

การกระจายตัวของลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองของประชากรลูก รุ่นที่ 2 ในมะระ

Segregation of fusarium wilt resistance in F₂ population of bittergourd

สิวาพร แก้วคำฟู¹, อรพินธุ์ สฤษดิ์สิน^{1*}, Darush Struss²

Siwaporn Kaewkumfu¹, Orapin Saritnum^{1*}, Darush Struss²

บทคัดย่อ: การศึกษาการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกรุ่นที่ 2 ของมะระที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะระสายพันธุ์พ่อ (EW-000254) ที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองกับมะระสายพันธุ์แม่ที่มีความอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลือง (EW-000256) โดยใช้พื้นที่ได้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ในการแบ่งกลุ่มความต้านทานตามสายพันธุ์พ่อ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-10.5 และกลุ่มอ่อนแอตามสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 28-42 พบว่าประชากรลูกรุ่นที่ 1 แสดงลักษณะความอ่อนแอต่อโรคทั้งหมด ซึ่งมีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 จึงมีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมเป็นแบบลักษณะด้อย (recessive trait) การศึกษาการกระจายตัวในประชากรรุ่นที่ 2 จำนวน 235 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ค่า Chi-square test พบว่าอัตราส่วนที่คาดหวังไม่เท่ากับ 1:3 ในประชากรลูกรุ่นที่ 2 โดยพบต้นที่ต้านทานและต้นอ่อนแอต่อโรคเป็น 75 และ 160 ผลการศึกษาแสดงว่าลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระจึงถูกควบคุมด้วยยีนด้อยและอาจถูกควบคุมโดยยีนมากกว่า 2 ยีนขึ้นไป

คำสำคัญ : มะระ, โรคเหี่ยวเหลืองในมะระ, AUDPC, Chi-square test

ABSTRACT: The segregation of fusarium wilt resistance trait in F₂ population of bitter gourd were studied. The parental line was crossed between resistance male parent “EW-000254” and susceptible female parent “EW-000256”. The disease severity was analysed base on the area under the disease progress curve (AUDPC). The cluster of AUDPC can be distinguished into 2 groups. According to the parental line; resistance group had AUDPC range 0-10.5 and susceptible group had AUDPC range 28-42. These criteria of disease resistance was found all susceptible to fusarium wilt in F₁ samples which had AUDPC range 31.5-42. The segregation data from F₁ was showed as susceptible. In F₂ population phenotypic data study of 235 samples were analyzed by chi-square. The plants ratio of resistance to susceptible was 75:160 which did not fitted to the expected ratio 1:3. The study was concluded as the gene that controlling the fusarium wilt resistance is controlled by recessive gene and it is possibly a polygenic resistance.

Keyword: Bitter gourd, fusarium wilt of bitter gourd, AUDPC, Chi-square test

¹ สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Horticulture program, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

² แผนกเทคโนโลยีชีวภาพ, บริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด, เชียงใหม่ 50290

