



การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* สาเหตุโรครตายพรายกล้วยด้วยเครื่องหมาย ISSR

Detection of Genetic Variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Causal Agent of Fusarium Wilt in Banana by ISSR Markers

วนรัตน์ นาทิโน¹ ธัญยสิริวัณิช ธัญสิริวรรณ^{1,2,3} อภิเดช แสงดี⁴ ราตรี บุญเรืองรอด⁵ และ ประภาส กาวีชา^{1,2,3*}

Natino, W. ¹, Thanyasiriwat, T. ^{1,2,3}, Sangdee, A. ², Boonruangrod, R. ³ and Kawicha, P. ^{1,2,3*}

¹ หน่วยวิจัยศัตรูพืชและการควบคุมโดยชีววิธี หน่วยวิจัยเทคโนโลยีจีโนมพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร 47200

¹ Plant Pest and Biocontrol Research Unit, Plant Genome Technology Research Unit, Department of Agriculture and Resources, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon 47000

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

² Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900,

⁴ หน่วยวิจัยจุลชีววิทยาและจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

⁴ Microbiology and Applied Microbiology Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham 44150

⁵ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

⁵ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: csnpk@ku.ac.th

Received 04 July 2021; Revised 28 July 2021; Accepted 30 July 2021

บทคัดย่อ

โรครตายพรายของกล้วยเกิดจากรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการปลูกกล้วยทั่วโลก การประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมและเข้าใจโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของรา Foc ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรครตายพรายจากจังหวัดสกลนคร ศรีสะเกษ สุรินทร์ นครพนม นครราชสีมา และหนองคาย นำตัวอย่างมาแยกราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลต นำมาดั่งกล่าวมาตรวจวินิจฉัยโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ด้วยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรา Foc race 1 ผลการตรวจพบว่าราที่คัดแยกได้ทั้งหมดคือรา Foc race 1 จากนั้นนำรา Foc ข้างต้นมาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างไอโซเลตรา Foc ที่ศึกษา มีความผันแปรทางพันธุกรรม โดยมีค่า genetic similarity ตั้งแต่ร้อยละ 73 – 100 จากการวิเคราะห์ Dendrogram สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา Foc ออกเป็นกลุ่ม ISSR 5 กลุ่ม โดยมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของรา และพบว่ารา Foc ภายในแหล่งที่มาหรือจังหวัดเดียวกันมีความผันแปรทางพันธุกรรม ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานหรือพัฒนาวิธีการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพในอนาคตควรให้ความสำคัญกับรา Foc ที่มีความแตกต่างกัน

คำสำคัญ: กล้วย, ความผันแปรทางพันธุกรรม, โรครตายพราย, ISSR

Abstract

Fusarium wilt disease of bananas, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc), significantly causes losses in banana productions worldwide. The assessment of genetic variation and understanding the genetic

structure of *Foc* will benefit effective disease management. Therefore, this research aimed to examine the genetic variation of *Foc* in the Northeast of Thailand by using ISSR markers. Disease plant samples with typical symptoms were collected from Sakon Nakhon, Si Sa Ket, Surin, Nakhon Phanom, Nakhon Ratchasima, and Nong Khai provinces and were used for fungal pathogen isolation. Forty-nine fungal isolates were isolated and identified by morphological characteristics and PCR assay with *Foc* race 1 specific primers. The results showed that all the isolated fungi were *Foc* race 1. All identified *Foc* isolates were then examined for their genetic variation by ISSR markers. The results revealed that *Foc* isolates were genetically variable. ISSR pattern showed 73 – 100 % genetic similarity among the *Foc* isolates. Dendrogram analysis could divide *Foc* isolates into 5 ISSR groups which were relevant to *Foc* location. The results also showed that the variations were found in *Foc* isolates from the same location or province. Therefore, disease-resistant cultivar selection and effective disease control development should rely on the variation of *Foc*.

Keywords: Banana, Genetic variation, Fusarium wilt, Panama disease, ISSR

บทนำ

รา *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (*Foc*) เป็นสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วย (Fusarium wilt หรือ Panama disease) โรคนี้มีลักษณะอาการเฉพาะของโรคดังนี้ เนื้อใบเหลือง ก้านใบหักทำให้ใบพับลงขนานกับลำต้น เนื้อเยื่อทอลำเลียงภายในลำต้นเทียมมีสีน้ำตาลแดงหรือม่วง ต้นพืชเหี่ยวและตายก่อนให้ผลผลิต (Ploetz, 2006) รา *Foc* สามารถแพร่กระจายผ่านทางส่วนขยายพันธุ์ของกล้วย เช่น หน่อจากต้นแม่ที่เป็นโรค (Stover, 1962; Li et al., 2011) การกระจายของโรคผ่านทางหน่อพันธุ์ที่มีรา *Foc* สามารถกระจายไประหว่างแปลงปลูกหรือระหว่างประเทศ (Dita et al., 2018)

