**ชื่อวิทยานิพนธ์** การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

**ผู้เขียน** นายรัฐกร ศรีสุทธี

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** อ. ดร. สรัญยา วัลยะเสวี ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ กรรมการ
อ. ดร. อังสนา อัครพิศาล กรรมการ

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 41 ไอโซเลทที่แยกจากพืช 38 ชนิด (ไม้ผล 14 ชนิด, ไม้ดอกไม้ประดับ 18 ชนิด และพืชอื่นๆ 6 ชนิด) โดยศึกษาจากลักษณะของโคโลนี ขนาดและรูปร่างของโคนิเดียและแอพเพรสซอเรีย และการสร้าง/ไม่สร้างซีตีและสเคอโรเตีย พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มโดย กลุ่มที่ 1 มี 33 ไอโซเลท โคโลนีมีสีขาว สีเขียวและสีเทา อัตราการเจริญ 10.9±5 มิลลิเมตร/วัน สร้างโคนิเดียรูปร่างคล้ายแคปซูล (cylindrical) สร้างแอพเพรสซอเรียแบบกระบอง (clavate) บางไอโซเลทสร้างซีตีและสเคอโรเตีย กลุ่มที่ 2 มี 2 ไอโซเลท โคโลนีสีเทาอมส้ม อัตราการเจริญ 13.5±0.2 มิลลิเมตร/วัน สร้างโคนิเดียรูปร่างคล้ายแคปซูล (cylindrical) สร้างแอพเพรสซอเรียแบบไม่สม่ำเสมอ (irregular) ไม่สร้างซีตีแต่สร้างสเคอโรเตีย กลุ่มที่ 3 มี 3 ไอโซเลท โคโลนีสีเทาอมส้ม อัตราการเจริญ 8.84±1 มิลลิเมตร/วัน สร้างโคนิเดียรูปร่างคล้ายลูกรักบี้ (fusiform) สร้างแอพเพรสซอเรียแบบกระบอง (clavate) ไม่สร้างซีตีและสเคอโรเตีย และกลุ่มที่ 4 มี 3 ไอโซเลท โคโลนีสีเทาปนเขียว อัตราการเจริญ 8.83±1 มิลลิเมตร/วัน สร้างโคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายเคียว (falcate) สร้างแอพเพรสซอเรียแบบกระบอง (clavate) สร้างซีตี แต่ไม่สร้างสเคอโรเตีย เมื่อทำการจัดจำแนกสปีชีส์โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* กลุ่มที่ 2 คือเชื้อรา *C. musae* กลุ่มที่ 3 คือเชื้อรา C. *acutatum* และ กลุ่มที่ 4 คือเชื้อรา *C. capsici*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการใช้ไพรเมอร์ inter-simple sequence repeat (ISSR) เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าการใช้ 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ $(GCC)_5$, $(CA)_8CT$, $(CA)_8G$, $(GACA)_4$, $(GTG)_5$ และ $(GAC)_5$ สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 161 แถบ เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Phylip และสร้าง dendrogram เพื่อแบ่งกลุ่มด้วยวิธี Neighbour-joining ผลพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 12 กลุ่ม ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิค ISSR นี้มีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และช่วยในการจัดกลุ่มได้ละเอียดมากขึ้น จะเห็นได้จากไอโซเลทเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* แบ่งย่อยออกได้อีก 10 กลุ่ม ดังนั้นเทคนิค ISSR มีประโยชน์ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่และมีความซับซ้อนมากได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Phylogenetic Analysis of *Colletotrichum* spp. by DNA Fingerprinting

**Author** Mr. Ratakorn Srisuttee

**Degree** Master of Science (Plant Pathology)

**Thesis Advisory Committee** Lect. Dr. Sarunya Valyasevi Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-Anun Member
Lect. Dr. Angsana Akarapisan Member

## ABTRACT

Forty-one isolates of *Colletotrichum* spp. which isolated from 38 plants (14 fruit plants, 18 ornamental plants and 6 other plants). These tested fungi were studied using morphological characterstic such as character of colony, size and shape of conidia and appressoria, present/absent of setae and sclerotia. The morphological observation showed that *Colletotrichum* spp. can be classified the isolates into 4 groups. Group 1(33 isolates); colony were white, green and grey, the growth rate were 10.9±5 mm/day, produced cylindrical conidia and clavate appressoria, some of tested fungi produced setae and sclerotia. Group 2 (2 isolates); colony were orange-grey, the growth rate were 13.5±0.2 mm/day, produced cylindrical conidia and irregular appressoria, setae absent but produced sclerotia. Group 3 (3 isolates); colony were orange-grey, the growth rate were 8.84±1 mm/day, produced fusiform conidia and clavate appressoria, setae and sclerotia absent and group 4 (3 isolates); colony were green-grey, the growth rate were 8.83±1 mm/day, produced falcate conidia and clavate appressoria, setae present but sclerotia absent. The tested fungi were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* and *C. capsici*, respectively

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

For genetic relationship of the tested fungi, by 6 ISSR primers; $(GCC)_5$, $(CA)_8CT$, $(CA)_8G$, $(GACA)_4$, $(GTG)_5$ and $(GAC)_5$, generated 161 bands and they were analyzed by Phylip and a dendrogram derived from cluster analysis using Neighbour-joining. The result showed that all of the tested fungi can be divided into 4 groups and 12 supgroups. Moreover, this grouping was similar to that based on the morphological characters and can be grouped *Colletotrichum gloeosporioides* isolates into 10 subgroups. Therefore, the ISSR technique was useful for analysis phylogenetic relationship within complex genera such as *Colletotrichum*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved