การทดสอบชุดไพรเมอร์สำหรับบ่งชี้ race ของเชื้อรา *oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Primer set test for race identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

มนัสวี สุริยวนากุล (Manatsawee Suriyawanakul)[1*]
วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (Weerasak Saksirirat)[2]

บทคัดย่อ

การนำชุดไพรเมอร์ (uni, sp13, sp23 และ sprl) ที่มีรายงานว่าสามารถแยก race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) ได้มาทดสอบการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 11 ไอโซเลต (KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, KS, CM1, CM2, CM3 และ PP1) และไอโซเลตมาตรฐานที่ทราบ race แล้วจำนวน 4 ไอโซเลต (Fol 1, Fol 2, Fol 3N และ Fol 3A) ด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ uni สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ทุก race และทุกไอโซเลตโดยมีขนาดของ DNA ประมาณ 670-672 bp สำหรับไพรเมอร์ sp13 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ทุก race เช่นเดียวกัน แต่ละ race มีขนาดของ DNA ประมาณ 445 bp และไพรเมอร์ sp23 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้เฉพาะ race 3 (ไอโซเลต Fol 3A) เท่านั้น DNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 518 bp ส่วนไพรเมอร์ sprl นั้น ใช้สำหรับทดสอบเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl) ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อรา Fol ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าชุดไพรเมอร์ uni, sp13, sp23 และ sprl ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง race ของเชื้อรา Fol ที่แยกได้จากประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิธีการและพัฒนาเทคนิคชีวโมเลกุลสำหรับแยก race ของเชื้อรา Fol อันจะเป็นประโยชน์ในการตรวจรับรองการปลอดโรคในกระบวนการออกใบปลอดโรคพืชต่อไป

Abstract

The primer set composed of uni, sp13, sp23 and sprl, which has been reported to classify the race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) was evaluated using the PCR technique on eleven Fol isolates collected in Thailand; KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, KS, CM1, CM2, CM3 and PP1 and standard races; Fol 1, Fol 2, Fol 3N and Fol 3A. The results reveal that the primer uni gave rise to a PCR

[1]*นักศึกษาปริญญาเอก ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[*]*corresponding author, e-mail: ao_crop@hotmail.com*

05 162 4/2/09, 9:49 AM
Black

product band of 670-672 bp in all tested Fol isolates. A DNA band of 445 bp was detected in all isolates of Fol when primer sp13 was used. However, primer sp 23 showed a DNA band (approximately 518 bp) only in race 3 (Fol 3A). The primer sprl did not express any DNA band in all Fol isolates. This work suggests that the primer set could not classify races of Fol isolated in Thailand. A molecular method according to DNA technology should be developed for Fol race classification and detection for supporting phyto-sanitary programs in Thailand.

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

บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากมะเขือเทศมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งวิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้มะเขือเทศยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยด้วย เนื่องจากมีเกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มากถึงประมาณ 37,500 ครอบครัว รวมทั้งมีบริษัทเมล็ดพันธุ์ที่ดำเนินกิจการประมาณ 70 บริษัท ซึ่งปริมาณการใช้เมล็ดพันธุ์ภายในประเทศคาดว่าจะมีมูลค่ามากกว่า 20,000 ล้านบาท/ปี และในปี 2548 มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์เป็นมูลค่า 1,153.4 ล้านบาท (วัชริน, 2548) ประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ มีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศมากในเขตจังหวัดหนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ และขอนแก่น โดยเป็นแหล่งผลิตมะเขือเทศผลสดสำหรับบริโภค ส่งโรงงานอุตสาหกรรม และเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์มากที่สุดในประเทศไทย (เกียรติเกษตร, 2541) ทั้งนี้พบว่าเกษตรกรมีทั้งประสบการณ์และความชำนาญในการผลิต รวมทั้งมีโครงสร้างพื้นฐานที่เหมาะสม เช่น งานวิจัยพื้นฐาน ระบบการคมนาคม การขนส่งทั้งทางบก น้ำและอากาศ ถือเป็นความได้เปรียบของประเทศไทยในการก้าวสู่การเป็นผู้พัฒนาเมล็ดพันธุ์และส่งออกไปยังตลาดโลก ในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกนั้นจะต้องมีใบรับรองปลอดโรคพืช (phytosanitary certificate) ที่ระบุการปลอดโรคบางชนิดทั้งในสภาพแปลงปลูกและโรคที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) ของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) นั้นเป็นโรคต้องห้ามโรคหนึ่งที่มีความสำคัญโดยเฉพาะเชื้อรา Fol race 3 นั้นมีความสำคัญต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อการส่งออกมาก เพราะสามารถเข้าทำลายมะเขือเทศได้รุนแรงและอาจถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ได้ทำให้ประเทศผู้นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศหลายประเทศ ระบุการปลอดเชื้อรา Fol race 3 จากประเทศผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ต้นทาง

