

การแยกความแตกต่างของเชื้อราไรซอกโทเนีย
สาเหตุโรครากเน่าของสตรอเบอรี่
โดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Differentiation of *Rhizoctonia* spp., Causal Agent of
Strawberry Root Rot Disease,
Using DNA Fingerprint Technique

ไกรวุฒิ เกตุอช^{1/} นุชนารถ จงเลขา^{1/} และ อังสนา อัครพิศาล^{1/}
Kraiwut Kateloy^{1/}, Nuchnart Jonglaekha^{1/} and Angsana Akarapisan^{1/}

Abstract : Isolation of plant pathogen from roots of wilted strawberry in 5 plantations located at Ban Borkaew Samoeng district, Mae Ram, Mae Rim district, Inthanon Royal Project Research Station and Angkhang Royal Project Research Station in Chiang Mai province and at Ban Huay Namrin in Chiang Rai province, 70 isolates of *Rhizoctonia* spp. were found. Number of nuclei in mycelial cells were determined by staining with Geimsa stain. Of all, 68 isolates were binucleate *Rhizoctonia* spp. (97%) and two were multinucleate *Rhizoctonia* spp. (3%). After pairing with known 5 tester isolates, only 60 isolates could be classified into various anastomosis grouping (AG) of 3 AG; AG-A, AG-G and AG-P but 10 isolates were unable to identify. The most common AG isolate recovered was AG-A (41.5%) followed by AG-G (37.1%) and AG-P (7.1%). Among unknown, eight isolate were binucleate and did not anastomose with any tester isolates. Frequencies of each AG isolate found were different i.e. AG-A was found from all collection sites whereas AG-G was found from three sites, Mae Rim, Borkaew and Inthanon and AG-P was found from Borkaew only. Fungal DNA was extracted and amplified in the portion of 28S rDNA using the polymerase chain reaction (PCR). These amplified fragments were digested with 4 restriction enzymes (*HhaI*, *MboI*, *MspI* and *TaqI*).

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

It was found that no single restriction enzyme accurately identified all AG. The use of a combination of four restriction enzymes data could group all 75 isolates into 12 groups, which correspond to the AG determination. There was no relation among each group and collection site from using PCR-RFLP technique.

บทคัดย่อ : การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากรากของต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวในพื้นที่เพาะปลูก 5 แห่งคือ บ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง บ้านแม่แรม อำเภอแมริม สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ และแปลงวิจัยโครงการหลวงอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่ และบ้านห้วยน้ำริน จังหวัดเชียงราย พบเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสี Geimsa และตรวจนับจำนวนนิวเคลียสในเซลล์ของเส้นใยพบว่าแต่ละเซลล์มีนิวเคลียส 2 อัน หรือเป็น binucleate *Rhizoctonia* spp. ทั้งสิ้น 68 ไอโซเลท (97%) และพบที่มีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์หรือเป็น multinucleate *Rhizoctonia* spp. 2 ไอโซเลท (3%) จากการจำแนกออกเป็น anastomosis group (AG) ต่าง ๆ พบว่า สามารถจำแนกได้เพียง 60 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย 3 AG ด้วยกันคือ AG-A, AG-G และ AG-P แต่อีก 10 ไอโซเลทไม่สามารถจำแนกได้ เชื้อที่พบมากที่สุดคือ AG-A (41.5%) รองลงมาคือ AG-G (37.1%) และ AG-P (7.1%) ในกลุ่มของเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกได้มี 8 ไอโซเลทเป็น binucleate และไม่สามารถรวมเส้นใยกับ tester isolate ที่มีอยู่ ความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG มีความแตกต่างกันไปกล่าวคือ พบ AG-A ในทุกพื้นที่ AG-G พบในสามพื้นที่คือ แม่ริม บ่อแก้ว และอินทนนท์ และ AG-P พบที่บ่อแก้วเพียงแห่งเดียว เมื่อทำการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด (*Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Taq*I) พบว่าแต่ละเอนไซม์ไม่สามารถแยกเชื้อที่อยู่ต่าง AG ออกจากกันได้ แต่เมื่อนำข้อมูลทั้ง 4 เอนไซม์มาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้ง 75 ไอโซเลทออกเป็น 12 กลุ่มซึ่งตรงกับการจำแนกออกเป็น AG โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่แยกได้จากการใช้เทคนิค PCR-RFLP กับพื้นที่เก็บตัวอย่าง

Index words: โรครากเน่า สตรอเบอรี่ เชื้อรา โรคชอคโทเนีย เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
Anastomosis group (AG), PCR-RFLP, *Rhizoctonia* spp., strawberry root rot

