

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บางชนิด โดยเทคนิค AFLP

ชื่อผู้เขียน นางสาว เอมอร พงศ์สารารักษ์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอมนันต์	ประธานกรรมการ
อ. พิภพ ถ้ายอง	กรรมการ
รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์	กรรมการ
รศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง	กรรมการ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ คือ สตรอเบอรี่ 1 สตรอเบอรี่ 2 ทับทิม ส้ม 1 ส้ม 2 ฝรั่ง กลัวยหอม กลัวยน้ำว้า ลำไย พลับ กาแฟ กลัวยไม้ ข้าวฟ่าง มะนาว และพริก ด้วยเทคนิค AFLP (amplified fragment length polymorphism) เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราทั้ง 15 ไอโซเลทมีความแตกต่างกันสูงมาก เช่น สีของโคโลนี (มีตั้งแต่สีขาว เขียว ส้ม และเทา) และมีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน (ตั้งแต่ 0.82 ถึง 1.72 เซนติเมตรต่อวัน) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้าง conidia รูปทรงกระบอกตรง มีขนาดตั้งแต่ $3.00 - 4.68 \times 12.38 - 14.34$ ไมครอน และสร้าง appressoria ทั้งแบบผิวเรียบ และผิวขรุขระ มีขนาดตั้งแต่ $5.58 - 8.22 \times 9.09 - 13.73$ ไมครอน เชื้อราบางไอโซเลทจะสร้าง sclerotia แต่ส่วนใหญ่ไม่สร้าง setae ยกเว้นไอโซเลทที่แยกได้จากมะนาวเพียงไอโซเลทเดียว เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาได้นำมาจัดจำแนกโดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่า ทุกไอโซเลทถูกจัดอยู่ในสปีชีส์ *Colletotrichum gloeosporioides* ดังนั้นการจัดจำแนกเชื้อราที่นำมาทดสอบจึงไม่อาจกระทำได้หากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราที่นำมาทดสอบ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราแต่ละไอโซเลท แล้วนำมาศึกษาโดยพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ *EcoRI/MseI* เป็น adapter และใช้ *EcoRI-A/MseI-C* เป็น primer ในการทำ PCR ครั้งที่หนึ่ง และใช้ *EcoRI-A/MseI-CAG*, *EcoRI-A/MseI-CAC*, *EcoRI-A/MseI-CAT* และ *EcoRI-AC/MseI-C* เป็น primer ในการทำ PCR ครั้งที่สอง ภายหลังจากนำผลผลิตของ PCR มาตรวจสอบด้วย PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างภายในสปีชีส์ (polymorphic band) 154 แถบ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม UPGMA (unweight-pair-group method using average) และ parsimony ผลปรากฏว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราที่นำมาทดสอบออกเป็น 11 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.7 ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอร์รี่ 1 และสตรอเบอร์รี่ 2 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากทับทิม กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากลำไย กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพลับ กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากมะนาว กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพริก กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากฝรั่ง กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ และกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากส้ม 1 และส้ม 2 โดยผลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ยังพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดเดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง ซึ่งแยกได้จากพืชต่างชนิดกันแต่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูง จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะเห็นได้ว่าเทคนิค AFLP มีประโยชน์ในการใช้จัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งจัดเป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่และมีความซับซ้อนมากได้

Thesis Title	Phylogenetic Relationship of <i>Colletotrichum</i> spp. Using AFLP Technique	
Author	Miss Aim On Pongsararuk	
M.S.	Plant Pathology	
Examining Committee	Lecturer Dr. Chaiwat To-anan	Chairman
	Lecturer Pipob Lamyong	Member
	Associate Professor Dr. Sombat Srichuwong	Member
	Associate Professor Dr. Saisamorn Lamyong	Member

Abstract

Phylogenetic analysis of the fifteen isolates of *Colletotrichum* spp. which were isolated from different host species; strawberry 1, strawberry 2, pomegranate, orange 1, orange 2, guava, banana 1, banana 2, longan, persimmon, coffee, orchid, sorghum, lime and pepper were examined using AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique. The morphological characteristic of the tested fungi on PDA medium showed highly significant difference such as color of colony (vary from white, green, orange to gray) and the growth rate on the medium (ranges from 0.82 to 1.72 centimeters/day). Microscopic studies showed that all of the tested fungi produced cylindrical conidia (3.00 - 4.68 × 12.38 - 14.34 micrometers) and produced smooth or rough appressoria ranged from 5.58 - 8.22 × 9.09 - 13.75 micrometers. Some of the tested fungi produced sclerotia but most of them were not produced setae except the isolate from lime. However classification of Sutton (1980), all of them were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. Thus, the isolated fungi could not be identified based on their morphology alone.

For genetic analysis of the tested fungi, DNA of each fungal isolate was extracted and was analyzed by AFLP technique using *EcoRI/MseI* as adapter, *EcoRI-A/MseI-C* as the primers for the 1st PCR and *EcoRI-A/ MseI-C* as the primers for the 2nd PCR. After analysis the PCR product by PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), a total of 154 polymorphic bands were obtained and they were analyzed by UPGMA (unweighted paired group using averages) and parsimony. The result showed that all of the tested fungi can be divided into 11 groups at a similarity of 0.7 as follows; the first group consisted of the fungi isolated from strawberry 1 and strawberry 2, the second group was isolated from pomegranate, the third group was isolated from banana 1 and banana 2, the fourth group was isolated from longan, the fifth group was isolated persimon, the sixth group was isolated from lime, the seventh group isolates from coffee and sorghum, the eighth group was isolated from pepper, the ninth group was isolated from guava, the tenth group was isolated from orchid, and the eleventh group was isolated from orange 1 and orange 2. Thus result also showed that the fungi which isolated from the same host species were closely related except the isolates from coffee and sorghum, they were identified as the same group. Therefore, the AFLP technique was useful technique for identification of individual isolates within complex genera such as *Colletotrichum*.