ในต่างประเทศมีรายงานว่าเชื้อรา Fol แบ่งออกเป็น 3 race คือ race 1, race 2 และ race 3 (Cornelissen, 2001) เชื้อรา Fol race 1 พบครั้งแรกเมื่อปี 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, 1982) ภายหลังพบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อรา Fol race 3 อย่างกว้างขวางเช่น ที่ California (Davis et al., 1988; Cai et al., 2003), Florida (Volin et al.,1982), Georgia (Chellemi et al., 1992), Arkansas และ North Carolina (Marlatt et al., 1996) Tennessee (Bost, 2001) และต่อมา Valenzuela-Ureta et al. (1996) ได้รายงาน

ว่าพบเชื้อรา Fol race 3 ในประเทศเม็กซิโก ซึ่งการเกิด race ต่างๆ ของเชื้อรา Fol อาจเป็นผลมาจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากเชื้อรา Fol มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา Fol อาจมาจากกระบวนการ mutation และ parasexual cycle หรืออาจมาจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดย race ที่มีความสำคัญคือ race 3 เนื่องจากทำลายมะเขือเทศได้อย่างรุนแรง (Marlatt et al., 1996) นอกจากนี้เชื้อรา Fol race 3 ยังเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญในแปลงผลิตมะเขือเทศเพื่อบริโภคผลสด และแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อการส่งออก ซึ่งประเทศผู้นำเข้าเมล็ดพันธุ์นั้นต้องการให้แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปลอดโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา Fol race 3 โดยระบุเป็นเงื่อนไขของการออกใบรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกเมล็ดพันธุ์ ส่งผลให้การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา Fol มีความสำคัญมากในปัจจุบัน ในการตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol นั้นใช้ชุดพืชอาศัยตรวจสอบ (differential host) โดยสังเกตจากปฏิกิริยาการตอบสนองในรูปแบบของการเข้าทำลายพืชอาศัยนั้นได้ (susceptible) หรือไม่ได้ (resistant) (Bunyatratchata et al., 2005) ซึ่งวิธีนี้สิ้นเปลืองเวลามาก ในปัจจุบันมีรายงานการใช้ชุดไพรเมอร์ (primer set) ในการจัดจำแนก race ของเชื้อ Fol นี้ได้ในประเทศญี่ปุ่น (Hirano and Arie, 2006) ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการนำชุดไพรเมอร์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับ เชื้อรา Fol ที่พบในประเทศไทย เพื่อบ่งชี้ race ของเชื้อรา Fol ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ เมล็ดพันธุ์โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อออกใบรับรองปลอดโรคพืชเป้าหมายและการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศของประเทศไทย

วิธีการวิจัย

1. การรวบรวมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)

ทำการรวบรวมเชื้อรา Fol ซึ่งได้มีการจัดจำแนก race แล้วด้วยชุดพันธุ์มะเขือเทศทดสอบโดย Bunyatratchata et al. (2005) จำนวน 15 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) ได้แก่ไอโซเลต Fol1 และ CM2 คือ race 1, ไอโซเลต Fol2, KK1, KK2, KK3, KK4 และ KK6 คือ race 2 ไอโซเลต Fol3A คือ race 3 จากอเมริกา, ไอโซเลต Fol13N คือ race 3 จากเนเธอร์แลนด์ ส่วนไอโซเลต KS, KK5, CM1, CM3 และ PP1 เป็นไอโซเลตที่ไม่ก่อโรคในมะเขือเทศ