คำนำ

สตรอเบอรี่ (*Fragaria fragariae*) เป็นไม้ผลเมืองหนาวที่สำคัญชนิดหนึ่งของภาคเหนือ การปลูกสตรอเบอรี่สามารถทำกำไรให้เกษตรกรเฉลี่ยไร่ละ 20,975.33 บาท (กอบปริญา, 2542) แต่ในการเพาะปลูกมักประสบปัญหาเรื่องโรคและแมลงรบกวนอยู่เสมอ โรคที่สำคัญโรคหนึ่งของสตรอเบอรี่คือ โรครากเน่าซึ่งมักเกิดกับแปลงที่มีการปลูกซ้ำที่เดิมอย่างต่อเนื่อง โรคนี้สามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตแต่จะรุนแรงในระยะที่ต้นสตรอเบอรี่ออกดอก-ผล (คณั, 2520) Maas (1998)

รายงานว่าการรากเน่าของสตรอเบอรี่อาจเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกันทั้งลักษณะทางกายภาพของดินที่ไม่เหมาะสม การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชและเชื้อราต่าง ๆ *Rhizoctonia* เป็นราสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคนี้และมีรายงานตั้งแต่ปี 2506 โดย Husain and McKeen (1963) ซึ่งในขณะนั้นให้ชื่อว่า *R. fragariae* สำหรับในประเทศไทย คณั (2520) ได้ศึกษาสาเหตุของโรครากเน่าของสตรอเบอรี่ ซึ่งทำความเข้าใจกับเกษตรกรบ้านช่างเคียน เชียงใหม่และรายงานว่า *R. fragariae* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค แต่เนื่องจากราในสกุล *Rhizoctonia* เป็นเชื้อที่ไม่สร้าง conidia การจัดจำแนก

เป็นสปีชีส์ทำได้ยาก จึงต้องอาศัยลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาต่าง ๆ มาประกอบ ทำให้เกิดความ
ยุ่งยากและผลที่ได้มักไม่แน่นอน ภายหลังจึงมีการนำ
วิธีการจำแนกออกเป็น anastomosis group (AG) มา
ใช้โดยอาศัยความสามารถในการรวมเส้นใย
(anastomosis) กับ tester strain ที่ทราบชนิดแล้วเป็น
เกณฑ์ในการแบ่ง ซึ่งเป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้น
และเป็นที่ยอมรับจนถึงปัจจุบัน ทำให้ทราบว่า
R. fragariae ที่เคยจำแนกไว้ประกอบด้วย 3 AG ด้วย
กันคือ AG-A, AG-G และ AG-I (Martin, 1988; Martin,
2000) อย่างไรก็ตาม วิธีการจำแนกออกเป็น AG เป็น
วิธีที่ต้องใช้ความพยายามและเวลาค่อนข้างมาก โดย
เฉพาะกรณีที่มีตัวอย่างมากและไม่ทราบพืชอาศัยอีก
ทั้งยังมีรายงานการสูญเสียความสามารถในการรวม
เส้นใยของ tester strain หรือเชื้อบางไอโซเลท
ไม่สามารถรวมเส้นใย tester strain ที่มีอยู่ได้
(Masuhara *et al*, 1993; Mazzola, 1997) แสดงให้เห็น
ถึงความจำเป็นในการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล
เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราในสกุลนี้

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทราบ
ชนิดและความถี่ของเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ใน
พื้นที่เพาะปลูกต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่และ
เชียงรายและนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย
ในการจัดจำแนกเชื้อราดังกล่าว

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อ: นำต้นสตรอเบอรี่ที่แสดง
อาการเหี่ยวจากแหล่งเพาะปลูก 4 แห่งในจังหวัด
เชียงใหม่คือ แปลงสถานีวิจัยโครงการหลวง
อินทนนท์ อ.จอมทอง แปลงสถานีวิจัยโครงการ
หลวงอ่างขาง อ.ฝาง แปลงเกษตรกรบ้านบ่อแก้ว
อ.สะเมิง และแปลงเกษตรกร อ.แม่ริม และ 1 แหล่ง

เพาะปลูกในจังหวัดเชียงรายคือแปลงเกษตรกรบ้าน
ห้วยน้ำริน อ.เวียงป่าเป้า นำมาล้างทำความสะอาด
เลือกรากที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมาตัดให้ได้ขนาด
ประมาณ 0.5 ซม. นำเชื้อที่ผิวด้วย 10% Clorox นาน
3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำมาวางบน
อาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสม
streptomycin sulfate 50 ไมโครกรัม/ลิตร บ่มเชื้อที่
อุณหภูมิห้องจนพบเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจึงแยก
มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกไอโซเลทที่
มีลักษณะเส้นใยของราในสกุล *Rhizoctonia* เก็บไว้
ใช้ในการศึกษาต่อไป

