ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Conidial characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* causing chilli anthracnose

โชติรส รอดเกตุ[1] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1] และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1]

Chotiros Rodkate[1] Ratiya Pongpisutta[1] and Chianarong Rattanakreetakul[1]

Abstract

Anthracnose is the most serious disease of chilli, especially in tropical and subtropical areas. *Colletotrichum gloeosporioides* is a species of causal pathogens. Isolates identified as *C. gloeosporioides* were highly variable. Thus, identification and differentiation based on conidial characteristics were constantly mystified. The fungus with 59 isolates collected from 14 provinces of chilli plantations were identified in this research. For specific confirmation of *C. gloeosporioides* isolates, the species-specific primer CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') in combination with the universal primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used for amplifying the DNA fragments using polymerase chain reaction (PCR). The amplification of ITS1-5.8s-ITS2 region using primers CgInt/ITS4 was positive for all isolates of *C. gloeosporioides*, producing a fragment of approximately 450 bp. For microscopic investigation of the fungus growing on potato dextrose agar (PDA), *C. gloeosporioides* produced conidia hyaline, 1-celled and truncate base. Conidial shapes were clustered into 4 groups as group 1 conidia straight, cylindrical, apex rounded, 2.75 - 3.38 × 10.38 – 13.13 µm in size (41 isolates), group 2 conidia straight, broadly cylindrical, rounded at the apex, 3.00 - 3.88 × 11.50 - 13.38 µm in size (16 isolates), group 3 conidia straight, broadly short cylindrical to ovoid, apex rounded, 2.63 × 8.63 µm in size (1 isolate) and group 4 conidia straight, slightly rounded to tapered at the apex, 3.00 × 11.63 µm in size (1 isolate).

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, conidial shape, PCR

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญของพริกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนและใกล้เขตร้อน เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญสปีชีส์หนึ่งและมีความผันแปรค่อนข้างสูง ดังนั้นการจำแนกและการแยกความแตกต่างโดยอาศัยลักษณะรูปร่างของสปอร์มักสร้างความสับสนมาโดยตลอด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 59 ไอโซเลต ซึ่งเก็บจากแปลงพริก 14 จังหวัด นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') ร่วมกับ universal primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ผลจากปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เมื่อศึกษารูปร่างของสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้างสปอร์ 1 เซลล์ ไม่มีสี ฐานตัด แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอก ปลายมน ขนาด 2.75 - 3.38 × 10.38 – 13.13 µm (41 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 2 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอกกว้าง ปลายมน ขนาด 3.00 - 3.88 × 11.50 - 13.38 µm (16 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 3 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอกกว้างสั้นไปจนถึงรูปไข่ ปลายมน ขนาดสปอร์ 2.63 × 8.63 µm (1 ไอโซเลท) และ กลุ่มที่ 4 สปอร์มีรูปร่างตรง พบทั้งปลายมนเล็กน้อยไปจนถึงปลายเรียว ขนาดสปอร์ 3.00 × 11.63 µm (1 ไอโซเลท)

คำสำคัญ: *Colletotrichum gloeosporioides* รูปร่างสปอร์ พีซีอาร์

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakorn Pathom, 73140

คำนำ

Colletotrichum gloeosporioides เป็นเชื้อราสปีชีส์หนึ่งที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบได้ในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกพริก จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) พบว่าลักษณะโคโลนีมีความหลากหลายแบ่งออกได้ถึง 9 กลุ่ม (รัติยา และคณะ, 2553) อย่างไรก็ตามเชื้อราสปีชีส์นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง และค่อนข้างสับสนในลักษณะรูปร่างสปอร์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาลักษณะรูปร่างของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลในการจัดจำแนกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 59 ไอโซเลท ซึ่งเก็บมาจากพื้นที่ปลูกพริก 14 จังหวัดคือ เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ อุดรธานี ขอนแก่น นครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี กาญจนบุรี นครปฐม และประจวบคีรีขันธ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน แล้วนำมาแยกเป็นสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร spezieller nährstoffarmer broth (SNB) เมื่ออายุ 2 วันนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยตามกรรมวิธีของ Lee and Taylor (1990) โดยมีการดัดแปลงบางขั้นตอน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ species-specific primer คือ ไพร์เมอร์ CgInt (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3') ร่วมกับ universal primer คือ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') ส่วนผสมน้ำยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 25 นาโนกรัม สารละลายบัฟเฟอร์ ($MgCl_2$) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้นรวม 1 มิลลิโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์จำเพาะ CgInt ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ ITS4 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์รุ่น Tprofessional Standard Gradient ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องโดยเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส 2 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และ 16 องศาเซลเซียส 10 นาที เป็นรอบสุดท้าย นำไปตรวจแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมใน 1 × TBE buffer ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที

การศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน จากนั้นเขี่ยสปอร์มาศึกษาใต้กล้อง light microscope บันทึกขนาดและรูปร่างของสปอร์ จัดกลุ่มตามความแตกต่างของรูปร่างสปอร์

ผล

การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากการศึกษาปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพร์เมอร์สองชนิดคือ CgInt และITS4 พบว่า *C. gloeosporioides* ทั้ง 59 ไอโซเลท พบแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (Figure 1)

การศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ศึกษาลักษณะสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะโดยรวมของเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ สปอร์มีเซลล์เดียว ไม่มีสี บริเวณฐานตัด จากลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์สามารถแบ่งสปอร์ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอก ปลายมน ขนาด 2.75 - 3.38 × 10.38 – 13.13 µm จำนวน 41 ไอโซเลท ได้แก่ CM001-2 CM013-2 KCB165 KCB170 KCB173 KCB182 KK037 KK049 KK055 KK063 KK075 NKP013 NKP018 NKP091 NKP092 NKS144 NRS014-1 PCB002 PCB006 PCB026 PCB034 PCB048 PKK067 PKK068 PKK077 PKK079 PSL115 PSL122 PSL131 SKT011 SKT046 SKT048 SKT059 SKT060 SSK018 SSK020 SSK049 SSK050 UBR082 UBR092 และ UDT097 กลุ่มที่ 2 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอกกว้าง ปลายมน ขนาด 3.00 - 3.88 × 11.50 - 13.38 µm จำนวน 16 ไอโซเลท ได้แก่ CM011-1 CM029-1 CM039 CR011-1 NKS140 NKS141 NKS147 NRS022 NRS030 PKK083 PSL076 PSL113 SKT037 UDT096 UDT098 และ UDT103 กลุ่มที่ 3 สปอร์มีรูปร่างตรง ทรงกระบอกกว้างสั้นไปจนถึงรูปไข่ ปลายมน

ขนาดสปอร์ 2.63 × 8.63 µm จำนวน 1 ไอโซเลท คือ NKP089 และ กลุ่มที่ 4 สปอร์มีรูปร่างตรง พบทั้งปลายมนเล็กน้อยไปจนถึงปลายเรียว ขนาดสปอร์ 3.00 × 11.63 µm จำนวน 1 ไอโซเลท คือ CM021-1 (Figure 2)