รา *Foc* ถูกแบ่งออกเป็น race ตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชพันธุ์ทดสอบ โดยที่รา *Foc* race 1 พบทั่วไป ทำให้เกิดโรคในกล้วย Gros Michel (กล้วยกลุ่มจีโนม AAA) และกล้วยที่อยู่ในกลุ่มจีโนม ABB *Foc* race 2 ทำให้เกิดโรคในกล้วยที่อ่อนแอต่อ *Foc* race 1 และกล้วย Baggoe (กลุ่มจีโนม AAB) *Foc* race 4 แบ่งออกเป็น Tropical race 4 (TR4) และ Subtropical race 4 (STR4) ทำให้เกิดโรคในกล้วยที่อ่อนแอต่อ race 1, 2 รวมถึงกล้วย Cavendish (Stover, 1990; Buddenhagen, 2009)

ในประเทศไทย พบรายงานของโรคตายพรายครั้งแรกในกล้วยน้ำว้า ปี ค.ศ. 1985 โดย Pitakpaivan (1985) จากนั้นโรคตายพรายได้กระจายไปทั่วทั้งประเทศ ในปี ค.ศ. 2019 พบการเกิดโรคตายพรายเนื่องจากรา *Foc* TR4 ในกล้วย Cavendish ที่ปลูกในบางพื้นที่ของจังหวัดเชียงราย (Department of Agriculture, Thailand, 2019) อย่างไรก็ตามกรมวิชาการเกษตรได้มีการกักกันพืชและกำจัดรา *Foc* TR4 จนไม่พบราสาเหตุแล้ว

จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* ในประเทศต่าง ๆ เช่น อินเดีย (Thangavelu et al., 2012) บราซิล (Costa et al., 2015; Cunha et al., 2015) และมาเลเซีย (Leong et al., 2010) พบว่ารา *Foc* มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง สำหรับในประเทศไทยยังมีการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* น้อย Somrith และ คณะ (2011) ได้ตรวจสอบกลุ่ม Vegetative compatibility (VCGs) ของรา *Foc* ที่รวบรวมจากทุกภาคของประเทศไทยจำนวน 117 ไอโซเลตสามารถแบ่งรา *Foc* ออกเป็น 6 VCGs โดย VCG 0123 พบมากที่สุด (ร้อยละ 76) อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่น

การศึกษาและข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของราสาเหตุโรคในพื้นที่ต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคที่สามารถต้านทานต่อเชื้อที่มีความผันแปร การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวินิจฉัยและประเมินความผันแปรของเชื้อสาเหตุโรค การพิจารณาวิธีการควบคุมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากรของเชื้อสาเหตุโรค ทั้งการควบคุมโดยวิธีทางเคมีและชีววิธี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรรา *Foc* สาเหตุโรคตายพรายในบางจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยเครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์เดี่ยวที่มีตำแหน่งจับบริเวณลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequence) หรือ microsatellite DNA เครื่องหมาย ISSR สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้สูงและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นยังคงเหมือนเดิม มีการนำเครื่องหมาย ISSR มาใช้ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* แล้วและสามารถตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมได้ เช่น การศึกษาของ Thangavelu และคณะ (2012), Cunha และคณะ (2015), Leong และคณะ (2010) เป็นต้น

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมรา *Foc* สาเหตุโรคตายพรายกล้วย

เก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยน้ำว้าที่แสดงอาการโรคตายพรายจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดสกลนคร ศรีสะเกษ สุรินทร์ นครพนม นครราชสีมา และหนองคาย โดยใช้มีดปลายแหลมเจาะเข้าไปในลำต้นเทียมของกล้วยที่ตำแหน่งสูงจากพื้นดินประมาณ 1 เมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างกบาลำต้นเทียมที่ภายในทอลำเลียงมีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดงขนาดประมาณ 3 x 5 เซนติเมตร เก็บและขนส่งตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างมาแยกราสาเหตุโรคต่อไป

นำตัวอย่างพืชมาแยกราสาเหตุโรคโดยตัดชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดประมาณ 0.5–1 ตารางเซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน

ด้วยสารละลาย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 เป็นเวลา 10 วินาที วางชิ้นส่วนพืชบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ผสม Kanamycin sulfate 10 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยรามาเลี้ยงในจานอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ไปตรวจสอบลักษณะสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรา *Foc* race 1 เพื่อยืนยันชนิดราสาเหตุโรค

