ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรม รา *Fusarium* spp.ในประเทศไทย

DNA Fingerprint and Genetic Variation of *Fusarium* spp. In Thailand

ธารทิพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ นภสร ปุญญพิทักษ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยเทคนิค AFLP พบว่าสามารถแบ่งการกระจายตัวทางพันธุกรรมของเชื้อได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และวานิลาจากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์ ส่วนการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD ไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* แต่ละไอโซเลทที่นำมาทดลองได้ เนื่องจากพบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 ไม่แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ที่นำมาทดลอง

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-01-01-08-50

คำนำ

รา *Fusarium* spp. จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina form – class Hyphomycetes form – order Tuberculariales form - family Tuberculariaceae (Ainsworth, 1973) *Fusarium* spp. เป็นราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญ เป็นสาเหตุโรคของพืชมากมายหลายชนิด อาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง *Fusarium* เป็นราที่อาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง หลายชนิด (species) เป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โรคถอดฝักดาบของข้าว โรคตายพรายของกล้วย โรคเหี่ยวของพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ โรครากเน่าของพืชตระกูลถั่ว โรคโคนเน่าและลำต้นเน่าของธัญพืช เป็นต้น(พัฒนาและคณะ, 2537) ราในสกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นราในดินสามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินได้นานในรูปของสปอร์ผนังหนาหรือ chlamydospore (Lester และคณะ, 1988; Windels, 1993)

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิด (species) ราสาเหตุโรคพืชมีความสำคัญและมีการพัฒนาไปอย่างมาก มีการนำวิทยาการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดจำแนกชนิด ตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของชนิด รวมทั้งการวินิจฉัยสาเหตุของโรคพืชซึ่งโดยทั่วไปดูจากลักษณะสัณฐานวิทยา แต่หากได้มีการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอแล้วจะให้ผลในทางสนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกทางหนึ่ง ให้ความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น รา *Fusarium* spp. เป็นนราที่มีพืชอาศัยจำนวนมากและสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นานหลายปีและเกิดความผันแปร (variation) ได้ง่าย การเก็บรวบรวมตัวอย่างและจำแนกชื่อชนิดของรา *Fusarium* spp. ทำให้ทราบการเกิดและการระบาดของโรค แหล่งแพร่กระจาย และได้สายพันธุ์พร้อมข้อมูลเก็บรักษาไว้ใน หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของรา *Fusarium* spp. ยังมีไม่ครบถ้วน ดังนั้นจึงทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคพืชที่เก็บรวบรวมไว้แล้วและที่เก็บรวบรวมใหม่ เพื่อให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp. ซึ่งผลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ด้านโรคพืชนำไปใช้เผยแพร่ได้และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปวิจัยต่อยอดด้านอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่คาดว่ามีสาเหตุจากรา *Fusarium* spp. จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทยและรา *Fusarium* spp. ที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืช
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Agar (PDB), Corn Leaf Ager (CLA) และ KCl
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ และสูง
6. Gel Electrophoresis เครื่องมือตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยแสงยูวี (UV transiluminator)
7. สารเคมี ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

วิธีการ

1. การศึกษาเชื้อสาเหตุและการจำแนกชนิด

แยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค (Tissue transplant) โดยตัดตัวอย่างพืชบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติให้มีขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร water agar บ่มเชื้อไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 loop ภายใต้ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ห่วงลวด (loop) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม ทำการจำแนกชนิด ศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ดังนี้

ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีรา *Fusarium* spp. ศึกษาการสร้าง pigment sclerotium และ sporodochium บันทึกลักษณะและวัดขนาดของ conidia conidiophore บันทึกการสร้างและลักษณะของ chlamydospore ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell phialide microconidia macroconidia

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp.

