โมเลกุลเครื่องหมายตรวจหาความต้านทานของพริกต่อโรคลำต้นไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici*

Development of Molecular Markers to Identify Resistance Gene of Chilli pepper to *Phytophthora capsici*

ศรีสุข พูนผลกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[2]

[1] กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Phytophthora capcisi*, สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลพริกระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่นๆ ได้ การคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อตรวจหาลักษณะความต้านทานที่ถ่ายทอดจากพันธุ์ต้านทานโรคโดยใช้สัดส่วนพริกลูกผสมที่ให้ผลต้านทานและอ่อนแอเป็นเครื่องบ่งชี้ Microsatellite primers UBC 836 แสดงสัดส่วนแถบดีเอ็นเอเป็น 10 ต่อ 2 ให้ผลตรงกันกับพริกลูกผสมชั่วที่ 2 ที่เกิดจาก พริกพันธุ์ PI2301234 เมื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อต้านทาน และ พริกพันธุ์ พิจิตร 01 เป็นพันธุ์แม่อ่อนแอเมื่อแสดงปฏิกิริยาต่อการเกิดโรคลำต้นไหม้เมื่อปลูกเชื้อราสาเหตุสายพันธุ์เพชรบูรณ์ ผลการศึกษาพบว่า Microsatellite primers UBC 836 สามารถใช้ตรวจสอบลักษณะต้านทานและอ่อนแอของพริกลูกผสมได้ แต่การศึกษาหาดีเอ็นเอตัวตรวจจะทำให้การติดตามลักษณะถ่ายทอดนี้ได้แม่นยำยิ่งขึ้น

คำนำ

ประเทศไทยทีพื้นที่เพาะปลูกพริกทั่วประเทศโดยเฉลี่ย 383,000 ไร่ ต่อปี ได้ผลผลิตรวมประมาณ 356,000 ตัน ผลผลิตส่วนใหญ่นำไปใช้ในประเทศในรูปของการบริโภคผลสด ผลแห้ง พริกป่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังส่งพริกเป็นสินค้าออกทำรายได้ให้แก่ประเทศ โดยมีการส่งออกในรูปพริกสดและพริกแห้ง (ผลแห้งและพริกป่น) ปีละประมาณ 10,300 และ 680 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 77 และ 40 ล้านบาท ตามลำดับ

เชื้อรา *Phytophthora capcisi,* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกทำความเสียหายต่อการปลูกพริกทั่วโลก เชื้อราสาเหตุมีพืชอาศัยกว้าง ได้แก่ มะเขือเทศ ลิลลี่ คาร์เนชั่น รักเร่ มะคาเดเมีย ยางพารา โกโก้ พืชตระกูลแตง พืชตระกูลส้ม มันสำปะหลัง ยาสูบ พริกไทย สาเก และพืชตระกูลมะเขือ (CABI, 2003) รายงานการพบโรคลำต้นไหม้ของพริกครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อ ปี พ.ศ. 2548 พบการเกิดโรคในแปลงปลูกพริกที่จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เชียงราย และสกลนคร (ศรีสุข, 2548) โดยพบความเสียหายตั้งแต่ 10 - 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับสภาพแวดล้อม วิธีการปลูก และพันธุ์พริก ด้วย

รหัสการทดลอง 09 01 49 02 02 04 08 52

เหตุนี้โรคลำต้นไหม้ของพริกจึงมีความสำคัญมากขึ้นเป็นลำดับ เชื้อราสาเหตุสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลพริกระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่นๆ ได้ อย่างไรก็ตามพบเชื้อรานี้ในแหล่งปลูกจำกัด อีกทั้งยังเป็นศัตรูพืชกักกัน ดังนั้นการตรวจเชื้อสาเหตุได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยและติดตามการนำเข้ามายังประเทศไทยและการระบาดไปยังแหล่งปลูกใหม่ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการสำรวจแปลงปลูกพริกในประเทศไทยเพื่อศึกษาสถานภาพการมีอยู่และความเสียหายที่เกิดจากเชื้อราจะเป็นประโยชน์ในการกำหนดพื้นที่การระบาด การป้องกันการระบาดไปยังแหล่งอื่นตลอดจนสนับสนุนงานการเฝ้าระวังศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารเคมี metalaxyl หรือ chlorothalonil พ่นบนใบและลำต้นจะป้องกันโรคได้ วิธีการทางเขตกรรม เช่น การตากดินก่อนการปลูกพืช Yucel (1995) พบว่าอุณหภูมิดินสูงถึง 47 องศาเซลเซียสจะกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรค ในขณะที่ Rista *et al. (*1995) พบว่าการให้น้ำต้นพริกที่ปลูกในโรงเรือนด้วยวิธีการต่างๆ ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคแตกต่างกัน ด้านการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน Yang *et al.* (1996) พบว่าพริกหวานพันธุ์ Zhongjiao 7 ต้านทานปานกลางต่อเชื้อสาเหตุ ส่วนการควบคุมโรคโดยชีววิธี พบเชื้อปฏิปักษ์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum, Gliocladium virens* และ *Strepptomyces griiseoviirdis* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Nemec *et al ,* 1996)

PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ชิ้นสั้นๆ (ที่เฉพาะเจาะจงกับ Primer) ที่อยู่ในสารละลายร่วมกับ DNA อื่นๆ หลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้น DNA ดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน DNA ชิ้นสั้นๆ ที่สังเคราะห์ได้นั้น สามารถนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส หรือขยายต่อได้ (สุรินทร์, 2543) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการจำแนกเชื้อและตรวจวินิจฉัยโรคในพืชกันอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นเทคนิคง่ายๆ มีความเฉพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำสูง และรวดเร็ว เพียงมีดีเอ็นเอติดตาม หรือ species-specific primer ของเชื้อสาเหตุ ก็สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคในส่วนของพืชได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (สุรินทร์, 2543; Robb *et al*., 1994; Stammler and Seemuller ,1994;) ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อราได้ก่อนเกิดการระบาดของโรค

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. พริกพันธุ์พ่อ PI2301234 และพันธุ์แม่ 7 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 01 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร18 –1 – 1 – 1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743
2. อุปกรณ์ในเรือนทดลอง
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ
4. สารเคมี primers เอนไซม์ และ วัสดุในงานโมเลกุลเครื่องหมาย

วิธีการ

การเตรียมพ่อ แม่ และลูกผสม

เตรียมลูกผสมพันธุ์พริก โดยใช้ ปลูกพริกพันธุ์พ่อ (ต้านทาน) ได้แก่ PI2301234 และพันธุ์แม่ 7 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 01 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร 05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร 18–1–1–1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743 ผสมพันธุ์พริกเพื่อสร้าง ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 ใช้ในการเปรียบเทียบการเป็นโรคระดับต่างๆ ร่วมกับ พันธุ์พ่อ –พันธุ์แม่ รวมทั้งสิ้นประมาณ 100 ต้น ต่อคู่ผสม

แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างต้นพริกแสดงอาการของโรคที่เก็บมาจากอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ และเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ เตรียมเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิต zoospores และคำนวณให้ได้ zoospores ที่ความเข้มข้น 20,000 ต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อสาเหตุบนพืชทดสอบโดยการราดโคนต้นด้วยปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น ตรวจสอบปฏิกิริยาของพันธุ์พริกที่มีต่อเชื้อราสาเหตุ บันทึกข้อมูลการเกิดโรค

การคำนวณลักษณะถ่ายทอดความต้านทานด้วยกฎของเมนเดลเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Microsatellite primers ในขั้นตอนต่อไป

การหาโมเลกุลเครื่องหมายตรวจหาพริกที่มียีนต้านทาน

เก็บใบพริก พันธุ์พ่อ แม่ ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 ต้นละ 3 ใบ สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของ Murray *et.al.* (1980)

การคัดเลือก primers ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยการใช้ Microsatellite primers จำนวน 100 สาย และ RAPD primers จำนวน 160 สาย และใช้เทคนิค gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่เก็บรักษาไว้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 25 นาโนกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (thermal cycler, Perkin-Elmer 9700) โดยใช้ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primer ชนิด 1o bases จำนวน 16o สาย (UBC primers ชุด 1 และ Operon primers) และ microsattlelite primer จำนวน 100 สาย (UBC primers ชุด 9) โปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้ที่อุณหภูมิของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ ต่อจากนั้นเพิ่มสายดีเอ็นเอต่อที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ไปตรวจผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความเข้มข้นของ agarose ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย ethidium bromide ถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Gel Documentation) เปรียบเทียบแถบที่เกิดบนแผ่นวุ้นกับลักษณะอาการต้านทาน / อ่อนแอที่แสดงปฏิกิริยาต่อเชื้อราสาเหตุ

คัดเลือกแถบที่ให้ผลสอดคล้องกับฐานข้อมูลตามกฎของเมนเดลว่าแสดงค่าตรงกับความต้านทานและอ่อนแอของต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อในขั้นตอนที่ 1 ตัดชิ้นวุ้น สกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอไปหาลำดับเบสโดยเทคนิคโคลนนิ่งในพลาสมิดเพื่อออกแบบดีเอ็นเอสายสั้นๆ สำหรับใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกต้นพริกที่มียีนต้านทานโรค

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2552 - กันยายน 2553 กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