การระบุชนิดของรา *Foc* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะโดยวิธี PCR เริ่มจากนำตัวอย่างรามาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ใช้เข็มเย็บกลุ่มเส้นใยจากบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ทำให้เส้นใยแห้งโดยวางในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเส้นใยที่แห้งมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม PCR buffer A (Vivantis, Malaysia) 1X dNTPs 200 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ W1805F (5'GTTGAGTCTCGATAAA CAGCAAT3') และไพรเมอร์ W1805R (5'GACGAGGGGA GATATGGTC3') (Li et al., 2012) ไพรเมอร์ละ 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.05 ยูนิต นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในเครื่อง Thermal cycler (Alpha Cyclor 1 PCRmax) โดยกำหนดอุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58.4 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตรวจสอบ PCR Product ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 1 ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ViSafe Green Gel Stain (Vivantis, Malaysia) นำราที่ได้ตรวจสอบยืนยันว่าคือรา *Foc* ไปตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมต่อไป

2. การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* ด้วยเครื่องหมาย ISSR

นำดีเอ็นเอของรา *Foc* ที่สกัดได้ในข้อ 1. มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ จาก Cunha และคณะ (2015) (Table 1) แต่ละไพรเมอร์แยกทำปฏิกิริยา PCR โดยปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม PCR buffer A (Vivantis, Malaysia) 1X dNTPs 200 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 200 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.05 ยูนิต นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในเครื่อง Thermal cycler (Alpha Cyclor 1 PCRmax) โดยกำหนดอุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตรวจสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 1.2 ในบัฟเฟอร์ 1X TBE

ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ViSafe Green Gel Stain (Vivantis, Malaysia) วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

คำนวณค่าร้อยละ Polymorphism ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ด้วยสูตร Percentage of polymorphism (%) = (Polymorphic band x 100) / Total band

Table 1 ISSR Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' to 3')
UBC 834C	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 849T	GTG TGT GTG TGT GTG TTA
UBC 862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG

Source: Cunha et al. (2015)

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาสร้าง Dendrogram ด้วยข้อมูล binary data โดยให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 และพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 100 ถึง 2000 คู่เบส (Ng, 2015) จากนั้นนำข้อมูล binary data ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTSYSpc) (Rohlf, 2009) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลในรูปของ Dendrogram

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รา *Foc* สาเหตุโรคราตายพรายกล้วยที่เก็บรวบรวม

แยกราบริสุทธิ์ได้จำนวน 49 ไอโซเลตจากกล้วยน้ำว้าที่แสดงอาการโรคราตายพรายในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนี้ จังหวัดสกลนคร จำนวน 8 ไอโซเลต จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 8 ไอโซเลต จังหวัดสุรินทร์ จำนวน 7 ไอโซเลต จังหวัดนครพนม จำนวน 8 ไอโซเลต จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 8 ไอโซเลต และจังหวัดหนองคาย จำนวน 10 ไอโซเลต (Table 2) ราทั้งหมดที่คัดแยกได้มีเส้นใยสีขาวและขาวปนม่วง (Figure 1A and 1B) ซึ่งลักษณะของโคโลนีและสีของเส้นใยตรงตามกับคุณลักษณะของราในสกุล *Fusarium* และสอดคล้องกับการศึกษาของ Cunha และคณะ (2015) ที่พบว่า สีของเส้นใยรา *Foc* มีความผันแปรตั้งแต่สีขาว จนถึงสีส้ม และสีม่วง

เมื่อราเจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน มีการสร้างสปอร์ 3 ลักษณะ ประกอบด้วย microconidia, macroconidia และ chlamydospore (Figure 2A and 2B) โดยรูปร่างของสปอร์แบบต่าง ๆ เป็นไปตามลักษณะของรา *Foc* ที่มีการรายงานโดย Cunha และคณะ (2015) และ Aguilar-Hawod และคณะ (2020) ดังนี้ microconidia มีรูปร่างไข่ (oval shape) พบทั้งแบบเซลล์เดียวและสปอร์ 2 เซลล์ ส่วน macroconidia มี

รูปร่างคล้ายเคียว (falciform) มี 3 ถึง 4 เซลล์ และ chlamydospore มีรูปร่างกลม ผนังหนาพบทั้งเรียบและขรุขระ พบทั้งระหว่างเส้นใย (intercalary) และปลายเส้นใย ซึ่งลักษณะของสปอร์ทั้งหมดที่พบตรงตามรายงานของ Leslie และ Summerell (2006)

