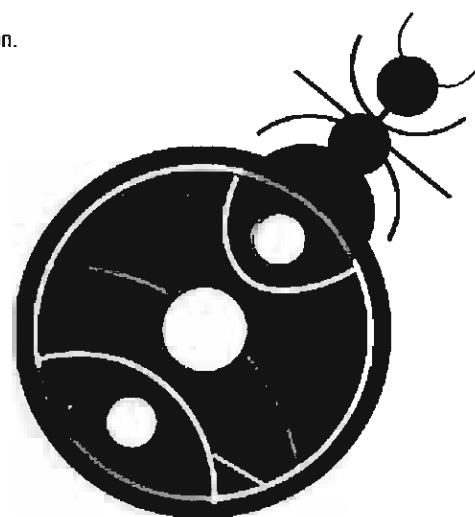
XXII International Congress of Entomology
15-21 August 2004 ■ Brisbane, Queensland, Australia

Unfortunately your machine does not meet the required specifications* for this application.

To browse the documents stored on this CD-ROM please click [here](#).

***Requirements**

Windows 98SE (with MDAC), Windows NT, Windows 2000, Windows XP





Strength in Diversity

Please selection a section

- [Section 0](#)
- [Section 1](#)
- [Section 2](#)
- [Section 3](#)
- [Section 4](#)
- [Section 5](#)
- [Section 6](#)
- [Section 7](#)
- [Section 8](#)
- [Section 9](#)
- [Section 10](#)
- [Section 11](#)
- [Section 12](#)
- [Section 13](#)
- [Section 14](#)
- [Section 15](#)
- [Section 16](#)
- [Section 17](#)
- [Section 18](#)
- [Section 19](#)
- [Section 20](#)

Entomology: Strength in Diversity

Section 4

Fungus derived from hindgut of passalid beetle

H Sato, C To-anun

FFPRI, Tsukuba Ibaraki 305-8687, Japan; hirokis@ffpri.affrc.go.jp

A species of *Leidyomyces* was discovered from *Aceraius helferi* (Coleoptera: Passalidae) collected in Chiang Mai, Thailand. A pair of the beetle was collected from a decayed log. Hindguts of the beetles were derived by dissection. Linings of the hindguts were observed after rinsing with distilled water. Several tufts of non-branching hyphae that were sharing a holdfast (attaching structure) were observed. This fungus was observed only at the former part of hindguts. The tufts were consisted of over fifteen hyphae growing up to 750 μm . This fungus was identified as a genus *Leidyomyces* by both its sharing feature of holdfast and living site of the gut. Diameter and length of the holdfast was 11-25 μm and 11-32 μm , respectively. Distal part of thallus was septate and showed a series of cell: length x diameter = 26-41 x 14.5-18 (μm) average 33.5 x 15.8 (μm), (N=16). Each of the cells produced a spore (primary infestation sporangiospore) inside; the genus *Leidyomyces* is consisted of only one species *L. attenuatus*. The size of the spore of our specimens was larger comparing with that of *L. attenuatus*.

King Mongkut's Institute
of Technology Ladkrabang



**Proceedings of
The 1st KMITL
International Conference
on**

***Integration of Science &
Technology for
Sustainable Development***

Volume 2

25 - 26 August, 2004

Held at KMITL, Bangkok, Thailand.

Powdery Mildews of Thailand in the Genus *Oidium* Subgenus *Pseudoidium* : Integrated Analyses of Morphological and Molecular Characteristics

Chaiwat To-anun¹, Aumpaiwan Sunawan¹ and Susumu Takamatsu²

*1 Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University,
Chiangmai 50200 THAILAND. Tel.: +66 53 944021; Fax.: +66 53 944666
E-mail: agppi006@chiangmai.ac.th*

*2 Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Bioresources, Mie University,
1515 Kamihama, Tsu 514-8507, JAPAN*

