

การจำแนกเชื้อรา *Fusarium* species จากพืชอาศัยต่าง ๆ
ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และเครื่องหมาย ISSR

Identification of *Fusarium* species isolated from various host plants using
morphological characteristics and ISSR markers

เบญจพล ศรีทองคำ¹และ จินตนา อันอาดมิ่งาม^{1*}
Benjapon Sritongkam¹ and Jintana Unartngarm¹

Abstract

Fusarium species have been reported as causal agents of various plant diseases such as vascular wilt, root, stem, collar rot, and damping off of seedlings. The present study was conducted to evaluate the diversity of *Fusarium* species based on morphological characteristics and ISSR markers. Twenty-four isolates of *Fusarium* were isolated from different plant locations. The growth of all isolates was observed on Potato Dextrose Agar (PDA), Spezieller-Nährstoff Agar (SNA), Malachite Green Agar (MGA), and Peptone PCNB Agar (PPA). The *Fusarium* isolates were identified as *F. oxysporum*, *F. semitectum* (syn. *F. incarnatum*), *F. verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) and *F. solani* using colony morphology, pigmentation, and macroconidia and microconidia characteristics on different media. Moreover, *Fusarium* isolates were examined for genetic diversity using ISSR markers with GCG(CAG)₅, (CAG)₅, (GTG)₅ primers. The results showed that there was high DNA polymorphism among the *F. oxysporum* isolates. These results were supported by the different host plants and diseases with which the isolates were associated. Furthermore, there were some polymorphic bands found only in *F. semitectum*, that could be further developed as specific markers.

Keywords : *Fusarium* sp., macroconidia, microconidia, inter simple sequence repeats (ISSR) marker

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of plant pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng saen, Kasetsart University, Kamphaeng saen campus, Nakorn Pathom. 73140, Thailand.

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2558

*Corresponding author : agrjne@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Fusarium* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืชหลาย ๆ ชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยว ลำต้นเน่า โคนเน่า และต้นกล้าเน่า วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินความหลากหลายของเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเครื่องหมาย ISSR เชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 24 ไอโซเลท แยกมาจากพืชชนิดต่างๆ ที่เป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA), Spezieller-Nährstoff Agar (SNA), Malachite Green Agar (MGA) และ Peptone PCNB Agar (PPA) แล้วนำมาจำแนกชนิดของเชื้อราได้เป็น *F. oxysporum* *F. semitectum* (syn. *F. incarnatum*) *F. verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) และ *F. solani* โดยใช้ลักษณะของโคโลนี รังควัตถุ macroconidia และ microconidia บนอาหารชนิดต่างๆ สำหรับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Fusarium* spp. โดยใช้เครื่องหมาย ISSR ด้วยไพรเมอร์ GCG(CAG)₅, (CAG)₅ และ (GTG)₅ พบว่าไอโซเลทของเชื้อรา *F. oxysporum* มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) ก่อนข้างสูง ซึ่งสนับสนุนการก่อให้เกิดโรคบนพืชที่หลากหลายชนิด นอกจากนี้พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่พบเฉพาะในไอโซเลทของเชื้อรา *F. semitectum* ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะสำหรับการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *F. semitectum* ในอนาคตได้

คำนำ

Fusarium Link. เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ใน Kingdom Fungi Phylum Ascomycota Class Sordariomycetes Order Hypocreales Family Nectriaceae โดยลักษณะของเชื้อราชนิดนี้จะสร้างเส้นใยที่มีผนังกัน (septum) สร้างโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) แบบเดี่ยวหรือแตกแขนง โคนิดิ (conidia) เกิดบนสปอโรโดเซียมและ phialide สร้างโคนิดิ 2 ชนิดได้แก่ มาโครโคนิดิ (Macroconidia) มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อราชนิดนี้ โดยใช้รูปร่าง ขนาด ลักษณะของ foot cell และ apical cell และจำนวนผนังกันโคนิดิ ไมโครโคนิดิ (microconidia) มีขนาดเล็กรูปร่างคล้ายรูปไข่ มี 0 – 1 เซลล์ อาจเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เกิดอยู่บริเวณตำแหน่งปลายหรือกลางของเส้นใย (Gams et al., 1987) เชื้อรา *Fusarium* species แต่เดิมเป็นเชื้อราในดิน และเป็น saprophyte สามารถเจริญได้ในดินแม้ไม่มีพืชอาศัย ต่อมาได้มีการกลายพันธุ์และสามารถเข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตเร็ว โคลินีสีโดยสามารถสร้างรังควัตถุเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เส้นใยมีลักษณะฟู ซึ่งบางครั้งมีการสร้างสปอโรโดเซียม ซึ่งสปอโร

