

# การใช้เทคนิค SSR และ AFLP ในการจำแนกความแตกต่าง ในระดับ race ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

## Use of SSR and AFLP techniques for race characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

หทัยรัตน์ อุไรรงค์<sup>1</sup>, วีระศักดิ์ สักดิ์ศิริรัตน์<sup>2\*</sup>, และพิศาล ศิริธร<sup>2</sup>

Hathairat Urairong<sup>1</sup>, Weerasak Saksirirat<sup>2</sup>, and Pisan Sirithorn<sup>2</sup>

**บทคัดย่อ:** การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมและ race ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) ที่เป็น race มาตรฐาน 4 ไอโซเลต [Fol1 (race 1), Fol2 (race 2), Fol3A (race 3), Fol3N (race 3)] และที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกมะเขือเทศที่สำคัญในประเทศไทยอีกจำนวน 11 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ผลการศึกษา โดยใช้เทคนิค SSR เพื่อการจำแนกเชื้อ Fol นี้ใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์และวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งสิ้น 18 แถบ เมื่อนำผลไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งเชื้อ Fol ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ชัดเจน ได้แก่ กลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศและกลุ่มเชื้อที่ไม่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศ ยกเว้นไอโซเลต CM3 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ไม่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศ อยู่สลับกลุ่มกับไอโซเลต Fol3N (ไอโซเลตที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรค) และมีบางไอโซเลตที่ไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ ได้แก่ ไอโซเลต KK1, KK2, KK3 และ KK4 จึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนไพรเมอร์เพื่อให้สามารถระบุความแตกต่างของไอโซเลตและ race ได้ จากการใช้เชื้อ Fol ในกลุ่มเดียวกันนี้ไปจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ (E-AAG/M-CAA, E-AAG/M-CTC, E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CAC, E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTT, E-ACT/M-CAA, E-ACT/M-CAT, E-ACG/M-CAA และ E-ACG/M-CAC) พบว่า สามารถบอกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลตได้ดีมาก เมื่อนำผลไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม พบว่า สามารถแยกเชื้อ Fol ที่เป็น race มาตรฐานไอโซเลต Fol1 (race 1) ออกจากไอโซเลต Fol2 (race 2), Fol3A (race 3) และ Fol3N (race 3) ได้ แต่ไม่สามารถแยกไอโซเลตที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคออกจากไอโซเลตที่ไม่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคได้

**ABSTRACT:** For race and genetic differentiation, fifteen isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol): four reference races [Fol1 (race 1), Fol2 (race 2), Fol3A (race 3), Fol3N (race 3)] and eleven isolates collected from tomato cultivated field in Thailand, were investigated by using the Simple Sequence Repeat (SSR) and Amplified

<sup>1</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture

<sup>2</sup> สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002.

Plant Pathology Section, Department of Plant Science and Agriculture Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

\* Corresponding author: weerasak@kku.ac.th

Fragment Length Polymorphism (AFLP). The results demonstrated that the differentiation of *Fol* was obtained using SSR technique with 6 pairs of fluorescent labeling primers was carried out with automated DNA sequencer (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer). A dendrogram constructed by using a similarity matrix derived from 18 polymorphic SSR fragments could be classified 15 isolates into two main groups as the pathogenic and non - pathogenic groups, except 2 isolates of CM3 (non - pathogen) and *Fol*3N (pathogen), which were in opposite group. The isolates of KK1, KK2, KK3 and KK4 could be identified when the addition primers were used. DNA fingerprints of these fungi using AFLP technique and 11 combination primers (E-AAG/M-CAA, E-AAG/M-CTC, E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CAC, E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTT, E-ACT/M-CAA, E-ACT/M-CAT, E-ACG/M-CAA and E-ACG/M-CAC) showed an obvious difference of each isolate. The *Fol*1 (race1) was discriminated from *Fol*2 (race2), *Fol*3A (race3) and *Fol*3N (race3) Nevertheless, the result from cluster analysis could not discriminate pathogenic from non - pathogenic isolates. (**Key words:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, SSR, AFLP, race)

## บทนำ

เชื้อ *Fol* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ของมะเขือเทศ มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า โรคเหี่ยวเหลืองระบาดทำความเสียหายในแหล่งปลูกมะเขือเทศทั่วโลก เชื้อชนิดนี้สามารถอยู่ข้ามฤดูหนาวในดินในรูปของสปอร์สามารถทำลายต้นมะเขือเทศได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะให้ผลผลิต การควบคุมโรคนี้สามารถทำได้โดยการอบดินด้วยไอน้ำร้อนซึ่งนิยมทำกันเฉพาะในเรือนกระจก หรือการอบดินด้วยสารเคมีเมทิลโบไมด์ (methyl bromide) แต่การใช้สารเคมีดังกล่าวเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ อีกทั้งยังเกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ และใช้กันอย่างแพร่หลายในทุกพื้นที่ แต่การใช้พันธุ์ต้านทานก็มีข้อจำกัดเพราะเชื้อ *Fol* สามารถพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นอยู่เสมอ นอกจากนี้ยังมีรายงานในต่างประเทศว่าเชื้อ *Fol* มี 3 race คือ race 1, 2 และ 3 เชื้อ *Fol* race 1 มีรายงานในปี ค.ศ. 1886 ในแปลงปลูกมะเขือเทศ ต่อมาเกิดการระบาดรุนแรงของ race นี้ ในรัฐอาร์คันซอ ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำความเสียหายต่อผลผลิตมะเขือเทศเป็นมูลค่านับล้านเหรียญสหรัฐ (Marlatt et al., 1996) สำหรับเชื้อ *Fol* race 2 พบระบาดครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาเช่นกันที่รัฐ Ohio ในปี ค.ศ. 1945 อีก 49 ปีต่อมาหลังจากที่เชื้อ *Fol* race 1 ระบาด (Alexander and Tucker, 1945) อีก 29 ปีต่อมาคือ ปี ค.ศ. 1978 พบเชื้อ *Fol*

race 3 ระบาดในประเทศออสเตรเลีย (Grattidge, 1982) ต่อมา มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Fol* race 3 นี้ในหลายรัฐของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ รัฐ California, Florida, Arkansas, North California และที่ Tennessee (Bost, 2001) โดย race ที่มีความสำคัญ คือ race 3 เนื่องจากเชื้อสามารถถ่ายทอดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ดังกล่าวข้างต้นทำให้การศึกษาเพื่อระบุ race ของเชื้อมีความสำคัญมากในปัจจุบัน ทั้งนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบว่าเป็น race ไດ และเพื่อใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ เพื่อออกใบรับรองปลอดโรคพืชและการส่งออก