เมื่อนำราทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ W1805F และ ไพรเมอร์ W1805R (Li et al., 2012) ที่จำเพาะต่อรา *Foc* race 1 พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 380 คู่เบส จากรากทุกไอโซเลต (Figure 3) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ราที่รวบรวมจากกล้วยน้ำว้าแสดงอาการโรคตายพรายคือ รา *Foc* race 1

การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคตายพรายในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้สำรวจในแปลงปลูกกล้วยหลายชนิด เช่น กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ กล้วยหอมทอง แต่พบโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงสนับสนุนการรายงานที่ผ่านมาของประเทศไทยที่พบการเข้าทำลายของ รา *Foc* race 1 และพบในกล้วยน้ำว้าเท่านั้น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ยืนยันการตรวจสอบด้วยชุดไพรเมอร์ของ Lin และคณะ 2009 ที่จำเพาะต่อ *Foc* race 4 พบว่า รา *Foc* ที่รวบรวมได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือให้ผลเป็นลบทั้งหมด (ไม่ได้นำเสนอข้อมูล)

Table 2 Fungal isolates isolated from *Musa* (ABB group) ‘Nam Wa’ cultivated in some provinces in the Northeast of Thailand

Province	Isolate name	No.
Sakon Nakhon	SK1, SK2-5, SK3-1, SK3-3, SK4-1, SK4-3, SK5-1, SK5-3	8
Si Sa Ket	SSK1-1, SSK1-4, SSK1-5, SSK2-1, SSK2-3, SSK3-1, SSK3-2, SSK3-4	8
Surin	SR1-1, SR1-3, SR1-5, SR2-1, SR3-1, SR3-3, SR3-4	7
Nakhon Phanom	NP1-2, NP1-5, NP1-6, NP3-1, NP3-3, NP3-4, NP4-1, NP4-2	8
Nakhon Ratchasima	NRS1-1, NRS1-3, NRS2-1, NRS2-2, NRS2-3, NRS2-4, NRS3-1, NRS3-2	8
Nong Khai	NK1-1, NK1-2, NK2-1, NK2-2, NK3-1, NK3-2, NK3-3 NK4-1, NK4-2, NK4-3	10
Total		49

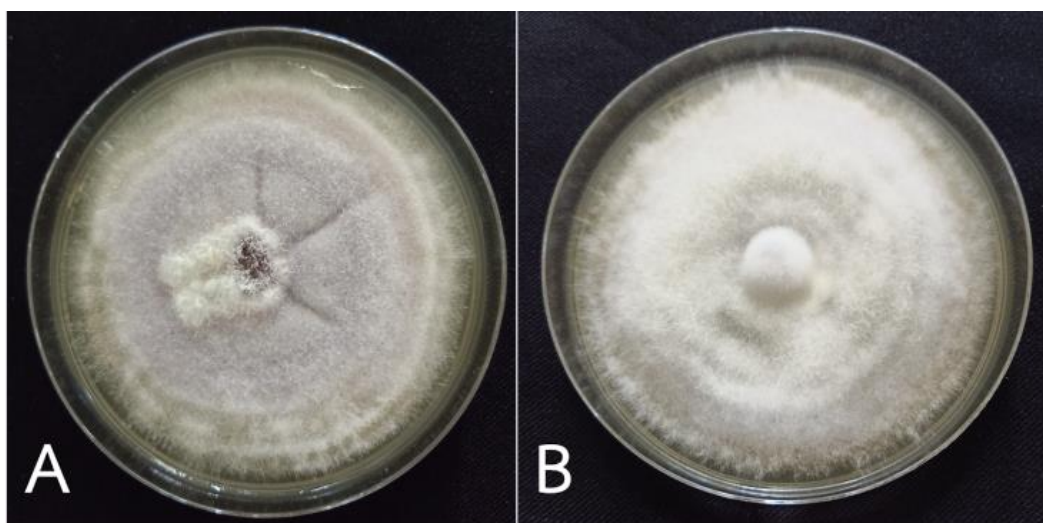


Figure 1 Mycelial color of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolate NRS1-1 (A: pale purple colony) and NK4-2 (B: white colony) on PDA media

