ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก

DNA Fingerprinting of *Phytophthora capsici*, Causal Agent of Chilli Pepper Blight

ศรีสุข พูนผลกุล[1] ศิริพงษ์ คุ้มภัย[1] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[2]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกเพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในแต่ละแหล่งปลูกและกำหนดขอบเขตของศัตรูพืชกักกัน ดำเนินการเก็บไอโซเลทของเชื้อราจำนวน 15 ไอโซเลท จากแหล่งปลูกพริกของจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย สกลนคร เพชรบูรณ์และหนองคาย ระหว่างปี 2550-2551 การศึกษาในห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร ปี 2552 โดยการใช้ RAPD primers และ microsattlelite primers 260 สาย เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P.capsici* และเชื้อราเปรียบเทียบ (*P. palmivora* , *Pythium aphanidermatum*) ผลของการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อราพบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ primer 15 สาย ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ การจำแนกกลุ่มของแถบดีเอ็นเอ ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท 95 เปอร์เซ็นต์ *P. capsici* จากหนองคาย เหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* ทั้ง 3 กลุ่ม 30 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-01-01-10-50

คำนำ

เชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกเป็นเชื้อราหนึ่งที่ทำความเสียหายต่อการปลูกพริกในประเทศไทย (ศรีสุข, 2548) มีรายงานความเสียหายของพริกต่อโรคนี้ในประเทศจีน เกาหลี และอินเดียซึ่งเป็นแหล่งผลิตพริกที่สำคัญ (CABI,2003) เชื้อราสามารถติดไปกับผลพริก ลำต้น ใบ และรากของพืชอาศัย และถูกจัดว่าเป็นเชื้อรากักกันพืช มีการศึกษาจำแนกสายพันธุ์ (physiological race)โดยการใช้พืชอาศัย แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทำให้เกิดโรคและพืชอาศัย
(Polach and Webster,1972)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 84 ไอโซเลท ด้วยการใช้ isozyme พบว่าแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ พืชตระกูลแตง พริกไทย และโกโก้ กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพืชเขตร้อน ได้แก่ พริกไทย มะละกอ มะคาดาเมียและยางพารา และเชื้อราจากรัฐฮาวายในสหรัฐอเมริกา กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อราที่แยกจากโกโก้ของประเทศบราซิล (Oudemans and Coffey, 1991) การศึกษาเชื้อรา *P. capsici* ที่แยกได้จากพริกด้วยการใช้เทคนิค RFLP สามารถจัดกลุ่มของแถบดีเอ็นเอออกได้ 4 กลุ่ม (Hwang *et al*., 1991) ในประเทศไทยมีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรานี้ด้วยการใช้พืชอาศัยมาตรฐาน 11 สายพันธุ์ (differential hosts) พบว่าเชื้อรานี้เป็น pathotype ที่ 3 (ศรีสุข, 2550) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ครั้งนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการพิจารณาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละแหล่งปลูกของประเทศสำหรับกำหนดขอบเขตของศัตรูพืชกักกัน และเพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงสำหรับการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่จะมีการพัฒนาขึ้นจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อรา *Phytophthora capcisi* 15 ไอโซเลท จากจังหวัด เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ หนองคาย สกลนคร และเชียงราย
2. เชื้อรา *P. palmivora* 2 ไอโซเลท (แยกได้จากรากส้มจังหวัดสมุทรสาคร และรากทุเรียนจังหวัดจันทบุรี)
3. เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของพริกที่แยกเชื้อได้จากต้นพริกในแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา
4. RAPD primers, microsattlelite primer (Univerity of British Columbia, Canada,ชุด 1 และ ชุด 9) จำนวน 200 primers และ Operon primers จำนวน 60 primers