การเตรียมเส้นใยราและการสกัดดีเอ็นเอ นำรา *Fusarium* spp. ที่จำแนกชนิดแล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน กรองเส้นใย ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำเส้นใยไปเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาสกัด DNA โดยนำเส้นใย 0.2 กรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม extraction buffer 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เติมสารละลาย 5M Nacl 190 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่เย็นจัด 800 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอธานอลทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด คว่ำหลอดทิ้งตะกอนไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดบน agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 30 นาที นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แล้วล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกโดยแช่เจลในน้ำสะอาด นำเจลไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2550
สิ้นสุด กันยายน 2552

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาเชื้อสาเหตุและการจำแนกชนิด

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีตามวิธีการและระบบของ Nelson *et al.* (1983) พบว่ารา *F. oxysporum* และ *F. proliferatum* ที่แยกได้จากส่วนของพืชที่เป็นโรคและราที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ จำนวน 30 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) มีลักษณะดังนี้

***F. oxysporum* Schlecht ex Fries, emend. Snyder & Hansen**

ชื่อพ้อง : *F. oxysporum* Schlecht. Emend. Snyd. & Hans. pro parte

F. redolens Wollenw.

F. oxysporum Schlecht. Emend. Snyd. & Hans. var. *redolens* (Wollenw.) Gordon

F. oxysporum Schlecht.

F. oxysporum Schlecht. var. *redolens* (Wollenw.) Gordon

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวแซมม่วง สีชมพูม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิ่ง ไม่มีสี มีขนาดสั้นกว่า phialide ของ *F. moniliforme* และ *F. solani* microconidia รูปไข่ ยาวรี สั้นป้อม จนถึงรูปทรงกระบอก ไม่มีสี มี 1-2 เซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 เซลล์ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียวแหลม หรือทู่มน ผนังบาง ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 24-26 x 3-4.5 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่แตกกิ่งก้านมากหรือเกิดบน sporodochium ที่มีลักษณะเป็นก้อน (tubercularia-like) เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือผนังขรุขระ เกิดที่บริเวณส่วนปลายเส้นใย (terminal) และส่วนกลางเส้นใย (intercalary) มักเกิดเดี่ยว แต่บางครั้งเกิดเป็นคู่หรือเป็นลูกโซ่

รา *Fusarium oxysporum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้น นักอนุกรมวิธานราที่ได้ศึกษา และจัดระบบการจำแนก จึงได้ให้ชื่อเป็น form-species เฉพาะพืชอาศัยแต่ละชนิด เช่น โรคเหี่ยวของแตงเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, โรคเหี่ยวของฝ้ายเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

และ โรคต้นเหี่ยวของถั่วเหลืองเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *glycines* ซึ่งขนาดและรูปร่างของ macroconidia มีความผันแปรบ้างในระหว่าง form-species (Booth, 1971) ในประเทศไทยพบราชนิดนี้กระจัดกระจายอยู่ทั้งในดินและพืช มากกว่าราชนิดอื่นโดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลี แตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และมันฝรั่ง (ปิยะวดี, 2533)

F. proliferatum **(Matsushima) Nirenberg**

ชื่อพ้อง : *F. moniliforme* Sheldon pro parte

F. moniliforme Sheldon emend. Snyd. & Hans. pro parte

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เส้นใยฟู หนาแน่น ขณะยังอ่อนมีสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้น มีสีชมพูส้ม สีส้มชมพู จนถึงสีชมพูม่วง โคโลนีเจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหาร มากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium มีสีส้ม ถึงสีส้มเข้ม โคโลนีด้านใต้อาหารวุ้นมีสีส้มอ่อน สีม่วงแดง จนถึงสีม่วงคราม บาง isolate สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA: ลักษณะโดยทั่วไปคล้าย *F. moniliforme* และ *F. subglutinans* ซึ่ง microconidium เกิดบน microconidiophore ทั้งแบบเป็นกลุ่ม (false head) และ ต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ (chain) แต่จำนวน conidium ในแต่ละลูกโซ่น้อยกว่า *F. moniliforme* พบสร้าง phialide ทั้งแบบ mono- และ polyphialide เช่นเดียวกับ *F. subglutinans* และไม่สร้าง chlamydospore