2. การเตรียมไพรเมอร์

สังเคราะห์ไพรเมอร์จากการรายงานของ Hirano and Arie (2006) ว่าสามารถแยก race ของเชื้อรา Fol ได้ (ตารางที่ 2) จำนวน 4 ชุด คือ uni (Forward 5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3', Reverse 5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'), sp13 (Forward 5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3', Reverse 5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'), sp23 (Forward 5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3', Reverse 5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3') และ sprl (Forward 5'-GATGGTGGAACGGTATGACC-3', Reverse 5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3')

3. การสกัด DNA

สกัด DNA ของเชื้อรา Fol จำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle และ Doyle (1987) โดยการเลี้ยงเชื้อรา Fol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองเอาส่วนที่เป็นเส้นใย ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำเส้นใยประมาณ 0.5-1.0 g มาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย

extraction buffer [2% w/v CTAB(hexadecylammonium bromide), 100 mM Tris-base, 20 mM EDTA, 1.42 mM NaCl, 1% PVP-40, pH 8.0] ปริมาตร 700 ml และ 2-mercaptonethanol จำนวน 3 µl ดูดใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที พลิกหลอดกลับไปมาเป็นครั้งคราว เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol, (24:1, v/v) ปริมาตร 500 µl พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 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 ด้วยส่วนผสมระหว่าง ethanol ความเข้มข้น 76 เปอร์เซ็นต์ และ ammonium acetate ความเข้มข้น 10 mM [76% ethanol :10 mM ammonium acetate, 1:1] ปริมาตร 500 µl พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือแต่เฉพาะตะกอน DNA ที่ก้นหลอด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศประมาณ 30-60 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE buffer [10 mM Tris-base pH 8.0, 10 mM EDTA] ปริมาตร 40 µl และกำจัด RNA ด้วยเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

4. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ทั้ง 15 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวน 4 ชุด PCR reaction ประกอบไปด้วย *Taq polymerase* (Promega) (5 unit/m1) จำนวน 0.4 µl, 10 X *Taq* buffer 2.5 µl, dNTPs mix (0.25 mM each) จำนวน 2 µl, ไพรเมอร์ (100 rM/ml) จำนวน 1 µl, MgCl2 (25 mM) จำนวน 0.75 µl และ genomic DNA (100 ng/µl) จำนวน 2 µl ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle (Biometra® รุ่น Tpersonal) โดยใช้ช่วงอุณหภูมิดังนี้ ขั้นที่ 1 denatured อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 7 นาทีจำนวน 1 รอบ, ขั้นที่ 2 denatured อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, annealing อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1.30 นาที, extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ เมื่อสิ้นสุดตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำเอา PCR product ไปใช้

การตรวจวิเคราะห์แถบ DNA

ตรวจวิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA โดยการนำ PCR product ปริมาตร 5 µl ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 µl 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 V เป็นเวลา 50 นาที นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) นาน 10 นาที ล้างออกโดยการแช่ในน้ำสะอาด 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปตรวจสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเครื่อง Gel documentation (GENE GENIUS bio imaging system)

ตารางที่ 1. แหล่งที่มาของเชื้อรา *Fusarirm oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)

ชนิดของเชื้อ	ไอโซเลต	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	Race[1]
Fusarium oxysporum	Fol 1	Fol004		race 1
f. sp. *lycopersici*	Fol 2	Fol007	The Netherlands	race 2
	Fol 3N	Fol029		race 3
	Fol 3A	Fol030	The United States of America	race 3
	KK1			race 2
	KK2		ภาวิชาโรคพืช	race 2
	KK3		คณะเกษตรศาสตร์	race 2
	KK4		มหาวิทยาลัยขอนแก่น	race 2
	KK5			Non pathogenic
	KK6			Race 2
	KS		จ. กาฬสินธุ์	Non pathogenic
	CM1			Non pathogenic
	CM2		มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	race 1
	CM3			Non pathogenic
	PP1		กรมวิชาการเกษตร	Non pathogenic

[1]บ่งชี้ race โดยใช้ชุดพืชอาศัยตรวจสอบมาตรฐาน (Standard differential hots)