5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช

6. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

วิธีการ

รวบรวมต้นพริกที่แสดงอาการลำต้นไหม้จากแหล่งปลูกพริก อำเภอแม่ริม และ อำเภอสันทรายจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร อำเภอเมือง และ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย และ อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย ซึ่งมีการระบาดของโรคและแยกเชื้อรา *P. capsici* บริสุทธิ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (RNV) ตรวจสอบความสามารถในการทำให้พริกเป็นโรคและ สายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้พันธุ์พริกทดสอบ 9 พันธุ์ ได้แก่ CM 334,PI 201232, CM 331, CNPH 703, PI 201238, PI 201234,, PI 189550, Early calwonder และ PB 602 เพื่อใช้เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้ในภายหลัง

แยกเชื้อรา *P. palmivora* บริสุทธิ์จากรากส้มที่เก็บจากจังหวัดสมุทรสงคราม และ จากรากทุเรียนที่เก็บจากจังหวัดจันทบุรีด้วยวิธีการเดียวกับการแยกเชื้อรา *P. capsici*

แยกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* บริสุทธิ์จากรากพริกที่เก็บจากจังหวัดนครราชสีมาด้วยวิธีการเดียวกับการแยกเชื้อรา *P. capsici*

เพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อราทั้ง 18 ไอโซเลท ด้วยอาหารเหลว V-8 เป็นเวลา 14 วัน กรองเส้นใย ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหลาย ๆ ครั้ง ผึ่งเส้นใยให้แห้ง นำไปบดให้เป็นผงละเอียด

นำผงของเส้นใยไปสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้วิธีการสกัดของ Murray and Thompson (Murray and Thompson, 1980) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล แอลกอฮอร์ 70% เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสารละลาย TE และนำไปเก็บในตู้ปรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

นำดีเอ็นเอที่เก็บรักษาไว้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 25 นาโนกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (thermal cycler, Perkin-Elmer 9700) โดยใช้ RAPD primer ชนิด 10 bases จำนวน 160 สาย (UBC primers ชุด 1 และ Operon primers) และ microsattlelite primer จำนวน 100 สาย (UBC primers ชุด 9) โปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้ที่อุณหภูมิของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ ต่อจากนั้นเพิ่มสายดีเอ็นเอต่อที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ไปตรวจผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความเข้มข้นของ agarose ที่ 1 % ในสารละลาย ethidium bromide ถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ นำภาพถ่ายดีเอ็นเอที่ปรากฏไปนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ คำนวณข้อมูล

แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NYSYS.PC ผลจากการคำนวณได้ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต้องการ เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้กับข้อมูลเบื้องต้นของสายพันธุ์เชื้อรา *P. capsici* ที่ได้จากการเกิดโรคบนพันธุ์พริกทดสอบ

ระยะเวลาการดำเนินงานและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลา ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ กลุ่ม วิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างเชื้อรา *P. capsici* สาเหตุของโรคลำต้นไหม้ จังหวัดเชียงใหม่ หนองคาย สกลนคร เพชรบูรณ์ และเชียงราย ได้ 10, 1, 1, 1 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ รวม 15 ไอโซเลท ตรวจสอบความสามารถในการทำให้พริกเป็นโรคพบว่าเชื้อรา 10 ไอโซเลท เชียงใหม่ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรครุนแรงระดับ 4 เชื้อราไอโซเลทเพชรบูรณ์ ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรคปานกลางระดับ 3.5 เชื้อรา 4 ไอโซเลทจากจังหวัดเชียงราย หนองคายและสกลนคร ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรคต่ำระดับ 2.5

เมื่อใช้ RAPD primers และ microsattlelite primer จำนวน 260 สาย ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อรา และปฏิบัติได้ผลเช่นเดียวกัน 3 ครั้งการทดลอง พบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ได้ แต่ primer เพียง 15 สาย ที่ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ นำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปคำนวณด้วยโปรแกรม NYSYS.PC ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา *P. capsici* ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์กลุ่มที่ 2 เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท ในกลุ่มที่ 1 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อรา *P. capsici* จากจังหวัดหนองคาย มีความเหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici*ทั้ง 3 กลุ่มเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จากจังหวัดนครราชสีมามีความแตกต่างกับเชื้อรา *P. capsici* และเชื้อรา *P. palmivora* อย่างมาก โดยพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเพียง 25 เปอร์เซ็นต์

การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท จาก 5 แหล่งปลูก ที่สร้างได้นี้กับความสามารถของการทำให้พริกเกิดโรค พบว่าเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้

เกิดโรคสูง(จากจังหวัดเชียงใหม่) เชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำ (จากจังหวัดเชียงราย) ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน และเชื้อรา ยกเว้นเชื้อรา *P. capsici* ไอโซเลทเพชรบูรณ์ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคระดับปานกลาง ระดับ 3.5 และเชื้อรา รา *P. capsici* ไอโซเลทสกลนคร ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำระดับ 2.5 ถูกจัดไว้ในกลุ่มที่แสดงความสามารถในการทำให้เกิดโรครุนแรงระดับ 4 สำหรับเชื้อรา รา *P. capsici* ไอโซเลทหนองคายที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำระดับ 2.5 ไม่ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกับเชื้อราไอโซเลทอื่น ๆ ผลการศึกษานี้พบว่าการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

สรุปผลการทดลอง

โรคลำต้นไหม้ของพริกเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* จำนวน 15 ไอโซเลท จากแหล่ง

ปลูกพริกของจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย สกลนคร เพชรบูรณ์และหนองคาย จำแนกสายพันธุ์ด้วยพืชทดสอบ 11 ชนิดพบว่าเป็น Pathotype ที่ 3 มีความรุนแรงของโรคบนพริกพันธุ์จินดาวัดได้ระดับ 4 (รุนแรงมาก) เมื่อใช้ RAPD primers และ microsattlelite primer จำนวน 260 สาย และ ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อราพบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ได้ primer 15 สาย ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ การจำแนกกลุ่มของแถบดีเอ็นเอ ได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1คือ *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท ในกลุ่มที่ 1 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อรา *P. capsici* จากหนองคาย เหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* ทั้ง 3 กลุ่ม 30 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

เอกสารอ้างอิง

ศรีสุข พูนผลกุล 2548. โรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบระบาดใหม่ ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2548

ศรีสุข พูนผลกุล และ ศิริพงษ์ คุ้มภัย 2550. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก. การประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550 พิษณุโลก

CAB International, 2003. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International

Hwang, B.K., A.W.A.M.de Cock, G. Bahnweg, H.H.Prell and R. Heitefuss. 1991.Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capcisi* isolates from pepper (*Capsicum annuum*). Syst. Appl. Microbiol. 14:111-116.

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nuc. Acid. Res. 8 : 4321-4325.

Polach, F.T. and R.K. Webster. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capcisi* . Phytopathology. 62:20-26.

Oudemans , P. and M.D.Coffey, 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. Mycol. Res. 95: 1025-1046.