การจำแนก Anastomosis group (AG):
นำเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้มาตรวจนับจำนวน
นิวเคลียสโดยเลี้ยงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย 2%
water agar (WA) บาง ๆ บ่มเชื้อในสภาพชื้นนาน 3
วันแล้วนำมาย้อมด้วยสี Geimsa ตามวิธีการของ
นิพนธ์ (2544) เมื่อทราบจำนวนนิวเคลียสแล้วจึงนำ
มาทดสอบความสามารถในการรวมเส้นใยกับ tester
strain (ตารางที่ 1) โดยนำมาเลี้ยงคู่กันบนสไลด์แก้ว
ที่เคลือบ 2% WA บาง ๆ บ่มเชื้อในสภาพชื้น
ประมาณ 36 ชั่วโมง จึงเริ่มตรวจผลภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์ เชื้อราคู่ใดที่เส้นใยเจริญเข้าหากันและ
เกิดการรวมเส้นใย ไม่ว่าจะพบการตายของเซลล์ที่อยู่
โดยรอบจุดรวมเส้นใยหรือไม่ก็ตามถือว่าเชื้อราคู่นั้น
อยู่ใน AG เดียวกัน

Table 1 List of *Rhizoctonia* tester strain used for anastomosis grouping^{1/}.

Binucleate <i>Rhizoctonia</i>	Isolate	Binucleate <i>Rhizoctonia</i>	Isolate
AG-A	C-517	AG-J	STC-23
AG-Ba	C-484	AG-K	FAS2909W
	SIR-2	AG-L	FKO-2-26
AG-Bb	C-455	AG-O	FKO-6-2
AG-C	OR706	AG-P	C-578
AG-D	W-12	AG-Q	C-620
AG-E	F-18	AG-R	Bn-39
AG-F	AH-6	Multinucleate	
AG-G	AH-9	<i>Rhizoctonia</i>	Isolate
AG-H	STC-9		
AG-I	AV-2	<i>R. solani</i> AG-5	ST2-1

^{1/} All tester strain provided by A., Ogoshi and N., Shigeo, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

PCR-RFLP: เลี้ยงเชื้อราในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาแต่เส้นใย นำไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Roger and Bendich (1988) เพิ่มปริมาณในส่วน of 28S rDNA ด้วยเครื่อง PTC-100TM (MJ Research, USA) ในปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 1X QIAGEN PCR buffer (Tris – Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂) 1X Q-solution, dNTP mix เข้มข้นอย่างละ 0.2 mM, primer LROR (5' - ACCCGCTGAACCTTAAGC-3' -) และ LR7 (5' - TACTACCACCAAGATCT-3' -)(Cubetaและคณะ, 1991) เข้มข้นอย่างละ 0.2 mM เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN, Germany) 1 unit น้ำกลั่น และดีเอ็นเอแม่แบบโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94°C นาน 3 นาที แล้วเข้าสู่ cycle ซึ่งประกอบด้วย denaturing ที่ 94°C 1 นาที annealing ที่ 52°C 45 วินาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 cycle ตามด้วย final extension ที่ 72°C 10 นาที PCR-

product ที่ได้จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI*, *MboI*, *MspI* และ *TaqI* (NEB, UK) ครั้งละ 1 ชนิดแยกกัน ตรวจสอบผลโดยการทำ gel electrophoresis บน 1.5% agarose และใช้ 100 bp ladder (NEB, UK) เป็น molecular weight marker ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV

การบันทึกผล: บันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยแต่ละแถบจะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี Unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) และใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Dice ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows release 9.0

ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อจากรากสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวในพื้นที่เพาะปลูก 5 แห่งของจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ได้เชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลทเมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสี Geimsa และตรวจนับจำนวนพบเชื้อราที่มีจำนวนนิวเคลียสในแต่ละเซลล์เท่ากับสอง (binucleate) จำนวน 68 ไอโซเลท คิดเป็น 97% (ภาพที่ 1) และเชื้อราที่มีจำนวนนิวเคลียสในแต่ละเซลล์มากกว่าสอง (multinucleate) จำนวน 2 ไอโซเลท (3%) หลังจำแนกออกเป็น anastomosis group (AG) พบ binucleate *Rhizoctonia* AG-A จำนวน 29 ไอโซเลท (41.5%) AG-G 26 ไอโซเลท (37.1%) AG-P 5 ไอโซเลท (7.1%) และ unknown 10 ไอโซเลท (14.3%) แบ่งออกเป็น unknown binucleate 8 ไอโซเลท และ unknown multinucleate 2 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาตามพื้นที่เก็บตัวอย่างพบว่า ตัวอย่างจากสถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์พบจำนวน 14 ไอโซเลท เป็น binucleate ทั้งหมด ประกอบด้วย AG-A 7 ไอโซเลท และ AG-G 7 ไอโซเลท ตัวอย่างจากบ้านบ่อแก้วพบจำนวน 18 ไอโซเลท เป็น binucleate ทั้งหมดเช่นกัน ประกอบด้วย AG-A 8 ไอโซเลท AG-G 5 ไอโซเลท และ AG-P 5 ไอโซเลท ตัวอย่างจากอำเภอแมริมพบจำนวน 20 ไอโซเลท เป็น binucleate 18 ไอโซเลท ประกอบด้วย AG-A 4 ไอโซเลท AG-G 14 ไอโซเลท และเป็น multinucleate 2 ไอโซเลทซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ ตัวอย่างจากสถานีวิจัยโครงการหลวงอ่างปางพบ binucleate *Rhizoctonia* AG-A เพียงอย่างเดียวจำนวน 9 ไอโซเลท และตัวอย่างจากบ้านห้วยน้ำรินพบจำนวน 9 ไอโซเลท