ABSTRACT

During 2003-2004, a survey of powdery mildew fungi was conducted in the northern part of Thailand, including Chiangmai, Chiangrai, Nan and Mae Hong Son. The main objective of this study was to describe and identify powdery mildews in the genus *Oidium*, subgenus *Pseudoidium*. This subgenus is characterized by conidia produced singly (solitary) one at a time without fibrosin bodies and polygoni-type germ tubes. The teleomorphic state, if found, belongs to the genus *Erysiphe*. In this study, we observed 51 host plant species covering 33 host plant families. On these 51 host plants, only one species of powdery mildew producing both anamorphic and teleomorphic states was found. This presentation provides descriptions of powdery mildews on each host plant species and their anamorphic and teleomorphic (when found) characteristics. Taxonomic notes, photographs and drawings of the specimens examined are presented. Phylogenetic trees of this subgenus are also provided. This is the first comprehensive study of powdery mildews in Thailand which compares morphological characteristics with phylogenetic analyses of the ITS nucleotide sequence

Keywords

Powdery mildew, Oidium, Pseudoidium, Erysiphe

1. INTRODUCTION

Powdery mildew fungi occur in both anamorphic and teleomorphic forms. The characteristics of all structures of these fungi can be of taxonomic value. Especially among the earlier authors, the opinion was widely distributed that only a limited number of features should generally be used in Erysiphacean taxonomy². Salmon¹ stressed that the conidial stages should not be used for systematic purposes and he ignored the

taxonomic value of the anamorphs entirely. Thus, he came to a very wide species concept and numerous authors followed him in neglecting the anamorphs. For many years it has been accepted that they are extremely difficult to identify when reproducing asexually. In Thailand, almost all species do not undergo sexual reproduction¹⁶, resulting in a poor knowledge of which species occur.

Technical progress in the last decades, e.g., in electron microscopy and molecular biology, strongly influenced the further development of the taxonomical system of the Erysiphales and its phylogenetic interpretation. Exciting innovations in the generic taxonomy of the Erysiphales, based on molecular and scanning electron microscopy (SEM) examinations, and a better insight into its phylogeny are results of comprehensive investigations recently carried out^{6,5}. The following changes in the generic system of the Erysiphales, based on SEM and molecular results have recently been introduced⁴. The new system of powdery mildew genera that connected with numerous nomenclatural changes, which are certainly not very welcomed by non-taxonomists. However, it has to be emphasized that these changes are the result of scientific progress. Thus it is possible to identify the powdery mildew in Thailand by comparing morphological characteristics with phylogenetic analyses of the ITS nucleotide sequences.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Light Microscopy of Fresh Material

Hyphae, conidiophores and conidia of fresh materials were examined in water using light microscopy with phase contrast using 20x, 40x and 100x oil immersion objectives. The following information was noted during the examination of the fresh specimens: size and shape of conidia,

presence or absence of fibrosin bodies, nature of conidiogenesis, characteristics of the conidiophore, e.g., size and shape of foot cell, position of the basal septum, shape and position of hyphal appressoria, position of germ tubes and shaped of appressoria on germ tubes of conidia. Thirty conidia were measured for each specimen examined.

2.2 DNA Extraction and PCR Amplification

Whole-cell DNA was isolated from fresh fungal specimens or herbarium specimens by the chelex method¹¹. The nuclear rDNA regions, ITS region including the 5.8S rRNA gene, was amplified twice or three times by the PCR using nested primer sets. The PCR product was subjected to preparative electrophoresis in 1.5% agarose gel in TAE buffer. The DNA product of each amplification was then excised from the ethidium stained gel and purified using the JETSORB kit (GENOMED, Germany) following the manufacturer's instructions.

2.3 DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

Nucleotide sequences of the PCR products were obtained for both strands using direct sequencing in an Applied Biosystems 373A sequencer (Applied Biosystems). The sequence reactions were conducted using the PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The primers ITS1, T3, T4 and ITS4 were used for the sequencing of the ITS region in both directions.