การจัดจำแนกและการระบุ race ของเชื้อส่วนใหญ่จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบการทำให้เกิดโรคกับพันธุ์มะเขือเทศที่มีถิ่นต้านทานที่เป็น specific dominant resistant genes ซึ่งเรียกพันธุ์พืชจำพวกนี้ว่า พันธุ์พืชอาศัยตรวจสอบ race (differential host) (Grattidge, 1982) การจำแนก race โดยวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ คือ อายุของพืชอาศัยต้องเท่ากัน สภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกัน ใช้ต้นกล้าจำนวนมาก วิธีการทำยุ่งยาก ต้องระมัดระวังการปนเปื้อน และใช้ระยะเวลานาน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการในการจัดจำแนกและระบุ race ของเชื้อโดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ตัวอย่างเช่น การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence analysis) ซึ่งวิธีการดังกล่าวใช้ในการจัดจำแนกได้ดีและแม่นยำ รวมทั้งทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของเชื้อหรือวิวัฒนาการของเชื้อ

อีกด้วย จึงเป็นที่น่าสนใจยิ่งในการศึกษาหาเทคนิค และวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่เหมาะสมในการ จำแนกความแตกต่างระหว่าง race ของเชื้อ *Fol* เพื่อเป็น การจัดอุปสรรคในการจัดจำแนก สร้างความแม่นยำ และรวดเร็วในการตรวจสอบ รวมทั้งเป็นฐานข้อมูล เกี่ยวกับ race ของเชื้อ *Fol* โดยเฉพาะที่พบในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นพื้นที่หลักของการผลิต เมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

## วิธีการศึกษา

### 1. สายพันธุ์เชื้อราที่นำมาศึกษา

เชื้อ *Fol* จำนวน 15 ไอโซเลต ที่นำมาศึกษา ได้แก่ ไอโซเลตที่เป็น race มาตรฐาน 4 ไอโซเลต [*Fol1* (race 1), *Fol2* (race 2), *Fol3A* (race 3) และ *Fol3N* (race 3)] และที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกมะเขือเทศที่สำคัญใน ประเทศไทยอีกจำนวน 11 ไอโซเลต (CM1, CM2, CM3, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6 และ KS) ซึ่งบ่งชี้ race โดย Bunyatratchata (2006)

### 2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อทั้งหมดจากข้อ 1 เลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ป่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ใช้แผ่นสไลด์แก้วที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วชุบ เส้นใยของเชื้อไปดให้ละเอียดในโถงที่เติมไนโตรเจน เหลว แล้วเติม extraction buffer [CTAB 2 เปอร์เซ็นต์, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2-mercaptoethanol จำนวน 600 และ 3 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้ส่วนผสมเข้ากัน ดูดใส่หลอดไมโครเซน ตรีฟิวจ์ เติมน้ำ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยการกลับหลอดขึ้นลง นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาที นาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่าของส่วนน้ำใส โดยค่อยๆ ผสมด้วยการกลับหลอดขึ้นลง นาน 5 นาที

จะพบดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวขุ่น เก็บตะกอนดีเอ็นเอ โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง (ล้างตะกอนด้วยวิธีเดียวกันนี้จำนวน 3 ครั้ง) ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงนำไปละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร จากนั้นหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง spectrophotometer และโดยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) เก็บ ดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ ในการศึกษาต่อไป

### 3. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR)

นำดีเอ็นเอจากข้อ 2 มาทำการเจือจางให้มีความ เข้มข้นเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ (Table1) (Bogale et al., 2005) ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อรา 2 ไมโครลิตร, 100mM dNTPs mix 1 ไมโครลิตร, 10x ImmoBuffer 1 ไมโครลิตร, 50mM MgCl<sub>2</sub> 0.5 ไมโครลิตร, DNA polymerase (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc. 5 unit/μl) 0.05 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ forward และ reverse (5μM) อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร, สีฟลูออเรสเซนต์ FdCTP 0.01 ไมโครลิตร และเติม deionized H<sub>2</sub>O ให้มีปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 10 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler จำนวนรอบ เวลา และอุณหภูมิของแต่ละช่วงเป็นดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ; 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที, 50 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที 40 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ จากนั้นแยกขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer และใช้โปรแกรม GeneScan ในการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR

**Table 1** The microsatellite primer sequences and repeat motif of *Fusarium* sp.

| Primers | SSR motif                            | Primer sequences (5'→3') | Origin                      |
|---------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| MB2F    | (GT) <sub>11</sub> (GA) <sub>6</sub> | TGCTGTGTATGGATGGATGG     | NCBI accession no. AY931024 |
| MB2R    |                                      | CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG   | (Bogale et al., 2005)       |
| MB10F   | (AAC) <sub>6</sub>                   | TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC   | NCBI accession no. AY931028 |
| MB10R   |                                      | TTGCAATTACCTCCGATACCAC   | (Bogale et al., 2005)       |
| MB11F   | (GGC) <sub>7</sub>                   | GTGGACGAACACCTGCATC      | NCBI accession no. AY931025 |
| MB11R   |                                      | AGATCTCCACCTCCACCTC      | (Bogale et al., 2005)       |
| MB14F   | (CCA) <sub>5</sub>                   | CGTCTCTGAACCACCTTCATC    | NCBI accession no. AY931027 |
| MB14R   |                                      | TTCCTCCGTCCATCCTGAC      | (Bogale et al., 2005)       |
| FS7F    | (CAA) <sub>8</sub>                   | CAGTGCCAGGCCATCCAAAAT    | Hathairat Urairong          |
| FS7R    |                                      | TGCAGATATGGTTGTTGTGATGGA | (non public)                |
| FS19F   | (CAC) <sub>5</sub>                   | CTGAGAAACACGAGCCACAA     | Hathairat Urairong          |
| FS19R   |                                      | CTGACCCGGAACGCACAAAG     | (non public)                |