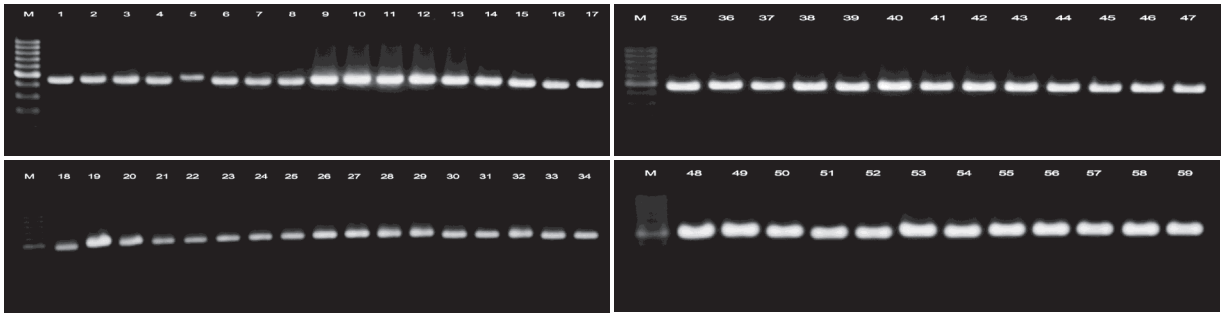

Figure 1 Amplification profiles of specific fragments of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates with the primers CgInt/ITS4. M:Molecular weight size markers 100 bp, Lanes 1-59 : CM001-2 CM011-1 CM013-2 CM021-1 CM029-1 CM039 CR011-1 KCB165 KCB170 KCB173 KCB182 KK037 KK049 KK055 KK063 KK075 NKP013 NKP018 NKP089 NKP091 NKP092 NKS140 NKS141 NKS144 NKS147 NRS014-1 NRS022 NRS030 PCB002 PCB006 PCB026 PCB034 PCB048 PKK067 PKK068 PKK077 PKK079 PKK083 PSL076 PSL113 PSL115 PSL122 PSL131 SKT011 SKT037 SKT046 SKT048 SKT059 SKT060 SSK018 SSK020 SSK049 SSK050 UBR082 UBR092 UDT096 UDT097 UDT098 and UDT103, respectively.

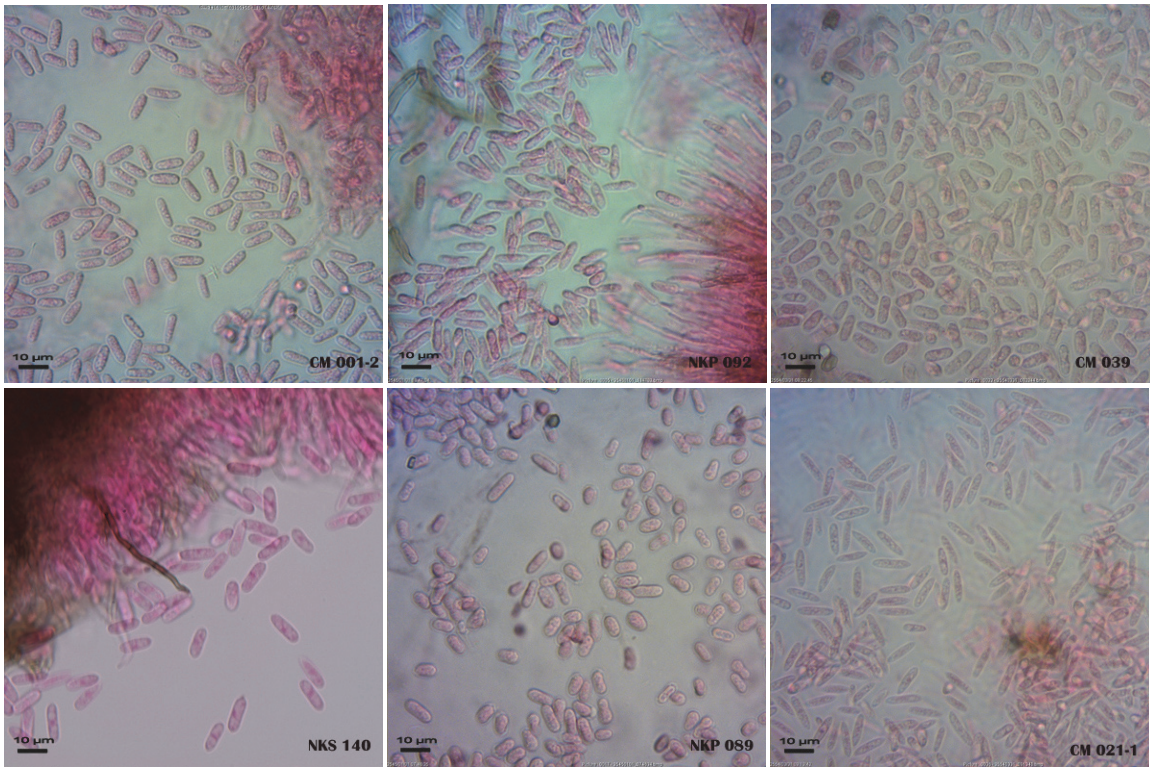

Figure 2 Conidial characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides*: Group 1 (CM001-2, NKP092), Group 2 (CM039, NKS140), Group 3 (NKP089) and Group 4 (CM021-1).

