# การใช้เทคนิค RAPD ในการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)

# Use of Random Amplified Polymorphic DNA Marker for Characterization of Fusarium Wilt Pathogen of Tomato (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)

*มนัสวี สุริยวนากุล (Manatsawee Suriyawanakul)*[1*]
*วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (Weerasak Saksirirat)*[2]
*ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์ (Piyada Theerakulpisut)*[3]

## บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) จำนวน 15 ไอโซเลต ที่แยกได้ในประเทศไทย และเชื้อรา Fol มาตรฐาน จำนวน 4 ไอโซเลต จากประเทศเนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา นำเชื้อรา Fol ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการเกิดโรคกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา พบว่ามี 14 ไอโซเลต ที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ ส่วนอีก 5 ไอโซเลต ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และได้นำเชื้อรา Fol ทั้งหมดจำนวน 19 ไอโซเลต มาศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Fusarium* ชนิดอื่น ได้แก่ *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. solani และ Fusarium* sp. โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ Operon Kit C จำนวน 20 ชุด พบว่าการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ OPC-04 พบแถบ DNA ขนาดประมาณ 520 bp ซึ่งเป็นขนาดที่มีเฉพาะกับเชื้อรา Fol ในไอโซเลตที่เกิดโรคกับมะเขือเทศเท่านั้น และเมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยไพรเมอร์ OPC-08 จะพบชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดประมาณ 180 bp ในไอโซเลตที่เกิดโรคเท่านั้นและไพรเมอร์ทั้งสองนี้สามารถจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศออกจากเชื้อรา *Fusarium* ชนิดอื่น ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงการตรวจสอบเชื้อรา Fol ด้วยเทคนิค PCR

[1] *นักศึกษาปริญญาเอก ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, CAB-PERDO, สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สกอ.*
[3] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**Corresponding author, e-mail: ao_crop@hotmail.com*

# Abstract

Fifteen isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Fol) were collected in Thailand and 4 standard isolates from The Netherlands and The United States of America, were tested for pathogenicity using tomato seedling (Sida variety). Fourteen isolates of Fol caused Fusarium wilt symptoms on tomato plants but five isolates did not infect the host plant. The DNA of 19 isolates of Fol were subjected to random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to compare their DNA patterns to F*usarium* (*F.oxysporum* f.sp. *melonis, F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum, F.moniliforme, F.poae, F.solani and Fusarium* spp. Twenty primers (Operon Kit C 20 primers) were used based on the RAPD-PCR technique. The primer OPC-04 produced DNA fractions of about 520 base pairs (bp). This fraction was found only on isolates that caused fusarium wilt disease. When using primer OPC-08, a PCR product appeared with a size of 180 bp, which was seen only in the isolates causing fusarium wilt disease. However, there were no DNA fractions of 520 and 180 bp in other *Fusarium* spp. tested. This result provides characterization of *Fusarium* wilt pathogens by the PCR technique.


**คำสำคัญ:** โรคเหี่ยวเหลือง, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, RAPD
**Keywords:** Fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, RAPD

## บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากมะเขือเทศมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งวิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้มะเขือเทศยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยด้วย เนื่องจากมีเกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มีมากถึงประมาณ 37,500 ครอบครัว รวมทั้งมีบริษัทเมล็ดพันธุ์ที่ดำเนินกิจการประมาณ 70 บริษัท ซึ่งปริมาณการใช้เมล็ดพันธุ์ภายในประเทศคาดว่าจะมีมูลค่ามากกว่า 20,000 ล้านบาท/ปี และในปี 2548 มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์เป็นมูลค่า 1,153.4 ล้านบาท (วัชริน, 2548) ประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเป็นอย่างมาก มีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศมากในเขตจังหวัดหนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ และขอนแก่น โดยเป็นแหล่งผลิตมะเขือเทศผลสดสำหรับบริโภค ส่งโรงงานอุตสาหกรรม และเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย(เกียรติเกษตร, 2541) ในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกนั้นจะต้องมีใบรับรองปลอดโรคพืช (phytosanitary certificate) ที่ระบุการปลอดโรคบางชนิดทั้งในสภาพแปลงปลูกและโรคที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) ของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) นั้นเป็นโรคต้องห้ามโรคหนึ่งที่มีความสำคัญโดยเฉพาะเชื้อรา Fol race 3 มีความสำคัญต่อการปลูกและการผลิตเมล็ดพันธุ์ มะเขือเทศเพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก เพราะสามารถเข้าทำลายมะเขือเทศได้รุนแรงและอาจถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ได้ ทำให้ประเทศผู้นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศหลายประเทศ ระบุการปลอดเชื้อรา Fol race 3 จากประเทศผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ต้นทาง

