Agricultural Sci. J. 48 : 3 (Suppl.) : 133-136 (2017) ว. วิทย. กษ. 48 : 3 (พิเศษ) : 133-136 (2560)

การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* species สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ

Identification of *Colletotrichum* species Causing Anthracnose Disease of Coffee

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] และ สัณฐิติ บินคาเดอร์[1]

Ratiya Pongpisutta[1], Chainarong Rattanakreetakul[1] and Santiti Bincader[1]

Abstract

Arabica coffee is a good variety as its yield is profitable to farmers, including the tribe people. Arabica coffee is grown in northern and northeastern Thailand with upland plantation and cool temperature. However, this plant is seriously attacked by a fungal pathogen causing anthracnose disease on leave and berry. The disease symptom was found in both pre- and post harvest. The casual pathogens reported were *Colletotrichum coffeanum* and *C. kahawae* which morphological markers similar to *C. gloeosporioides*. So, morphological index for *Colletotrichum* identification is very imperative. DNA sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR) technique was selected to ensure for fungal identification.

Keywords: Coffee anthracnose, *Colletotrichum*, RFLP-PCR

บทคัดย่อ

กาแฟอาราบิก้าเป็นพันธุ์ที่สำคัญ ให้ผลผลิตดีสร้างกำไรต่อเกษตรกรรวมทั้งชาวเขา ปลูกกันมากบนที่สูงในภาคเหนือและอาจพบในภาคอีสาน และมีอากาศหนาวเย็น อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญของกาแฟคือการเข้าทำลายจากเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสทั้งบนใบและผล ซึ่งเกิดได้รุนแรง และเป็นโรคที่เกิดได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวอีกด้วย สำหรับเชื้อสาเหตุโรคนั้นมีทั้ง *Colletotrichum coffeanum* และ *C. kahawae* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับ *C. gloeosporioides* การใช้ดัชนีทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* เป็นเรื่องสำคัญ นอกจากนี้เพื่อความเชื่อมั่น การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอและเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR) จึงถูกนำมาใช้ร่วมด้วย

คำสำคัญ: โรคแอนแทรคโนสกาแฟ *Colletotrichum* RFLP-PCR

คำนำ

กาแฟอาราบิก้า (*Coffee arabica*) ผลิตกันมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย อย่างไรก็ตามเกษตรกรประสบปัญหาศัตรูพืชที่สำคัญได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่มีคุณภาพ เชื้อรา *Colletotrichum* หลายสายพันธุ์สามารถแยกได้จากกาแฟอาราบิก้าที่เป็นโรคแอนแทรคโนส ทั้งจากใบ กิ่ง และผล ซึ่งอาจพบได้ทั้งที่เป็นเชื้อสาเหตุ และ saprophyte ได้เช่นเดียวกัน (Waller *et al*., 1993) โดยปกติการจำแนกเชื้อราชนิดนี้จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาช่วยสนับสนุน รวมทั้งการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อราและพิสูจน์การเกิดโรค

แยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากอาการโรคแอนแทรคโนสบนใบ ก้าน และผลของกาแฟจากแหล่งต่างๆ จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ 2271 (ใบ-จ.แม่ฮ่องสอน), 2309 (ใบ-อ.ภูเรือ จ.เลย), 2317 (ใบและผล-อ.แม่สาย จ.เชียงราย), 2318 (ใบ-จ.น่าน), 2319 (ใบ-อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่), 2320 (ใบ-แม่จอนหลวง จ.เชียงใหม่), 2323 (ก้าน-จ.แม่ฮ่องสอน), 2324 (ผล-บ้านห้วยฮ้อม จ.แม่ฮ่องสอน), 2325 (ผล-อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่) เปรียบเทียบกับ *Colletotrichum* จากมะม่วง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ PHN01 และ PH060 นำมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28°ซ) นาน 7 วัน บันทึกข้อมูลลักษณะโคโลนี และบันทึกรูปร่างสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140

นำเชื้อรา 9 ไอโซเลท โดยเตรียม spore suspension ความเข้มข้น 1.5 x10^6สปอร์/มล จากนั้นฉีดพ่นบนใบกาแฟ บ่มใน chamber นาน 1 วัน แล้วย้ายไปไว้ภายในโรงเรือน หลังการปลูกเชื้อ 7-10 วัน ทำการบันทึกการเกิดโรค

2. การจำแนกเชื้อรา

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 11 ไอโซเลท โดยดัดแปลงจากวิธีของ วรานันท์ (2554) และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ universal primer ITS4 และ ITS5 ตรวจหา DNA product ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1%ใน 1xTBE buffer บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel document (GeneFlashsyngene bio imaging)