โดเซียมเป็นลักษณะที่ไม่คงที่ เชื้อรา *Fusarium* หลายสปีชีส์ไม่สร้างโครงสร้างนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่ใช่เป็นลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อราชนิดนี้ (Barron, 1977) สำหรับคลาไมโดสปอร์ในบางสปีชีส์อาจใช้เวลานานในการสร้าง และบางชนิดพบว่าไม่มีการสร้างคลาไมโดสปอร์ (Domsch et al., 1980) ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิดที่ Wollenweber and Reinking (1935) ศึกษา คือ รูปร่างของมาโครโคนิดิ จำนวนของผนังกันมาโครโคนิดิ รูปร่างของ basal foot cells รวมทั้งรูปร่างของปลายมาโครโคนิดิ รวมทั้งความยาวและความกว้างของมาโครโคนิดิ (Nelson, 1991) นอกจากนี้เชื้อรา *Fusarium* เป็นเชื้อราที่มีความผันแปรง่าย หากเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานหรือมีการย้ายอาหารบ่อยๆ อาจมีการสูญเสียลักษณะบางอย่างไปได้ มีการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างของโคนิดิ ตลอดจนจำนวนผนังกันโคนิดิ รวมทั้งลักษณะการเจริญบนอาหารสังเคราะห์ ในบางสปีชีส์อาจสูญเสียความสามารถในการสร้างมาโครโคนิดิ (macroconidia) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด จึงจำเป็นต้องใช้อาหารเฉพาะในการเก็บรักษาเชื้อรานี้ (Gams et al., 1987)

เชื้อรา *Fusarium* เป็นเชื้อราที่มีความผันแปรสูง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเชื้อรา

หรือการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (Nelson *et al.*, 1983) ความผันแปร และความหลากหลาย เชื้อรา *Fusarium* spp. ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคพืชหลายชนิด และมีพืชอาศัยกว้าง ได้แก่ โรคเน่าคอดิน เน่าระดับดิน กล้าเน่า ของต้นกล้าพืชผักต่างๆ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โรคตายพรายของกล้วย โรคเมล็ดต่างของข้าว โรคถอดผักตบชวาของข้าว นอกจากนี้ เชื้อรา *Fusarium* บางชนิด เช่น *F. oxysporum* มีการแบ่งในระดับที่ต่ำกว่าสปีชีส์ คือ *forma specialis* (f. sp.) โดยแบ่งตามพืชอาศัย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบชนิดของอาหารสังเคราะห์ที่สามารถกระตุ้นเชื้อรา *Fusarium* ให้เจริญและคงลักษณะสำคัญของแต่ละสปีชีส์ของเชื้อรา *Fusarium* ไว้ นอกจากนี้ได้ศึกษาหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* spp.

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อรา *Fusarium* spp.

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่เป็นโรคต่างๆที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. แยกเชื้อราจากพืชด้วยวิธี tissue transplanting โดยการตัดชิ้นส่วนของพืชให้มีขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร โดยให้มีส่วนที่แสดงอาการกับส่วนปกติอย่างละครึ่ง แล้วนำไปแช่ใน 10% Clorox เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อชิ้นพืชแห้งนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 จุด แล้วนำไปวางในที่แสงสลบมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราย้ายลงในจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) นอกจากนี้ตัวอย่างเชื้อส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแยกสปอร์เดี่ยว (single spore) โดยการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วหยดสารแขวนลอยสปอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บนอาหาร Water Agar (WA) แล้วใช้แท่งแก้ว

รูปตัวแอล (L) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้า บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) แล้วใช้เข็มเขี่ยเส้นใย ตัดปลายเส้นใย ย้ายลงจานอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญและสร้างสปอร์จึงเก็บเชื้อลงบนอาหารเอียง (slant agar)

การจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อรา *Fusarium* spp. ทุกไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Spezieller-Nahrstoffar Agar (SNA), Malachite Green Agar (MGA) และ Peptone PCNB Agar (PPA) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA มาวางบนอาหารแต่ละชนิด เป็นจำนวน 5 จานเลี้ยงเชื้อ (ซ้ำ) ต่อไอโซเลทแล้วนำไปบ่มในที่แสงสลบมืดเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน นอกจากนี้ มีการนับจำนวนแมคโครโคนิเดียและไมโครโคนิเดียของเชื้อรา *Fusarium* spp. แต่ละไอโซเลทบนอาหารชนิดต่างๆ โดยใช้ Haemocytometer ตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลขนาดของแมคโครโคนิเดียและไมโครโคนิเดียของเชื้อรา *Fusarium* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมบันทึกภาพ

การเตรียมเส้นใยและการสกัดดีเอ็นเอ

การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) จากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร SNA โดยการใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้น จำนวน 5 ชิ้นแล้วนำไปใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตรที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อบรรจุอยู่ ปริมาตร 1 มิลลิเมตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิเมตรใส่ลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้พร้อมเขย่าเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่อง vacuum pump และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 300

มิลลิลิตรเก็บเส้นใยที่กรองได้ในกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Lyophilizer เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วนำไปบดด้วยไนโตรเจนเหลว แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่บดแล้วปริมาณ 0.05 กรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCL, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol 0.5 vol. และ chloroform: IAA 0.5 vol. สกัดโปรตีนออกด้วยการนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสย้ายใส่หลอดใหม่ เติม RnaseA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม chloroform: IAA 1 vol. ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม ethanol 2 vol. แล้วเก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ปริมาตร Ethanol 50-100 มิลลิลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำ 2 ครั้งเก็บตะกอน DNA ที่แห้งแล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA) ดัดแปลงจาก Zimand *et al* (1994)

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis และเติม 0.1% Gel star เมื่อเจลแข็งตัวนำมาตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ 100 bp. Lamda DNA / EcoRI + Hind III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard marker) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR) ของเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยเครื่องหมาย Inter simple sequence repeat (ISSR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนซ้ำ (simple sequence repeat) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GCG(CGA)₅, (CAG)₅ และ (GTG)₅ อย่างละ 10 pmole 1X buffer 2.5 mM MgCl₂ 0.2 mM dNTP mix และ 1 unit Taq DNA polymerase (Takara) โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 37 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Biometra รุ่น: T-Gradient) จากนั้นนำ PCR product มาทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ 100 base pair plus เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard marker) เพื่อเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ผลและวิจารณ์

การรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Fusarium* spp. และการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Fusarium* spp. จากแหล่งต่างๆ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน จำนวน 24 ไอโซเลท (Table 1) และนำมาทำการทดสอบชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เชื้อรา *Fusarium* spp. สร้างลักษณะสำคัญที่เหมาะสมต่อการจัดจำแนกชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ PDA, SNA, MGA และ PPA พบว่า อาหาร SNA สามารถกระตุ้นให้เชื้อรา *Fusarium* spp.เจริญเติบโตได้เร็วสุด (Figure 1) และสร้าง macroconidia, microconidia ได้จำนวนมากกว่าเชื้อราชนิดเดียวกันบนอาหารชนิดอื่น (Figure 2) และมีขนาดและรูปร่างที่คงที่ ไม่มีเกิดความผัน

แปรระหว่างการเพาะเลี้ยง จากการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร SNA สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum* Schltdl. จำนวน 15 ไอโซเลท *F. solani* (Mart.) Sacc. จำนวน 1 ไอโซเลท *F. verticillioides* J. Sheld. จำนวน 4 ไอโซเลท และ *F. semitectum* (Roberge) Sacc. จำนวน 4 ไอโซเลท (Table 1)

เชื้อรา *F. oxysporum* มีลักษณะ macroconidia ลักษณะสั้นอวบ ปลายเซลล์มีลักษณะสั้นโค้งคล้ายตะขอฐานเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็น foot-shape โดยส่วนมาก มี 3 septa มีขนาด 27×3 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ หรือ กระสวย ไม่มีผนังกันเซลล์ มีขนาด 2.5×3.5 ไมครอน ลักษณะโคโลนีเส้นใยของเชื้อรา มีสีขาว ม่วง และ ชมพู (Figure 4 : A, B)

เชื้อรา *F. solani* มีลักษณะ macroconidia ค่อนข้างสั้น โค้ง โดยส่วนมาก มี 3-7 septa มีขนาด 40.1×5 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ หรือ กระสวย มี 0-1 septum มีขนาด 10.4×3 ไมครอน ลักษณะโคโลนีเส้นใยของเชื้อรา มีสีขาว เหลือง และ เทาอมม่วง (Figure 4 : C, D)

เชื้อรา *F. verticillioides* (Sacc.) (syn *F. moniliforme*) มีลักษณะ macroconidia ลักษณะค่อนข้างยาว ปลายเซลล์มีลักษณะโค้ง ฐานเซลล์ เป็นรูปราง

foot-shape ค่อนข้างมนมี 3-6 septa มีขนาด 26×2.5 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ หรือ กระสวย ไม่มีผนังกันเซลล์ มีขนาด 7.3×2 ไมครอน ลักษณะโคโลนีเส้นใยของเชื้อรา มีสี ขาว ม่วง และ ชมพู (Figure 4 : E, F)