Nelson, *et al*. (1983) จัด *Fusarium* ใน section Liseola จำนวน 4 ชนิด คือ *F. moniliforme F. proliferatum F. subglutinans* และ *F. anthophilum* มีลักษณะโดยทั่วไปใกล้เคียงกันมาก จะแตกต่างกันในบางลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกชนิด หากใช้ระบบการจัดจำแนกของ Nelson ต้องดำเนินการตามขั้นตอนของ Nelson และมีความละเอียดถี่ถ้วน รา *F. proliferatum* มีรายงานของต่างประเทศว่า พบรานี้บนพืชตระกูลกล้วยไม้สกุล*Dendrobium* (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm.) ในประเทศไทยมีรายงานการพบรา *F. proliferatum* บนเอื้องพร้าวที่ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. oxysporum* และ *F. proliferatum*

2.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. oxysporum* ด้วยเทคนิค AFLP ใช้ microsatellite primers (Steenkamp *et al*., 2005) 9 คู่

primer	ลำดับเบส (5'------>3')	primer	ลำดับเบส (5'------>3')
MB2F	TGCTGTGTATGGATGGATGG	MB2R	CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG
MB5F	ACTTGGAGGAAATGGGCTTC	MB5R	GGATGGCGTTTAATAAATCTGG
MB9F	TGGCTGGGATACTGTGTAATTG	MB9R	TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG
MB10F	TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC	MB10R	TTGCAATTACCTCCGATACCAC
MB11F	GTGGACGAACACCTGCATC	MB11R	AGATCCTCCACCTCCACCTC
MB13F	GGAGGATGAGCTCGATGAAG	MB13R	CTAAGCCTGCTACACCCTCG
MB14F	CGTCTCTGAACCACCTTCATC	MB14R	TTCCTCCGTCCATCCTGAC
MB17F	ACTGATTCACCGATCCTTGG	MB17R	GCTGGCCTGACTTGTTATCG
MB18F	GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC	MB18R	TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *F. oxysporum* พบว่า คู่ไพรเมอร์ MB11F และ MB11R แสดงให้เห็นความแตกต่างมากที่สุด จากความแตกต่างของราแต่ละไอโซเลท แบ่งที่ความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ

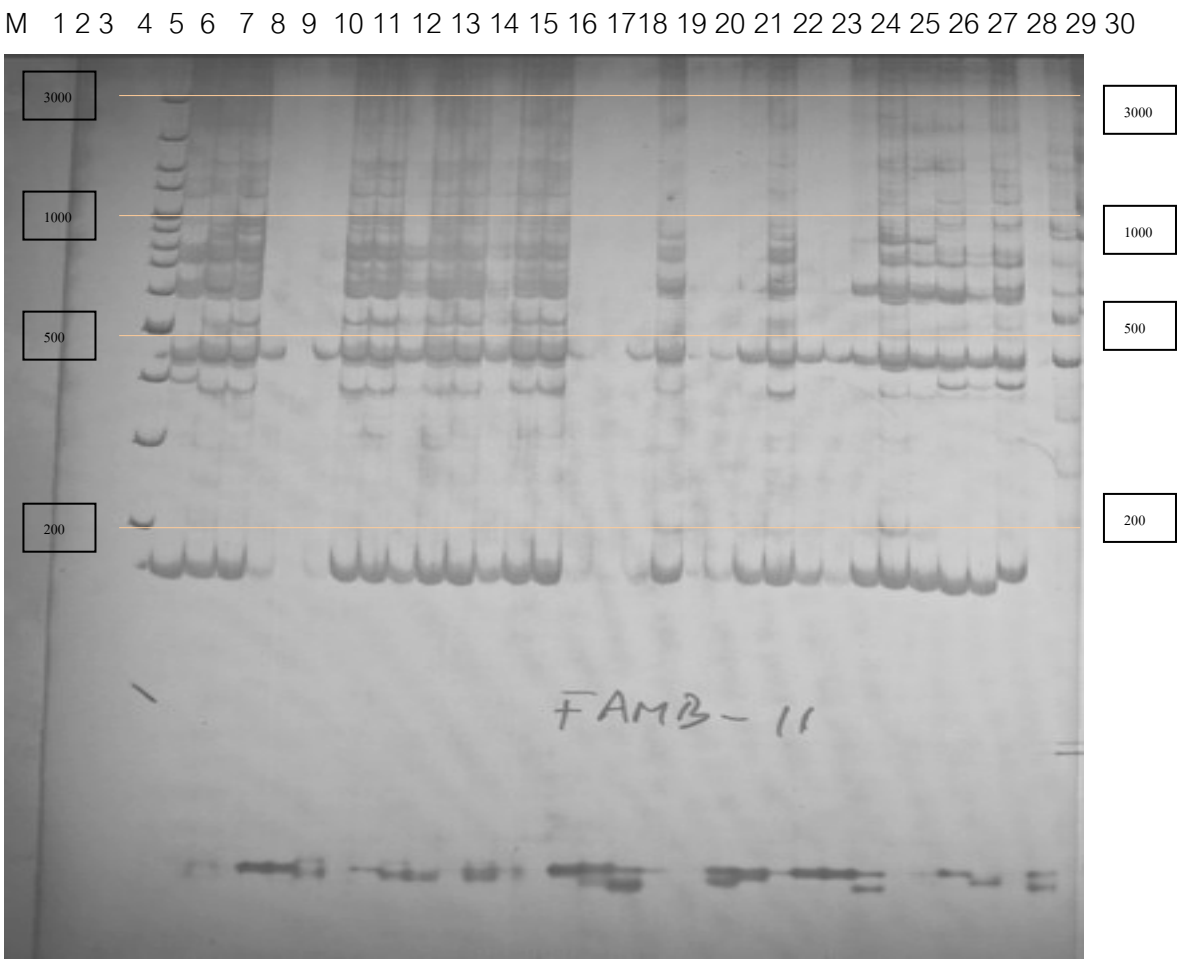
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และต้น วานิลา จากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์

