

XÁC ĐỊNH QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA CÁC CHỦNG NẤM BỆNH *Cryptosporiopsis eucalypti* GÂY BỆNH ĐÓM LÁ BẠCH ĐÀN

Trần Thanh Trăng

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Mười lăm chủng nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* thu thập trên các cây chủ bạch đàn ở các địa phương khác nhau được phân tích vùng trình tự ITS (internal transcribed spacer). Sự khác biệt trong vùng ITS giữa các chủng là không lớn, song đã có sự phân bố của các chủng nấm theo vùng địa lý thu thập mẫu. Các chủng nấm thu thập trong một vùng có độ tương đồng cao, lên đến 100%. Khoảng cách di truyền của các chủng thuộc nhóm I và nhóm III lớn hơn so với các chủng thuộc nhóm II và nhóm III.

Từ khóa: Độ tương đồng, nấm *Cryptosporiopsis eucalypti*, vùng ITS,

GIỚI THIỆU

Nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* Sankaran & B.Sutton gây bệnh đốm lá, khô ngọn và loét thân trên một số loài bạch đàn ở rất nhiều nước, chủ yếu các nước vùng nhiệt đới ẩm (Sankaran và cộng sự 1995; Old và cộng sự 1999). Loài nấm này gây ra bệnh đốm lá bạch đàn ở Indonesia, Braxin (Fereira và cộng sự 1998) Thái Lan, Lào, Nhật Bản, Trung Quốc, Sri Lanka, Hawaii (Old và Yuan 1994; Booth và cộng sự 2000) và New Zealand (Gadgil và Dick 1999). Ngoài ra còn gây bệnh đốm lá bạch đàn ở Úc, Ấn Độ và Mỹ (Sankaran và cộng sự 1995). Ở Việt Nam, nấm *C. eucalypti* được đánh giá là một trong những loài nấm bệnh gây hại nguy hiểm nhất đối với rừng trồng bạch đàn (Old và cộng sự 2000; Phạm Quang Thu 2005). Khi gây bệnh trên cây bạch đàn, nó gây ra triệu chứng điển hình trên lá cây là đốm lá, đôi khi các lá bị bệnh hình thành các u nhỏ, trên bề mặt lá sần sùi, làm cho lá bị rụng, khi tán công lên cành hoặc ngọn bạch đàn nó làm cho cành ngọn bị khô héo, sau đó mọc lên các chồi và lá non với kích thước rất nhỏ vào cuối mùa mưa, đôi khi còn làm cho ngọn và cành ngọn bị chết. Nấm *C. eucalypti* có những thể quả nấm tồn tại lâu dài trên đỉnh ngọn và cành nhỏ, thường gây nên triệu chứng tái xâm nhiễm kéo dài. Triệu chứng điển hình này xuất hiện ở hầu hết các loài bạch đàn ở khắp các vùng trong cả nước với tỷ lệ và mức độ bị bệnh rất khác nhau. Ở Việt Nam các loài bạch đàn bị bệnh nặng nhất do loài nấm này gây ra là Bạch đàn trắng *Eucalyptus camaldulensis* và một số dòng bạch đàn lai U6, W5 trồng ở những nơi có lượng mưa cao (Phạm Quang Thu 2005; Nguyễn Hoàng Nghĩa 2006). Nấm bệnh *C. eucalypti* có thể phát sinh phát triển trên các vùng có lượng mưa trung bình năm từ trên 700mm đến 2596mm, nhiệt độ từ 11-35°C (Booth và cộng sự 2000; Phạm Quang Thu 2005). Ảnh hưởng rõ rệt nhất của loài nấm này đối với bạch đàn ở Việt Nam là trên các vùng ẩm ướt (trong và sau mùa mưa), nhiệt độ trung bình của tháng trên 20°C, lượng mưa trung bình năm lớn hơn 2000mm (Hoàng Xuân Tý 1999).