The obtained sequences were initially aligned using the Clustal V package¹⁰. The alignment was then defined visually with a word processing program with color-coded nucleotides. Phylogenetic trees were obtained from the data using maximum-likelihood (ML), distance, and parsimony methods. For ML and distance analyses, the most appropriate evolutionary model was determined for a given data set using PAUP* 4.0b8¹⁷ and Modeltest 3.06. A starting tree was obtained with the neighbor-joining method. With this tree, likelihood scores were calculated for 56 alternative models of evolution by PAUP*. The output file was then imported to Modeltest to compare the models by using Akaike's (1974) information criterion (AIC). Once a model of evolution was chosen, it was used to construct phylogenetic trees with the ML and neighbor-joining (NJ) methods using PAUP*.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The first systematic trial to identify the conidial states of powdery mildews at species level was made by⁷ who grouped species of *Oidium* according to the size and shape of their conidia and created a key to its species. Foex⁸, Jaczewski¹² contributed to the classification of the conidiophore types in the genus *Oidium*. Jaczewski¹² introduced the terms *Euoidium* and *Pseudoidium* for *Oidium* states with catenate and solitary conidia respectively. Hirata¹¹ provided comprehensive germination experiments with Japanese species of powdery mildews. Golovin⁹ reported extensive study on the anamorphs of the genus *Leveillula*. A survey on the Erysiphaceae, including the anamorphs, was given by Yarwood¹⁹. Boesewinkel¹ provided the first real key based on a combination of more than 12 morphological characteristics observed on conidia, conidiophores, appressoria, haustoria, fibrosin bodies, and mycelium. Shin and La¹⁴ and Shin and Zheng¹⁵ introduced some new morphological features of taxonomic relevance.

Progressive report was done by the work of Cook et al.⁶, who examined surface of conidia by SEM and separated genus *Oidium* into eight subgenera. Braun³ discussed the classification of the Erysiphaceae proposed by Cook et al.⁶ and introduced some corrections and alterations. Comprehensive examinations of nucleotide sequences of the rDNA ITS region of powdery mildew fungi have also been carried out¹⁸. Because the results of these studies provided numerous molecular data as well as new SEM examinations, it was possible to re-arrange the classification of the Erysiphaceae⁵. Recently, Braun et al.⁴ reported that the characteristics of the anamorphs are the base for the generic taxonomy of the Erysiphales and reflect the phylogeny in this fungal group. The teleomorphs are less important for the generic taxonomy but provide useful features on the species level. Thus, it is possible to classify the powdery mildews which generally teleomorphic state are not found or rarely occurs in most of the powdery mildews in Thailand¹⁶.

The accurate identification of powdery mildew fungi is desirable, not only to determine not only to determine appropriate control measures, but also for resistance breeding and to ensure quarantine barriers are not broken. Since 2002, a survey of powdery mildew fungi in the genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium*, was conducted in the northern part of Thailand, including Chiangmai, Chiangrai, Nan and Mae Hong Son. This subgenus is characterized by conidia produced solitarily without fibrosin bodies, and by polygoni-type germ tubes. The

teleomorphic state belongs to the genus *Erysiphe*. During the study, 51 host plant species covering 33 host plant families were collected and used for microscopic observation of morphological characteristics. Because specimens from 50 of the 51 host plant species lacked the teleomorphic state, sequencing of the rDNA ITS region was done on 18 of them to aid in the identification of the anamorphic material. Of the 51 host plant species, 38 species are first records in Thailand, of which 13 species are first records in the world. The teleomorphic state was found only in a powdery mildew on *Tectona grandis* (teak), which was identified as *Erysiphe tectonae* (section *Uncinula*). Braun and Takamatsu⁵ studied the phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, and *Uncinula* by morphology and rDNA ITS sequences, and found a very close relationship between the genera *Erysiphe*, *Microsphaera* and *Uncinula*. They reduced the genus *Uncinula* into *Erysiphe* emend. based on the characteristics of the anamorphic state (*Pseudoidium*) and ITS sequences. Thus, *U. tectonae* was transferred to *Erysiphe tectonae* (Salmon) Braun and Takamatsu⁵. In the present study, the ITS sequence of *E. tectonae* differed from all isolates of *Erysiphe* species, suggesting that it is a unique species. In conclusion, morphology and the ITS sequences data of the other fungi in this subgenus are described in details. This is the first comprehensive study of powdery mildews in Thailand to give a detailed description of the morphological characteristics and a phylogenetic analysis of the ITS nucleotide sequence of the subgenus *Pseudoidium*.

4. ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Hitachi Scholarship Foundation, the Thailand Research Fund (PDF/47/2542), JICA (ATRAC), and a grant-in-Aid for Scientific Research (Nos. 13660047, 14255004 and 15405021) from Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

5. REFERENCES

1. Boesewinkel, H.J. (1980) The morphology of the imperfect states of powdery mildews (*Erysiphaceae*). Bot. Rev. (Lancaster) 46:167-224.
2. Braun, U. (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). Beih Nova Hedwigia 89:1-700.
3. Braun, U. (1999) Some critical notes on the classification and generic concept of the Erysiphaceae. Schlechtendalia 3:49-55.
4. Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J. and Shin, H.D. (2002) The taxonomy of the powdery mildew fungi. pp 13-55. In The Powdery Mildews, A comprehensive treatise (RR B Janger, WR Bushnell, AJ Dik, TLW Carver ed.) APS Press Minnesota
5. Braun, U. and Takamatsu, S. (2000) Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (*Erysiphaceae*) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (*Cystothecaceae*) inferred from rDNA ITS sequences & some taxonomic consequences. Schlechtendalia 4:1-33.
6. Cook, R.T.A., Inman, A.J. and Billings, C. (1997) Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. Mycol. Res. 101:975-1002.
7. Ferraris, I. (1912) Flora italica cryptogama. I. Hyphales.
8. Foex, E. (1913) Recherches sur *Oidiopsis taurica* (L.v.). Ann Bull Soc myc Fr 29:577-588.
9. Golovin, P.N. (1956) Morfologiceskij obzor roda *Leveillula* Arnaud (mucnistoro-sjanye gribysem Erysiphaceae) Tr bot inst im VL Komarova, An SSSR, ser II 10:193-308.
10. Higgins, D.G., Bleaby, A.J. and Fuchs, R. (1992) CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. Comput. Appl. Biosci. 8:189-191.
11. Hirata, K. (1955) On the shape of the germ tubes of *Erysiphaceae* (II). Bull. Fac. Agr. Niigata Univ. 7:24-36.
12. Jaczewski, A. (1927) Karmannyj opredelitel' gribov 2 Mucnistoro-sjanye griby Leningrad
13. Salmon, E. (1900) A monograph of the Erysiphaceae. Mem Torrey Bot Club 9: 1-292.
14. Shin, H.D. and La, Y. (1993) Morphology of edge lines of chained immature conidia on conidiophores in powdery mildew fungi and their taxonomic significance. Mycotaxon 26: 445-451.
15. Shin, H.D. and Zheng, R.Y. (1998) Anamorphic morphology of *Uncinula* and allied genera (I). Mycotaxon 66: 243-266.
16. Sontirat, P., Pitakpawan, P., Khamhangridthong, T., Choobamroong, W. and Kueprakone, U. (1994) Host Index of Plant Diseases in Thailand (Third Edition). Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture Bangkok Thailand.
17. Swofford, D.L. (2001) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0b8 Sinauer, Sunderland, MA.
18. Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y. and Nomura, Y. (1999) Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* sect. *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS
19. Yarwood, C. E. (1957) Powdery mildews. Bot. Rev. 13:235-301.

The IV Asia-Pacific Mycological Congress & The IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium



ABSTRACTS

14 – 19 November, 2004, Chiang Mai Thailand.



By:

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
International Mycological Association Committed for Asia
and British Mycological Society.

Two species of *Leptographium* isolated from blue-stained sapwood of *Pinus kesiya* and bark beetle galleries in Thailand

Y. Yamaoka¹, H. Masuya², W.-H. Chung¹, H. Goto³, C. To-Anun⁴ and S. Tokumasu¹

¹ Graduate School of Life & Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

³ Kyusyu branch of Forestry and Forest Products Research Institute, Kumamoto, Kumamoto 860-0862, Japan

⁴ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Two species of *Leptographium* were isolated from blue-stained sapwood of *Pinus kesiya* and bark beetle galleries in pine forests near Chiang Mai, Thailand. Based on morphological observations, these two species were identified as *L. pini-densiflorae* and *L. yunnanense*. *Leptographium pini-densiflorae* has only been reported from Japan. The fungus was isolated from five bark beetles invading *Pinus densiflora* in Japan. In Thailand, it was isolated from *Pinus kesiya* invaded by *Coccotrypes longior* and *Polygraphus major*. This is the first record of the fungus outside of Japan. *Leptographium yunnanense* has been reported from China and Japan and isolated from *Tomicus piniperda* and beetle infested pines. In Thailand, it was isolated from weevils (Curculionidae).