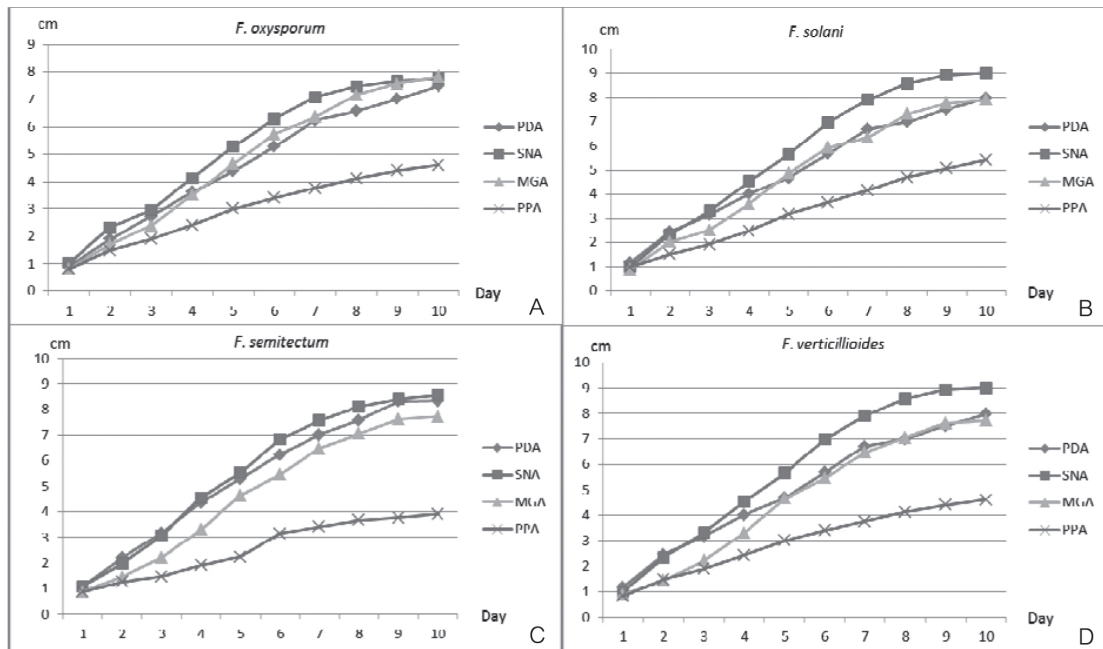
เชื้อรา *F. semitectum* (syn. *F. incarnatum*) มีลักษณะ macroconidia ลักษณะเรียวยาว โค้ง ปลายเซลล์มีลักษณะโค้งคล้ายเป็นปุ่ม ฐานเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็น foot-shape โดยส่วนมาก มี 3-5 septa มีขนาด 30.2×3.4 ไมครอน ส่วน microconidia มีลักษณะเป็นรูปกระสวย มี 3-5 septa มีขนาด 8.3×3.3 ไมครอน ลักษณะโคโลนีเส้นใยของเชื้อรา มีสี ส้ม และ น้ำตาล (Figure 4 : G, H)

อาหาร SNA สามารถกระตุ้นการสร้างลักษณะต่างๆ ของเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้ ลักษณะโคโลนีมีสีขาวใส เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีความชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้อาหาร SNA มีส่วนในการกระตุ้นการพัฒนาของ conidiogenous cell และ ยังส่งเสริมให้ macroconidia ของเชื้อรา *Fusarium* spp. มีขนาดและรูปร่างคงที่ ผนังกันเซลล์และฐานเซลล์มีความชัดเจน และ ไม่มีความแตกต่างกันในเชื้อรา *Fusarium* สปีชีส์เดียวกัน (Leslie et al., 2006) นอกจากนี้มีรายงานว่า KCI ในอาหาร SNA มีส่วนชักนำให้เชื้อรา *Fusarium* spp. สร้าง microconidia ได้จำนวนมาก (Iqbal et al., 2005)

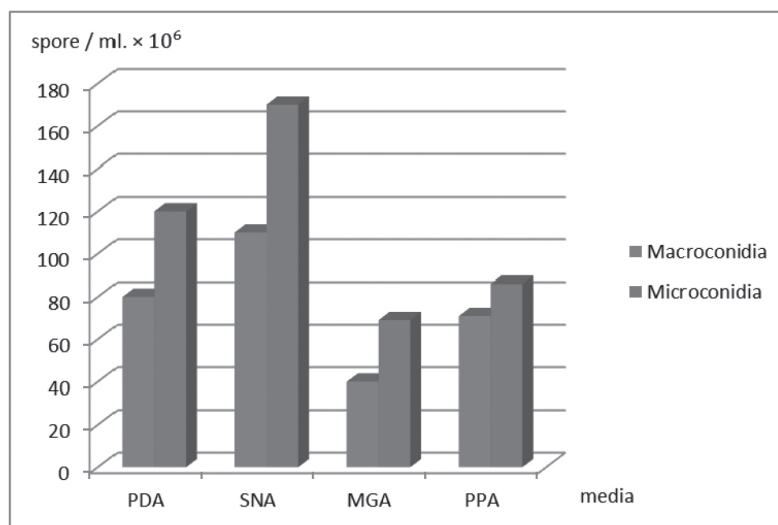
ตารางที่ 1 เชื้อรา *Fusarium* species ต่างๆ ชนิดของพืชอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อ