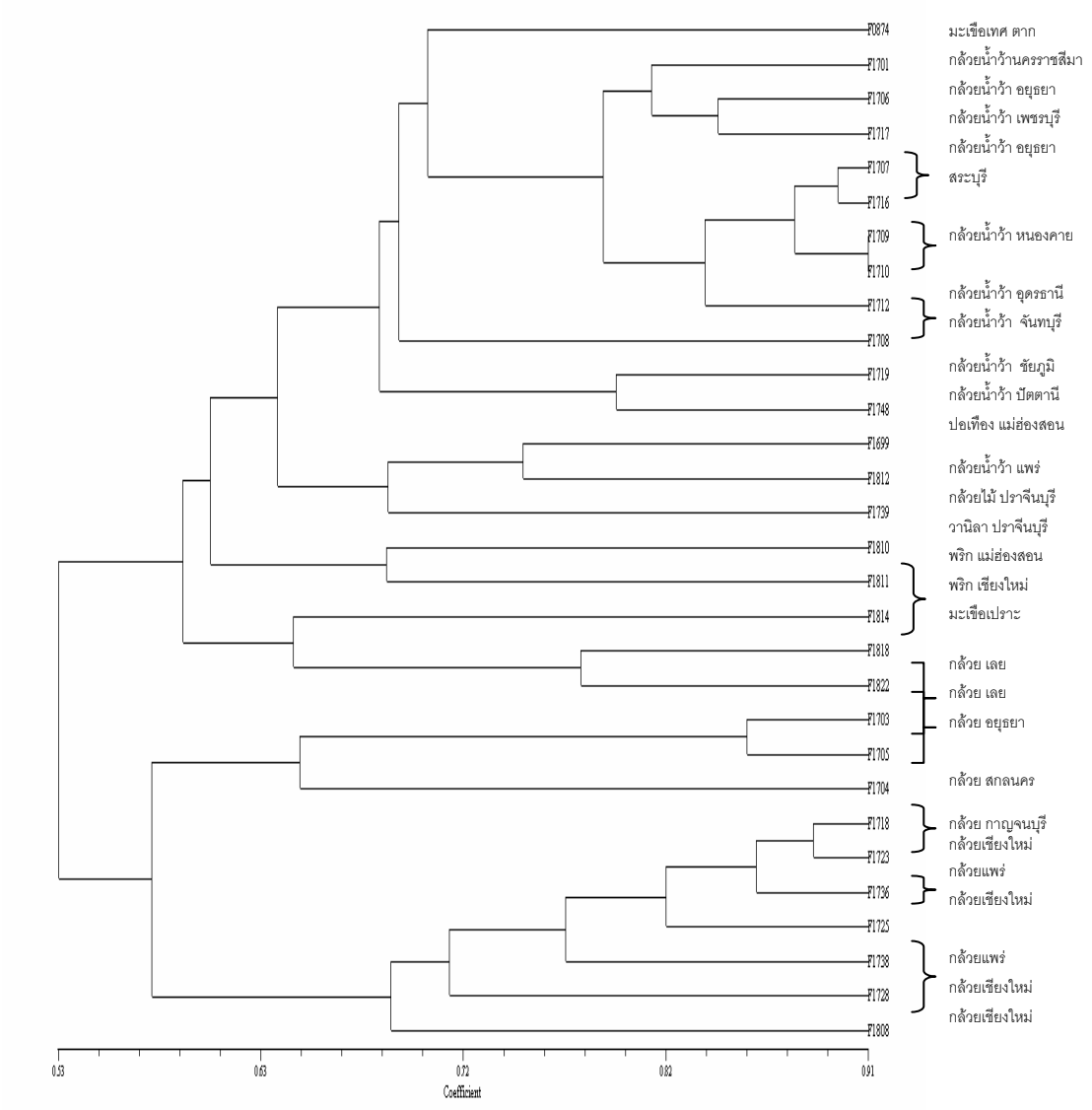
กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. oxysporum* ที่เกิดจากเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MB11F และ MB11R เครื่องหมาย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานใช้ 100 bp plus fermentas กลุ่มตัวเลข คือ ดีเอ็นเอ *F. oxysporum*



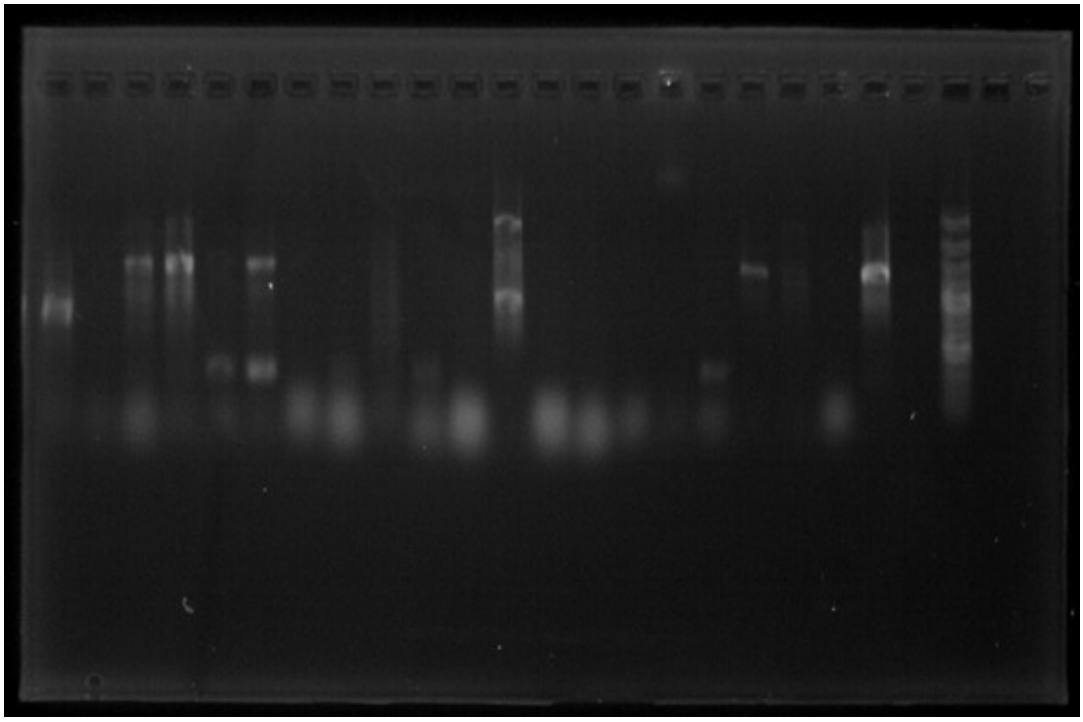
ภาพที่ 2 โครงสร้าง dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *F. oxysporum* สังเคราะห์จากไพรเมอร์ MB11F และ MB11R แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากพืชชนิดต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ด้วยเทคนิค RAPD ใช้ primers