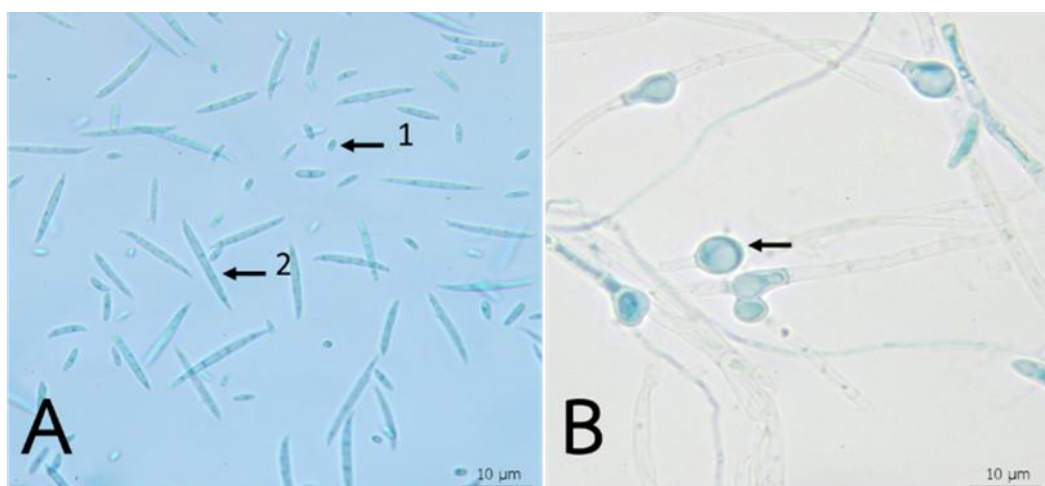


Figure 2 Reproductive structures of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolate NRS1-1. A: 1= Microconidia, 2= Macroconidia and B: Chlamydospore

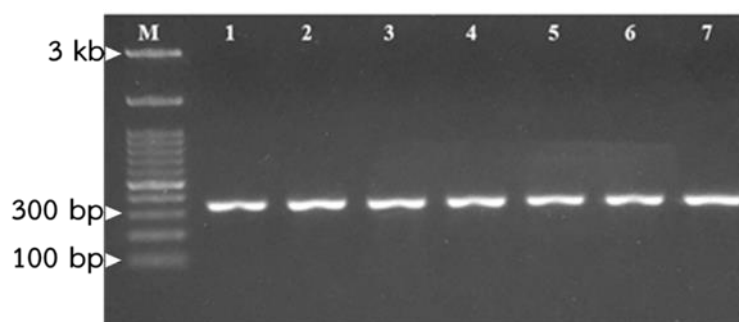


Figure 3 PCR amplification analyses of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates using primer set W1805F/W1805R. Lane M: 100 bp DNA ladder, 1: isolate SK1, 2: SSK1-1, 3: SR1-1, 4: NP1-2, 5: NRS1-1, 6: NK1-1, 7: *Foc* isolate FOC1708 (reference isolate)

2. ความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* ด้วยเครื่องหมาย ISSR

หลังจากนำเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ตาม Table 1 มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Foc* ทั้ง 49 ไอโซเลต พบว่าไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 6 ถึง 13 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 250 – 2000 คู่เบส โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอและขนาดของแถบดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ (Figure 4)

ISSR ไพรเมอร์ที่นำมาศึกษามีค่าร้อยละของ polymorphism ตั้งแต่ 66.6 ถึง 100 โดยไพรเมอร์ UBC 862 มีค่าร้อยละของ polymorphism สูงที่สุด รองลงมาคือไพรเมอร์ UBC834C และ UBC849T ตามลำดับ (Table 3)

ISSR ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ได้มีการประเมินค่าร้อยละ polymorphism มาก่อนแล้วโดย Cunha และ คณะ (2015) ซึ่งพบว่าค่า polymorphism ของแต่ละไพรเมอร์มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 60 ถึง 100 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างราในการศึกษาครั้งนี้พบว่า จำนวนแถบดีเอ็นเอและค่า polymorphism มีความแตกต่างกัน เช่น เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC 862 ในการศึกษานี้มีค่า polymorphism ร้อยละ 100 ซึ่งต่างจากการทดลองของ Cunha และคณะ (2015) ที่รายงานว่าค่า polymorphism เท่ากับร้อยละ 69 เช่นเดียวกับการใช้ไพรเมอร์ UBC 864 ที่รายงานไว้เท่ากับร้อยละ 100 ในขณะที่การศึกษานี้มีค่า

เท่ากับร้อยละ 84.6 สาเหตุที่พบความแตกต่างนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของตัวอย่างหรือไอโซเลตของรา *Foc* ซึ่งมีจำนวนและตำแหน่งของ microsatellite DNA ที่อยู่บนจีโนมแตกต่างกัน กลุ่มตัวอย่างราทั้งหมดจากการศึกษาครั้งนี้คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้า ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างราของ Cunha และคณะ (2015) แยกได้มาจากกล้วย Pome (กลุ่มจีโนม AAB) และ Cavendish (กลุ่มจีโนม AAA) ในประเทศบราซิล