นำดีเอ็นเอที่ได้ตรวจหาลำดับเบส โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) วิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูลสากล โดยใช้โปรแกรม BLAST และอีกส่วนหนึ่งนำมาศึกษาด้วยเทคนิค RFLP-PCR โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Alu*I (AG/CT), *Eco*RI (G/AATTC), *Hin*fI (G/ANTC), *Pst*I (CTGCA/G), *Pvu*II (CGAT/CG) และ *Rsa*I (GT/AC) ตรวจสอบ digested product ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% ใน 1xTBE buffer บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel document

ผล

1. ศึกษาลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อรา และพิสูจน์การเกิดโรค

เชื้อรา 11 ไอโซเลท สร้างโคโลนีแตกต่างกัน ยกเว้น 2319 และ 2320 ซึ่งคล้ายกันมาก ดังมีรายละเอียดดังนี้ (Fig. 1-2)

2271 ขอบขาว ตรงกลางสีเขียวขี้ม้า reverse พบจุดดำกระจายเล็กน้อยspore mass สี salmon พบการสร้าง setae สปอร์รูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) ปลายมน (obtuse) ฐานตัด (truncate)

2309 โคโลนีสีขาวปนเทากลางโคโลนีสีเขียวขี้ม้า reverse พบจุดดำเป็นวง spore mass สี salmon สปอร์ส่วนใหญ่รูปร่างลูกแพร์ (pear shaped) พบบ้างที่เป็นทรงกระบอกและอาจมีส่วนคอดกลางสปอร์

2317 โคโลนีฟูสลับกับ spore mass เกิด zonation เส้นใยเทาตรงกลาง reverse เป็น zonation วงสีเข้มสลับกับ spore mass สี salmon พบการสร้าง setae สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2318 ขอบโคโลนีบาง กลางโคโลนีสีเขียวขี้ม้า reverse เป็นจุดสีเขียวขี้ม้าเข้ม แน่นเป็นวง พบ spore mass สี pale salmon สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2319 โคโลนีสีเทา ตรงกลางเขียวขี้ม้า ขอบบาง reverse พบแฉกเขียวขี้ม้าเข้มสร้าง spore mass สี pale salmon สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2320 โคโลนีสีเทา ตรงกลางเขียวขี้ม้าฟูเล็กน้อย ขอบบาง reverse พบแฉกเขียวขี้ม้าเข้ม spore mass สี pale salmonสร้าง setae สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2323 โคโลนีเส้นใยเทา ค่อนข้างฟู ตรงกลางเขียวขี้ม้า เป็น zonation ส่วน reverse พบจุดดำเข้มกระจายเป็น zonation สลับกับ spore mass สำหรับ spore mass สี salmon พบการสร้าง setae สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2324 โคโลนีเทาปนเขียวขี้ม้าหม่น reverse พบจุดดำกระจายเป็นวงสำหรับ spore mass สี salmon สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

2325 เส้นใยเทาฟูปนเขียวขี้ม้าหม่น reverse พบจุดดำกระจายเป็น zonation สร้าง spore mass สี salmon สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

PHN01 เส้นใยเทาฟู ขอบโคโลนีบาง โตช้า reverse พบจุดดำแน่นเป็นวงปนกับสปอร์สร้าง spore mass สี salmon orange สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

PH060 โคโลนีสีขาวฟู มีการสร้างสปอร์ปะปน reverse พบวงของสปอร์สี orange-buff สปอร์รูปร่างทรงกระบอกปลายมน ฐานตัด

ผลจากการพิสูจน์โรค พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีเพียง 3 ไอโซเลท คือ 2209, 2324 และ 2325 แสดงอาการแผลสีน้ำตาลเข้มบนใบกาแฟสำหรับไอโซเลท 2324 แสดงอาการโรคบนใบกาแฟที่ยังอ่อน