เป็น binucleate *Rhizoctonia* AG-A 1 ไอโซเลท และที่ไม่สามารถจำแนกได้ 8 ไอโซเลท (ตารางที่ 2)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA พบ PCR-product 3 รูปแบบคือ 1.4 kb, 1.8 kb และ 1.4 + 1.8 kb เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิดพบว่า ผลจากแต่ละเอนไซม์ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ตรงกับการจำแนกออกเป็น AG แต่เมื่อนำผลของทั้ง 4 เอนไซม์มาวิเคราะห์ร่วมกันสามารถแบ่งกลุ่มได้ทั้งสิ้น 12 กลุ่ม ตรงกับการจำแนกออกเป็น AG และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละกลุ่มกับพื้นที่เก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 3) กลุ่มที่ 1 เป็น AG-P มีสมาชิกจำนวน 6 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.4 kb กลุ่มที่ 2 เป็น AG-G มีสมาชิกจำนวน 9 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.4 kb กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อ Unk-bi มีสมาชิกจำนวน 8 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.4 kb กลุ่มที่ 4 เป็น AG-A มีสมาชิกจำนวน 9 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.4 kb กลุ่มที่ 5 เป็น AG-G มีสมาชิกจำนวน 18 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.4 kb กลุ่มที่ 6 มีสมาชิกเพียงไอโซเลทเดียวคือ tester AG-I มี PCR-product ขนาด 1.4 และ 1.8 kb กลุ่มที่ 7 และ 8 เป็น AG-A มี PCR-product ขนาด 1.4 และ 1.8 kb ทั้ง 2 กลุ่ม และมีสมาชิกจำนวน 4 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ กลุ่มที่ 9 และ 10 เป็น AG-A เช่นกัน มี PCR-product ขนาด 1.8 kb และมีสมาชิกจำนวน 9 และ 7 ไอโซเลทตามลำดับ กลุ่มที่ 11 เป็น Unk-multi มีสมาชิกจำนวน 2 ไอโซเลท มี PCR-product ขนาด 1.8 kb และกลุ่มที่ 12 มีเพียงไอโซเลทเดียว คือ tester AG-5 มี PCR-product ขนาด 1.8 kb (ภาพที่ 3 และ ตารางที่ 3)

Table 2 Number of nuclei and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. isolated from 5 plantation sites.

Plantation sites	isolates	Number of nuclei Anastomosis groups (AG)					
		Binucleate	Multinucleate	A	G	P	unknown
Mae Rim	20	18	2	4	14	-	2(multi)
Borkaew	18	18	-	8	5	5	-
Inthanon	14	14	-	7	7	-	-
Angkhang	9	9	-	9	-	-	-
Huay Namrin	9	9	-	1	-	-	8(bi)
Total	70	68	2	29	26	5	10
		(97%)	(3%)	(41.5%)	(37.1%)	(7.1%)	(14.3%)

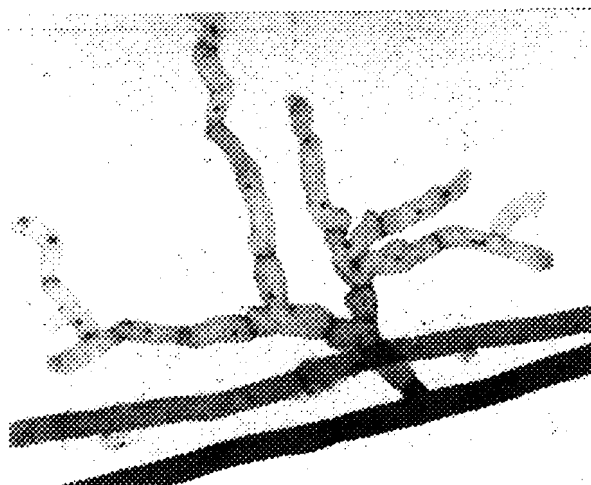


Figure 1 Two nuclei in most cells of the hyphae of binucleate *Rhizoctonia* sp. after stained with Geimsa stain.

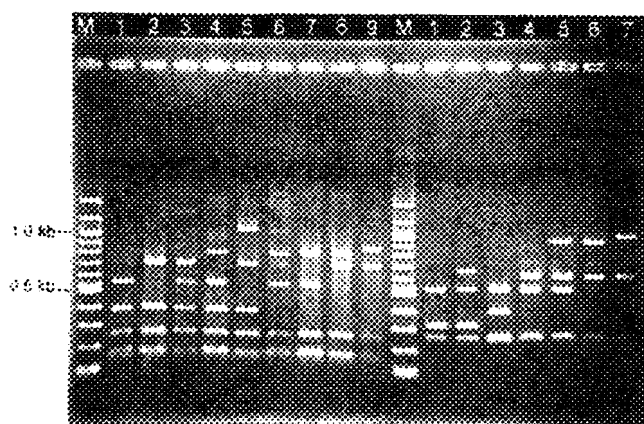
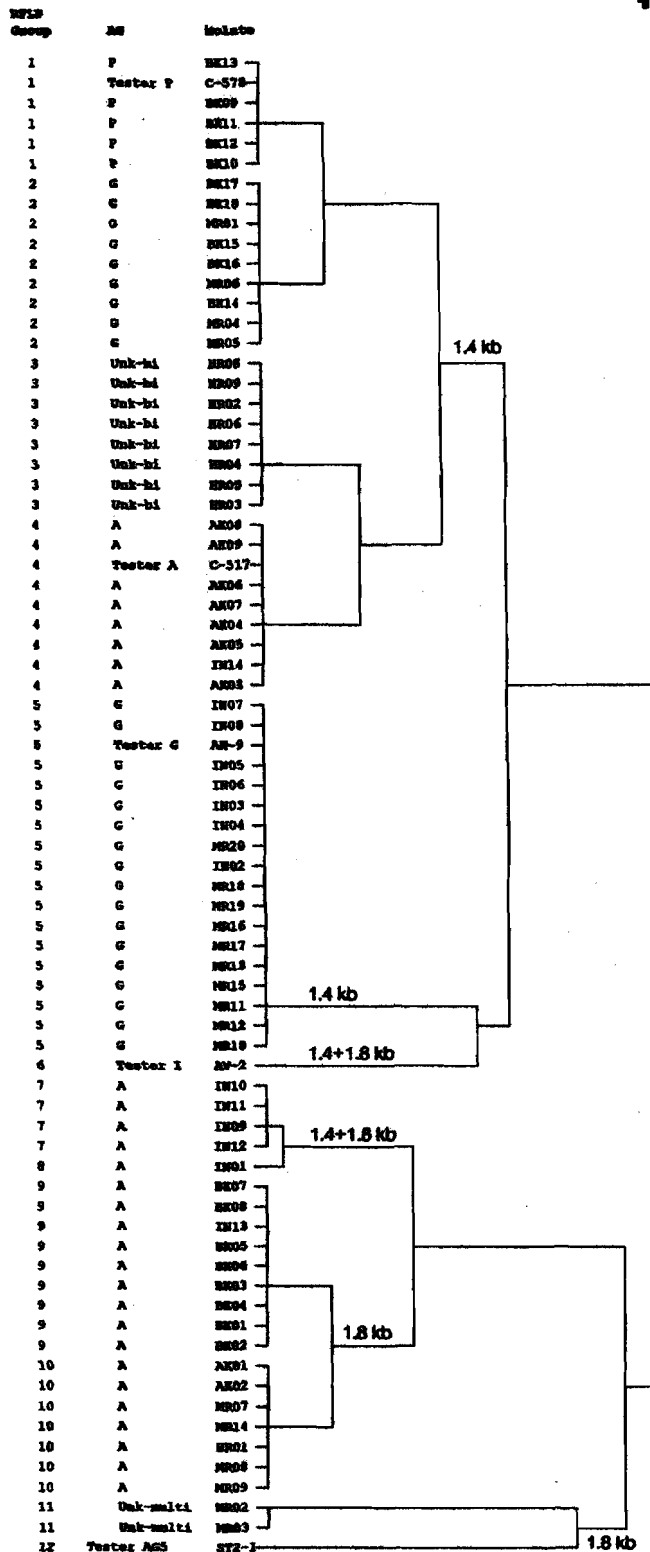


Figure 2 RFLP pattern after treatment of the PCR-amplification products with the restriction endonuclease *HhaI* (lane 1-9, left) and *TaqI* (lane 1-7, right) M = Molecular weight marker (100 bp ladder- NEB, UK).