Figure 5 แสดงให้เห็นว่ารา *Foc* ที่นำมาศึกษามีความผันแปรพันธุกรรมทั้งจากแหล่งปลูกกล้วยในจังหวัดเดียวกันและต่างจังหวัด ราที่คัดแยกจากจังหวัดนครราชสีมา (เชื้อไอโซเลตขึ้นต้นด้วยอักษร NRS) มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่ารา *Foc* ในจังหวัดอื่น โดยพบกระจายอยู่ใน ISSR กลุ่ม C และ D มีค่า similarity coefficient ระหว่างไอโซเลตตั้งแต่ 0.76 จนถึง 1.00 เช่นเดียวกับรา *Foc* จากจังหวัดนครพนมที่กระจายตัวอยู่ใน ISSR กลุ่ม D และ F มีค่า similarity coefficient ระหว่างไอโซเลตตั้งแต่ 0.78 จนถึง 0.94 ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีการวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับการเกิด genetic recombination ของรา *Foc* เนื่องจากไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ดังนั้นความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* อาจมีสาเหตุมาจากกลไกทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เช่น การกลาย การพบ transposon ใน

จีโนม การรวมกันของเส้นใยของราต่างไอโซเลต (hyphal anastomosis) และการเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) เป็นต้น (McDonald and Linde, 2002) นอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการปรับตัวและการมีวิวัฒนาการร่วม (co-evolution) ระหว่างราสาเหตุโรคและพืชอาศัยรวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Bentley and Dale, 1995)

รา *Foc* ที่มาจากแหล่งเดียวกันส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากกว่าราจากแหล่งอื่น เช่น รา *Foc* ทุกไอโซเลตที่มาจากจังหวัดหนองคายจัดอยู่ใน ISSR กลุ่ม E และรา *Foc* ทุกไอโซเลตที่มาจากจังหวัดสกลนครจัดอยู่ใน ISSR กลุ่ม B เท่านั้น เป็นต้น

การวิเคราะห์ Dendrogram จาก Figure 5 พบว่า รา *Foc* ที่มาจากจังหวัดใกล้เคียงกันหรือพื้นที่จังหวัดติดกันไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เช่น รา *Foc* จากจังหวัดสกลนคร มีความใกล้ชิดกับรา *Foc* จากจังหวัดศรีสะเกษ มากกว่าจังหวัดนครพนม ในขณะที่รา *Foc* จากจังหวัดนครพนมมีความใกล้ชิดกับราจากจังหวัดนครราชสีมา มากกว่า ส่วนรา *Foc* ที่มาจากจังหวัดสุรินทร์ มีความใกล้ชิดกับรา *Foc* จากจังหวัดหนองคาย ผลการศึกษานี้ อาจสนับสนุนได้ว่าการเคลื่อนย้ายวัสดุทางการเกษตรหรือหน่อพันธุ์ที่มีการติดเชื้อจากแปลงสู่แปลงหรือจังหวัดสู่จังหวัดที่มีระยะห่างไกลกันได้ จึงตรวจพบว่ารา *Foc* มีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดและอยู่ในกลุ่ม ISSR เดียวกัน

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* ทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มหรือประชากรรา *Foc* ในพื้นที่ปลูก ประเทศ หรือภูมิภาคนั้น ๆ จะช่วยให้การจัดการโรคมีความเป็นไปได้และมีประสิทธิภาพ เช่น นำข้อมูลและตัวแทน

เชื้อจากกลุ่ม ISSR ต่าง ๆ ไปใช้ในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค การเลือกพื้นที่หรือแปลงปลูกที่มีความหลากหลายของรา *Foc* สูงเพื่อใช้ประเมินความต้านทานโรคในระดับแปลงเพื่อให้ได้พันธุ์ต้านทานที่แท้จริงกับรา *Foc* ทุกกลุ่ม อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาเพิ่มเติมจากรา *Foc* ทั้งประเทศและศึกษาความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคหรือความก้าวร้าว (aggressiveness) ของรา *Foc* เพิ่มเติมจะทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างประชากรรา *Foc* ในประเทศไทยมากยิ่งขึ้น

Table 3 Amplified fragments, polymorphic band, and polymorphism of DNA fingerprints generated by ISSR primers

Primers	Total amplified fragments (no.)	Polymorphic bands (no.)	Polymorphism (%)
UBC 834C	10	9	90
UBC 849T	9	8	88.8
UBC 862	10	10	100
UBC 864	13	11	84.6
UBC 866	6	5	83.3
UBC 881	9	6	66.6