และโปรแกรม Genotyper (PE Applied Biosystems) ในการวิเคราะห์ข้อมูลแบบจัดกลุ่ม นำข้อมูลนั้นมาสร้างเป็น binary matrix นำค่าที่ได้จากตารางไปคำนวณ similarity matrix โดยใช้วิธี Unweighted Pair - Group Method Using the Arithmetic Average (UPGMA) เขียน dendrogram โดยใช้ Neighbor-joining tree การวิเคราะห์ทำได้โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0

#### 4. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

##### 4.1 การคัดเลือก AFLP primer combination

จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol 1* ด้วยเทคนิค AFLP โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Vos และคณะ (1995) ดังนี้

##### 1) ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่มีปริมาณ 250 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR I* และ *Mse I* อย่างละ 2.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (10mM Tris-acetate, 10mM Mg acetate, 50mM potassium acetate และ 5mM DTD, pH 7.5) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *EcoR I* และ *Mse I* Adaptor (ลำดับเบสแสดงใน Table 2) โดยเตรียม ligation mastermix จำนวน 10 ไมโครลิตร

[*EcoR I* adaptor (5-pmol/μl) จำนวน 1 ไมโครลิตร, *Mse I* adaptor (50 pmol/μl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase 1 unit, 10x T4 DNA ligase buffer จำนวน 2 ไมโครลิตร, 0.5M NaCl จำนวน 2 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA] นำ ligation mastermix เติมนลงในดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์สมบูรณ์แล้ว บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 2) Preselective amplification

เจือจางดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor แล้วลง 10 เท่า เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะชิ้นที่ปลาย ทั้ง 2 ข้างที่เชื่อมต่อกับ *EcoR I* adaptor และด้านที่เหลือเชื่อมต่อกับ *Mse I* adaptor นำดีเอ็นเอนี้มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วย preselective primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน adaptor แต่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ปลาย 3' ข้างละ 1 นิวคลีโอไทด์ (+1) ในการทดลองนี้ใช้ preselective primer ที่เป็น *EcoR I* + A และ *Mse I* + C ดังแสดงใน Table 2

ในการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน preselective amplification มีส่วนประกอบดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor เจือจางลงแล้ว 10 เท่า 4 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer (100mM Tris-HCl pH 8.3, 15mM MgCl<sub>2</sub> และ

**Table 2** The sequences of AFLP adaptor and preselective primer.

| Adaptor/primer             | Primer sequences (5'→3') | Size (bp) |
|----------------------------|--------------------------|-----------|
| <b>Adaptor</b>             |                          |           |
| EcoR I adaptor 1           | CTCGTAGACTGCGTACC        | 17        |
| EcoR I adaptor 2           | AATTGGTACGCAGTCTAC       | 18        |
| Mse I adaptor 1            | GACGATGAGTCCTGAG         | 16        |
| Mse I adaptor 2            | TACTCAGGACTCAT           | 14        |
| <b>Preselective primer</b> |                          |           |
| EcoR I + A                 | GACTGCGTACCAATTCA        | 17        |
| Mse I + C                  | GATGAGTCCTGAGTAAC        | 17        |

500mM KCl) 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNA polymerase (Bioline USA Inc.) 1.2 unit, 5pmole dNTPs 2 ไมโครลิตร, 1µM EcoR I + A primer 1 ไมโครลิตร, 8.3 µM Mse I + C primer 2 ไมโครลิตร และเติม deionized H<sub>2</sub>O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler จำนวนรอบ เวลา และอุณหภูมิของแต่ละช่วงเป็นดังนี้ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ; 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 20 รอบ และ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที 1 รอบ

**3) Selective amplification**

โดยใช้ primer combination ระหว่าง EcoR I + 3 nucleotide ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่างๆ ที่ปลาย 5' จำนวน 8 เส้น กับ Mse I + 3 nucleotide 8 เส้น (Table 3) ปฏิบัติดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอจากขั้น preselective amplification ที่เจือจางลง 20 เท่า

3 ไมโครลิตร, 1µM EcoR I primer-Axx 1 ไมโครลิตร, 3µM Mse I primer-Cxx 1 ไมโครลิตร และ AFLP core mix (PE Applied BioSystems) เติม deionized H<sub>2</sub>O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำไปทำ touch down PCR ที่มีโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ; 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที, 66 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 10 รอบ และจากนั้นลดอุณหภูมิลง 1 องศาเซลเซียส ทุกๆ รอบ เมื่อครบแล้วทำอีก 20 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 20 นาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที จากนั้นนำผลผลิต PCR จำนวน 3 ไมโครลิตร ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer

**Table 3** The selective EcoR I and Mse I primer sequences have three selective bases extend into the restriction fragments with fluorescent labelling.