เชื้อรา Fol เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างมากต่อมะเขือเทศทั่วโลก เชื้อราชนิดนี้มีแหล่งอาศัยทั่วไปในดิน สามารถเข้าทำลายต้นมะเขือเทศได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะให้ผลผลิต เนื่องจากเชื้อรา Fol เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน อีกทั้งยังสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเพื่อใช้ในการแพร่กระจายได้

ถึง 3 แบบ ได้แก่ microconidia, macroconidia และ chlamydospores (Agrios, 2005) จึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้ดีและยากในการป้องกันกำจัด อุณหภูมิในดินที่เหมาะสมในการแพร่กระจายของเชื้อคืออุณหภูมิระหว่าง 20-34 องศาเซลเซียส ซึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น จึงมักพบการระบาดของเชื้อรา Fol อยู่เสมอ ในต่างประเทศมีรายงานว่าพบเชื้อรา Fol จำนวน 3 race ด้วยกันคือ race 1, race 2 และ race 3 เชื้อรา Fol race 1 พบครั้งแรกเมื่อ ปี ค.ศ. 1886 ในรัฐ Arkansas ประเทศสหรัฐอเมริกา (Booth, 1971; Marlatt et al., 1996) สำหรับ Fol race 2 พบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1945 ในรัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา (Alexander and Tucker, 1945) ส่วน Fol race 3 พบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1978 ในประเทศออสเตรเลีย (Grattidge and O'Brien, 1982) ภายหลังพบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อรา Fol race 3 อย่างกว้างขวางเช่น ที่ Florida (Volin and Jones.,1982), California (Davis et al., 1988; Cai et al., 2003), Georgia (Chellemi et al., 1992), Arkansas, North Carolina (Marlatt et al., 1996), ประเทศเม็กซิโก (Valenzuela-Ureta et al., 1996), Tennessee (Bost, 2001) ต่อมาได้รายงานว่าพบเชื้อรา Fol race 3 ในประเทศบราซิล (Reis et al., 2005) ซึ่งการเกิด race ต่างๆ ของเชื้อรา Fol อาจเป็นผลมาจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ ส่งผลให้การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา Fol มีความสำคัญมากในปัจจุบัน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุเชื้อรา Fol ที่ผ่านมาใช้วิธีตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดีย (conidia) คลามิโดสปอร์ (chlamydospore) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคใน มะเขือเทศ (pathogenicity) เป็นต้น ปัจจุบันเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพเช่น การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction, PCR) มีความก้าวหน้ามากขึ้น และได้นำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium* spp. หลายชนิด เช่น *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. solani* รวมถึงเชื้อรา Fol นอกจากนี้ มนัสวี และคณะ (2548) Bunyatratchata et al. (2005) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol แต่ยังไม่ได้พัฒนาถึงการตรวจสอบเชื้อรา Fol ในทุก race จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการบ่งชี้เชื้อรา Fol ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ ออกจากเชื้อรา Fol ที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรค และจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา Fol จากเชื้อ *Fusarium* ชนิดอื่นๆ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบยืนยันเชื้อรา Fol ก่อนที่จะใช้ไพรเมอร์ในการจำแนก race ต่อไป