2. การจำแนกเชื้อรา

จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล(database) ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST ผลพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากกาแฟและมะม่วง แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *C. gloeosporioides, C. kahawae, C. siamense*, และ *Glomerella cingulata* (Table 1) เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลทและจากสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน รวมทั้ง out group จากฐานข้อมูล NCBI มาหาความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA v.2.1 และทดสอบค่าความเชื่อมั่นโดยใช้ Bootstrap 1,000 พบว่าจากการวิเคราะห์รูปแบบความสัมพันธุ์ Phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joiningmethod นั้น กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มใหญ่มีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 2317, PHN01, 2320, PH060, 2323, 2325, 2318 และ 2319 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. gloeosporioides* AIFS2 กลุ่มที่ 2 ไอโซเลท 2309 มีความใกล้ชิดกับ *C. siamense* กลุ่มที่ 3 ไอโซเลท 2271 นั้นมีความสัมพันธ์กับ *G. cingulata* P099 และกลุ่มที่ 4 ไอโซเลท 2324 มีความสัมพันธ์กับ *C. kahawae* C1200.1 (Fig.3) ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด พบเพียง *Hin*fI เท่านั้นที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้เห็นความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* ดังนี้ 1) กลุ่ม *G. cingulata* พบ 4 band (>100, 140, 160, 280 bp) 2) กลุ่ม *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* พบ 3 band (>100, 140, 280 bp) และ 3) กลุ่ม *C. kahawae* พบ 4 band (100, 140, 200, 300 bp)

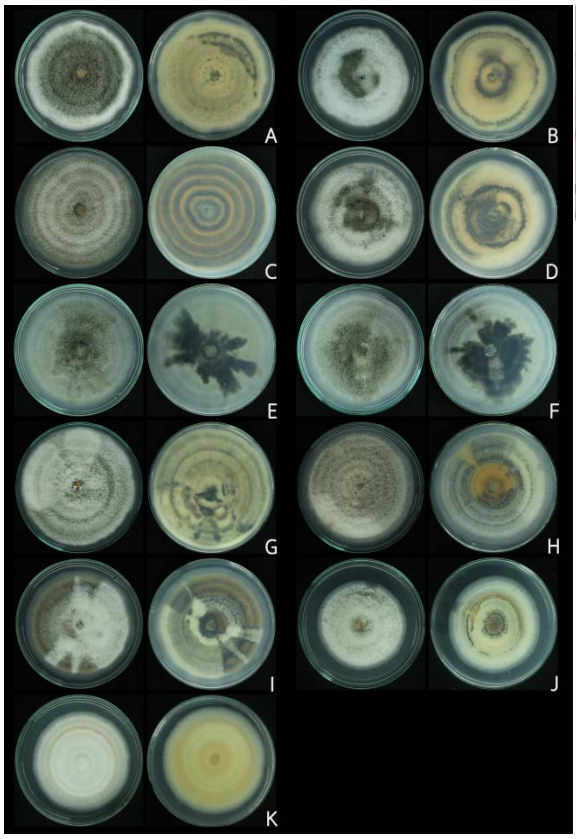

Figure 1 Colony characteristics of *Colletotrichum* spp. on PDA, A) 2217, B) 2309, C) 2317,D) 2318, E) 2319, F) 2320, G) 2323, H) 2324, I) 2325,J) PHN01 and K) PH060.

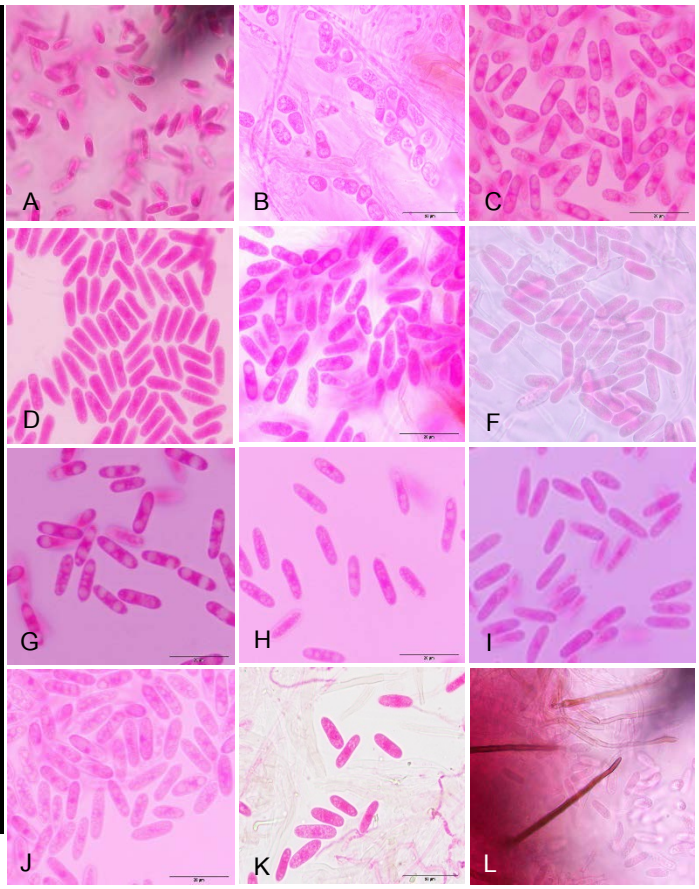

Figure 2 (A-K) Spore shapes of *Colletotrichum* spp. A) 2217, B) 2309, C) 2317, D) 2318, E) 2319, F) 2320, G) 2323, H) 2324, I) 2325, J) PHN01, K) PH060 and L) seta of 2217 (x100 magnification).

วิจารณ์ผล

การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากกาแฟพันธุ์อาราบิก้า หากอาศัยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวก็คงประสบกับปัญหาในการจำแนก แม้ว่าจะใช้ลักษณะทางเครื่องหมายดีเอ็นเอ (molecular markers) ซึ่งเชื้อรา *Colletotrichum* บาง species ก็มีความใกล้เคียงกันมาก เช่น ไอโซเลท 2309 ที่จำแนกเป็น *C. siamense* นั้นใกล้เคียงกับ *C. gloeosporioides* โดยแตกต่างเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น แต่รูปร่างของสปอร์มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่

ไอโซเลท 2324 ซึ่งเป็น *C. kahawae* ที่มีรูปร่างสปอร์เหมือนกัน แต่กลับมีความแตกต่างจากกลุ่มที่เป็น *C. gloeosporioides* ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเพราะข้อจำกัดของการศึกษา gene บริเวณ ITS ต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* clade (Weir *et al*., 2012)

Table 1 Identity and similarity of nucleotide sequencing from *Colletotrichum* spp. compared to database of Genbank using the basic BLAST

Isolate	Nucleotide (bp)	Accession	Species	Identity (%)	E value
2271	593	EF423544.1	*Glomerella cingulata*	99	0
2309	586	JX010159.1	*Colletotrichum siamense*	99	0
2317	598	KX197386.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
2318	607	KR704204.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
2319	610	KX197389.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
2320	621	KM881568.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
2323	675	JX231012.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
2324	620	JX010214.1	*Colletotrichum kahawae*	99	0
2325	543	AY266391.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
PHN01	669	KU534983.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0
PH060	608	KU534982.1	*Colletotrichum gloeosporioides*	99	0

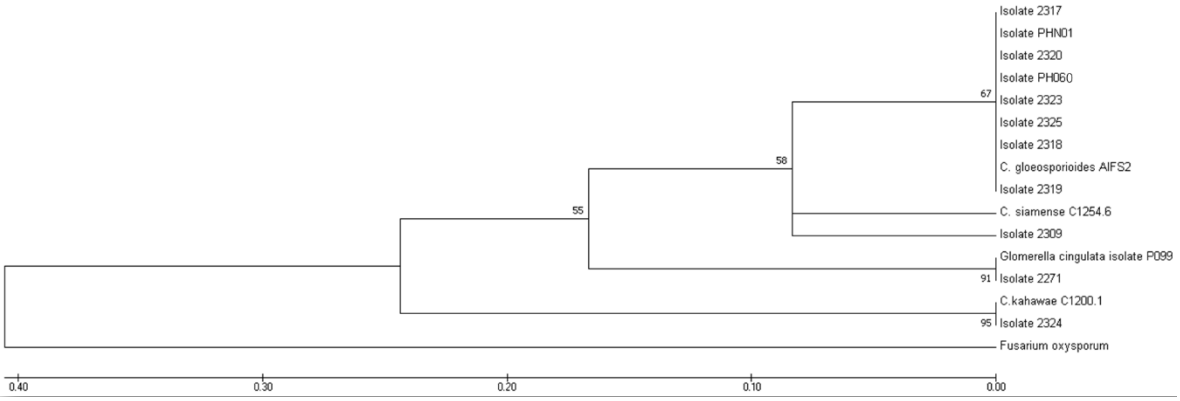

Figure 3 Phylogenetic tree of relationship between 11 isolates of *Colletotrichum* spp. compared to some isolates from NCBI database based on UPGMA clustering.

สรุป

เชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากอาการโรคแอนแทรคโนสของกาแฟอาราบิก้า จากพื้นที่สูงในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *C. gloeosporioides, C. kahawae, C. siamense* และ *G. cingulata* ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6ชนิด พบเพียง *Hin*fI เท่านั้น ที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้เห็นความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 9 ไอโซเลทได้ หลังการพิสูจน์โรค พบเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ได้แก่ ไอโซเลท 2309 (*C. siamense*), 2324 (*C. kahawae*) และ 2325 (*C. gloeosporioides*)

เอกสารอ้างอิง

วรานันท์ วิญญรัตน์. 2554. การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 135 น.

Waller, J.M., P.D. Bridge, R. Black and G. Hakiza. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycological Research 97(8): 989-994.

Weir, B.S., P.R. Johnston and U. Damn. 2012 The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73 :115-180.