| EcoR I selective primer           | Mse I selective primer        |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| NED-GACTGCGTACCAATTC-AAC (E- AAC) | GATGAGTCCTGAGTAA-CAA (M- CAA) |
| JOE-GACTGCGTACCAATTC-AAG (E- AAG) | GATGAGTCCTGAGTAA-CAC (M- CAC) |
| FAM-GACTGCGTACCAATTC-ACA (E- ACA) | GATGAGTCCTGAGTAA-CAG (M- CAG) |
| FAM-GACTGCGTACCAATTC-ACT (E- ACT) | GATGAGTCCTGAGTAA-CAT (M- CAT) |
| NED-GACTGCGTACCAATTC-ACC (E- ACC) | GATGAGTCCTGAGTAA-CTA (M- CTA) |
| JOE-GACTGCGTACCAATTC-ACG (E- ACG) | GATGAGTCCTGAGTAA-CTC (M- CTC) |
| NED-GACTGCGTACCAATTC-AGC (E- AGC) | GATGAGTCCTGAGTAA-CTG (M- CTG) |
| JOE-GACTGCGTACCAATTC-AGG (E- AGG) | GATGAGTCCTGAGTAA-CTT (M- CTT) |

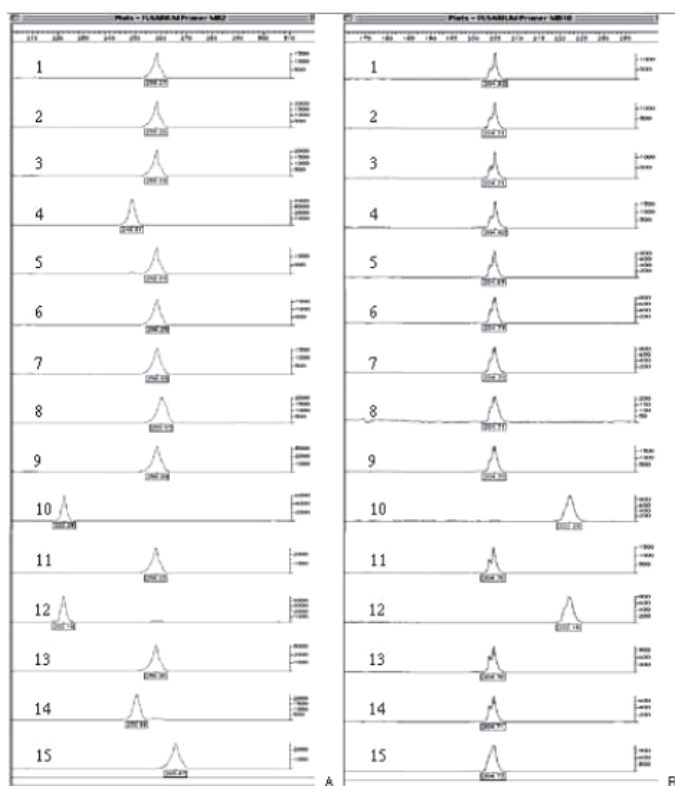
## 4.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* โดยใช้เทคนิค AFLP

นำผลของ primer combination ที่ดีโดยตรวจผลจากข้อ 4.1 เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* จำนวน 15 ไอโซเลต สำหรับขั้นตอนการดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกคู่ของไพรเมอร์ในข้อ 4.1 จากนั้นนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอเชื้อ *Fol* ที่ได้จากเทคนิค AFLP ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer โดยใช้โปรแกรม GeneScan และ Genotyper (PE Applied Biosystems) ในการวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลนี้มาสร้างเป็น binary matrix นำค่าที่ได้จากตารางไปคำนวณ similarity matrix โดยใช้วิธี Unweighted Pair - Group Method Using the Arithmetic Average (UPGMA) เขียน dendrogram โดยใช้ Neighbor-joining tree การวิเคราะห์ทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0

## ผลการศึกษา

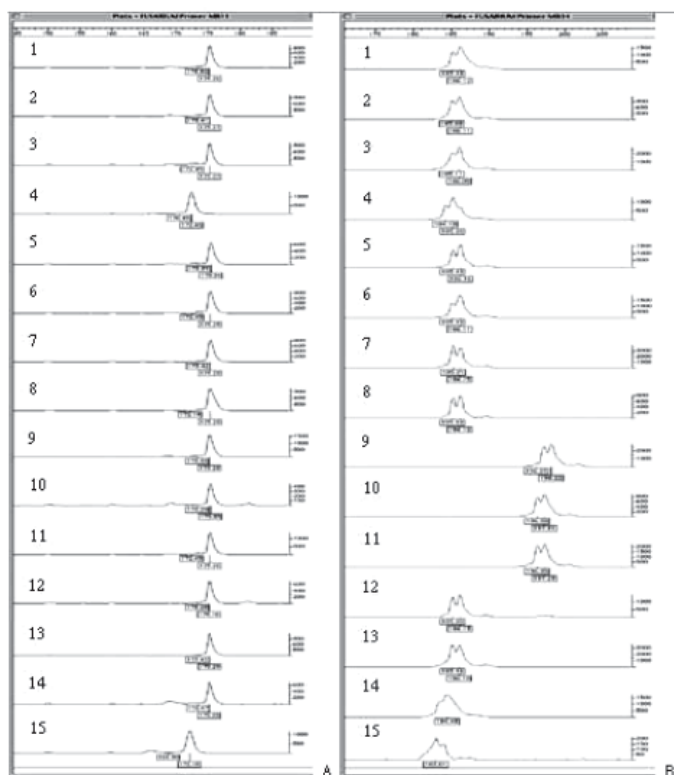
### 1. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR)

จากการศึกษาด้วยเทคนิค SSR ในการจำแนกเชื้อ *Fol* จำนวน 15 ไอโซเลต โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่พบว่า ไพรเมอร์ MB2 (Figure 1A) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 5 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 222 คู่เบส พบในไอโซเลต KK6 และ CM2 แถบดีเอ็นเอขนาด 248 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol*3N แถบดีเอ็นเอขนาด 250 คู่เบส พบในไอโซเลต PP แถบดีเอ็นเอขนาด 258-259 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol*1, *Fol*2, *Fol*3A, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1 และ CM3 และแถบดีเอ็นเอขนาด 265 คู่เบส พบในไอโซเลต KS ส่วนไพรเมอร์ MB10 (Figure 1B) ให้แถบดีเอ็นเอที่มี



**Figure 1** Microsatellite DNA fingerprint profiles of 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* amplified with MB2 primer (A) and MB10 primer (B); when X stand for size of DNA fragment (bp) ; row 1-15 = *Fol*1, *Fol*2, *Fol*3A, *Fol*3N, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, PP and KS respectively.