## วิธีการวิจัย

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) จำนวน 19 ไอโซเลต และเชื้อ *Fusarium* spp. อื่นที่นำมาศึกษาจำนวน 9 ไอโซเลต ได้มาจากแหล่งต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1.** แหล่งที่มาของเชื้อรา Fol และเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่นำมาศึกษา จำนวน 19 และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ

| ชนิดของเชื้อ/ไอโซเลต | ไอโซเลต | แหล่งที่มา |
|---|---|---|
| *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* | Fol 1, Fol 2, Fol 3N | ประเทศเนเธอร์แลนด์ |
| | Fol 3A | ประเทศสหรัฐอเมริกา |
| | KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6 | จ. ขอนแก่น |
| | KS | จ. กาฬสินธุ์ |
| | CM1, CM2, CM3 | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| | PP1 | กรมวิชาการเกษตร |
| | NK1, NK2 | จ. หนองคาย |
| | SN1, SN2 | จ. สกลนคร |
| *F.oxysporum* f.sp. *melonis* | Fom | จ. กาญจนบุรี |
| *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* | Foc | |
| *F.moniliforme* | *F. monoliforme* | สถาบันวิจัยและวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย |
| *F.poae* | *F. poae* | |
| *F.solani* | *F. solani* | |
| *Fusarium* spp. | Fu1 | จ. มุกดาหาร |
| | Fu5 | จ. มหาสารคาม |
| | Fu6 | จ. ขอนแก่น |
| | Fu13 | จ. สกลนคร |

## การทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคของเชื้อรา Fol

นำเชื้อรา Fol จำนวน 19 ไอโซเลต ได้แก่ Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, KS, PP1 NK1, NK2, SN1 และ SN2 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 4 $^{o}$C) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 106 สปอร์/มิลลิลิตร นำไปปลูกเชื้อกับต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 20 วัน โดยวิธีการตัดรากต้นกล้ามะเขือเทศออกประมาณ 1 เซนติเมตร จากปลายราก แล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ (root dip) เป็นเวลา 20 นาที โดยประยุกต์ตามวิธีการของ Marlatt et al.(1996) และ Bunyatratchata, et al. (2005) จากนั้นนำต้นกล้ามะเขือเทศไปปลูกในดินปลูกผสมวัสดุปลูก (พีทมอส) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อัตราส่วนดินปลูกต่อพีทมอสเท่ากับ 5:2 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว จำนวน 1 ต้น/กระถาง ไอโซเลตละ 12 กระถาง ตรวจสอบอาการของต้นกล้ามะเขือเทศทุกวัน เป็นเวลา 20 วันหลังจากปลูกเชื้อ

## การสกัด Genomic DNA ของเชื้อรา

การสกัด DNA ของเชื้อราทั้งหมด 28 ไอโซเลต ที่นำมาศึกษา ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองเอา

ส่วนที่เป็นเส้นใยล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเส้นใยประมาณ 0.5-1.0 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วเติมสารละลาย extraction buffer [2% CTAB (hexadecylammonium bromide), 100 mM Tris-base, 20 mM EDTA, 1.42 mM NaCl, 1% PVP-40, pH 8.0] ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ 2-mercaptonethanol จำนวน 3 ไมโครลิตร ดูดใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที โดยพลิกหลอดกลับไปมาเป็นครั้งคราว เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol, (24:1, v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ไปใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็นจัด ปริมาตร 0.7 เท่า พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เพื่อให้ DNA ตกตะกอน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วยส่วนผสมระหว่างเอธานอล ความเข้มข้น 76 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (mM) [76% ethanol :10 mM ammonium acetate, 1:1] ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือแต่เฉพาะตะกอน DNA ที่ก้นหลอด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE buffer [10 mM Tris-base pH 8.0, 1 mM EDTA] ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและกำจัด RNA ด้วยเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

## การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของเชื้อราทั้งหมด 28 ไอโซเลต ที่นำมาศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ตามวิธีการของ มนัสวี และคณะ (2548) โดยใช้ไพรเมอร์ OPC จำนวน 20 ชุด (OPC 01- OPC 20) ในปฏิกิริยา PCR reaction 25 ประกอบไปด้วย *Taq* polymerase (Promega) (5 unit/μl) จำนวน 1ไมโครลิตร, 10 X *Taq* buffer 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs (0.25 mM) จำนวน 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (100 ρMol/μl) จำนวน 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 mM) จำนวน 2 ไมโครลิตร และ genomic DNA (100 ng/μl) จำนวน 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle (Biometra® รุ่น Tpersonal) โดยใช้ช่วงอุณหภูมิ ดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denatured อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ, ขั้นที่ 2 denatured อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, annealing อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 1 นาที, extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ ขั้นที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจวิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA โดยการนำ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร นำมาแยกขนาดบน 2% agarose gel electrophoresis ภายใต้สภาพ 0.5 X TBE [1X TBE: 89 mM Tris-base, 89 boric acid และ 2 mM EDTA] ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วจึงนำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) นาน 10 นาที นำไปล้าง EtBr โดยการแช่ในน้ำสะอาด 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปตรวจสอบ DNA ด้วยเครื่อง Gel documentation (GENE GENIUS bio imaging system)