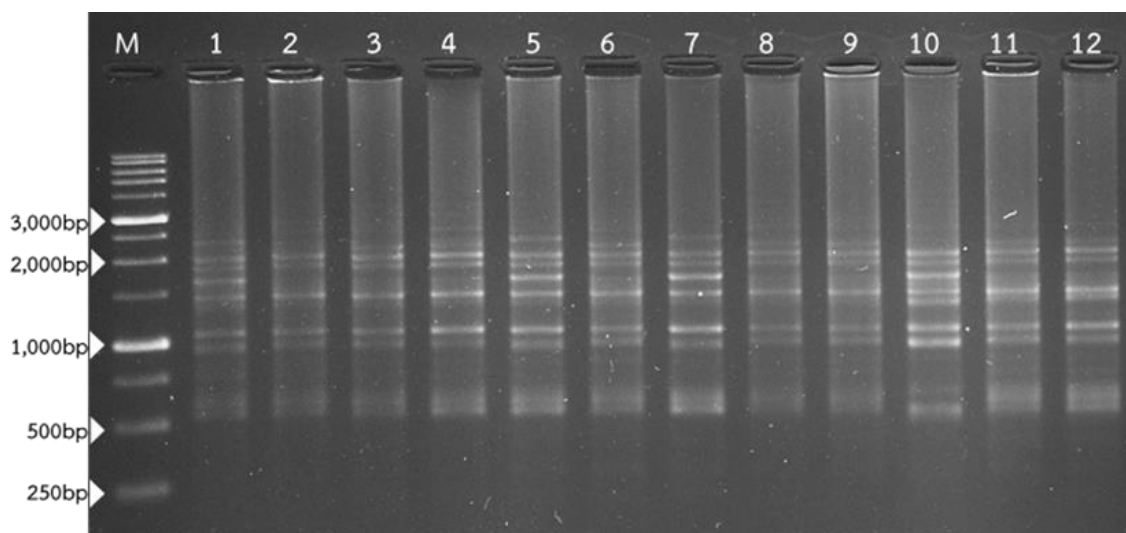


Figure 4 DNA fingerprints of some *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates generated by using primer UBC 862. Lane M: One Mark 100 bp DNA Ladder, 1: *Foc* isolate NRS2-3, 2: NRS2-4, 3: NRS3-1, 4: NRS3-2, 5: NP1-22-3, 6: NP1-5, 7: NP1-6, 8: NP3-1, 9: NP3-3, 10: NP3-4, 11: NP4-1, 12: NP4-2

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของรา *Foc* สาเหตุโรคตายพรายกล้วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย ISSR จากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอและสร้าง Dendrogram สามารถแบ่งรา *Foc* ออกเป็น 6 กลุ่ม ISSR (ISSR group) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของรา

สาเหตุโรค ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางจัดการโรคที่เหมาะสมต่อไป