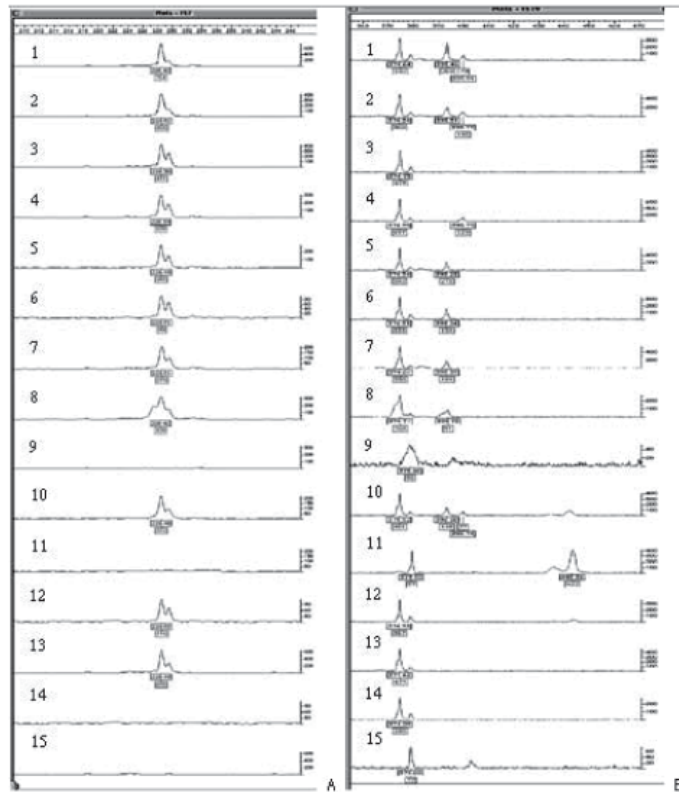




**Figure 2** Microsatellite DNA fingerprint profiles of 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* amplified with MB11 primer (A) and MB14 primer (B); when X stand for size of DNA fragment (bp) ; row 1-15 = *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, PP and KS respectively.

ความแตกต่างกันจำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, CM1, CM3, PP และ KS แถบดีเอ็นเอขนาด 222 คู่เบส พบในไอโซเลต KK6 และ CM2 ส่วนไพรเมอร์ MB11 (Figure 2A) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, CM1, CM3, PP และ KS แถบดีเอ็นเอขนาด 222 คู่เบส พบในไอโซเลต KK6 และ CM2 ไพรเมอร์ MB11 (Figure 2A) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 172 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol3N* และ KS แถบดีเอ็นเอขนาด 175 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3 และ PP ไพรเมอร์ MB14 (Figure 2B) ให้

แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 3 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 183-184 คู่เบส พบในไอโซเลต PP และ KS แถบดีเอ็นเอขนาด 185-186 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, CM2 และ CM3 แถบดีเอ็นเอขนาด 196-198 คู่เบส พบในไอโซเลต KK5, KK6 และ CM1 ไพรเมอร์ FS7 (Figure 3A) ให้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวโดยมีขนาด 228 คู่เบส ในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK6, CM2 และ CM3 ส่วนอีก 4 ไอโซเลต ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ได้แก่ ไอโซเลต KK5, CM1, PP และ KS และไพรเมอร์ FS19 (Figure 3B) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 4 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 374 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol1*, *Fol2*, *Fol3A*, *Fol3N*, KK1, KK2, KK3, KK4, KK6, CM2, CM3 และ PP แถบดีเอ็นเอขนาด 378-379 คู่เบส พบในไอโซเลต KK5,



**Figure 3** Microsatellite DNA fingerprint profiles of 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* amplified with FS7 primer (A) and FS19 primer (B); when X stand for size of DNA fragment (bp) ; row 1-15 = *Fol*1, *Fol*2, *Fol*3A, *Fol*3N, KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, CM1, CM2, CM3, PP and KS respectively.

CM1 และ KS แถบดีเอ็นเอขนาด 393 คู่เบส พบในไอโซเลต *Fol*1, *Fol*2, KK1, KK2, KK3, KK4 และ KK6 และ แถบดีเอ็นเอขนาด 443 คู่เบส พบในไอโซเลต CM1 เมื่อนำข้อมูลที่ได้ของเชื้อ *Fol* 15 ไอโซเลต ทั้ง 6 ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 ได้ค่าระยะห่างของแต่ละไอโซเลต (Table 4) และนำค่าระยะห่างของแต่ละไอโซเลตนี้ไปสร้าง dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของแต่ละไอโซเลต (Figure 4) พบว่า สามารถจัดกลุ่มเชื้อ *Fol* ได้ เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันมาก ได้แก่ กลุ่ม A และ B ซึ่งกลุ่ม A ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ a1 และ a2 โดยกลุ่ม a1 มีจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ *Fol*3A, CM3, KK3, KK4, KK1, KK2, *Fol*1 และ *Fol*2 ส่วนกลุ่ม a2 มีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ KK6 และ CM2 และกลุ่ม B แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ b1 และ b2 โดยกลุ่ม

b1 มีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ KK5 และ CM1 ส่วนกลุ่ม b2 มีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ PP, KS และ *Fol*3N

## 2. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

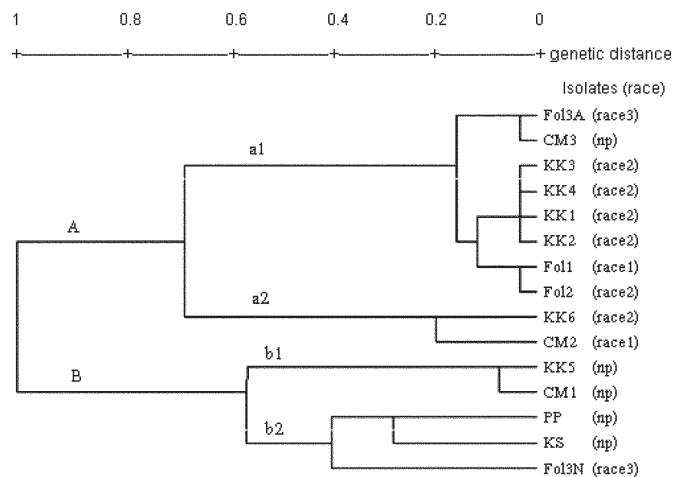
### 2.1 การคัดเลือก AFLP primer combination