Powdery mildews of Thailand: Integrated analyses of morphological and molecular characteristics

Chaiwat To-Anun^{1*}, Sawwanee Kom-Un¹, Susumu Takamatsu²

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiangmai 50200 Thailand

² Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu 514-8507, Japan

The powdery mildew fungi are important pathogens of plants which are obligately parasitic on the leaves, stems, fruits and flowers of a wide range of angiosperms. Since 1999, survey of powdery mildew fungi in northern part of Thailand, i.e., Chiang Mai, Chiangrai, Nan and Sukhothai has been conducted. The main objects in this study are to describe and identify powdery mildews on 124 specimens consisted of 89 plant species covering 26 families. The powdery mildews in this study include anamorphic state genera *Oidium*, *Oidiopsis* and *Ovulariopsis*, and teleomorphic state genera *Phyllactinia*, *Erysiphe* and *Brasiliomyces*. Within 89 host plant species, 56 species are first records in Thailand and 17 species are first records in the world. Anamorphic specimens of genus *Oidium* were further divided into subgenus *Pseudoidium* on 40 host plant species, subgenus *Reticuloidium* on six host plant species and *Fibroidium* on 34 host plant species. *Oidium* subgenus *Microidium* is proposed as a new subgenus of *Oidium* on the basis morphological and molecular characteristics on three species of *Phyllanthus* spp. The genera *Oidiopsis* and *Ovulariopsis* were described on two and three host plant species, respectively. New species of powdery mildew genus *Brasiliomyces* on *Dalbergia cultrata* was described in details on the basis of morphological and molecular characteristics. In addition, we conducted the molecular tool to aid the identification of anamorphic materials by assessing the rDNA sequence. This study provides descriptions of powdery mildews on each host plant species, their anamorphic and teleomorphic (if found) characteristics, specimens examined, taxonomic notes, photographs and drawings. Phylogenetic trees of each genus are also provided. This is the first comprehensive study of powdery mildews in Thailand by comparing morphological characteristics with analyses of the ITS nucleotide sequences.

Entomogenous fungi collected in Chiang Mai, Thailand

H. Sato¹ and C. To-anun²

¹Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Kurokami 4-11-16, Kumamoto city, Kumamoto 860-0862, Japan

²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Entomogenous fungi were researched in northern Thailand mainly in Chiang Mai from Sep. 22 to Oct. 2 in 2003. The collection sites are as follows: Queen Sirikit Botanical Garden, Medical plants garden, and forest in Doi Suthep and Doi Inthanon (the highest mountain in Thailand ca 2500m above sea level). Nine Entomopathogenic fungi and three commensal fungi were collected. The pathogenic ones were five species of *Cordyceps* (Ascomycota), three species of imperfect fungi including *Metarhizium anisopliae*, one Entomophthoralean fungus (Zygomycota). Specimens of *Cordyceps nutans*, *C. sphecocephala* and *C. myrmecophila*(?) were collected commonly in Queen Sirikit Botanical Garden. In *C. nutans* specimens larger host insects showed larger stromat(a). Trichomycetes, a class in Zygomycota, is consisted of commensal fungi living in arthropod's gut. They are attaching to the gut lining with special anchor structure. *Harpella melusinae* (Harpellales) was derived from midgut of black fly larvae collected from small stream in Doi Inthanon and was the second record from Thailand. A species of *Leidyomyces* (Eccrinales), derived from the anterior hindgut of passalid beetles living in decayed logs, was thought to be a new species. An *Enterobryus* species was also observed in the same gut of the passalid insect.