Department of Biotechnology, East West Seed Company, Chiang Mai, 50290

* Corresponding author: orapins343@hotmail.com

บทนำ

มะระ (*Momordica charantia* L.) เป็นพันธุ์ไม้เลื้อยเขตร้อนในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ชื่อสามัญคือ bitter melon (ศศิวิมล และคณะ, 2546) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชียและแอฟริกา นิยมปลูกกันมากในประเทศจีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ และอินเดีย ในประเทศอินเดียเรียกว่า “Karela” (AgriFarming, 2015) ตามรายงานของ USDA-ARS National Nutrient Database พบว่ามะระมีคุณค่าทางอาหารสูงเพราะอุดมไปด้วยวิตามินซี โฟเลต วิตามิน B9 และธาตุเหล็ก (Singh et al, 2015) ดังนั้นมะระจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางอาหารสูงและนิยมนำมาปลูกกันอย่างแพร่หลาย สาเหตุหลักที่ส่งผลต่อการลดลงของคุณภาพและปริมาณผลผลิตของมะระ คือ โรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium wilt*) ซึ่งมีเชื้อสาเหตุมาจาก *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* โดยมีรายงานการลดลงร้อยละ 30 – 50 (Tamilselvi and Pugalandhi, 2015) โรคเหี่ยวเหลืองมีรายงานการพบครั้งแรกที่เมืองซีฮู ประเทศไต้หวัน ในปี ค.ศ. 1985 (Sun and Huang, 1982) โดยเชื้อสาเหตุจะอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน (soil-borne disease) ทำให้การป้องกันและกำจัดโรคเป็นไปได้ยาก (Tamilselvi et al, 2016) พืชที่ถูกทำลายจะมีอาการเหี่ยวเฉา ใบแก่มีเส้นใบเหลืองและตายในที่สุด เมื่อตัดดูส่วนของลำต้นจะพบว่า ท่อน้ำเลี้ยงมีสีน้ำตาล เพราะขาดได้ดีในสภาพดินที่การระบายน้ำไม่ดี แปลงมีน้ำขัง ดินที่มีสภาพเป็นกรดและอุดมภูมิประมาณ 25-34 องศาเซลเซียส (วัลลา, 2550) ในประเทศไต้หวันจึงใช้การต่อยอด (grafting) เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ เพื่อลดการใช้สารเคมี ผลการทดสอบพบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตถึง 82-127 ต้นต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับมะระที่ไม่ต่อยอดที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 16 ต้นต่อเฮกตาร์ (Lin, 2008) จะเห็นได้ว่าโรคเหี่ยวเหลืองเป็นปัญหาหลักของพืชตระกูลแตง ในปีค.ศ.2010 Oumouloud et al (2010) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานของ *F. oxysporum* races 0 และ races 2 ในแคนตาลูปสายพันธุ์ Tortuga พบว่ามีการควบคุมด้วยสองยีนที่เป็นอิสระจากกัน โดยมียีนเด่น 1 ยีนและยีนด้อย คือ *fom-4* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของลักษณะที่ควบคุมความ

ต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ของประชากรลูกรุ่นที่ 2 ในมะระ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

วิธีการศึกษา

การสร้างประชากร

สายพันธุ์พ่อ (EW-000254) ที่ต้านทานและสายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ (EW-000256) ต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์จากบริษัท East-West Seed นำสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ปลูกและผสมกันเพื่อผลิตประชากรลูกรุ่นที่ 1 (F_1) และนำ F_1 ปลูกและผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F_2) จำนวน 235 ต้น

การศึกษาลักษณะการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ของประชากรลูกรุ่นที่ 2 ในมะระ

การทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) โดยใช้ไฮโดรเลต จากจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืช บริษัท East-West Seed ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำไปปลูกเชื้อกับต้นกล้ามะระอายุที่ 14 วันหลังการเพาะเมล็ดกับสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ ประชากรลูกรุ่นที่ 1 (F_1) และประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F_2) จำนวน 235 ต้น ด้วยวิธีจุ่มรากต้นกล้า (root tip) ในสารแขวนลอยสปอร์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 คือ ไม่แสดงอาการของโรค ระดับ 1 คือ แสดงอาการใบซีดและเหลือง ประมาณร้อยละ 1-30 ระดับ 2 คือ แสดงอาการใบเหลืองมากและเหี่ยว ประมาณร้อยละ 31-60 ระดับ 3 คือ แสดงอาการใบเหลืองมากและเหี่ยว ประมาณร้อยละ 61-100 และระดับ 4 คือ พืชตาย (ดัดแปลงจาก Marlatt et al, 1996) และนำค่าจากการประเมิน

ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคไปคำนวณพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC; the area under the disease progress curve) ตามวิธีของ Plank (1963) เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโรคเหี่ยวเหลือง จากนั้นทดสอบหาอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในประชากรลูกรุ่นที่ 2 ในมะระ ด้วยวิธี Chi-square test เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง โดยอัตราส่วนที่คาดหวังเท่ากับ 1:3

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ จากค่า AUDPC สามารถแบ่งกลุ่มความต้านทานออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มต้านทานตามสายพันธุ์พ่อ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-10.5 และกลุ่มอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองตามสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 28-42 (Figure 1) ในประชากรลูกรุ่นที่ 1 (F_1) ลักษณะอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองทั้งหมดเหมือนสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 (Figure 2) ดังนั้น