ผลการคัดเลือกคู่ของ AFLP ไพโรมอร์ของ *Eco*R I และ *Mse* I selective primer อย่างละ 8 สาย รวมเป็น 64 primer combination โดยใช้เชื้อ *Fol* ไอโซเลต *Fol*1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AFLP เพื่อคัดเลือกคู่ของไพโรมอร์ที่เหมาะสมสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* ทั้งหมด โดยพิจารณาจากจำนวนแถบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนมากและคมชัดเจน ทุกๆ แถบ ผลการคัดเลือกพบว่า มีไพโรมอร์ จำนวน 11 คู่ ที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอคมชัด ได้แก่ ไพโรมอร์



**Table 4** Associations among 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* revealed by 6 pairs of microsatellite primer.

| Isolates | Proximity matrix |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          | Fol1             | Fol2  | Fol3A | Fol3N | KK1   | KK2   | KK3   | KK4   | KK5   | KK6   | CM1   | CM2   | CM3   | PP    | KS    |
| Fol1     | 0.000            |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol2     | 0.000            | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol3A    | 0.154            | 0.154 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol3N    | 0.385            | 0.385 | 0.385 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK1      | 0.077            | 0.077 | 0.077 | 0.462 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK2      | 0.077            | 0.077 | 0.077 | 0.462 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK3      | 0.077            | 0.077 | 0.077 | 0.462 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK4      | 0.077            | 0.077 | 0.077 | 0.462 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |
| KK5      | 0.538            | 0.538 | 0.385 | 0.769 | 0.462 | 0.462 | 0.462 | 0.462 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |
| KK6      | 0.462            | 0.426 | 0.615 | 0.692 | 0.538 | 0.538 | 0.538 | 0.538 | 0.692 | 0.000 |       |       |       |       |       |
| CM1      | 0.615            | 0.615 | 0.462 | 0.846 | 0.538 | 0.538 | 0.538 | 0.538 | 0.077 | 0.769 | 0.000 |       |       |       |       |
| CM2      | 0.426            | 0.426 | 0.308 | 0.538 | 0.385 | 0.385 | 0.385 | 0.385 | 0.692 | 0.308 | 0.769 | 0.000 |       |       |       |
| CM3      | 0.154            | 0.154 | 0.000 | 0.385 | 0.077 | 0.077 | 0.077 | 0.077 | 0.385 | 0.615 | 0.462 | 0.308 | 0.000 |       |       |
| PP       | 0.538            | 0.538 | 0.385 | 0.615 | 0.462 | 0.462 | 0.462 | 0.462 | 0.462 | 0.692 | 0.538 | 0.538 | 0.385 | 0.000 |       |
| KS       | 0.846            | 0.846 | 0.692 | 0.615 | 0.769 | 0.769 | 0.769 | 0.769 | 0.462 | 1.000 | 0.538 | 0.846 | 0.692 | 0.462 | 0.000 |



**Figure 4** Dendrogram for 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* derived from Neighbor-joining tree analysis based on 6 microsatellite primers ; np = non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

E-AAG/M-CAA, E-AAG/M-CTC, E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CAC, E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTT, E-ACT/M-CAA, E-ACT/M-CAT, E-ACG/M-CAA และ E-ACG/M-CAC ไพรเมอร์อื่นที่เหลือให้แถบลายพิมพ์ที่น้อยหรือไม่ชัดเจน

## 2.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* โดยใช้เทคนิค AFLP

เมื่อนำผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้คู่ของไพรเมอร์ทั้ง 11 คู่ จากข้อ 2.1 ไปทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* ทั้ง 15 ไอโซเลต ปรากฏว่าไพรเมอร์ทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอไม่มากนัก โดยอยู่ในช่วง 15-25 แถบต่อไพรเมอร์

ต่อไอโซเลต เท่านั้น ขนาดของซันดิเอ็นเอที่ตรวจพบ มีความยาวอยู่ระหว่าง 50-500 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fol* 15 ไอโซเลต ทั้ง 11 ไพรเมอร์ ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 ได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลต (Table 5) และนำค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลตนี้ไปสร้าง dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของแต่ละไอโซเลต (Figure 5) พบว่า สามารถจัดกลุ่มเชื้อ *Fol* ได้ เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันมาก ได้แก่ กลุ่ม A และ B ซึ่งกลุ่ม A ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ a1 และ a2 โดยกลุ่ม a1 มีจำนวน 8 ไอโซเลต (KK3, KK4, *Fol*3N, KK1, *Fol*2, KK5, CM3 และ PP) ส่วนกลุ่ม a2 มีจำนวน 2 ไอโซเลต (KK2 และ *Fol*3A) และกลุ่ม B แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ b1 และ b2 โดยกลุ่ม b1 มีจำนวน 2 ไอโซเลต (CM1 และ *Fol*1) ส่วนกลุ่ม b2 มีจำนวน 3 ไอโซเลต (KK6, CM2 และ KS)