นำ DNA fingerprint ที่ได้มาสร้าง dendrogram วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี unweighted pair group method of using arithmatic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.0

## ผลการวิจัย

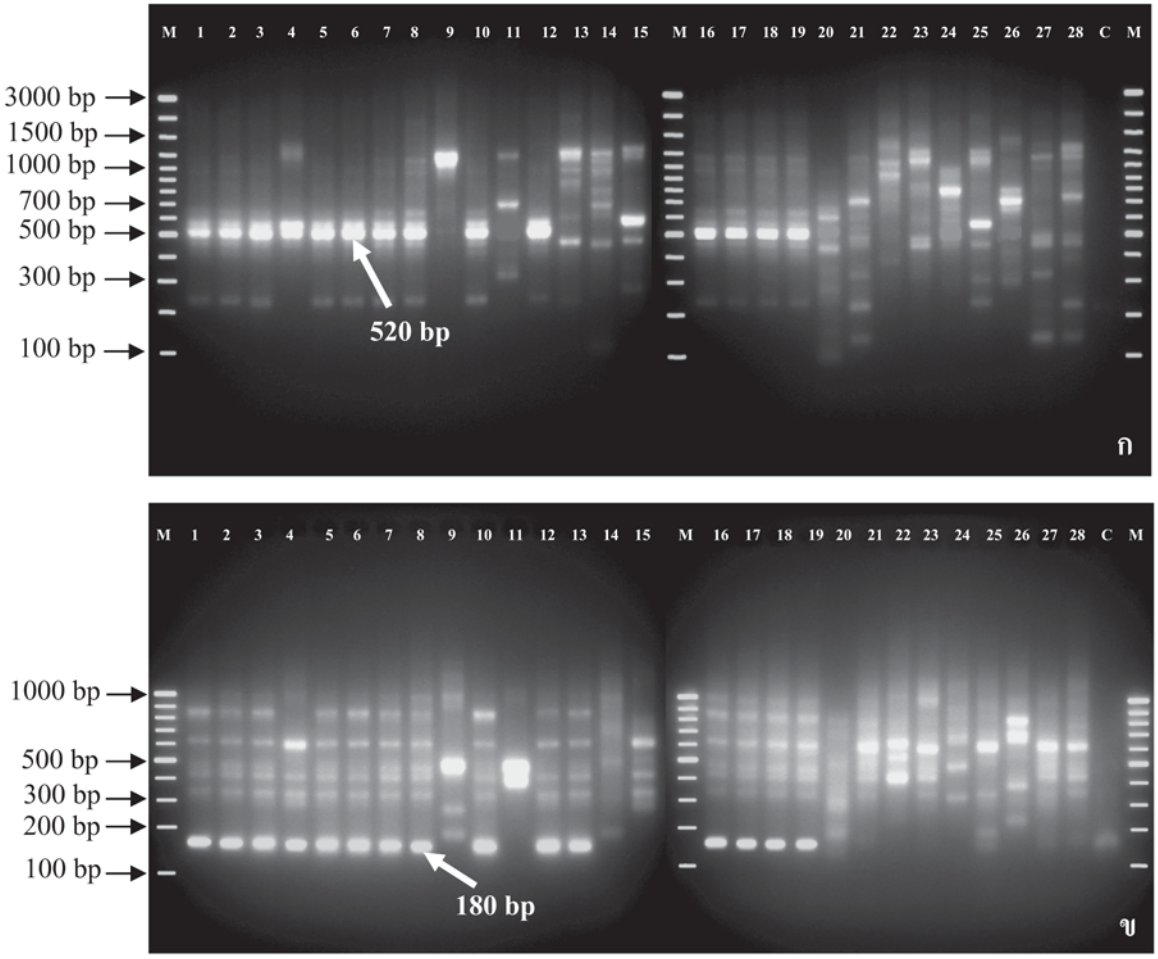
### ความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคของเชื้อรา Fol