ตารางที่ 2. ชิ้นส่วน DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ uni, sp13, sp23 และ sprl

	Primer set							
	uni		sp13		Sp23		sprl	
	ต่างประเทศ[1]	ไทย	ต่างประเทศ[1]	ไทย	ต่างประเทศ[1]	ไทย	ต่างประเทศ[1]	ไทย
Fol race 1	+	+	+	+	-	-	-	-
Fol race 2	+	+	-	+	+	-	-	-
Fol race 3	+	+	+	+	+	+	-	-
Forl	-	*	-	*	-	*	+	*

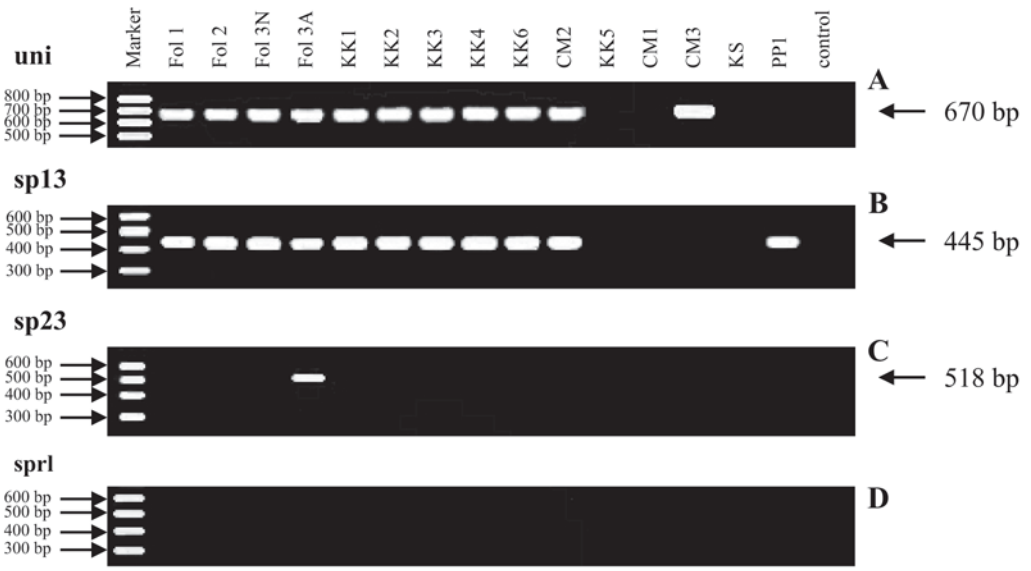
+ : ปรากฏแถบ DNA

- : ไม่ปรากฏแถบ DNA

[1] : รายงานโดย Hirano and Arie (2006)

* : ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่ได้ทดสอบกับเชื้อ Forl

05 166 4/2/09, 9:50 AM
Black



ภาพที่ 1. รูปแบบ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) จำนวน 15 ไอโซเลตจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ uni (A), sp13 (B), sp23 (C) และ sprl (D) ตามลำดับ

ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการนำไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถแยก race ของเชื้อรา Fol ได้ในต่างประเทศ มาทดสอบกับเชื้อรา Fol ที่พบในประเทศไทย จำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, KS, CM1, CM2, CM3 และ PP1 เปรียบเทียบกับเชื้อรา Fol race มาตรฐาน ไอโซเลต Fol 1 (race 1), Fol 2 (race 2), Fol 3N (race 3) จากเนเธอร์แลนด์ และ Fol 3A (race 3) จากอเมริกา ในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ uni สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ทุก race แต่ละ race มี DNA ขนาดประมาณ 670 bp ซึ่งไม่พบชิ้นส่วน DNA นี้ในไอโซเลตที่ไม่ทำให้เกิดโรค (KK5, CM1, KS และ PP1) (ภาพที่ 1A) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Hirano and Arie (2006) สำหรับไพรเมอร์ sp13 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ทุก race เช่นเดียวกัน และยังสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ในไอโซเลต PP1 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ โดยแต่ละโอโซเลตมี DNA ขนาดประมาณ 445 bp (ภาพที่ 1B) แตกต่างจากรายงานที่มีในต่างประเทศว่าการใช้ไพรเมอร์ sp13 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้เฉพาะ race 1 และ race 3 เท่านั้นแต่ขนาด DNA ที่ได้เท่ากัน คือ 445 bp ส่วนการใช้ ไพรเมอร์ sp23 นั้นสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้เฉพาะไอโซเลต Fol 3A ซึ่งเป็น race 3 เท่านั้น ชิ้นส่วน DNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 518 bp (ภาพที่ 1C) ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Hirano and Arie (2006) ที่พบว่าการใช้ไพรเมอร์ sp23 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ในเชื้อรา Fol race 2 และ race 3 ส่วนไพรเมอร์ sprl นั้น เป็นไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl) ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อรา Fol ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา Fol ได้ จากเหตุผลนี้จึงสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรา Fol ที่ศึกษาและรายงานโดย Bunyatratchata และคณะ (2005) นั้น เป็นเชื้อรา Fol นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานในประเทศไทยถึงการพบเชื้อรา Forl