## สรุปและวิจารณ์

### 1. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR)

ผลการศึกษาดำเนินการใช้เทคนิค SSR ในการจำแนกเชื้อ *Fol* จำนวน 15 ไอโซเลต โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันทั้งหมด 18 แถบ เมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลแบบจัดกลุ่ม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *Fol* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม A เป็นกลุ่มของเชื้อ *Fol* ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศได้ ยกเว้นไอโซเลต CM3 และกลุ่ม B เป็นกลุ่มของเชื้อ *Fol* ที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศได้ ยกเว้นไอโซเลต *Fol*3N ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของมนัสวีและคณะ (2548) ที่ใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จำแนกเชื้อ *Fol* ทั้ง 15 ไอโซเลตนี้ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *Fol* ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศ ออกจากกลุ่มของเชื้อ *Fol* ที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศได้ ยกเว้นไอโซเลต CM3

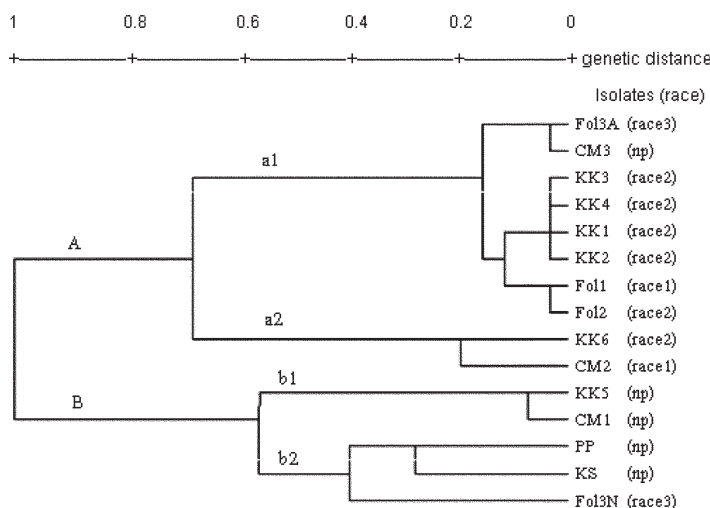
เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี่ยังพบว่า เชื้อ *Fol* ไอโซเลต KK1, KK2, KK3 และ KK4 มีค่า proximity matrix เท่ากับ 0 แสดงว่ามีความเหมือนกันมากหรือมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก แต่เมื่อดูผลจาก Table 6 ซึ่งเป็นผลของ proximity matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของเชื้อ *Fol* ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) จำนวน 11 คู่ของไพรเมอร์ พบว่า มีเฉพาะไอโซเลต KK3 และ KK4 เท่านั้นที่มีความเหมือนกัน (ค่า proximity matrix = 0) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Fol* จำนวน 2 ไอโซเลตนี้ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจริง เช่นเดียวกับการศึกษาด้วยเทคนิค SSR พบว่า ไอโซเลต CM3 มีความเหมือนกับไอโซเลต *Fol*3A กรณีนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ถ้าใช้ไพรเมอร์จำนวนน้อยตำแหน่ง อาจทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลออกมาคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ โดยเฉพาะผลที่ปรากฏว่า 2 ไอโซเลตที่มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม เพื่อให้ข้อมูลในการทดลองนี้มีประโยชน์มากยิ่งขึ้น จึงควรนำผลของการศึกษาเชื้อ *Fol* โดยใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วย จะทำให้มีไพรเมอร์มากพอที่จะศึกษาประชากรของเชื้อ *Fol* อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Bogale และคณะ (2005) กล่าวว่า การใช้ SSR จำนวน 9 ตำแหน่งก็เพียงพอที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *F. oxysporum* ได้

### 2. การวิเคราะห์โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

การจำแนกเชื้อ *Fol* ทั้ง 15 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค AFLP พบว่า คู่ผสมของไพรเมอร์ที่ให้ผลดีมีจำนวน 11 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAA, E-AAG/M-CTC, E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CAC, E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTT, E-ACT/M-CAA, E-ACT/M-CAT, E-ACG/M-CAA และ E-ACG/M-CAC คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้งหมดให้ขนาดของซันดิเอ็นเออยู่ระหว่าง 50-500 คู่เบส และให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 15-25 แถบ ซึ่งนับว่าน้อย เพราะการทดลองนี้ได้เลือกปรับจำนวนเบส

**Table 5** Associations among 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* revealed by 11 pairs of AFLP primer.

| Isolates | Proximity matrix |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          | Fol1             | Fol2  | Fol3A | Fol 3N | KK1   | KK2   | KK3   | KK4   | KK5   | KK6   | CM1   | CM2   | CM3   | PP    | KS    |
| Fol1     | 0.000            |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol2     | 0.484            |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol3A    | 0.796            | 0.363 |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fol3N    | 0.522            | 0.242 | 0.452 |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK1      | 0.459            | 0.140 | 0.427 | 0.051  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK2      | 0.561            | 0.306 | 0.631 | 0.408  | 0.268 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK3      | 0.408            | 0.140 | 0.478 | 0.115  | 0.064 | 0.306 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK4      | 0.446            | 0.140 | 0.401 | 0.153  | 0.025 | 0.255 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| KK5      | 0.631            | 0.325 | 0.586 | 0.299  | 0.146 | 0.452 | 0.274 | 0.146 |       |       |       |       |       |       |       |
| KK6      | 0.866            | 0.688 | 0.834 | 0.561  | 0.535 | 0.854 | 0.573 | 0.586 | 0.580 |       |       |       |       |       |       |
| CM1      | 0.790            | 0.611 | 0.643 | 0.408  | 0.408 | 0.739 | 0.471 | 0.395 | 0.389 | 0.675 |       |       |       |       |       |
| CM2      | 0.796            | 0.592 | 0.841 | 0.503  | 0.529 | 0.822 | 0.389 | 0.490 | 0.662 | 0.720 | 0.656 |       |       |       |       |
| CM3      | 0.745            | 0.274 | 0.535 | 0.287  | 0.236 | 0.478 | 0.197 | 0.287 | 0.408 | 0.771 | 0.618 | 0.484 |       |       |       |
| PP       | 0.611            | 0.268 | 0.580 | 0.204  | 0.191 | 0.535 | 0.255 | 0.280 | 0.338 | 0.637 | 0.522 | 0.567 | 0.312 |       |       |
| KS       | 0.968            | 0.701 | 1.000 | 0.573  | 0.561 | 0.892 | 0.739 | 0.701 | 0.694 | 0.866 | 0.841 | 0.949 | 0.822 | 0.510 | 0.000 |