Voucher No.	Fungal species	Host species	Location
KKFC 517	<i>F. oxysporum</i>	<i>Arachnis flos-aeris</i>	Nakhon pathom
KKFC 518	<i>F. oxysporum</i>	<i>Piper betle</i>	Nakhon pathom
KKFC 521	<i>F. oxysporum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Kanchanaburi
KKFC 522	<i>F. oxysporum</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	Kanchanaburi
KKFC 523	<i>F. oxysporum</i>	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	Ratchaburi
KKFC 524	<i>F. oxysporum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Supanburi
KKFC 525	<i>F. oxysporum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Supanburi
KKFC 527	<i>F. oxysporum</i>	<i>Brassica alboglabra</i>	Nakhon pathom
KKFC 528	<i>F. oxysporum</i>	<i>Apium graveolens</i>	Nakhon pathom
KKFC 529	<i>F. oxysporum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Nakhon pathom
KKFC 530	<i>F. oxysporum</i>	<i>Rhynchosyris</i> sp.	Nakhon pathom
KKFC 531	<i>F. oxysporum</i>	<i>Dendrobium</i> sp.	Nakhon pathom
KKFC 532	<i>F. oxysporum</i>	<i>Vanda tessellata</i>	Nakhon pathom
KKFC 535	<i>F. oxysporum</i>	<i>Aglaonema</i> sp.	Nakhon pathom
KKFC 536	<i>F. oxysporum</i>	<i>Centella asiatica</i>	Nakhon pathom
KKFC 520	<i>F. verticillioides</i>	<i>Oryza sativa</i>	Nakhon pathom
KKFC 576	<i>F. verticillioides</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pathum thani
KKFC 577	<i>F. verticillioides</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pathum thani
KKFC 578	<i>F. verticillioides</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pathum thani
KKFC 551	<i>F. semitectum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chiang Mai
KKFC 552	<i>F. semitectum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chiang Mai
KKFC 553	<i>F. semitectum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chiang Mai
KKFC 554	<i>F. semitectum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chiang Mai
KKFC 529	<i>F. solani</i>	<i>Coffea arabica</i>	Chachoeng sao

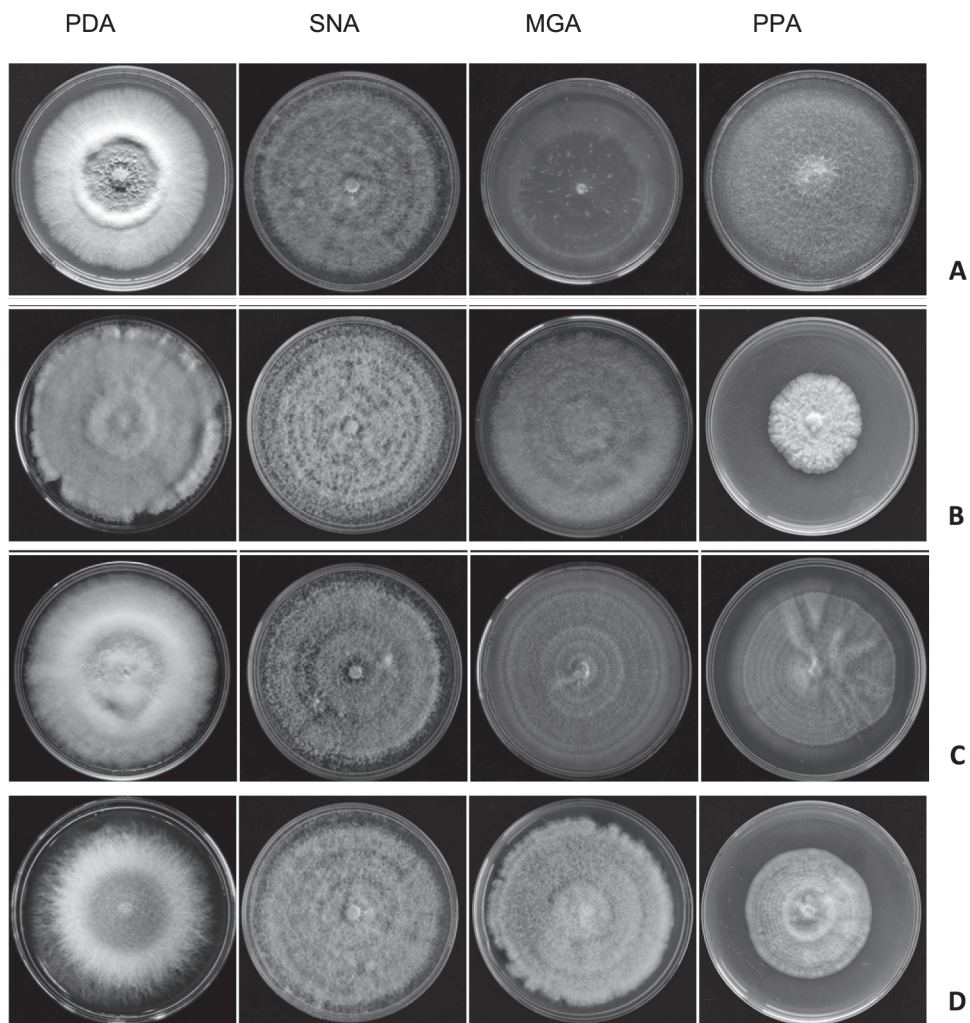
Notation : KKFC = Kasaetsart Kamphaeng Saen Fungal Collection