05 167 4/2/09, 9:50 AM
Black

ในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ เชื้อรา Forl นั้นเป็นสาเหตุของโรค crown root rot ในมะเขือเทศ เป็นโรคที่เกิดกับระบบราก ซึ่งมีความแตกต่างจากโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) อย่างไรก็ตามทั้งสองโรคนี้มีเชื้อราสาเหตุที่อยู่ในสกุล (genus) และชนิด (species) เดียวกัน แต่แตกต่างกันที่ forma specialis (f.sp.) เท่านั้น จึงเป็นสาเหตุให้การวินิจฉัยด้วยลักษณะอาการและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 โรคนี้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดั้งนั้นการที่ Hirano and Arie (2006) ได้ศึกษาถึงการใช้ไพรเมอร์ sprl เพื่อนำมาประกอบการตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol จึงเป็นการยืนยันการบ่งชี้เชื้อรา Forl ออกจากเชื้อรา Fol ด้วยเทคนิค PCR ส่วนไพรเมอร์ uni นั้นสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของเชื้อรา Fol ทุกไอโซเลต และทุก race ให้ชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดประมาณ 670 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับที่ Hirano and Arie (2006) ได้รายงานไว้จึงถือได้ว่า uni เป็นไพรเมอร์ที่มีประโยชน์มากในการใช้บ่งชี้เชื้อรา Fol ด้วยเทคนิค PCR และชิ้นส่วน DNA ที่ได้อาจมีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา Fol

สำหรับการใช้ไพรเมอร์ sp13 และ sp23 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของเชื้อรา Fol ไอโซเลตที่พบในประเทศไทยได้ผลที่แตกต่างไปจากการศึกษาของ Hirano and Arie (2006) ในประเทศญี่ปุ่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้พืชอาศัยตรวจสอบมาตรฐาน (Standard differential host) ที่มีพันธุ์มะเขือเทศมาตรฐานแตกต่างกัน จากชุดการใช้ไพรเมอร์ที่มีรายงานในต่างประเทศ เพื่อตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol โดยเทคนิค PCR นี้ยังมีข้อจำกัดอยู่มากและสำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้น้อยมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิธีการตรวจสอบและพัฒนาเทคนิคสำหรับแยก race ของเชื้อรา Fol ต่อไปอย่างยิ่ง เพื่อเป็นประโยชน์ในระบบการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์เพื่อออกใบรับรองปลอดโรคพืชเป้าหมายและการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาชุดไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบ race ของเชื้อรา Fol ให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น หรือพัฒนาเทคนิคทางด้าน DNA เทคนิคอื่นๆ เช่น DNA probe มาตรวจสอบเป็นต้น อันจะนำไปสู่เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ให้กับประเทศต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์ พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น 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

Alexander, L. J. and Tucker, C. M. 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarirum* 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.

Cornelissen, B. J. C. 2001. **Molecular characterization of avirulence gene 1 from Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici and the corresponding resistance gene I-1 from tomato *(Lycopersicon esculentum)***. Retrieved November 10, 2003, from http://www.stw.nl/projecten/A/abi3754.html.

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 O'Brien, R. G. 1982. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** 66 :165 - 166.

Hirano, Y. and Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and race of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **J. Gen. Plant Pathol.** 72: 273-283.

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.

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.