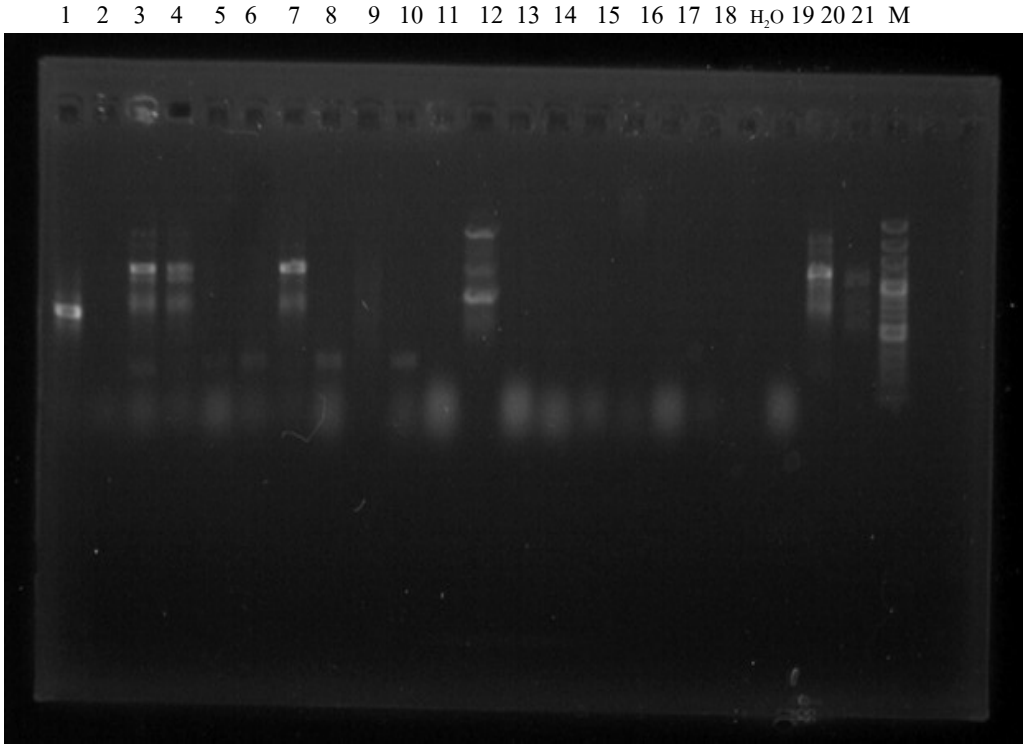
primer	ลำดับเบส (5'------>3')	primer	ลำดับเบส (5'------>3')
PFE08	CTCTCCGCCA	PFE12	GGAGGGTGTT