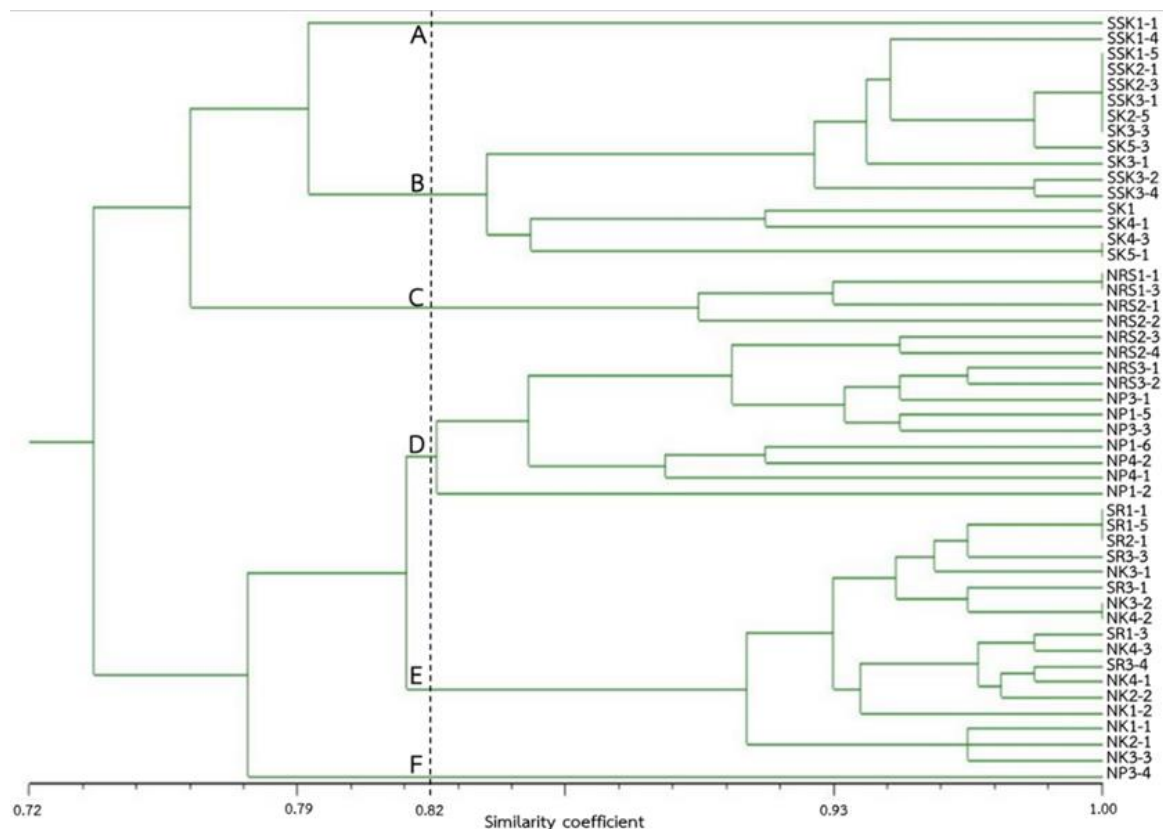


Figure 5 Dendrogram from UPGMA cluster analysis using Similarity Coefficient of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from the Northern of Thailand based on ISSR markers

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์เชื้อพันธุกรรมพืชแห่งประเทศไทย และคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

เอกสารอ้างอิง

- Aguilar-Hawod, K.G.I., de la Cueva, F.M. and Cumagun, C.J.R. 2020. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing Panama wilt of banana in the Philippines. *Pathogens* 9: 32.
- Bentley, S., Pegg, K.G. and Dale, J.L. 1995. Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research* 99: 1378-1384.
- Buddenhagen, I. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'Tropical Race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828: 193-204.
- Cunha, C.M., Hinz, R.H., Pereira, A., Tcacenco, F.A. and Stadnik, M.J. 2015. Aggressiveness and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Santa Catarina, southern Brazil. *Tropical Plant Pathology* 40: 326-334.
- Department of Agriculture. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Thailand. Available from: <https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/11/detection-of-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-tropical-race-4-in-thailand/> (accessed on 15 January 2020)
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E.S. and Staver, C.P. 2018. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science* 9: 1468.
- Leong, S.K., Latiffah, Z. and Baharuddin, S. 2010. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from Malaysia. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1026-1037.
- Leslie, J.F. and Summerell B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing.
- Li, C., Chen, S., Zuo, C., Sun, Q., Ye, Q., Yi, G. and Huang, B. 2011. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology* 131: 327-340.
- Li, M.H., Yu, X.T., Wang, H.F., Zhou, J.N., Xi, P.G. and Jiang, Z.D. 2012. Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4. *Scientia Agricultura Sinica* 45: 3971-3979.
- McDonald, B.A. and Linde, C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124: 163-180.

- Ng, W.L. and Tan, S.G. 2015. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Science Journal* 9: 30-39.
- Pitakpaiwan, P. 1985. Banana diseases. *Review of Tropical Plant Pathology* 2: 175-196.
- Ploetz, R.C. 2006. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96: 653-656.
- Rohlf, F.J. 2009. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software: Setauket, NY.
- Somrith, A., Singburadom, N., and Piasai, O. 2011. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 45: 451-460.
- Stover, R.H. 1962. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa species. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Stover, R.H., 1990. Fusarium wilt of Banana: Some history and current Status of the Disease. *In* *Fusarium wilt of banana.*, pp.1-7.
- Thangavelu, R., Kumar, K.M., Devi, P.G. and Mustaffa, M.M. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates (Foc) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. *Molecular biotechnology* 51: 203-211.
- IPCC. 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jacquemard, J.C. 1979. Contribution to the study of the height growth of the stems of (*Elaeis guineensis* Jacq.). study of the L2T x D10D cross. *Oleagineux* 34: 492-497.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. The Netherlands: CAB International.
- Monroy-Barbosa, A. and Bosland, P.W. 2010. A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *HortScience* 45: 1563-1566.
- Office of Agricultural Economics 2018. The Farmers' Agenda for farmers on "FTA Funds to prepare 100 million Baht to help palm plantation improve competitiveness". Bangkok: Office of Agricultural Economics Research, Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Russell, R.S. 1977. *Plant Root Systems: Their function and interaction with the soil*. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, London.
- Tan, G.Y. and Hardon, J.J. 1976. Nursery selection. *In*: *Oil Palm Research* (eds. Corley, R.H.V., Hardon, J.J. and Wood, B.J.) Elsevier, Amsterdam, Netherlands: 139-143.
- Tye, Y.Y., Lee, K.T., Wan Abdullah, W.N. and Leh, C.P. 2011. Second-generation bioethanol as a sustainable energy source in Malaysia transportation sector: status potential and future prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15: 4521-4536.