ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกความแตกต่างของเชื้อราไรซอคโทเนียสาเหตุโรครากเน่าของสตรอเบอรี่โดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ชื่อผู้เขียน นายไกรวุฒิ เกตุลอย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. นุชนารถ	จงเลขา	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. อังสนา	อัครพิศาล	กรรมการ
อาจารย์ ดร. ชวนพิศ	บุญชิตสิริกุล	กรรมการ
อาจารย์ ดร. วรวรรณ	ชาลีพรหม	กรรมการ

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากรากของต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวใน 5 พื้นที่เพาะปลูก คือ แปลงเกษตรกรบ้านบ่อแก้ว แปลงเกษตรกรอำเภอแม่ริม แปลงสถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ และแปลงสถานีวิจัยโครงการหลวงอ่างขาง ในจังหวัดเชียงใหม่ และแปลงเกษตรกรบ้านห้วยน้ำริน จังหวัดเชียงราย พบเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสี Geimsa และตรวจนับจำนวนนิวเคลียสในเซลล์ของเส้นใยพบว่าเป็นรา binucleate *Rhizoctonia* spp. ทั้งสิ้น 68 ไอโซเลท (98%) และรา 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 เมื่อทำ

การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด (*Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Taq*I) พบว่า แต่ละเอนไซม์ไม่สามารถแยกเชื้อที่อยู่ต่าง AG ออกจากกันได้ แต่เมื่อนำข้อมูลทั้ง 4 เอนไซม์มาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้ง 75 ไอโซเลทออกเป็น 12 กลุ่มซึ่งตรงกับการจำแนกออกเป็น AG หลังจากสุ่มตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด (*Cla*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I และ *Xmn*I) พบว่าให้ผลทำนองเดียวกับบริเวณ 28S rDNA คือ ผลจากแต่ละเอนไซม์ไม่สามารถแยกเชื้อที่อยู่ต่าง AG ออกจากกันได้ แต่เมื่อนำข้อมูลของเอนไซม์ *Cla*I, *Mbo*I และ *Rsa*I มาวิเคราะห์ร่วมกัน สามารถแบ่งตัวอย่างทั้ง 23 ไอโซเลทออกเป็น 8 กลุ่มซึ่งตรงกับการจำแนกออกเป็น AG ทั้ง 2 การทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่แยกได้จากการใช้เทคนิค PCR-RFLP กับพื้นที่เก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

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

Author Mr. Kraiwut Kateloy

M.S. Plant Pathology

Examining Committee

Associate Professor Dr. Nuchnart Jonglaekha	Chairman
Lecturer Dr. Angsana Akarapisan	Member
Lecturer Dr. Chuanpit Boonchitsirikul	Member
Lecturer Dr. Worawan Chaleeprom	Member

Abstract

Isolation of plant pathogen from roots of wilted strawberry in 5 plantations located at Ban Borkaew, Mae Rim, 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. In all, 68 isolates were binucleate *Rhizoctonia* spp. (97%) and two were multinucleate *Rhizoctonia* spp. (3%). After paring with known 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 of which 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 (*Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I and *Taq*I). 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. DNA from random samples from each group were amplified in the portion of ITS1-5.8S-ITS2 and were digested with 8 restriction enzymes (*Cla*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I and *Xmn*I). Results were similar to that obtained from the portion of 28S rDNA, there was no single restriction enzyme could separate different AG isolates into groups but the combination of data from three restriction enzymes (*Cla*I, *Mbo*I and *Rsa*I) were accurately grouped all random 23 isolates into 8 groups which correspond to the AG determination. In both experiments, there was no relation among each group and collection site from using PCR-RFLP technique.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University