เชื้อรา Fol 19 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบ 14 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK6, CM2, NK1, NK2, SN1 และ SN2 ที่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา และที่เหลืออีก 5 ไอโซเลต คือ KK5, CM1, CM3, KS และ PP1 ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา (รูปที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ต้นมะเขือเทศที่ไม่ปลูกเชื้อรา Fol)

**รูปที่ 1.** อาการเหี่ยวเหลืองของต้นมะเขือเทศเมื่อได้รับการปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ไอโซเลต Fol 1, Fol 2, Fol 3N, KK1, KK2, KK6, CM1, CM2 และ CM3 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อรา Fol)

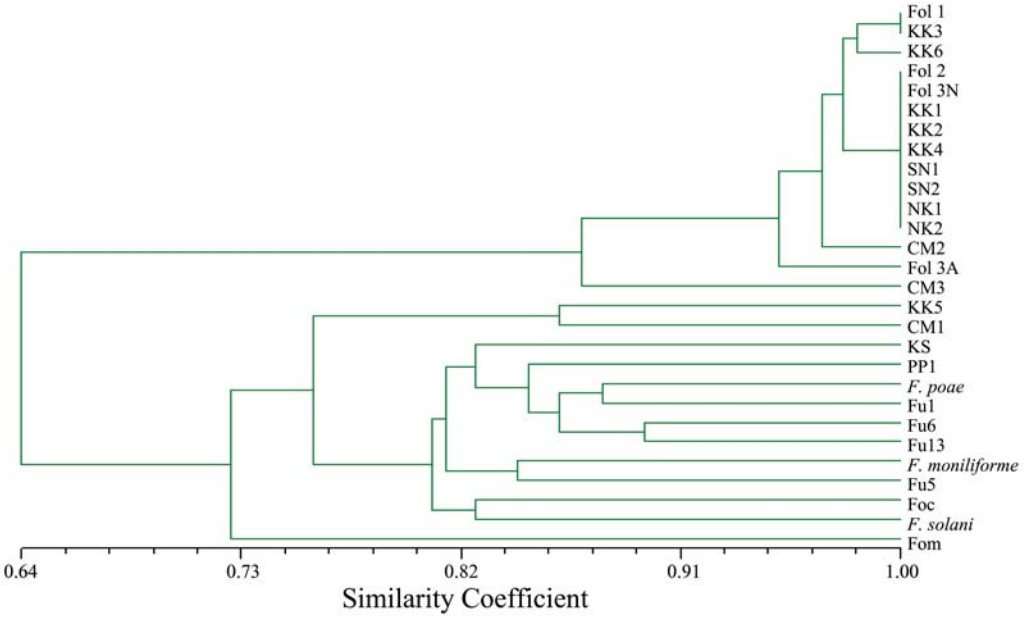
**การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของเชื้อรา Fol ด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยไพรเมอร์ OPC-04 พบแถบ DNA ขนาดประมาณ 520 bp (รูปที่ 2ก) ซึ่งเป็นขนาดที่มีเฉพาะในไอโซเลตที่เกิดโรคกับมะเขือเทศเท่านั้น และเมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยไพรเมอร์ OPC-08 จะพบชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดประมาณ 180 bp (รูปที่ 2ข) ในไอโซเลตที่เกิดโรค และไอโซเลต CM3 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ไม่ทำให้เกิดเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศพันธุ์สีดา แต่ไอโซเลตนี้เป็นไอโซเลตที่เคยทำให้เกิดโรคดังกล่าวมาก่อน




**รูปที่ 2.** รูปแบบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) และเชื้อ *Fusarium* sp. จากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 (ก) และ OPC-08 (ข) โดย lane M = DNA marker (Permentas, O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1-29 = เชื้อราไอโซเลต Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, KS, PP1, NK1, NK2, SN1, SN2, F. *oxysporum f.sp. melonis*, *F. oxysporum f.sp. cucumerinum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. solani*, Fu1, Fu5, Fu6 และ Fu13 ตามลำดับ และ lane C = Contorl (หลอด PCR ที่ไม่ได้ใส่ DNA ของเชื้อรา)