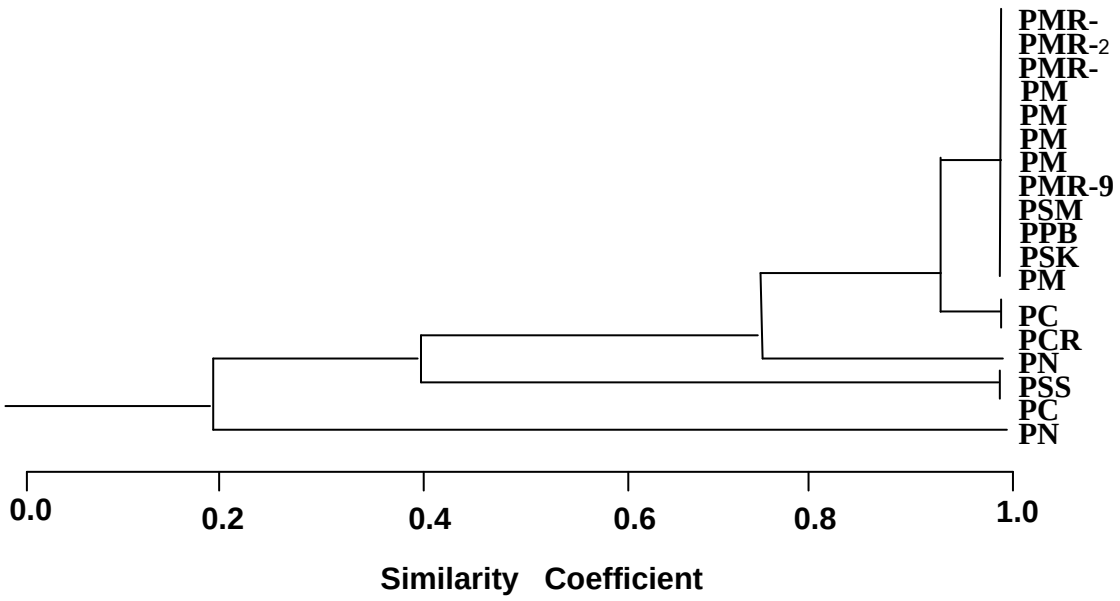

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16 isolates of *Phytophthora capsici* and 2 isolates of *P. palmivora* constructed with RAPD data by using NTSYS.PC program [*P. capsici* isolates; PMR = MaeRim, Chiangmai ; PSM = Sansai , Chiangmai; PSK = Sakonnakorn; PPB = Petchaboon; PCR = Chiangrai ; PNK = Nongkai , *P. palmivora* isolates; PSS = Samutsakorn (from tangarine) ; PJB = Chantaburi (from durian) PNR= *Pythium aphanidermatum* isolates from Nakornrachasima.

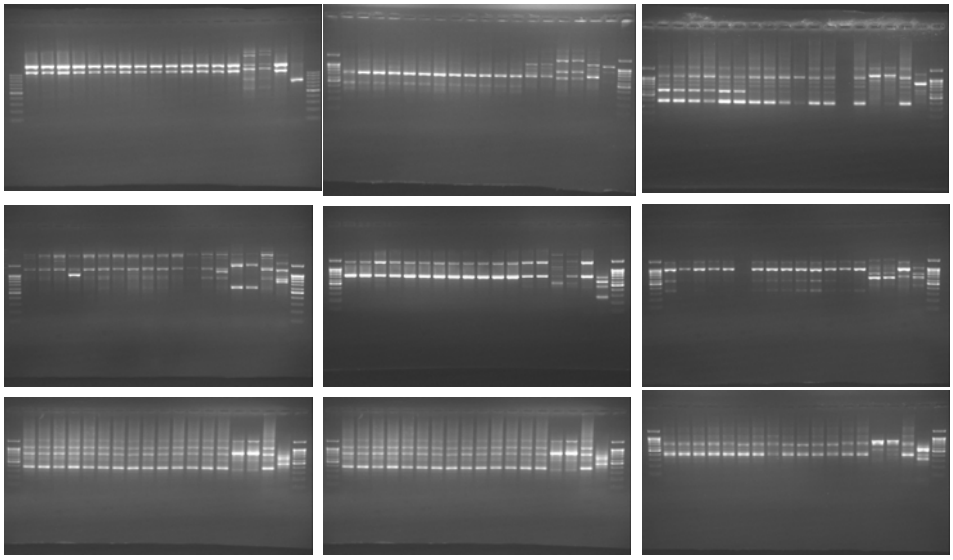

Fig. 2 Random amplified polymorphic DNA(RAPD) profiles of amplification with primers UBC

(Univerity of Britich Columbia) 848, 856,858,866,868,873,884,889. and 891 *Phytophtora capsici* Lane 1-9= from MaeRim, Chiangmai, Lane 10 = from Sansai, Chiangmai; Lane 11-12 = from Sakonnakorn, Petchaboon; Lane 13-14 = Chiamgrai; Lane 15-16 *P. pamivora;* Lan17= *Pythium aphanidermatum* Lane 18 = Nongkai. Molecular marker : 100 bp ladder.