การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม ของ Race แบคทีเรีย *Rasonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

Identification and DNA Fingerprint of Race of *Rasonia solanacearum* in Thailand

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเครั่ง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 100ไอโซเลท คัดเลือกโคโลนีที่รุนแรงเพื่อใช้ในการทดสอบ ทำการปลูกพืชอาศัยของ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ อายุ 1 เดือน จากนั้นนำ *เชื้อ R. Solanacearum* ความเข้มข้น 108 cfu/ml ที่คัดเลือกไว้มาปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย ผลการทดสอบพบว่า พืชอาศัยทั้งหมดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 14-28 วัน แสดง ว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือทั้ง 100 ไอโซเลทจัดอยู่ใน Race 1

รหัสโครงการ 03-04-54-04-01-02-07-54

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ Solanaceae (Kelman, 1953) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย สภาพแวดล้อมและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อโรคชนิดนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ขิง และปทุมมา เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน สามารถเข้าทำลายพืชทางรากโดยเข้าตามรอยแผลที่เกิดจากการทำลายของแมลง ไส้เดือนฝอย รอยฉีกขาดของรากหรือแผลที่เกิดในธรรมชาติ สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ดีโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุกจะมีการระบาดของโรครุนแรงและรวดเร็ว เชื้อนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์โดยสามารถแอบแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ (Latent infection) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและปริมาณของเชื้อโรคมากพอก็จะแสดงอาการของโรคออกมา โดยจะแสดงอาการเมื่อนำหัวพันธุ์ไปปลูกในสภาพแปลง ทำให้เกิดการระบาดของโรคในแปลงปลูก นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชอาศัยอื่นได้เนื่องจากมีพืชอาศัยที่กว้าง ทำให้เชื้อโรคสามารถอยู่ข้ามฤดูได้

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบกระจายในเขตร้อนและใกล้เขตร้อนอบอุ่นเย็นของพื้นที่ทั่วโลก มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มาก โดยมีความแตกต่างในพืชอาศัย(host range) การกระจายตัวตามภูมิศาสตร์(geographical distribution) ความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity) ความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อโรค (epidemiological relationships) และ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ (physiological properties) ทำให้มีการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกหรือบรรยาย (describe) ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียตามการกระจายตามตามภูมิประเทศและการเกิดโรคบนพืชอาศัยไว้ดังนี้

Race 1: มีผลกระทบกับยาสูบ, มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, มะเขือยาว, กล้วย diploid และพืชในกลุ่มมะเขืออื่นๆและ วัชพืช มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 2: มีผลกระทบกับกล้วย triploid (ก่อให้เกิดโรค Moko) และ เฮลิโคเนีย มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 3: มีผลกระทบส่วนใหญ่กับมันฝรั่งและมะเขือเทศ ไม่มีผลกระทบกับพืชกลุ่มมะเขืออื่นๆ มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิลดสูงสุด (27 ° C).

Race 4: มีผลกระทบกับพืชตระกูลขิง (Zingiber officinale) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 5: มีผลกระทบกับพืชตระกูลหม่อน (Morus spp.) ที่พบที่ประเทศจีน มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

บางสายพันธุ์สามารถเกิดโรคกับพืชอาศัยได้กว้างแต่บางสายพันธุ์เกิดโรคกับพืชในวงศ์จำกัด เช่น สายพันธุ์ที่พบในแถบเขตหนาวเช่นในแถบประเทศยุโรป เรียกว่าเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า low temperature จัดอยู่ใน race 3 ซึ่งทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่ง และมะเขือเทศในเขตพื้นที่สูงที่มีอากาศหนาวเย็นเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่เข้าทำลายพืชตระกูลกล้วยเท่านั้น จัดอยู่ใน race 2 (ก่อให้เกิดโรค Moko disease) ในประเทศไทยได้มีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *R. solanacearum* ไว้บ้างแต่ยังไม่มีการศึกษาและรายงานชนิดของrace ที่พบในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลการเกิดโรคความรุนแรง ตลอดจนพืชอาศัยที่พบในประเทศไทย ซึ่งถ้าทราบถึงชนิดของrace ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะทำให้หาวิธีการป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องต่อไป และเป็นการรายงานชนิดของ race ของเชื้อ *R. solanacearum* ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. ปลูกพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้แก่ พืชตระกูลมะเขือ (มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือพวง มะเขือเปราะ ยาสูบ) ตระกูลขิง(ขิง ขิงแดง ปทุมมา กระเจียว กระทือ) หน้าวัว ฤาษีผสม กล้วยชนิดต่างๆ เป็นต้น

2. การเตรียมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมโรคพืช จำนวน 300 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร TTC ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 523 บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 100 µl ของสารละลายเชื้อมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 523 บ่มที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.3 มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

3. การปลูกเชื้อ *R. solanacearum* บนพืชอาศัย โดยก่อนปลูกเชื้องดการให้น้ำพืชทดสอบเป็นเวลา 1 วัน ทำการปลูกพืชทดสอบโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น 1-2 เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง 1: 10(V/V) (~ 25 มิลลิลิตร/ต้น)

4. บันทึกผล ตรวจผลการทดลองทุกๆ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ค่าคะแนนความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 1-5 ตามอาการของพืช ดังนี้

1 = พืชปกติ (healthy plant)

2 = ใบเหี่ยว 1 ใบต่อต้น (one leaflet or leaf wilting)

3 = 1/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (1/3 of plant wilting)

4 = 2/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (2/3 of plant wilting)

5 = แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นหรือต้นตาย (whole plant wilting or dead)

ยืนยันการเกิดโรคเหี่ยวโดยการตรวจด้วย ELISA และ แยกเชื้อบนอาหาร TTC

5. ทดสอบชนิด Biovar นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ทดสอบพืชอาศัยเรียบร้อยแล้วมาทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิด เพื่อจัดจำแนก biovar ของแต่ละไอโซเลทเพื่อหาความสัมพันธ์ของ biovar กับการเกิดโรคบนพืชอาศัยของสายพันธุ์ประเทศไทยเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstoonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB (Luria &Bertani medium) (Sambrook et al., 1989) อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. การแยกสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ให้บริสุทธิ์

ใช้การแยกสกัดจีโนมิค ดีเอ็นเอ โดยตามวิธีของ Pitcher et al. (1989) ใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *R.solanacearum* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูปละลาย ใน 1 ml ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 µl ของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น Vortex เติมด้วย 500 µl ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 µl ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 µl ของสารผสม chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24/1 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC จำนวน 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 µl ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer, pH. 8.0 ปริมาณ 100 µl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260 และ A280 ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค rep-PCR

การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค rep PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ในการทดลองได้แก่ enterobacteria repetitive intergenic concensus (ERIC) และ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al.*, 1994) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv..*citri* 50 ng ผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoethanol,

10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 µM, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 50 pM และ ไพรเมอร์ BOX จำนวน 100 pM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Louws *et al.* (1994)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	53 (BOX)	1
	53 (ERIC)	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	65	8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 µl มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 µl จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 100ไอโซเลท คัดเลือกโคโลนีที่รุนแรงเพื่อใช้ในการทดสอบ ทำการปลูกพืชอาศัยของ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ อายุ 1 เดือน จากนั้นนำ *เชื้อ R. Solanacearum* ความเข้มข้น 108 cfu/ml ที่คัดเลือกไว้มาปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย ผลการทดสอบพบว่า พืชอาศัยทั้งหมดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 14-28 วัน แสดง ว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือทั้ง 100 ไอโซเลทจัดอยู่ใน Race 1

เอกสารอ้างอิง

Buddenhagen, I.W. (1986) Bacterial wilt revisited. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985* (Ed. by Persley, G.J.), pp. 126-143. *ACIAR Proceedings* **13**.

Buddenhagen, I.W.; Kelman, A. (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **2**, 203-230.

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L.; Kelman, A. (1962) Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 726.

Cook, D.R.; Sequeira, L. (1988) The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in taxonomy and diagnosis. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* No. 4, p. 4.

Cook, D.; Sequeira, L. (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 77-93. CAB International, Wallingford, UK.

Echandi, E. (1991) Bacterial wilt. In: *Compendium of tobacco diseases* (Ed. by Shew, H.D.; Lucas, G.B.), pp. 33-35. EPPO/CABI (1992) *Quarantine pests for Europe* (Ed. by Smith, I.M.; McNamara, D.G.; Scott, P.R.; Harris, K.M.). CAB International, Wallingford, UK.

French, E.R.; Sequeira, L. (1968) Bacterial wilt or moko of plantain in Peru. *Fitopatologia* **3**, 27-38.

Hartman, G.L.), pp. 95-112. CAB International, Wallingford, UK.

Hayward, A.C. (1994a) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 9-24. CAB International, Wallingford, UK.

Hayward, A.C. (1994b) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 123-135. CAB International, Wallingford, UK.