เมื่อนำ DNA fingerprints ที่ได้จากไพรเมอร์ OPC 01 - OPC 20 มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี unweighted pair group method of using arithmatic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.0 พบว่าที่ค่า similarity coefficient 0.91 (91 %) แบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราที่นำมาวิเคราะห์ออกเป็น 15 กลุ่ม (รูปที่ 3) คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KKK3, KK4, KK6, CM2, SN1, SN2, NK1 และ NK2 ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อรา Fol สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต CM3 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต KK5 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต CM 1 กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลต KS กลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลต PP1 กลุ่มที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลต *F. poae* กลุ่มที่ 8 ได้แก่ ไอโซเลต Fu1 กลุ่มที่ 9 ได้แก่ ไอโซเลต Fu6 กลุ่มที่ 10 ได้แก่ ไอโซเลต Fu13 กลุ่มที่ 11 ได้แก่ ไอโซเลต *F. moniliforme* กลุ่มที่ 12 ได้แก่ ไอโซเลต Fu5 กลุ่มที่ 13 ได้แก่ ไอโซเลต Foc กลุ่มที่ 14 ได้แก่ ไอโซเลต *F. solani* และกลุ่มที่ 15 ได้แก่ ไอโซเลต Fom ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศ




**รูปที่ 3.** Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) จำนวน 19 ไอโซเลต ได้แก่ Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, KS, PP1 NK1, NK2, SN1 และ SN2 และเชื้อ *Fusaruim* spp. จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ *F. oxysporum* f.sp. *melonis, F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum, F. moniliforme, F. poae, F. solani,* Fu1, Fu5, Fu6 และ Fu13 วิเคราะห์จาก DNA fingerprints โดยใช้ไพรเมอร์ OPC 01-OPC 20

# สรุปและวิจารณ์

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค (pathogenic test) ของเชื้อรา Fol โดยการนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา Fol ปริมาณสปอร์เท่ากับ $10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร ไปปลูกเชื้อกับต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 20 วัน โดยวิธีการตัดรากต้นกล้ามะเขือเทศออกประมาณ 1 เซนติเมตร จากปลายรากแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ (root dip) เป็นเวลานาน 20 นาที นำต้นมะเขือเทศไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง ไอโซเลตละ 12 กระถาง พบว่าเชื้อรา Fol ที่นำมาทดสอบมี 14 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต Fol 1, Fol 2, Fol 3N, Fol 3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK6, CM2, SN1, SN2, NK1 และ NK2 ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา และที่เหลืออีก 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต KK5, CM1, CM3, KS และ PP1 ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control treatment) ผลการทดลองในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Bunyatratchata et al. (2005) เชื้อรา Fol ไอโซเลต CM3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่นั้น เคยมีรายงานว่าทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศ Bunyatratchata et al. (2005) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าไอโซเลต CM3 ไม่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศและยืนยันในการวิจัยครั้งนี้คือ ไอโซเลต CM3 ไม่ทำให้เกิด อาจเพราะสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไป

จากการทดลองบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici) ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 พบว่าเชื้อรา Fol ไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศมี pattern DNA แตกต่างจาก ไอโซเลตที่ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศอย่างชัดเจน โดยได้ PCR product ขนาด 520 bp ที่พบเฉพาะในไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรค โดยไม่พบในไอโซเลตอื่นที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ ซึ่งก่อนหน้า มนัสวี และคณะ (2548) ได้ศึกษาการตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol โดยใช้เทคนิค PCR พบว่ามีไพรเมอร์ OPE-03 และ OPH-20 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา Fol race 3 ออกจาก race 1 และ race 2 ได้อย่างชัดเจน โดยมีขนาดของ PCR product 350 bp และ 500 bp ตามลำดับ ที่พบเฉพาะในเชื้อรา Fol race 1 และ race 2 เท่านั้น อย่างไรก็ดีการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ไพรเมอร์ OPE-04 ทำให้ได้ PCR product ขนาด 520 bp นี้สามารถนำไปพัฒนาเป็น Sequence characterized amplified region (SCAR-PCR) หรือ ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) สำหรับตรวจสอบเชื้อรา Fol ที่สามารถทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศได้ ส่วนไพรเมอร์ OPC-08 นั้นพบ PCR product ขนาด 180 bp เฉพาะในไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศ และไอโซเลต CM3 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ มี pattern DNA ใกล้เคียงกับกลุ่มของไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อรา Fol ไอโซเลต CM3 อาจจะเคยเป็นไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ แต่เกิดการสูญเสียความสามารถในการทำให้พืชอาศัยเกิดโรค หรืออาจเป็นเพราะว่าไอโซเลต CM3 อาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม มาจากกลุ่มของไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศในแง่ของการสูญเสียความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคได้ ซึ่งการสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา Fol นั้น อาจเกิดจากการถ่ายเชื้อหลายครั้งโดยไม่ได้ถ่ายเชื้อด้วยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยว (Windels, 1992) จึงทำให้มี pattern DNA ใกล้เคียงกับกลุ่มของไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ และเมื่อนำ DNA fingerprints ที่ได้จากเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPC 01- OPC 20 มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี unweighted pair group method of using arithmatic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.0 พบว่า dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา ที่ค่า similarity coefficient 0.91 (91%) สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา Fol สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ ออกจากไอโซเลตอื่นๆ ที่ไม่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศได้อย่างชัดเจน

ดังนั้น เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPC-04 และ OPC-08 จึงสามารถใช้ตรวจและจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) ออกจากเชื้อรา *Fusarium* spp.ชนิดอื่นๆ ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ได้อย่างรวดเร็วชัดเจน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคอื่นๆ ในการตรวจสอบเชื้อรา Fol ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน, ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์. 2541. **มะเขือเทศ.** ฐานเกษตรกรรม. กรุงเทพฯ.

วัชริน มีรอด. 2548. **สหภาพยุโรปยักษ์ใหญ่แห่งวงการเมล็ดพันธุ์.** ค้นเมื่อ 28 พฤษภาคม 2551, จากhttp://www.biotec.or.th/policy/home/european.asp

มนัสวี ฉายผาด, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, และ พรเทพ ถนนแก้ว. 2548. การพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อบ่งชี้ race ของเชื้อ Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. **แก่นเกษตร** 33 (2): 108-123.

Agrios, G. N. 2005. **Plant pathology** 5th ed. Academic Press, Inc., New York.

Alexander, L. J. and Tucker, C. M. 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. **J. Agric. Res.** 70: 303 - 313.

Booth, C. 1971. **The genus Fusarium.** Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Bost, S. C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Tennessee. **Plant Disease** 85: 802.

Bunyatratchata, W., Saksirirat, W., Sirithorn, P., and Teerakupisut, P. 2005. Race identification of fusarium with pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. **Khon Kaen Agriculture Journal** 33: 95 - 107.

Cai, G., Gale, L. R., Schneider, R. W., Kistler, H. C., Davis. R. M., Elias, K. S., and Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at a single site in California. **Phytopathology** 93: 1014- 1022.

Chellemi, D. O., Dankers, H. A., and Crosier, B. 1992. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in northwest Florida and Georgia. **Plant Disease** 76: 861.

Davis, R. M., Kimble, K. A., and Farrar, J. J. 1988. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. **Plant Disease** 72: 453.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19:11 - 15.

Grattidge, R. and ÕBrien, R. G. 1982. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** 66 :165 - 166.

Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P., and Cooper, P. E. 1996. Two genetically distinct population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 in the United States. **Plant Disease** 80:1336 - 1342.

Reis, A., Costa, H., Boiteux, L.S. and Lopes, C.A. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 30:426-428.

Valenzuela-Ureta, J. G., Lawn, D. A., Heisey, R. F., and Zamudio-Guzman, V. 1996. First report of fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. **Plant Disease** 80: 105.

Volin, R. B. and Jones, J. P. 1982. A new race of fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.** 95: 268 - 270.

Windels, C.E. 1992. Fusarium. In: Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi. L.L. Singleton, I.D. Mihail and C.M. Rush (Eds.) APS Press, St. Paul, Minnesota.