AK = Angkhang, BK = Borkaew, HR = Huay Namrin, IN = Inthanon, MR = Mae Rim, Unk-bi = Unknown binucleate *Rhizoctonia*, Unk-multi = Unknown multinucleate *Rhizoctonia*

Figure 3 Dendrogram based on RFLP analysis of 75 *Rhizoctonia* spp. isolates. The dendrogram was constructed by cluster analysis of combined data of restriction endonuclease *Hha*I, *Taq*I, *Msp*I, and *Mbo*I using the unweighed pair group method with arithmetic average (UPGMA).

Table 3 Anastomosis groups, RFLP groups, PCR-products and fragment size after treatment with restriction endonuclease *HhaI*, *MboI*, *MspI* and *TaqI* of *Rhizoctonia* spp. .

Anatomosis Group	RFLP	PCR-product		approximately fragment size after digested with restriction enzymes (bp)			
(AG)	Group	1.8	1.4	HhaI	MboI	AspI	TaqI
AG-P	1	-	+	700,370,240,140	760,550,120	730,425,270	520,380,250
AG-G	2	-	+	700,370,240,140	760,550,120	730,425,270	620,520,250
Unknown-binucleate	3	-	+	1,040,700,370,240,140	760,550,120	520,425,270,220	620,520,250
AG-A	4	-	+	550,370,240,140	760,550,120	520,425,270,220	620,520,250
AG-G	5	-	+	700,370,240,140	520,200,120	500,425,270,220	520,330,250
AG-I	6	+	+	700,550,370,240,140	550,500,200,120	850,730,425,270	660,520,330,250
AG-A	7	+	+	840,550,370,240,140	1,000,760,550,120	850,520,425,270,220	950,620,520,250
AG-A	8	+	+	550,370,240,140	1,000,760,550,120	850,520,425,270,220	950,620,520,250
AG-A	9	+	-	840,550,240,140	1,000,760,120	850,520,270,220	950,620,250
AG-A	10	+	-	780,550,240,140	1,000,760,120	850,520,270,220	950,620,250
Unknown-multinucleate	11	+	-	780,550,240,140	760,550,250,200,120	850,520,270,220	950,620,250
AG-5	12	+	-	840,700,240,140	1,000,760,250,120	900,730,570,270	980,620,250

สรุปและวิจารณ์

การแยกเชื้อจากรากสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวจากพื้นที่เพาะปลูก 5 แห่งในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงราย พบเชื้อราในสกุล *Rhizoctonia* ทั้งหมด 70 ไอโซเลท ในจำนวนนี้ 97% เป็น binucleate และ 3% เป็น multinucleate ใกล้เคียงกับรายงานของ Martin (1988) และ Martin (2000) ที่พบรา binucleate *Rhizoctonia* 97% และ 99.2% ตามลำดับ ผลจากการจำแนกรานี้ออกเป็น anastomosis group (AG) พบว่า binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้ประกอบด้วย 3 AG คือ AG-A, AG-G และ AG-P ในจำนวน 41.5, 37.1 และ 7.1% ตามลำดับ แตกต่างจากรายงานของ Martin (1988) และ Martin (2000) ตรงที่พบ AG-P แต่ไม่พบ AG-I สำหรับ AG-P ที่พบในการศึกษครั้งนี้ยังไม่มีรายงานในสตรอเบอรี่มาก่อน ซึ่งผลจากการทำ PCR-RFLP ในส่วน 28S rDNA ก็ให้ผลตรงกัน คือเชื้อที่แยกได้ในการศึกษากครั้งนี้เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-P โดยมีรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิดเหมือนกับ tester AG-P (ภาพที่ 3) มีรายงานว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเช่นกัน โดย Oniki *et al.* (1984) พบว่า *Rhizoctonia* AG-P สามารถทำให้เกิดอาการ black rot กับใบชาได้ (อ้างโดย Sneh *et al.*, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากครั้งนี้ไม่ได้ทำในส่วนของการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค สำหรับ *Rhizoctonia* spp. ที่ไม่สามารถจำแนกได้มีจำนวน 10 ไอโซเลท เป็น multinucleate 2 ไอโซเลท และ binucleate 8 ไอโซเลท ในส่วนของ multinucleate ไม่ได้ทำการศึกษาย่างละเอียดเนื่องจากพบเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น แต่ได้ทดสอบการรวมเส้นใยกับ tester AG-5 ที่มีรายงานในสตรอเบอรี่โดย Martin (1988) และ Martin (2000) และนำไปศึกษาการจัดกลุ่มด้วยเท