**Figure 4** Dendrogram for 15 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* derived from Neighbor-joining tree analysis based on 6 microsatellite primers ; np = non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

คัดเลือกที่ปลาย 3' เป็น +3 เบส ทั้งนี้เนื่องจากต้องการให้มีความจำเพาะสูง แต่มีผลทำให้ได้แถบดีเอ็นเอค่อนข้างน้อย การศึกษาครั้งนี้ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิธีติดฉลากที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ข้าง EcoRI ด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ

(automated DNA sequencer) จากนั้นเครื่องจะทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และแปลงเป็นรหัส 0 (ไม่มีแถบ) กับ 1 (มีแถบ) โดยอัตโนมัติ เมื่อนำผลนี้ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ในรูป dendrogram พบว่าเทคนิค AFLP นี้ สามารถศึกษาความหลากหลายของเชื้อ Fol ทั้ง 15 ไอโซเลต ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับกลุ่มนี้

ได้ดี เพราะจะเห็นได้จากค่าความสัมพันธ์หรือระยะห่างแต่ละไอโซเลต มีตั้งแต่ 0 (ไอโซเลต KK3 และ KK4 มีค่าเท่ากัน) และ 1 (ไอโซเลต KS และ Fo3A มีค่าต่างกันมาก) เมื่อดูจาก dendrogram จะสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *Fol* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ระยะห่างเท่ากับ 0.8) ได้แก่ กลุ่ม A และ B กลุ่ม A ยังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (ระยะห่างเท่ากับ 0.4) ได้แก่ a1 และ a2 โดยที่กลุ่ม a1 ประกอบด้วยเชื้อ *Fol* จำนวน 8 ไอโซเลตที่คล้ายกันมาก ได้แก่ เชื้อ *Fol* ที่เป็น race มาตรฐาน 2 และ 3 ได้แก่ ไอโซเลต *Fo2* และ *Fo3N* ตามลำดับ กลุ่มเชื้อ *Fol* ที่เป็น race 2 ได้แก่ ไอโซเลต KK1, KK3 และ KK4 และกลุ่มเชื้อ *Fol* ที่ไม่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศ ได้แก่ ไอโซเลต KK5, CM3 และ PP กลุ่ม a2 ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต ที่คล้ายกันมาก ได้แก่ *Fo3A* และ KK2 สำหรับในกลุ่ม B แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ b1 และ b2 ที่มีความห่างกันทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่ม A โดยที่กลุ่มย่อย b1 ประกอบด้วยเชื้อ *Fol* ไอโซเลต *Fo1* และ CM1 กลุ่มย่อย b2 ประกอบด้วยเชื้อ *Fol* ไอโซเลต KK6, CM2 และ KS ซึ่งจะเห็นว่าในแต่ละกลุ่มจะประกอบไปด้วยเชื้อ *Fol* ที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรคปะปนกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อดูในแง่ของวิวัฒนาการจะเป็นไปได้ว่าไอโซเลต *Fo1* และ *Fo2* มีวิวัฒนาการแยกจากกัน เพราะอยู่กลุ่มใหญ่ต่างกลุ่มกัน สำหรับไอโซเลต *Fo3N* น่าจะมีวิวัฒนาการร่วมกับไอโซเลต *Fo2* แต่มีความห่างมากกว่าไอโซเลต *Fo3N* ถ้าหากดู polymorphism ที่เกิดขึ้นโดยดูจากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน เพื่อการจำแนก race จะพบว่า แถบดีเอ็นเอของทั้ง 11 คู่ผสมของไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบที่เหมือนกัน (common band) มีแถบส่วนน้อยที่ให้ความแตกต่าง และบางไอโซเลตมี common band ที่ต่างออกไป แสดงให้เห็นว่ามีพันธุกรรมที่ต่างกับไอโซเลตอื่นๆ มาก ถ้าทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันเหล่านี้ไปทำการอ่านลำดับเบสแล้วออกแบบเป็นไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ใหม่ จะทำให้การจำแนกหรือระบุความแตกต่างของ race ได้รวดเร็วกว่านี้ เพราะถึงแม้ว่าเทคนิค AFLP จะเป็นเทคนิคที่ดี ให้ polymorphism ได้จำนวนมาก สามารถบอกความแตกต่าง

ของสิ่งมีชีวิตได้ดี ใช้ดีเอ็นเอน้อย ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตนั้นก็ตาม แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการทดลองเพราะมีขั้นตอนหลายขั้น ส่งผลให้ไม่สามารถทำได้รวดเร็วเท่ากับการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะได้

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืนและศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *Fol* และสนับสนุนการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์บางส่วน

## เอกสารอ้างอิง

- มนัสวี ฉายมาด, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, และพรเทพ ถนนแก้ว. 2548. การพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อบ่งชี้ race ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. แก่นเกษตร 33(2): 108-123.
- Alexander, L.J., and C.M. Tucker. 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. J. Agric. Res. 70: 303-313.
- Bogale, M., B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, and E.T. Steenkamp. 2005. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. Molecular Ecology Notes 5: 622-624.
- Bost, S.C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Tennessee. Plant Disease 85: 802.
- Bunyatratchata, W. 2006. Race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, wilt pathogen of tomato, and efficacy of soil fungi for controlling the disease. Ph.D. Dissertation. Department of Plant Pathology, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen.
- Bunyatratchata, W., W. Saksirirat, P. Sirithorn, and P. Theerakulpisut. Race identification of *Fusarium* wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. Khon Kaen Agric. 33(2): 95-107

- Grattidge, R. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease* 66: 165-166.
- Marlatt, M.L., J.C. Correll, P. Kaufmann, and P.E. Cooper. 1996. Two genetically distinct population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease* 80: 1336-1342.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.