Xác định được mối quan hệ di truyền giữa các chủng nấm *C. eucalypti* ở các vùng/miền khác nhau mang ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu phòng trừ và quản lý loài nấm bệnh gây hại bạch đàn này. Do trình tự DNA của vùng sao chép nội bộ ITS (internal transcribed spacer) của ri-bô-xôm DNA của các loài nấm vừa có trình tự bảo thủ vừa có các trình tự thay đổi (Curran và cộng sự, 1994) nên các vùng ITS này đã được nghiên cứu để lập cây phân loại của nhiều loài nấm cũng như nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài nấm trong cùng một chi hay họ với nhau như nghiên cứu mối quan hệ của các loài nấm tán (Agaric fungi) (Molcanvol và

cộng sự, 2000), mối quan hệ của một số loài nấm thuộc chi *Puccinia* (Sinchai và cộng sự, 2006) hay mối quan hệ của các loài nấm đấm (Manfred và David, 2002). Trong nghiên cứu này các vùng ITS của các chủng nấm bệnh *C. eucalypti* thu được từ 3 miền khác nhau được sử dụng để phân tích.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Mười lăm (15) chủng nấm *C. eucalypti* thu thập từ các địa phương khác nhau (Bảng 1) được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Các chủng nấm đã được định loại bằng phương pháp hình thái học và phân lập thuần khiết hệ sợi trên môi trường PDA (Potato Dextro Agar).

Cặp mồi sử dụng để khuếch đại các vùng ITS của nấm *C. eucalypti*: mồi forward ITS1-F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) (Gardes và Bruns 1993) và mồi reverse ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White và cộng sự, 1990).

Bảng 1: Ký hiệu chủng và nơi thu thập các chủng nấm *C. eucalypti*

ST T	Ký hiệu chủng	Tên nấm	Nơi thu thập	Cây chủ
1	PT1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Tam Thanh, Phú Thọ	<i>Eucalyptus urophylla</i>
2	PT2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Tam Thanh, Phú Thọ	<i>E. camaldulensis</i>
3	PT3	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Thanh Ba, Phú Thọ	<i>E. camaldulensis</i>
4	DL1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Đại Lải, Vĩnh Phúc	<i>E. camaldulensis</i>
5	DL2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Đại Lải, Vĩnh Phúc	<i>E. urophylla</i>
6	QT1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Đông Hà, Quảng Trị	<i>E. amaldulensis</i>
7	QT2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Đông Hà, Quảng Trị	<i>E. amaldulensis</i>
8	QT3	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Đông Hà, Quảng Trị	<i>E. urophylla</i>
9	GL1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Pleiku Gia Lai	<i>E. camaldulensis</i>
10	GL2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Mang Yang, Gia Lai	<i>E. camaldulensis</i>
11	BD1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Bầu Bàng, Bình Dương	<i>E. camaldulensis</i>
12	BD2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Bầu Bàng, Bình Dương	<i>E. camaldulensis</i>
13	DN1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Vĩnh Cửu, Đồng Nai	<i>E. camaldulensis</i>
14	DN2	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Trảng Bom, Đồng Nai	<i>E. camaldulensis</i>
15	BP1	<i>Cryptosporiopsis eucalypti</i>	Bến Cát, Bình Phước	<i>E. camaldulensis</i>

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA của các chủng nấm: sử dụng phương pháp glassmilk của Glen và cộng sự (2002). Cho một lượng nhỏ sợi nấm vào ống eppendorf 1.5ml. Tán nhỏ các vật liệu trên trong ống eppendorf bằng chày. Thêm vào đó 250µl chất tách chiết DNA. Ống eppendorf được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút. Sau đó được ly tâm với tốc độ 14,000 vòng/phút trong 15 phút. Khoảng 200µl dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf mới trong có chứa 800µl NaI 100% (trạng thái lạnh) và 7µl glassmilk. Hỗn hợp được làm lạnh và lắc đều trong vòng 15 phút để DNA gắn vào glassmilk, sau đó được ly tâm với tốc độ 14,000 vòng/phút trong 10 giây. Phần kết tủa được rửa sạch bằng dung dịch đệm và cồn. Sau đó hỗn

hợp được ly tâm, tách phần kết tủa và làm khô. Phần kết tủa được hòa tan trong 25 μ l dung dịch TE (10mM Tris HCl pH8, 1mM EDTA), hỗn hợp được ủ trong bể nước ở 45°C trong vòng 5 phút. Ống eppendorf được ly tâm ở 14,000 vòng/phút trong 2 phút, phần hỗn hợp chứa DNA được chuyển sang ống eppendorf mới, bảo quản ở 4°C.