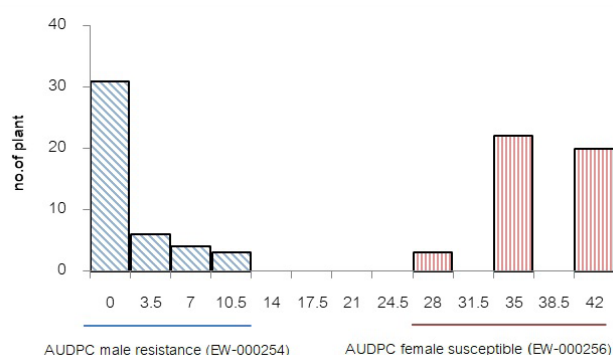


Figure 1 Phenotypic distribution of AUDPC in parental line

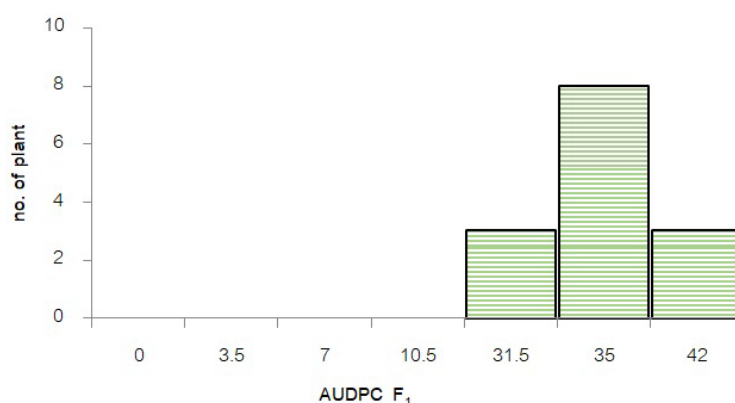


Figure 2 Phenotypic distribution of AUDPC in F_1 (EW-000256 x EW-000254).

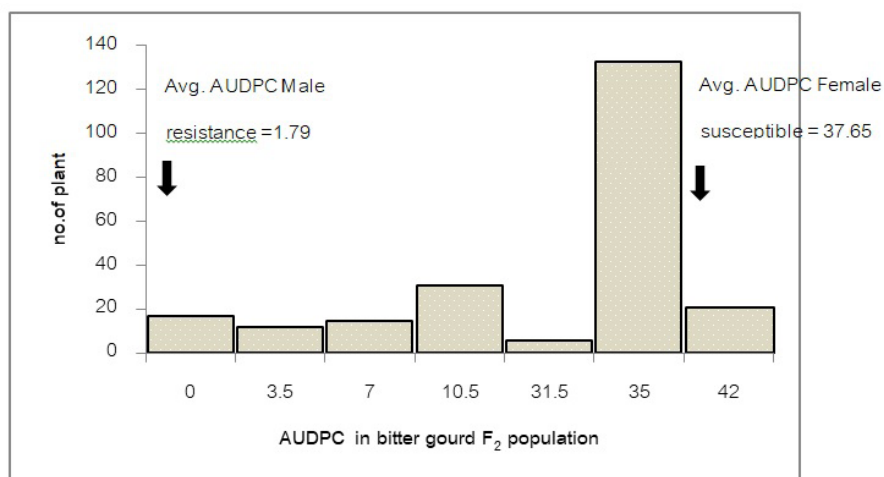


Figure 3 Phenotypic distribution of AUDPC in bitter gourd F₂ population

ลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ดังนั้นลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองจึง มีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของเป็นลักษณะด้อย (recessive trait) จากนั้นศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานในประชากรลูกรุ่นที่ 2 มีอัตราส่วนของต้นต้านทานต่อต้น อ่อนแอ เท่ากับ 75:160 มีอัตราส่วนที่คาดหมายไม่เท่ากับ 1:3 จากการทดสอบค่า Chi-square test มีค่าคำนวณได้เท่ากับ 5.99 ซึ่งมีค่าที่มากกว่าค่า Chi-Square ในตารางความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 มีค่าเท่ากับ 3.842 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($p=0.014$)

(Table 1) แสดงว่าลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระอาถูก ควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 คู่ และมีการกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากรลูกรุ่นที่ 2 ไปในทางลักษณะอ่อนแอต่อโรค (Figure 3) มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) โดยกราฟมีลักษณะเบ้ขวา (negative skew) แสดงว่าในประชากรลูกรุ่นที่ 2 ส่วนมากจะแสดงอาการอ่อนแอต่อโรคและมีส่วนน้อยที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง จากการศึกษาในเมล่อน ยีนต้านทาน *Fom-1* (race 2) *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน (single dominant gene) (Tezuka et al, 2009) ในแคนตาลูป (*cantalupensis*) การถ่ายทอดลักษณะต้านทานของ

Table 1 Chi-square test (χ^2) for the segregation of *Fusarium* wilt resistance (expected ratio 1:3) in bitter gourd F₂ population