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ CgInt และ ITS4 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส จากการรายงานของ Raul *et al*. (2008) ในการศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะละกอโดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยใช้ไพร์เมอร์ CgInt และ ITS4 พบว่าเฉพาะเชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ส่วน Freeman *et al*. (2000) ศึกษาการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลในการวิเคราะห์เชื้อรา *Colletotrichum* ที่พบในอัลมอนด์และผลไม้ต่างๆ โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ คือไพร์เมอร์ CaInt2/ITS4 และไพร์เมอร์ CgInt/ITS4 พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ให้ผลของปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน โดยเชื้อรา *C. acutatum* ให้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 490 คู่เบส ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 450 คู่เบส และจากงานวิจัยของ Medeiros *et al*. (2010) พบว่าการจำแนกเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากพืชอาศัยหลายชนิด โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ CgInt และ ITS4 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ให้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ส่วน *C. acutatum* และ *C. sublineolum* ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพร์เมอร์จำเพาะต่อสปีชีส์นี้เลย

สำหรับงานวิจัยด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น Bailey and Jeger (1992) รายงานว่าลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีรูปร่างตรง ทรงกระบอก ปลายมน ฐานตัดสั้น มีขนาด 3.5 – 6 × 12 – 17 µm ขณะที่ Simmonds (1965) พบว่าสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีรูปร่างตรง ทรงกระบอก ปลายมน ฐานเรียวตัดสั้น มีขนาด 3 – 5 × 11 – 17.5 µm อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยในครั้งนี้พบ *C. gloeosporioides* ซึ่งได้ยืนยันความถูกต้องด้านสปีชีส์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์แล้วนั้นกลับพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 59 ไอโซเลทมีรูปร่างและขนาดของสปอร์ที่แตกต่างกันทั้ง 4 กลุ่ม โดยพบสปอร์รูปร่างตรง ทรงกระบอก ทรงกระบอกกว้าง ทรงกระบอกกว้างสั้นไปจนถึงรูปไข่ ปลายมน บางครั้งพบปลายมนเล็กน้อยไปจนถึงปลายเรียว ขนาดมีตั้งแต่ 2.63 – 3.88 × 8.63 – 13.38 µm.

สรุป

จากการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 59 ไอโซเลท โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ซึ่งใช้ไพร์เมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ทุกไอโซเลท แต่เมื่อทำการศึกษารูปร่างและขนาดของสปอร์พบว่าสปอร์มีความแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มสปอร์ได้ 4 กลุ่ม งานวิจัยนี้สามารถนำมาปรับใช้เป็นแนวทางในการจำแนกและแยกความแตกต่างของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

รัติยา พงศ์พิสุทธา วรานันท์ วิญญรัตน์ โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41(1): 318-321.

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. Colletotrichum Biology, Pathology and Control C A B International. Wallingford UK. 15 p.

Freeman, S., D. Minz, E. Jurkevitch, M. Maymon and E. Shabi. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. Phytopathology 9(6): 608-614.

Lee, S.B. and J.W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In PCR Protocols a Guide to Methods and Application. 282-287.

Medeiros, L.V., D.B. Maciel, V.V. Medeiros, K.L.M. Houllou and N.T. Oliveira. 2010. *Pel*B gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. Genetics and Molecular Research 9(2): 661-673.

Raul, T.T., Q.R. Andres, C.V. Alberto, L. Patricia, L.S. Alfonso and P.B. Daisy. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. Molecular Biotechnology 40: 293-298.

Simmonds, J.H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agriculture and Animal Science 22: 437-459.