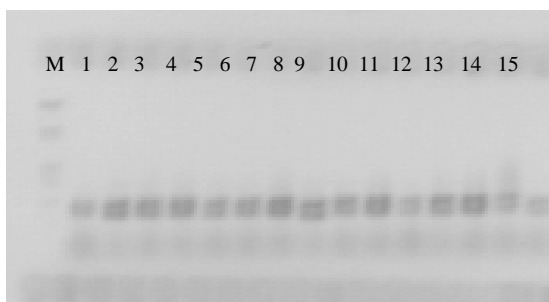
Khuyếch đại PCR: vùng ITS 1 và 2 được khuyếch đại từ DNA vừa thu trên bằng cặp mồi được thiết kế điển hình cho nấm ITS1-F (Gardes và Bruns 1993) và ITS4 (White và cộng sự, 1990). Trong 50 μ l phản ứng PCR, 10 μ l DNA được sử dụng như DNA khuôn. Mỗi phản ứng PCR gồm có 1x polymerase buffer (Fisher Biotec), 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.25 μ M cho mỗi loại mồi, và 0.08U TTH⁺ polymerase (Fisher Biotec) và 0.2 mg/ml chất BSA (Bovine Serum Albumin, Fisher Biotec). Thông số khuyếch đại PCR như sau: bước khởi đầu tách đôi sợi DNA ở 95°C trong 3 phút. Sau đó là 35 chu kỳ: tách sợi DNA ở 94°C trong 30 giây, nhiệt độ gắn kết ở 55°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây, ở chu kỳ cuối cùng sự kéo dài được thực hiện ở 72°C trong 7 phút. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR loại PTC 225 Peltier Thermal Cycler.

Điện di: các sản phẩm PCR được điện di trên bản gel (2,5% agarose) ở 4 volts/cm, trong 30 phút. Thang DNA 100bp (Fisher Biotec) được sử dụng để ước lượng kích cỡ DNA. Bản gel được nhuộm trong ethidium bromide (1 μ g/1ml), lắc ở tốc độ chậm trong 15 phút. DNA được quan sát dưới tia cực tím và được chụp ảnh với máy ảnh Kodak EDAS290.

Xác định trình tự chuỗi phân tử DNA: 90-100 μ l sản phẩm PCR được làm sạch bằng bộ kit MO BIO Laboratories, Inc. UltraCleanTM PCR Clean-up. Phản ứng xác định trình tự chuỗi: sử dụng bộ kit Quick Start với một số thay đổi như sau: Mỗi phản ứng xác định trình tự chuỗi DNA gồm 10 μ l, trong đó sử dụng 3-5 μ l DNA mẫu cùng với 3.2 pmol mồi (ITS1-F) và 2 μ l DTCS Quick Start Master Mix. Kết tủa bằng cồn: 0.25 μ l của 20 mg/ml glycogen, 2 μ l của 3 M Sodium Acetate và 2 μ l của 100mM Na₂-EDTA được bổ sung vào mỗi phản ứng. Trình tự chuỗi DNA được xác định trên hệ thống phân tích gen và được sửa trên phần mềm Chromas Lite, phiên bản 2.0, 2004. Các chuỗi DNA được sắp xếp trên ClustalW (Thompson và cộng sự, 1994). Các chuỗi DNA mẫu và DNA tham khảo được sắp xếp với nhau, biểu đồ Dendrogram được tạo trên phần mềm ClustalW sau đó được xem trên phần mềm TreeView, phiên bản 1.6.6.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