คนิก PCR-RFLP ซึ่งก็พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทดังกล่าวไม่สามารถรวมเส้นใยกับ tester AG-5 ได้ และมีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างออกไป สำหรับ binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ทั้ง 8 ไอโซเลทเนื่องจากไม่พบการรวมเส้นใยกับ tester strain ทั้งหมดที่มีอยู่ Masuhara *et al.* (1993) Mazzola (1997) และ Martin (2000) ก็พบว่า *Rhizoctonia* spp. ที่ทดสอบบางไอโซเลทไม่รวมเส้นใยกับ tester strain เช่นกัน อาจเป็นไปได้ว่า tester strain ที่ได้รับสูญเสียความสามารถในการรวมเส้นใยไป โดยพบว่าขณะถ่ายเชื้อเพื่อเก็บเป็น stock มีบางไอโซเลทเจริญช้ามากโดยเฉพาะ tester AG-I ที่ใช้เวลาถึง 1 สัปดาห์จึงพบการเจริญของเส้นใยจากปัญหาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราในสกุลนี้ เมื่อเปรียบเทียบความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG ในพื้นที่ต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันไป (ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของอุณหภูมิในแต่ละพื้นที่ Martin (1988) and LaMondia and Martin (1989) ได้กล่าวถึงผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคว่า เชื้อทั้ง 3 AG สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงต่างกันที่อุณหภูมิต่างกัน ในช่วงอบอุ่น (24 องศาเซลเซียส) AG-G สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงกว่า AG-I และ AG-A แต่ในช่วงอุณหภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส AG-I ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุด ซึ่งผลการศึกษากครั้งนี้พบ AG-G มากที่สุดในตัวอย่างจากแมริมซึ่งเป็นเขตพื้นราบและมีอุณหภูมิสูงกว่าพื้นที่อื่น ๆ ในขณะที่ไม่พบ AG-G เลยในตัวอย่างจากอ่างช้างซึ่งเป็นพื้นที่สูงและมีอุณหภูมิต่ำ

จากการศึกษาการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วย primer LROR/LR7 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด (*HhaI*, *MboI*, *MspI* และ

TagI) พบว่า ไม่มีเอนไซม์ชนิดใดสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG แต่เมื่อนำผลของเอนไซม์ทั้ง 4 เอนไซม์มาวิเคราะห์ร่วมกันสามารถจัดกลุ่มได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG โดยตัวอย่างทั้งหมด 70 ไอโซเลท และ tester strain 5 ไอโซเลทแบ่งออกเป็น 12 กลุ่ม ประกอบด้วย AG-A 5 กลุ่ม AG-G 2 กลุ่ม AG-P, AG-I, AG-5, Unknown binucleate และ Unknown multinucleate อย่างละ 1 กลุ่ม โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละกลุ่มกับพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งตรงกับรายงานของ Martin (2000) ที่ใช้เทคนิคและเอนไซม์เดียวกันนี้ในการจัดกลุ่มรา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ในประเทศสหรัฐอเมริกา ผลจากการทดลอง ทั้งสองแสดงให้เห็นว่าการทำ PCR-RFLP โดยใช้ ดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการแบ่งกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ได้ดีในระดับหนึ่ง สามารถใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างเพื่อคัดเลือกตัวแทนในแต่ละกลุ่มก่อนนำมาจำแนกแบบ AG ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากแต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังพบความแตกต่างของผลการทดลองจากที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ทั้งในเรื่องขนาด PCR-product ในแต่ละ AG และผลหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Cubeta *et al.* (1991) พบว่า เชื้อ AG-A และ AG-G ที่ทำการศึกษามี ดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA เพียงขนาดเดียวคือ 1.4 kb และเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII*, *TagI*, *HhaI* และ *Sau3AI* พบว่าทั้ง AG-A และ AG-G มีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกันในทุกไอโซเลท ในขณะที่ Martin (2000) ได้นำเทคนิคและเอนไซม์เดียวกันมาใช้ในการศึกษารา binucleate *Rhizoctonia* ในสตรอเบอรี่พบว่า AG-A มีดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA 3 ขนาด คือ 1.4, 1.8 และ 1.4+1.8 kb ส่วน AG-G ยังคงมีขนาด 1.4 kb เช่นเดิม เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะพบว่า AG-A ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันถึง 6 รูปแบบ และ AG-G มี 5 รูปแบบ ในการศึกษครั้งนี้ AG-A ที่พบมีดีเอ็นเอ 3 ขนาด (1.4, 1.8 และ 1.4 ± 1.8 kb) และ AG-G มีขนาด 1.4 kb เช่นเดียวกับที่ Martin (2000) รายงานไว้ และให้รูปแบบดีเอ็นเอ 5 และ 2 รูปแบบใน AG-A และ AG-G ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ความแปรปรวนเหล่านี้ส่วนหนึ่งอาจอธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากธรรมชาติของเชื้อนี้ที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งนิวเคลียสทั้งสองอาจมีทั้งส่วนที่เหมือนและส่วนที่ต่างกัน ถ้านิวเคลียสทั้งสองมีดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA แตกต่างกันก็มีโอกาสที่จะเกิด PCR-product 2 ขนาดในตัวอย่างเดียว ความแตกต่างของนิวเคลียสนี้มีรายงานการพบในเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Alahakoon *et al.*, 1992) และ *Sclerotium rolfsii* (Harlton *et al.*, 1995) เช่นกัน ความแปรปรวนของ PCR-product และผลหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ชี้ให้เห็นว่า binucleate *Rhizoctonia* มีความผันแปรในระดับประชากรสูง โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA นี้อาจไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง anastomosis group ต่างๆ