ภาพที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* spp. บนอาหารชนิดต่างๆ



ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโคนิดี ของเชื้อรา *Fusarium* spp. บนอาหารชนิดต่างๆ.

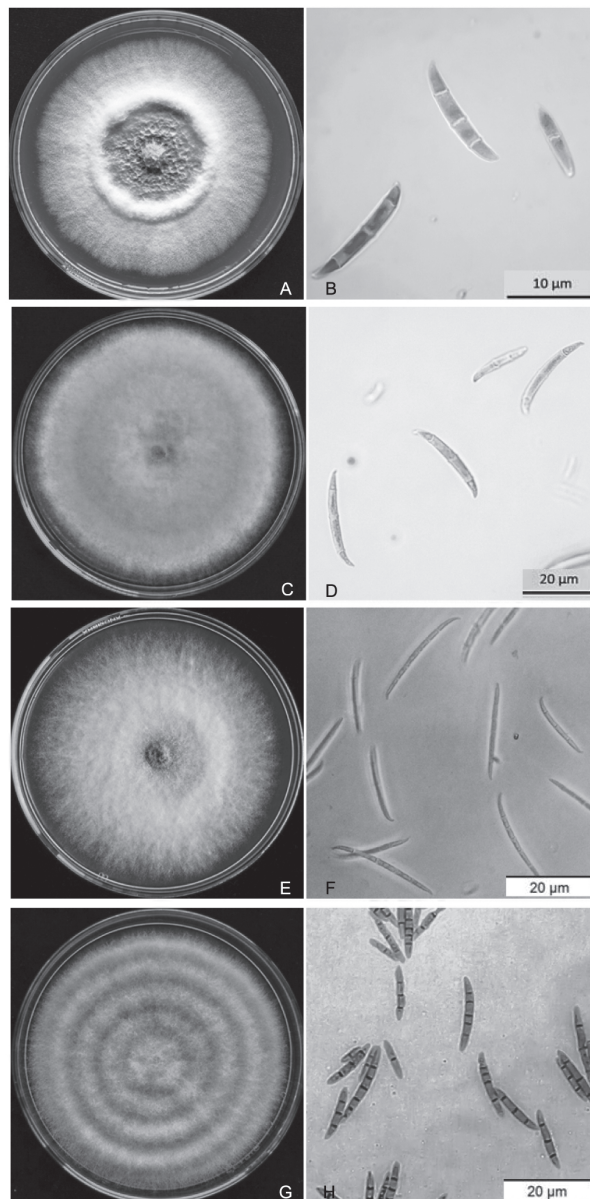


ภาพที่ 3

โคโลนีของเชื้อรา *Fusarium* spp. บนอาหารชนิดต่างๆ (PDA : potato dextrose agar,

SNA : Spezieller-Nährstoffar Agar, MGA : Malachite Green Agar, PPA : Peptone

PCNB Agar) A : *F. oxysporum*, B : *F. incarnatum*, C : *F. solani* และ D : *F. verticillioide*



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *Fusarium* spp. : *F. oxysporum* (A,B), *F. solani* (C, D), *F. verticillioides* (E, F) และ *F. semitectum* (G, H)

ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยเครื่องหมาย ISSR

ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium* spp. จากการวิเคราะห์เครื่องหมาย ISSR ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 3 ชนิด คือ GCG(CGA)₅, (CAG)₅ และ (GTG)₅ พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 12 ไอโซเลท มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลทของเชื้อราชนิดนี้ และค่อนข้างมีความหลากหลายสูง มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300-2,000 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์

