ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นัลทรานสไครพ์สเพเซอร์

ชื่อผู้เขียน นางสาว ศรัญญา ลิ้มไพแสง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์	ประธานกรรมการ
อ. พิภพ ลำยอง	กรรมการ
รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์	กรรมการ
รศ. ดร. สายสมร ลำยอง	กรรมการ

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 13 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชต่างๆ ดังนี้ คือ *Begonia* sp. *Coffea arabica* *Caladium bicolar* *Citrus reticulata* *Codiaeum variegatum* *Diospyros kaki* *Euphoria longana* *Limonium* sp. *Lycopersicon esculentum* *Musa sapientum* และ *Sorghum bicolor* โดยขั้นแรกได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราดังกล่าว พบว่าเชื้อรามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันไปเช่น ลักษณะสีของโคโลนี รูปร่าง และขนาด conidia setae appressoria และอัตราการเจริญบนอาหาร (potato dextrose agar และ potato carrot agar) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ พบว่าเชื้อราทั้งหมดสามารถจัดจำแนกออกเป็นสามกลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืช *Begonia* sp. *Coffea arabica* *Caladium bicolar* *Citrus reticulata* *Codiaeum variegatum* *Diospyros kaki* *Euphoria longana* *Limonium* sp. และ *Sorghum bicolor* กลุ่มที่สองประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ที่แยกได้จากพืช *Caladium bicolar* และ *Curcuma sessilis* และกลุ่มที่สามประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum coccodes* ที่แยกได้จากพืช *Lycopersicon esculentum* จากนั้นนำเชื้อราทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน nuclear rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้

ไพรเมอร์ ITS5 และ P3 ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 17 สปีชีส์ ได้แก่ *Colletotrichum 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* จาก the DNA databank of Japan (DDBJ) จากนั้นนำผลที่ได้มาสร้าง neighbor-joining tree โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นัลทรานสไครพ์สเพเซอร์ (โดยใช้เฉพาะช่วง ITS1) และทำการวิเคราะห์ค่า bootstrap เปรียบเทียบข้อมูล 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0 และคำนวณค่า data matrix ด้วยโปรแกรม PAUP version 3.1 ผลการทดลองที่ได้ พบว่าเชื้อราที่นำมาทดลองสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสในตำแหน่งอินเทอร์นัลทรานสไครพ์สเพเซอร์ กลุ่มที่ได้เหล่านี้จะสอดคล้องกับกลุ่มที่แยกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ *Colletotrichum gloeosporioides C. capsici* และ *C. coccodes* ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จาก *Musa sapientum* ที่ถูกจัดเป็นเชื้อรา *Colletotrichum musa* ดังนั้นลำดับเบสบน rDNA เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในจีนัส *Colletotrichum*

Thesis Title Phylogenetic Relationship of *Colletotrichum* Based on Internal Transcribed Spacer Sequences Analysis

Author Miss Saranya Limkaisang

M.S. Plant Pathology

Examining Committee

Lect. Dr. Chaiwat To-anun	Chairman
Lect. Pipop Lumyong	Member
Assoc. Prof. Dr. Sombut Srichuwong	Member
Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Member

Abstract

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. The tested fungi were first identified using morphological characteristic. Highly significant difference between the tested fungi were observed, such as color of colony, shape and size of conidia, setae, appressoria and growth rate on the media (potato dextrose agar and potato carrot agar). According to morphological characteristic, the tested fungi were divided and identified into three groups, *Colletotrichum gloeosporioides* (isolated from *Begonia* sp., *Coffea arabica, Caladium bicolar, Citrus reticulata, Codiaeum variegatum, Diospyros kaki, Euphoria longana, Limonium* sp., and *Sorghum bicolor*), *Colletotrichum capsici* (isolated from *Caladium bicolar* and *Curcuma sessilis*) and *Colletotrichum coccodes* (isolated from *Lycopersicon esculentum*). 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* (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 based on the nucleotide length of the ITS regions. This grouping was similar to that based on the morphological characters, *Colletotrichum 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.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University