การศึกษาค้นคว้านี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่มีการจำแนกรา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากสตรอเบอรี่ออกเป็น anastomosis group (AG) และได้นำเทคนิค PCR-RFLP เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราดังกล่าว ซึ่งก็พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่งแต่ทั้งนี้ยังขาดข้อมูลในหลายๆ ด้าน เช่น ความสามารถในการทำให้เกิดโรค และความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG ในแต่ละฤดูที่จะช่วยนำไปสู่การศึกษาวงจรของโรค และการป้องกันกำจัดทั้งการใช้สารเคมีและการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษา
และวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะ
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุน
การวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์ ดร. อังสนา
อัศรพิศาล ที่ให้คำแนะนำในด้านเทคนิคลายพิมพ์ดี
เอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

กอบปริญญ อุตรศักดิ์. 2542. สภาพการผลิตและการตลาด
สตรอเบอรี่ในจังหวัดเชียงใหม่. การค้นคว้า
อิสระระดับปริญญาโท ภาควิชาส่งเสริมการ
เกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่. 78 หน้า.

คณีย์ บุญเกียรติ. 2520. การศึกษาเกี่ยวกับโรครากเน่าของ
สตรอเบอรี่. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิ
ชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่. 32 หน้า.

นิพนธ์ วิจารณ์. 2544. "ข้อมนิเวศพืชเชอร์รา".
เอกสารประกอบการสอนวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิ
ชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. 5 หน้า.

Alahakoon, P.W., Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E.,
and P.R. Mills. 1992. Selection of genetic variant
within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates
pathogenic on mango by passaging through
wounded tomato fruits. *Physiological and
Molecular Plant Pathology* 41: 227-240.

Cubeta, M.A., Echandi, E., Abernethy, T., and R. Vilgalys.
1991. Characterization of anastomosis groups
of binucleate *Rhizoctonia* species using
restriction analysis of an amplified ribosomal
RNA gene. *Phytopathology* 81: 1395-1400.

Harlton, C.E., Le'vesque, C.A., and Z.K.Punja. 1995.
Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii*
and related species. *Phytopathology* 85: 1269-
1281.

Husain, S.S., and W.E.McKeen. 1963. *Rhizoctonia
fragariae* in relation to strawberry degeneration
in southwestern Ontario. *Phytopathology* 53: 532-
540.

LaMomdia, J.A., and S.B.Martin, 1989. The influence of
Pratylenchus penetrans and temperature on
black root rot of strawberry by binucleate
Rhizoctonia spp. *Plant Disease* 73: 107-110.

Maas, J.L. 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*
(2nd ed.). APS Press, St. Paul. 98 p.

Martin, F.N. 2000. *Rhizoctonia* spp. recovery from
strawberry roots in central coastal California.
Phytopathology 90: 345-353.

Martin, S.B. 1988. Identification, isolation frequency, and
pathogenicity of anastomosis groups of
binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry
roots. *Phytopathology* 78: 379-384.

Masuhara, G., Neate, S. M., and D. A.Schisler. 1994.
Characteristics of some *Rhizoctonia* spp. from
South Australian plant nurseries. *Mycological
Research* 98: 83-87.

Mazzola, M. 1997. Identification and pathogenicity of
Rhizoctonia spp. isolated from apple roots and
orchard soils. *Phytopathology* 87: 582-587.

Rogers, S.O., and A.J.Bendich. 1988. Extraction of DNA
from plant tissue, pp. 1-10. In Gelvin, S.B., and
Schilperoort, R.A. (eds.). *Plant Molecular
Biology Manual A6*. Kluwer Academic
Publishers, Dordrecht.

Sneh, B., Burpee, L.L., and A.Ogoshi. 1991. Identification
of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul.
133 p.