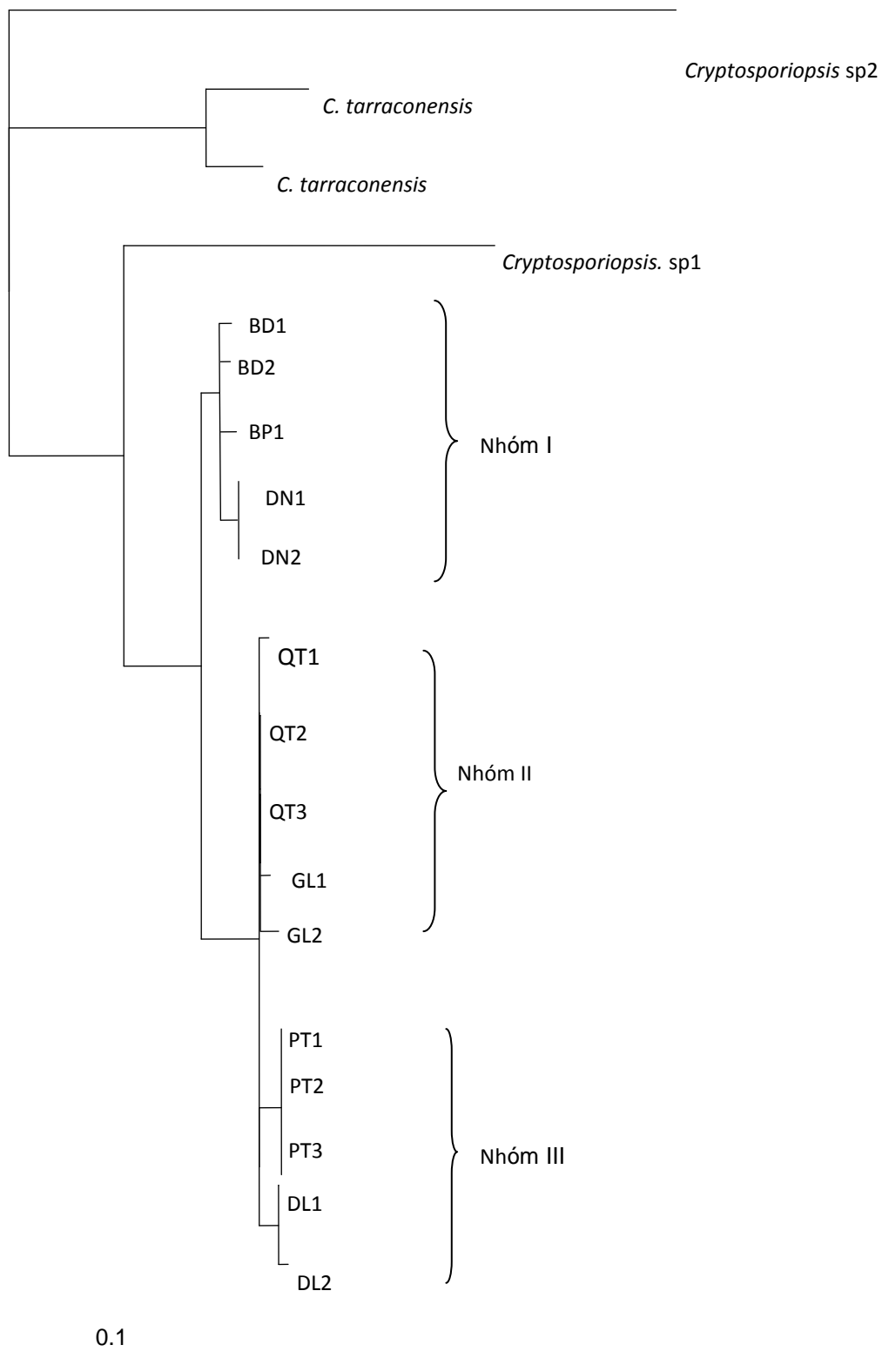
Mười năm chủng nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* đã được tách chiết DNA, kết quả của phản ứng PCR của cặp mồi ITS1F và ITS4 đối với các chủng nấm bệnh được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1: Sản phẩm PCR của 15 chủng nấm *C. eucalypti* trên bản gel. M: thang DNA = 100bp.

Như vậy cả 15 chủng nấm *C. eucalypti* đều được khuyếch đại bởi cặp mồi ITS1-F và ITS4 và cho kết quả rõ nét trên Hình 1.

Các mẫu DNA của các chủng nấm sau khi tách chiết thành công được tiếp tục khuếch đại bằng mồi ITS1-F. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và chạy phản ứng xác định trình tự chuỗi. Kết quả lập cây phân loại phân tích sự biến động vùng ITS cho 15 chủng nấm bệnh *C. eucalypti* được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2: Biểu đồ Dendrogram phân tích chuỗi ITS của các chủng nấm *Cryptosporiopsis eucalypti*. Thanh bar: độ biến động 10%.

Các vùng ITS được xem là rất hữu ích để phân tích nguồn gốc cũng như sự biến động trong loài của các loài nấm hay dưới loài có liên quan với nhau trong cùng một giống (Võ Thị Thu Oanh và cộng sự, 2009). Từ biểu đồ Dendrogram trên cho thấy sự khác biệt trên toàn vùng ITS (bao gồm vùng ITS1 và ITS2) của 15 chủng nấm bệnh trên là không lớn, tuy nhiên có thể thấy các chủng nấm được phân bố vào ba nhóm chính theo vùng địa lý thu thập mẫu. Trong đó nhóm I bao gồm 5 chủng nấm thu ở các tỉnh Đông Nam Bộ bao gồm Bình Phước