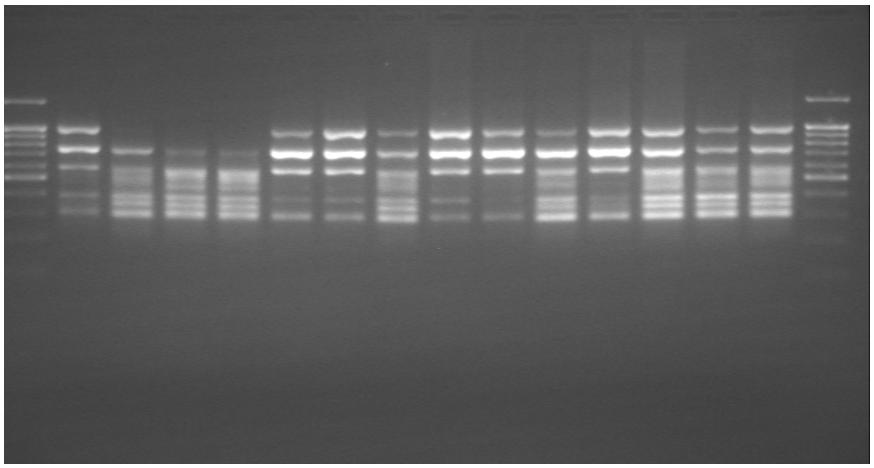
ผลการคำนวณลักษณะถ่ายทอดความต้านทานด้วยกฎของเมนเดลพบว่าลูกผสมชั่วที่ 2 ที่เกิดจาก พริกพันธุ์ PI2301234 เมื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อต้านทาน และ พริกพันธุ์ พิจิตร 01 เป็นพันธุ์แม่อ่อนแอ ให้พริกลูกผสมต้านทานต่อลูกผสมอ่อนแอเป็น 10 ต่อ 2 เมื่อนำดีเอ็นเอมาทดสอบด้วย Microsatellite primers จำนวน 260 สายพบว่า หมายเลข Microsatellite primers UBC 836 แสดงสัดส่วนแถบดีเอ็นเอเป็น 10 ต่อ 2 ให้ผลตรงกันกับพริกลูกผสมชั่วที่ 2 ที่แสดงปฏิกิริยาต่อการเกิดโรคลำต้นไหม้ (ภาพที่ 1)

สรุปผลการวิจัยและคำแนะนำ

Microsatellite primers สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายได้แต่ยังไม่แม่นยำ จะต้องเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความจำเพาะกับลักษณะต้านทานโรคไปหาลำดับเบสและออกแบบดีเอ็นเอตัวตรวจจึงจะให้ผลการตรวจสอบและติดตามลักษณะความต้านทานโรคลำต้นไหม้ที่แม่นยำได้

ภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพริกพันธุ์พ่อ (1) แม่ (2) และลูกผสม (3-14) เมื่อใช้ Microsatellite primers UBC 836,

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M



R s s s R R R R R R R R R R

R : S = 10 : 2

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2543. พันธุศาสตร์เบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพ.

ศรีสุข พูนผลกุล 2548. โรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบระบาดใหม่ ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2548

Bracy R.P., H.A. Hobbs, D.Dufresne, 1996. Phytophthora blight in bell pepper – can it be controlled? Louisiana Agriculture, 39: 18-19.

CAB International, 2003. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International

Nemec S. L.E. Datnoff and J. Strandberg , 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protection. 15:735-742

Rista, L.M. , M. Sillon and L. Fornasero. 1995. Effect of different irrigation strategies on the mortality of pepper by *Phytophthora capcisi* Leonian in greenhouses. Horticultura Argentina. 14:44-51

Robb, J. ; X.Hu; H. Platt and R. Nazar. 1994. PCR – based assays for the detection and quantification of *Verticillium* species in potato, p. 83-90. *In* : Schots, A.; F.M. Dewey and R.Oliver. Modern assays for plant pathogenic fungi : identification, detection and quantification, CAB International. Oxford. Stammler, G. and E. Seemuller, 1994. Detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in infected raspberry root by PCR, p. 135-139. *In* :

Schots, A.; F.M. Dewey and R.Oliver. Modern assays for plant pathogenic fungi : identification, detection and quantification, CAB International. Oxford.

Yang, Gui Mei, Guo Jia Zhen and Bao Xi Zhang,1996. Breeding of early maturing sweet pepper cultivar Zhongjiao 7. China Vegetables. 3:4-6.

Yucel, S. 1995. A study on soil solarization and combined with fumigant application to control Phytopathora crown blight (*Phytophthora capcisi* Leo) on peppers in the East Mediterranean region of Turkey. Crop Protection. 14:653-655.