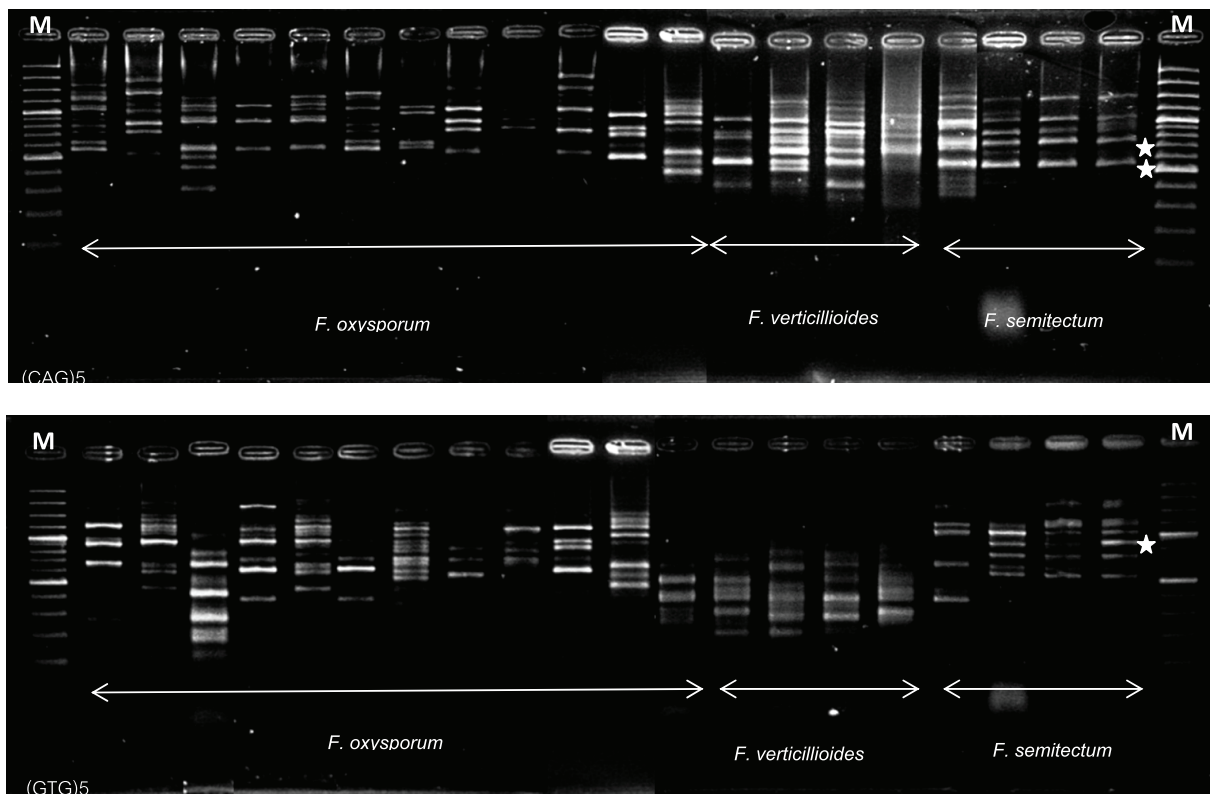
(CAG)₅ และ 100-2,000 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (GTG)₅ (Figure 5) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *F. semitectum* และ *F. verticillioides* ความหลากหลายที่บนแถบดีเอ็นเอสัมพันธ์กับเชื้อรา *F. oxysporum* ได้แยกมาจากพืชอาศัยที่หลากหลายชนิด (Table 1) และความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกัน เชื้อรา *F. verticillioides* จำนวน 4 ไอโซเลท มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 200-1,500 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (CAG)₅ และ 200-900 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณ

ด้วยไพรเมอร์ (GTG)₅ (Figure 5) สำหรับเชื้อรา *F. semitectum* จำนวน 4 ไอโซเลท มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300-1,500 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (CAG)₅ และ 300-2,000 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (GTG)₅ (Figure 5) ในจำนวนไอโซเลทของเชื้อรา *F. semitectum* ที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 1-2 แถบต่อไพรเมอร์ ที่พบเฉพาะในตัวอย่างเชื้อรา *F. semitectum* ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (CAG)₅ และ (GTG)₅ แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันนี้ สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายสำหรับการระบุสปีชีส์ได้ต่อไป สำหรับการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายหรือการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ Sibounnavong *et.al.* (2012) ได้ใช้เครื่องหมาย AFLP สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ และเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่เป็นสาเหตุโรค ซึ่งเครื่องหมาย AFLP สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคและไม่เป็นสาเหตุโรคได้ และแยกกลุ่มตามระดับความรุนแรงของโรค เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fourie *et.al* (2009) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ระหว่าง Vegetative compatibility groups (VCGs) ต่างๆ และสายพันธุ์ที่ไม่ใช่สาเหตุโรค โดยใช้เครื่องหมาย RFLP ที่วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ TEF-MtSSU IGS และ MtR พบว่า สามารถแยกกลุ่มเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ได้สอดคล้องกับการแยกตามกลุ่ม VCGs และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Moore *et.al* (1993) ที่ได้วิเคราะห์ IGS PCR-ISSR ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* และแยกกลุ่มระหว่างไอโซเลทที่เป็นสาเหตุโรคกับไอโซเลทที่ไม่เป็นสาเหตุโรคออกจากกันได้ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลนี้เป็น

เครื่องหมายที่ทำได้เร็ว ง่ายและมีความแม่นยำในการจำแนก สำหรับการศึกษาเครื่องหมาย ISSR ของเชื้อราในจีนัส *Fusarium* นั้น ได้มีการใช้เครื่องหมาย ISSR สำหรับการแยกสปีชีส์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. โดย Bayraktar และ Dolar (2010) ได้วิเคราะห์เครื่องหมาย ISSR ของเชื้อรา *Fusarium* สปีชีส์ต่างๆ ที่สำรวจในแปลงปลูกหัวหอมในประเทศตุรกี พบว่าการเก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดกลุ่มตามวิธี UPGMA พบว่าเชื้อราที่เป็นสปีชีส์เดียวกันรวมอยู่กลุ่มเดียวกัน ตามการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ยกเว้นเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งมีความหลากหลายค่อนข้างสูง สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม ด้วยเครื่องหมาย ISSR

สรุป

อาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อและเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium* species คือ อาหาร SNA ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้าง macroconidia ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. และจากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาสามารถจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 4 สปีชีส์ คือ *F. oxysporum* จำนวน 15 ไอโซเลท *F. solani* จำนวน 1 ไอโซเลท *F. verticillioides* จำนวน 4 ไอโซเลทและ *F. semitectum* จำนวน 4 ไอโซเลทและการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่า มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างไอโซเลทของเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งสอดคล้องกับความหลากหลายพีชีชาติ และการก่อให้เกิดโรคบนพืชนั้นๆ นอกจากนี้ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันใน *F. semitectum* ที่สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่ระบุสปีชีส์ได้ในอนาคต



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่ได้จาก ISSR markers โดยใช้ไพรเมอร์ (CAG)5 และ (GTG)5 , M = 100 base pair plus standard marker

คำขอบคุณ

ผลการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูง แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันธุศาสตร์ และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษาวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Barron, G. L. 1977. The Genera of Hyphomycetes from Soil. 3rd ed., Noble offset printers, Inc., New York. pp. 364
- Bayraktar H., and Dolar F. 2010. Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey. Journal of Plant Pathology. Iowa, USA. Pp. 28-34.

- Domsch, K. H., Gams W. and Traute-Heidi Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. pp. 859.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., and Viljoen A. 2009. Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Vegetative Compatibility Groups. Applied and Environmental Microbiology. Washington, D.C. USA. P. 4770-4781
- Gams, W., H. A. Vander A., A. L. Vander Plaats-Niterink, R. A. Samsom and J. A. Stalpers. 1987. CBS Course of Mycology. 3rd ed., Netherlands. pp. 139
- Iqbal, Z., Dasti, A. A., and Saleem, A. 2005. Selective growth media to study morphological and cultural characteristics of *Fusarium mangiferae*, the cause of mango malformation. Proc. International conference on mango and date palm: Culture and Export. Faisalabad, Pakistan. P. 124-129
- Leslie, J. F. and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing professional. Iowa, USA. P. 6
- Moore, N.Y., Pegg K. G., Allen R.N., and Irwin J. A. G.. 1993. Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Australia. Aust. J. Exp. Agric. 33:797-802.
- Nelson, P. E. 1991. History of *Fusarium* systematics. Phytopathology. Iowa, U.S.A. p. 81: 1045-1048.
- Nelson, P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. U.S.A. pp. 193
- Sibounnavong, P., Unartngam J., and Soyong K. 2012. Genetic variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from tomatoes in Thailand using pathogenicity and AFLP marker. African Journal of Microbiology Research. Nigeria. Vol. 6(27), pp. 5636-5644,
- Wollenweber, H. W. and Reinking O. A.. 1935. Die *Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Berlin: Paul Parey. pp. 355
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycological Res. 98: 531-534.