(chủng BP1), Bình Dương (chủng BD1, BD2) và Đồng Nai (chủng DN1 và DN2). Trong nhóm I các chủng DN1 và DN2 có độ tương đồng lên đến 100%. Ba chủng còn lại được phân chia thành 3 nhánh nhỏ với độ biến động nhỏ (1-2%). Bạch đàn ở các tỉnh Đông Nam Bộ đã từng bị xảy ra dịch bệnh, trong đó loài nấm *C. eucalypti* cùng với loài nấm *Cylindrocladium quinquesepatum* được ghi nhận là một trong những loài nấm bệnh hại chính và có mức độ nguy hiểm nhất (tán lá bạch đàn bị bệnh ở các cấp độ từ 3-6 trong đó cấp độ 3 là cấp trung bình, tán phía dưới của cây bị rụng lá, cấp độ 6 là cấp độ nguy hiểm nhất, tán lá bị rụng hoàn toàn hoặc cây bị chết ngược từ ngọn trở xuống) (Nguyễn Trần Nguyên, 1999). Ở một số tỉnh thành khác thuộc miền Nam như Kiên Giang cũng đã xuất hiện loại nấm bệnh này (CSIRO 1999).

Ở nhóm II, năm chủng nấm được thu ở hai tỉnh miền Trung, trong đó ba chủng (QT1, QT2 và QT3) thu ở tỉnh Quảng Trị có độ tương đồng rất cao, lên đến 100%. Hai chủng GL1 và GL2 thu ở Gia Lai có độ biến động nhỏ (1-2%) so với 3 chủng QT1, QT2 và QT3 và cũng có độ biến động nhỏ (1%) giữa hai chủng này. Nấm *C. eucalypti* đã từng được ghi nhận ở nhiều tỉnh thuộc miền Trung Việt Nam như Thừa Thiên Huế, Gia Lai, Bình Thuận, loài nấm này chủ yếu gây hại Bạch đàn trắng, mức độ gây hại từ rất nặng cho đến nhẹ (Trần Hữu Banh, 1999; Old và cộng sự 2000)

Ở nhóm III, năm chủng nấm được thu ở miền Bắc, trong đó ba chủng nấm (PT1, PT2 và PT3) thu từ Phú Thọ có độ tương đồng lên đến 100%. Hai chủng DL1 và DL2 thu từ Đại Lải (tỉnh Vĩnh Phúc) có độ biến động nhỏ (1-2%) so với các chủng nấm thu ở Phú Thọ. Độ biến động giữa hai chủng nấm thu ở Đại Lải tương đối nhỏ (1%). Ở miền Bắc Việt Nam, nấm bệnh *C. eucalypti* cùng với một số loài nấm bệnh khác như *Mycosphaerella* spp., *Colliena fragariae* được coi là một trong những loài nấm bệnh gây hại chính đối với cây bạch đàn. Nấm *C. eucalypti* gây bệnh hại lá nghiêm trọng đối với một số xuất xứ của loài Bạch đàn trắng (*E. camaldulensis*) ở Bà Vì, Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Giang (Phạm Quang Thu 2005),

Như vậy đã có sự biến động trong loài giữa các chủng nấm bệnh *C. eucalypti* thu được ở các miền khác nhau mặc dù sự biến động là không lớn. Khoảng cách di truyền của nhóm I và nhóm III lớn hơn so với nhóm II và nhóm III. Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy cần thiết phải có sự nghiên cứu về đặc tính gây bệnh hay khả năng gây bệnh của các chủng nấm bệnh thu từ các vùng khác nhau trên đối tượng cây bạch đàn.

KẾT LUẬN

Cặp mồi ITS1-F và ITS4 đã khuếch đại được 15 chủng nấm nghiên cứu.

Các chủng nấm thu từ một miền có độ tương đồng cao, lên đến 99 -100%.

Sự biến động giữa các chủng nấm ở các miền khác nhau là không lớn song đã có sự biến động trong loài giữa các chủng thu thập và các chủng nấm được phân bố vào 3 nhóm chính theo vùng địa lý thu thập. Khoảng cách di truyền của các chủng thuộc nhóm I (thu ở các tỉnh Đông Nam bộ) và nhóm III (thu ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam) là lớn hơn so với nhóm II (thu ở các tỉnh miền Trung) và nhóm III.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banh, T. H., 1999. Eucalypt plantations and their disease situation in Thu Thien Hue province. ACIAR Workshop on Eucalypt Diseases, Ho Chi Minh City, Vietnam, 8-10 November 1999 (Abstract in Workshop booklet).

Booth, T, Dudzinski, M., Jovanovic, T., Old, K.M., Pongpanich, K. and Pham Quang Thu, 2000. Development worldwide hazard prediction for *Cryptosporiopsis eucalypti* on eucalypts. In Minimising Disease Impacts on Eucalypts in South East Asia. Final Report on ACIAR Projects 9441.

CSIRO, 1999. ACIAR Project 9441, 4th Annual Progress Report, January – December 1999.

Curran J., Driver F., Ballard J. W. O., and Milner R. J., 1994. Phylogeny of *Metarhizium* analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 98: 542-552.

Gadgil, P.D. and Dick, M., 1999. Fungi Silvicolae Novazelandiae: 2. *New Zealand Journal of Forest Science* 29: 440-458.

Gardes, M. and Bruns, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

Glen, M., Tommerup, I. C., Bougher, N. L. and O'Brien, P. A., 2002. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? *Mycorrhiza* 12: 243-247.

Hoàng Xuân Tý, 1999. Predicting distribution and impacts of *Eucalyptus* foliar disease in Vietnam. Workshop on Eucalypt Diseases, 8-10 November 1999, Ho Chi Minh City. CSIRO Forestry and Forest Products, Canberra 23pp.

Jean-Marc Moncalvo, Francois M. Lutzoni, Stephen A. Rehner Jacqui Johnson and Rytas Vilgalys, 2000. Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 49:278-305.

Manfred Binder and David S. Hibbett, 2002. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (Mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular phylogenetics and Evolution* 22: 76-90.

Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2006. Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu chọn giống kháng bệnh có năng suất cao cho một số loài bạch đàn và keo” giai đoạn 2001-2005. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Nguyen, T. N., 1999. Early Growth and Disease Assessment of a *Eucalyptus camaldulensis* Progeny Trial in the South-East Vietnam. Australian Tree Seed Centre, CSIRO Forestry and Forest Products, Canberra, Australia. Professional Attachment Report 53 pp.

Old, K.M. and Yuan, Z.Q., 1994. Foliar and stem diseases of *Eucalyptus* in Vietnam and Thailand. Report prepared for CSIRO Division of Forestry and Australia Center for International Agricultural Research, Canberra.

Old, K.M., Dudzinski, M.J. and Pham Quang Thu, 1999. Technical Workshop on Eucalypt Diseases. (CSIRO Forestry and Forest Products, Canberra, and Forest Science Institute of Vietnam, Hanoi).

Old, K.M., Pongpanich, K., Dudzinski, M.J., Yuan, Z.Q., Pham Quang Thu and Nguyen Tran Nguyen, 2000. Cryptosporiopsis leaf spot and shoot blight of eucalypts. In *Minimising Disease Impacts on Eucalypts in South East Asia*. Final report to CSIRO/ACIAR project 9441, Canberra, Australia.

Phạm Quang Thu, 2005. Bệnh đốm lá, khô ngọn bạch đàn do nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* Sankaran & Sutton. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 8: 67-68.

Sankaran, J.V. Sutton, B.C. and Balasundaran, M., 1995. *Cryptosporiopsis eucalypti* sp. Nov., causing leaf spots of eucalypts in Australia, India and U.S.A. *Mycological Research* 99: 827-830.

Sinchai Chatasiri, Osamu Kitade and Yoshitaka Ono, 2006. Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae* and *P. patriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. *Mycoscience* 47: 123-129.

Thompson, J. D., Higgins, D. G and Gibson, T. J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22: 4673-4680.

Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn và Bùi Cách Tuyền, 2009. So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin gây bệnh trên côn trùng phân lập ở một số tỉnh thành phía Nam Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 4: 21-25.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, T., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (eds Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) 315-322 pp. Academic Press, San Diego, USA.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF CRYPTOSPORIOPSIS EUCALYPTI CLONES CAUSING LEAF SPOT OF EUCALYPTUS

Tran Thanh Trang

Forest Science Institute of Vietnam

SUMMARY

The ITS regions of rDNA of fifteen *Cryptosporiopsis eucalypti* clones collected on *Eucalyptus* hosts from different provinces were varified. The variation in ITS regions between clones were minor, however those clones were divided into three groups according to geographic regions of collection. The homology similarity of clones collected in a region

were very high, up to 100%. The genetic distances of clones in group I and group III was higher than that of group II and group III.

Key words: *Cryptosporiopsis eucalypti*, homology, ITS region