Generation	Phenotype	AUDPC	Expected ratio	Observed	Expected	chi-square (χ^2)	df	P value
				(O)	(E)			
F ₂	Resistance	R (<10.5)	1	75	58.75	5.99	1	0.014 *
	Susceptible	S (>10.5)	3	160	176.25			

Remark: p-value < 0.05

* statistically significant at the 0.05 level

F. oxysporum races 0 และ races 2 สายพันธุ์ Tortuga ควบคุมด้วยสองยีนที่เป็นอิสระจากกัน โดยยีนเด่น 1 ยีนอาจเป็นยีน *Fom-1* และยีนด้อย คือ *fom-4* (Oumouloud et al, 2010) และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมความต้านทานต่อ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) ของแคนตาลูป พันธุ์ Hemed ด้านทานโรคสูง และ muskmelon พันธุ์ Dulce ที่อ่อนแอต่อโรคในประชากรลูกรุ่นที่ 2 พันธุ์ Hemed มียีนเด่น 1 ยีนที่ควบคุม คือ *Forc-1* และยีนด้อย คือ *forc-2* (Elkabetz et al, 2016) แต่การศึกษากการกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระยังไม่มีการศึกษามาก่อน ในการศึกษาการถ่ายทอดความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระครั้งนี้ พบว่าความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระที่จะถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 คู่ ซึ่งจะต่างไปจากพืชตระกูลแตง เมล่อน และแคนตาลูป ที่ส่วนใหญ่จะถูกควบคุมด้วยยีนเด่น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อสาเหตุและระดับการแสดงออกของพืชแต่ละชนิด

สรุปและข้อเสนอแนะ

การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F_2) ของมะระเป็นลักษณะด้อย (recessive trait) ลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (quantitative trait locus ,QTL) และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงพันธุ์ลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมศรี นนทสวัสดิศรี ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ สนับสนุน และคำแนะนำในการแก้ไข ตลอดระยะเวลาในการดำเนินงานทดลอง และบริษัท East-West Seed ที่ให้การสนับสนุนในด้านพันธุ์มะระในการทดสอบความต้านทาน โรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*

เอกสารอ้างอิง

- วัลลา ดิษฐพงษ์พิชญ์. 2550. โรคพืชผักที่สำคัญในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทอีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด.
- ศศิวิมล แสงผล, เขมฐิติ สาทรกิจ และ ทยา เจริญจิตติกุล. 2546. สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซูปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. <http://Asiafarming.com/bitter-gourd-farming-guide>. ค้นเมื่อ 11 กันยายน 2559.
- AgriFarming. 2015. Bitter gourd farming information guide. Online. Available <http://Asiafarming.com/bitter-gourd-farming-guide>. Accessed 11 September 2016.
- Elkabetz, M., Paris, H. S., Burger, Y., Hanan, A. and Cohen, R. 2016. Two genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). Scientia Horticulturae. 201(57-60).
- Lin, Y. 2008. Grafting techniques for controlling fusarium wilt of bitter gourd. Fruits and Fertilizer Technology Center PT.
- Marlatt, M., Correll, J., Kaufmann, P. and Cooper, P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. Plant Disease. 80(12): 1336-1342.
- Oumouloud, A., Arnedo-Andrés, M., González-Torres, R. and Alvarez, J. 2010. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0 and 2 in melon accession Tortuga. Euphytica. 176(2): 183-189.
- Plank, J. v. d. 1963. Plant diseases: epidemics and control. Plant diseases: epidemics and control. Elsevier
- Singh, D. K., Upadhyay, A. and Agrahari, P. 2015. A Review on Salient Pharmacological Features of *Momordica charantia*. International Journal of Pharmacology. 11(5): 405-413.

- Sun, S. K. and Huang, J.W. 1982. A new Fusarium wilt of bitter gourd in Taiwan. Plant Disease. 67(2): 226-227.
- Tamilselvi, N. and Pugalendhi, L. 2015. Agronomic evaluation of grafted bitter gourd (*Momordica charantia* L.) cultivars for growth and yield. 10(3): 1331-1334.
- Tamilselvi, N. A., Pugalendhi, L. and Raguchander, T. 2016. Exploiting cucurbitaceous species as rootstocks for management of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum*) in bitter gourd. Australian Journal of Crop Science.10(10): 1460-1465.
- Tezuka, T., Waki, K., Yashiro, K., Kuzuya, M., Ishikawa, T., Takatsu, Y. and Miyagi, M. 2009. Construction of a linkage map and identification of DNA markers linked to *Fom-1*, a gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 2 in melon. Euphytica. 168(2): 177-188.