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *F. proliferatum* 20 ไอโซเลท พบว่า การเกิดแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 (ภาพที่ 3 และภาพที่ 4) ยังไม่สามารถเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างได้ การสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ไอโซเลทต่างๆ จึงยังไม่สามารถทำได้ ถึงแม้ว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ PFE12 แถบดีเอ็นเอเลน 3 และเลน 4 แถบดีเอ็นเอเลน 5 และเลน 6 จะให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของรา *F. proliferatum* ที่เป็นสาเหตุโรคของกล้วยไม้และของข้าว ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการทดลองเริ่มต้นในการศึกษาหาไพรเมอร์ ชนิดต่างๆมาใช้เพื่อให้สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างราทุกไอโซเลทได้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 M



ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. proliferatum* ที่เกิดจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ PFE08 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ 100 bp plus fermentas



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. proliferatum* ที่เกิดจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ PFE12 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP สามารถแบ่งการกระจายตัวทางพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* ได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และวานิลา จากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์

ส่วนการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของราแต่ละไอโซเลทที่นำมาทดลองได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 ไม่แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ที่นำมาทดลอง ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปต้องทำการศึกษาไพรเมอร์จำนวนหลายชุด ให้สามารถแสดงความเหมือนหรือความแตกต่างของราแต่ละไอโซเลท เพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ. 2533. ชนิดของเชื้อรา *Fusarium* จากพืชและดินในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Ainsworth, G. C. 1973. Introduction and keys to higher taxa, pp.1-7. *In* The fungi Vol. IV B. Eds., G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow, and A.S. Sussman. Academic Press, New York.

Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. C.M.I., Kew, Surrey, England. 237 p.

http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm

Lester, W. B., C. M. Liddell and B. A. Summerell. 1988. Laboratory Manual for Fusarium Research Incorporating a Key and Descriptions of Common Species Found in Australia, 2nd ed. University of Sydney, Australia. 156 p.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. H. O. Marasas. 1983. Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 193 p.

Windels, C. E. 1991. Current status of *Fusarium* taxonomy. Phytopathology 81:1948 - 1951

ตารางที่ 1 รา *F. oxysporum* จำนวน 30 ไอโซเลทและแหล่งที่มา

ลำดับที่	รหัส	ชื่อเชื้อ	พืชอาศัย	โรค/อาการโรค	สถานที่เก็บโรค
1	DOAC 0874	*F. oxysporum* f.	มะเขือเทศ	ต้นเหี่ยว	ต.ช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก
2	DOAC 1699	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.ปัตตานี
3	DOAC 1701	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ต.ไทยสามัคคี อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
4	DOAC 1703	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เลย
5	DOAC 1704	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภู-พาน อ.เมือง จ.สกลนคร
6	DOAC 1705	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
7	DOAC 1706	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
8	DOAC 1707	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
9	DOAC 1708	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.อุดรธานี
10	DOAC 1709	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
11	DOAC 1710	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
12	DOAC 1712	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
13	DOAC 1716	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.สระบุรี
14	DOAC 1717	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เพชรบุรี
15	DOAC 1718	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.กาญจนบุรี
16	DOAC 1719	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.จันทบุรี
17	DOAC 1723	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
18	DOAC 1725	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
19	DOAC 1728	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
20	DOAC 1736	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
21	DOAC 1738	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
22	DOAC 1739	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ชื่อเชื้อ	พืชอาศัย	โรค/อาการโรค	สถานที่เก็บโรค
23	DOAC 1748	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.ชัยภูมิ
24	DOAC 1808	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ต.ขี้เหล็ก อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
25	DOAC 1810	*F. oxysporum*	กล้วยไม้	ต้นเหี่ยว ใบไหม้	ต.เนินหอม อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
26	DOAC 1811	*F. oxysporum*	วนิลา	เถาเหี่ยว	ต.เนินหอม อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
27	DOAC 1812	*F. oxysporum*	ปอเทือง	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
28	DOAC 1814	*F. oxysporum*	พริก	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
29	DOAC 1818	*F. oxysporum*	พริก	ต้นเหี่ยว	ต.บ่อหลวง อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
30	DOAC 1822	*F. oxysporum*	มะเขือเปราะ	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน