โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยกและการระบุชนิดของราน้ำจากต้นยางพารา

ชื่อนิสิต นางสาวอมลวรรณ จันเพชร์ รหัสประจำตัว 6032357023

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การคัดแยกและการระบุชนิดของราน้ำจากต้นยางพารา
โดย	นางสาวอมลวรรณ จันเพชร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2321499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดแยกและการระบุชนิดของราน้ำจากต้นยางพารา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาวอมลวรรณ จันเพชร์

รหัสประจำตัวนิสิต 6032357023

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ การคัดแยกและการระบุชนิดของราน้ำจากต้นยางพารา

นิสิตผู้นำเสนอโครงการ นางสาวอมลวรรณ จันเพชร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

โรคใบร่วงในต้นยางพาราเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำยางในประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุจากราน้ำในสกุล *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Phytopythium* sp. งานวิจัยนี้แยกและระบุชนิดของราน้ำจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคจากสวนยางพาราในพื้นที่ทางภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาด้วยยีนบริเวณ ITS ของราน้ำ 4 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ คือ S.1, S.2, S.3 และ S.4 ทั้ง 4 ไอโซเลทมีลักษณะของสปอร์แรงเจียมคล้ายกับราน้ำในสกุล *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Phytopythium* sp. ที่เคยมีการรายงานค้นพบก่อนหน้านี้ในประเทศไทย ทุกไอโซเลทมีลักษณะการปล่อยซูโอสปอร์ที่เหมือนกันคือ โปรโตพลาซึมจะไหลออกมาจากสปอร์แรงเจียมผ่านท่อปล่อยเข้าไปใน vesicle จากนั้นซูโอสปอร์จะพัฒนานอกสปอร์แรงเจียมภายใน vesicle และจะถูกปล่อยหลังจากผนังของ vesicle แตก ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มักพบใน *Pythium* sp. และ *Phytopythium* sp. จึงอาจจะมีความเป็นไปได้ว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้เป็นราน้ำในสกุลดังกล่าว อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมเพื่อให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้ชัดเจน เพื่อยืนยันว่าแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้เป็นสปีชีส์ใด โดยเทียบลำดับสารพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลทในฐานข้อมูลแล้วจึงใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด

TITLE	Isolation and identification of watermold from para rubber tree
INVESTIGATOR	Miss Amonwan Chanpet
ADVISOR	Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University

Abstract

Leaf fall disease in rubber trees is a problem affecting the quantity and quality of rubber latex in Thailand. This was caused by *Phytophthora*, *Pythium* and *Phytopythium* species. In this research, water mold was isolated and identified from diseased leaf stalks of rubber trees in Southern and Eastern Thailand. The water mold was studied by morphological characteristic and molecular analysis based on the internal transcribed spacer (ITS) region of four isolates which were provisionally named as isolate S.1, S.2, S.3 and S.4. Sporangia characteristics of all four isolates were similar to those of the genera *Phytophthora*, *Pythium* and *Phytopythium* species. In addition, all isolates had the same method of zoospore discharge which was that the protoplasm flows out of the sporangium through a discharge tube to form a plasma-filled vesicle at the tip. Zoospores were developed outside the sporangium, within the membrane of a vesicle and were released after rupture of the membrane. It is a morphological character found in genus *Pythium* and *Phytopythium.* Therefore, it is possible that all four isolates belong to these genera. However, it is necessary to study the genetic sequence to identify the species and to verify each isolate by comparing the sequence of the genetic material of each isolate on the database. Then use morphology to compare with the species that are most similar to each other.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ และ รศ. ดร.ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้คำแนะนำแนวทางในการทำงานวิจัย รวมถึงให้ความรู้และวิธีการทำงานวิจัย ข้อคิดเห็นต่าง ๆ จนทำให้โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์จนทำให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้ทำวิจัยในการดำเนินงาน รวมไปถึงสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาว วิรัชนันท์ วุฒา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำแนวทางแก้ปัญหาจากการดำเนินงาน แนะนำความรู้ รวมไปถึงกำลังใจในการทำงานจนสามารถทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ จุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 ที่คอยช่วยเหลือ คอยให้คำแนะนำ รับฟังปัญหาและให้กำลังใจตลอดช่วงการเรียนในมหาวิทยาลัยจนกระทั่งจบการศึกษา

และสุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว บิดา มารดา พี่สาว ที่คอยให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษา คอยให้กำลังใจและแรงผลักดันทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในวันนี้ได้

อมลวรรณ จันเพชร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ-ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	8
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก ก: สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
ภาคผนวก ข : สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย	33
ภาคผนวก ค : การตรวจสอบราน้ำด้วยวิธี PCR	34

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราแท้ (fungi) และราในชั้น oomycetes 1

รูปที่ 1.2 แสดงแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการของรา 65 ชนิดในชั้น oomycetes 2

รูปที่ 1.3 วงจรชีวิตของ Phytophthora infestans 3

รูปที่ 1.4 รูปร่างของสปอร์แรงเจียม 4

รูปที่ 1.5 การสร้าง papillum บนสปอร์แรงเจียม 4

รูปที่ 1.6 ลักษณะการเรียงตัวของก้านชูสปอร์แรงเจียม; (A) simple sympodium; (B) Compound sympodia; (C) umbellate sympodium 5

รูปที่ 1.7 ตำแหน่งของยีนและไพรเมอร์ ITS1 ext B และ ITS4 ext A ที่ใช้ตรวจสอบราในชั้น oomycetes 6

รูปที่ 4.1 ไอโซเลท S.1 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า (a-c) สปอร์แรงเจียมรูปทรง ovoid; (d) สปอร์แรงเจียมรูปทรง globose; (e) สปอร์แรงเจียมสร้าง papilla; (f) สปอร์แรงเจียมสร้าง 2 papilla; (g) protoplasm ถูกดันออกจากสปอร์แรงเจียมเข้าสู่ vesicle; (h) สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนาภายใน vesicle; (i) Outgrowing papilla 19

รูปที่ 4.2 ไอโซเลท S.2 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า (a-d) สปอร์แรงเจียม; (e) สปอร์แรงเรียมที่ว่างเปล่า; (f) Outgrowing papilla; (g-i) vesicle กำลังพัฒนา 20

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 4.3 ไอโซเลท S.2 แสดงลักษณะโอโอโกเนียมและแอนเทอริเดียม 20
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า
(a-b) ลูกศรชี้ตำแหน่งของแอนเทอริเดียม

รูปที่ 4.4 ไอโซเลท S.3 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 21
แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า (a-e) สปอร์แรงเจียม;
(f) Outgrowing และ branching papilla; (g) protoplasm ถูกดันออกจากสปอร์แรงเจียม
เข้าสู่ vesicle; (h-i) สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนาภายใน vesicle

รูปที่ 4.5 ไอโซเลท S.3 แสดงลักษณะโอโอโกเนียมและแอนเทอริเดียม 22
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า
(a-d) ลูกศรชี้ตำแหน่งของแอนเทอริเดียม

รูปที่ 4.6 ไอโซเลท S.4 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 23
แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า (a-b) สปอร์แรงเจียม;
(c-d) Outgrowing และ branching papilla; (e-g) protoplasm ถูกดันออกจาก
สปอร์แรงเจียมเข้าสู่ vesicle; (h) สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนา
ภายใน vesicle; (i) สปอร์แรงเจียมที่ว่างเปล่า

รูปที่ 4.7 ไอโซเลท S.4 แสดงลักษณะโอโอโกเนียม 23
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า
(a-b) โอโอโกเนียม

รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของราน้ำ S.1, S.2, S.3 และ S.4 ที่เจริญบน 24
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 4 วัน

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 4.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท S.1, S.2, S.3 และ S.4 โดยมี ตัวแปรควบคุมบวกเป็น *Phytopythium* species ตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 25

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 12

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 12

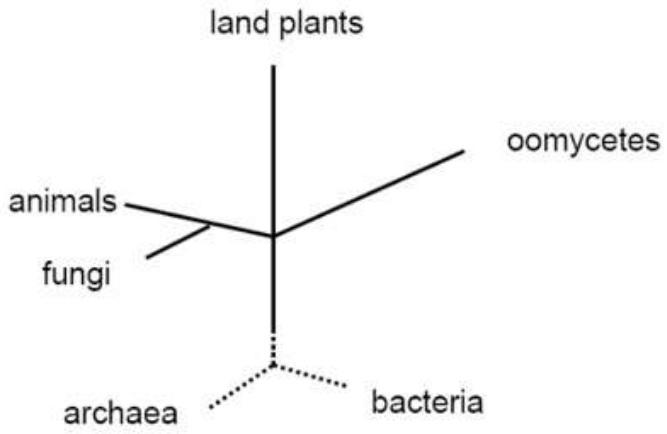
ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 13

ตารางที่ 4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างและไอโซเลทของราน้ำ 17

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสปอร์แรงเจียมของไอโซเลทราน้ำที่คัดแยกได้ 18

บทที่ 1
บทนำ

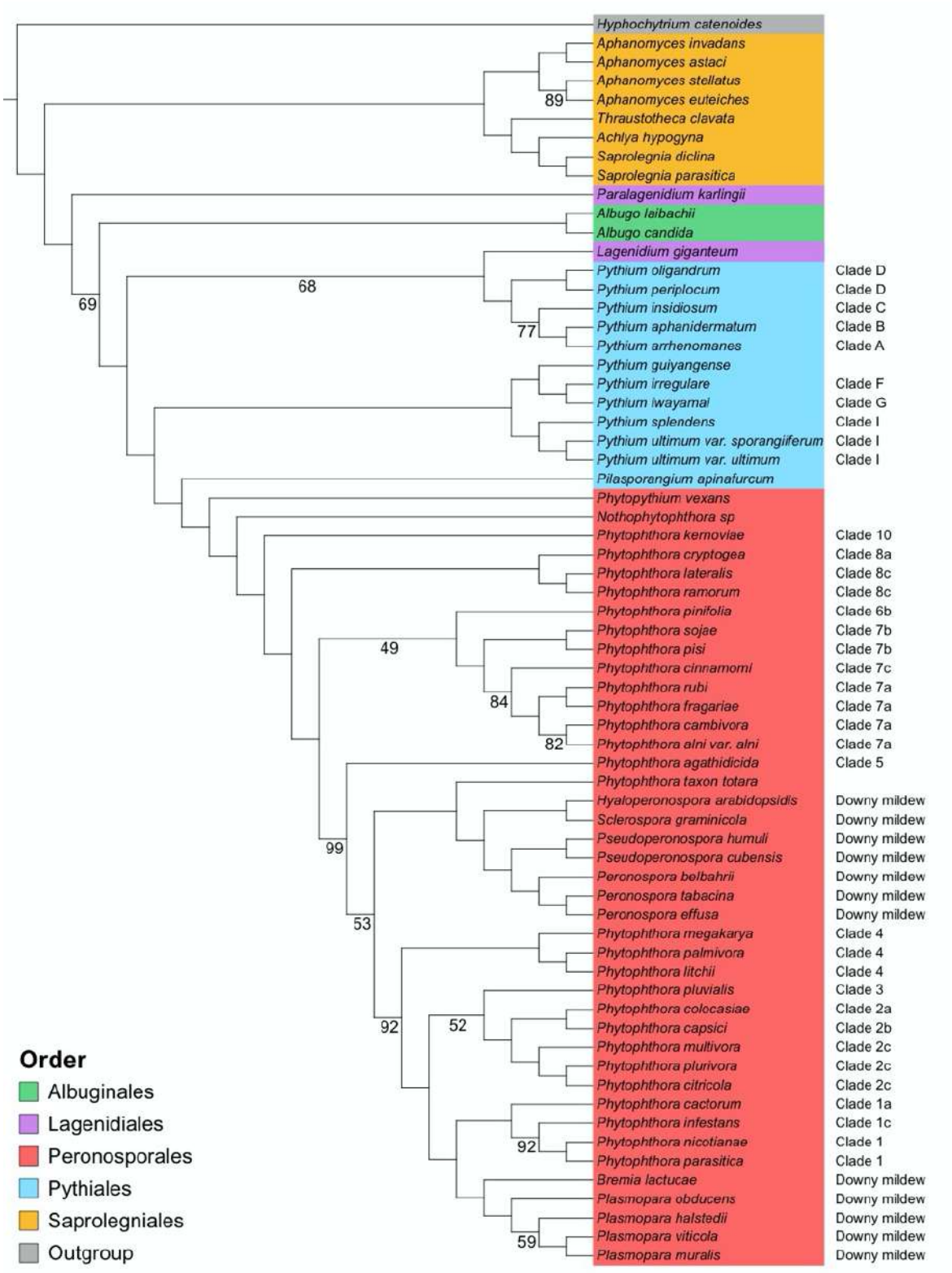
ไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*), พิเที่ยม (*Pythium*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium*) เป็น “รา น้ำ” ในชั้น oomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นเชื้อก่อโรคในพืชที่มีความรุนแรงมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง โรคพืชที่ราน้ำในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุ เช่น โรคคอเน่าโคนดิน, โรครากเน่า, โรคราน้ำค้าง โรคที่รู้จักทั่วไป เช่น โรคใบไหม้ในมันฝรั่ง (Potato late blight), โรคราน้ำค้างในองุ่นทำไวน์ (grape downy mildew) , โรคตายฉับพลันของต้นโอ๊ค (sudden oak-death) เนื่องจากลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใย, การได้รับอาหารผ่านการดูดซึม, และการสืบพันธุ์ผ่านทางสปอร์ ในอดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืชจึงให้ราในชั้น oomycetes ถูกจัดว่าเป็นราชั้นต่ำ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับราแท้ กลุ่มของราแท้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสัตว์มากกว่าราในชั้น oomycetes และราในชั้น oomycetes มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสาหร่ายและพืชมากกว่าราแท้ (รูปที่ 1.1) (Fry William E., 2010)



(Fry William E., 2010)

รูปที่ 1.1 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราแท้ (fungi) และราในชั้น oomycetes

ราในชั้น oomycete ประกอบไปด้วย 4 อันดับ (รูปที่ 1.2) คือ อันดับ Peronosporales, Pythiales, Albuginales และ Saprolegniales โดยสกุล ไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium*) ถูกจัดอยู่ในอันดับ Peronosporales ส่วนสกุล พิเที่ยม (*Pythium*) ถูกจัดอยู่ในอันดับ Pythiales (J. McGowan และ D. A. Fitzpatrick, 2020)

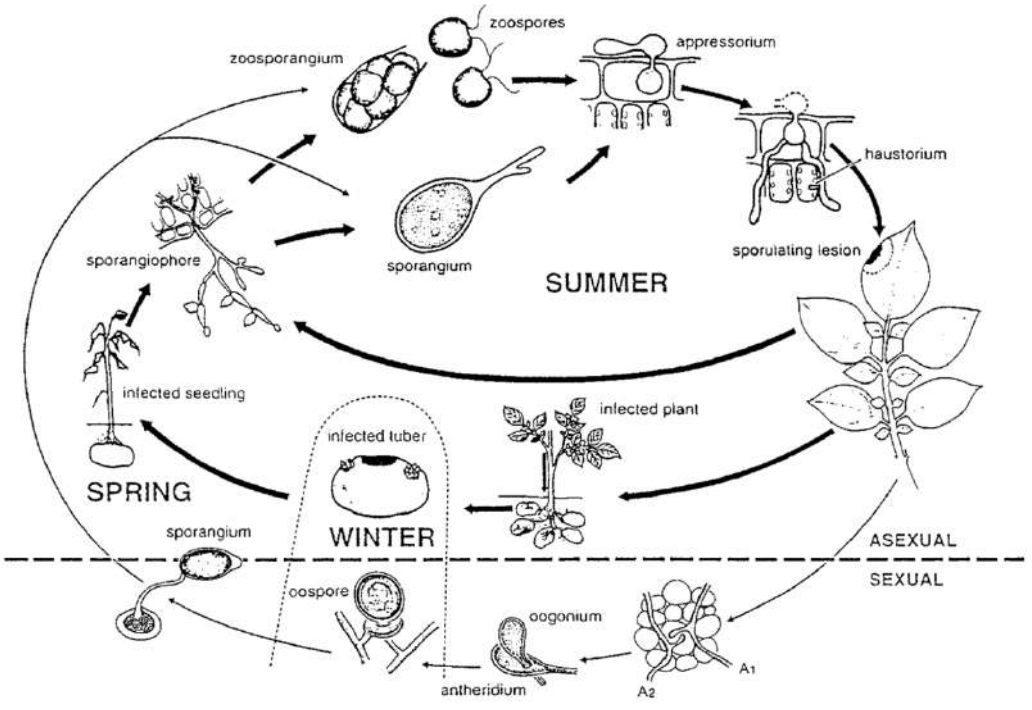


(J. McGowan และ D. A. Fitzpatrick, 2020)

รูปที่ 1.2 แสดงแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการของรา 65 ชนิดในชั้น oomycetes

การวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ยีนและ intergenic region เพื่อเป็นการยืนยันว่าราในกลุ่ม oomycetes แตกต่างจากราแท้ อีกทั้งยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกราในกลุ่ม oomycetes จากราแท้ เช่น เส้นใยไม่มีผนังกั้น (coenocytic), นิวเคลียสในเซลล์ปกติมักจะเป็น diploid, ผนังเซลล์ประกอบด้วย β-1,3 และ β-1,6 glucan ไม่มี chitin ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ราแท้, สปอร์มีแฟลกเจลลา 2 เส้น เรียกว่า ซูโอสปอร์ (zoospore) ในโครงสร้างที่เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) (Fry William E., 2010)

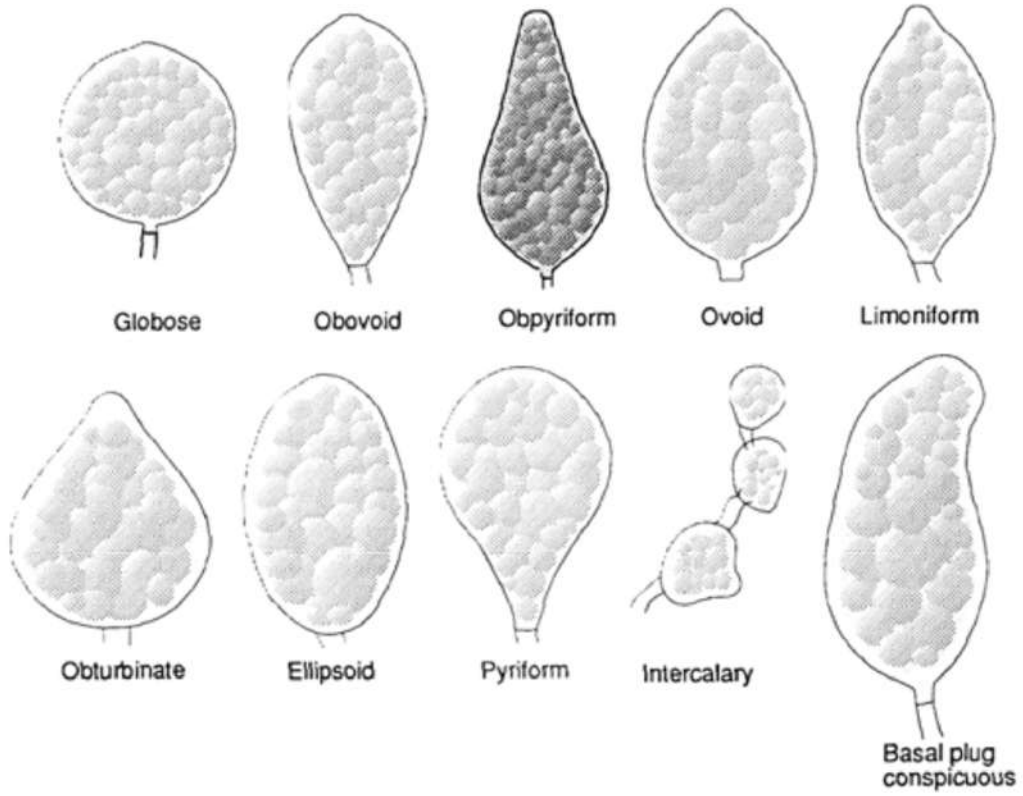
วงจรชีวิตมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (รูปที่ 1.3) สปอร์แบบไม่อาศัยเพศเป็นอับสปอร์ที่เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) ภายในอับสปอร์เดี่ยวมีหลายนิวเคลียสจากการแบ่งตัวของไซโทพลาสซึมในสปอร์แรงเจียม โดยจะปล่อยสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียมเป็น ซูโอสปอร์ (zoospore) ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ซึ่งสามารถเคลื่อนที่และแพร่กระจายโดยอาศัยน้ำเป็นตัวพา เมื่อซูโอสปอร์พบกับพืชอาศัยจะปลดแฟลกเจลลาและเข้าเกาะผิวนอกของพืชอาศัย จากนั้นเจริญโดยสร้าง germ tube งอกออกมาและเจริญผ่านเข้าผิวนอกของพืชอาศัยจนกระทั่งพัฒนาโครงสร้างที่เรียกว่า appressorium ซึ่งเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อด้านในของเซลล์พืช และสร้างเส้นใยลุกลามไปยังส่วนอื่น (Fawke, Doumane และคณะ, 2015) ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอาจมีการสร้างคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) ทำให้สามารถอยู่รอดได้นาน เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะกลับมาเจริญเป็นสายใย ในขณะที่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างโอโอสปอร์ (oospore) สายใยพบแบบ heterothallic และ homothallic ประกอบไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) ซึ่งสามารถเกิดการผสมกันแล้วขยายพันธุ์ต่อไป (Drenth A., Guest D.I., และคณะ, 2004)



(Drenth A., Guest D.I., และคณะ, 2004)

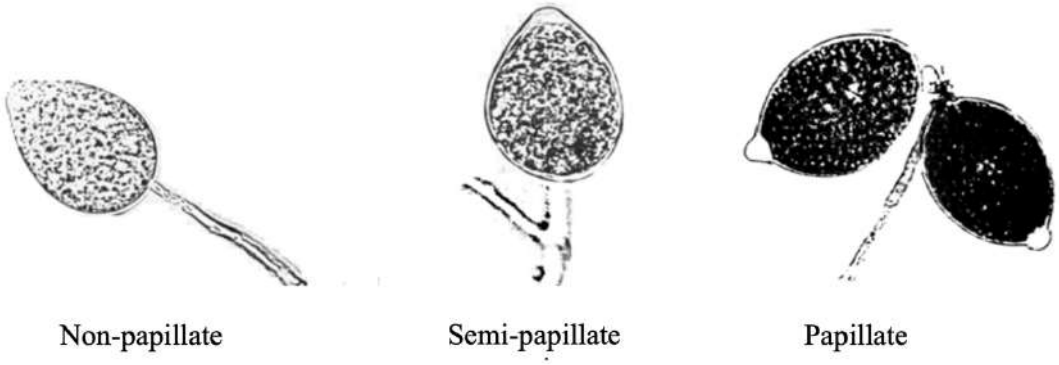
รูปที่ 1.3 วงจรชีวิตของ *Phytophthora infestans*

การจัดจำแนกราในชั้น oomycetes โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ เช่น รูปร่างของสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.4), ขนาดของสปอร์แรงเจียม, การหลุดร่วงจากสปอร์แรงจิโอฟอร์ (caducity), การสร้าง papillum บนสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.5), ลักษณะของเส้นใย, ลักษณะการเรียงตัวของก้านชูสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.6) รวมถึงการสร้างคลาไมโดสปอร์ (Drenth และ Sendall, 2001)



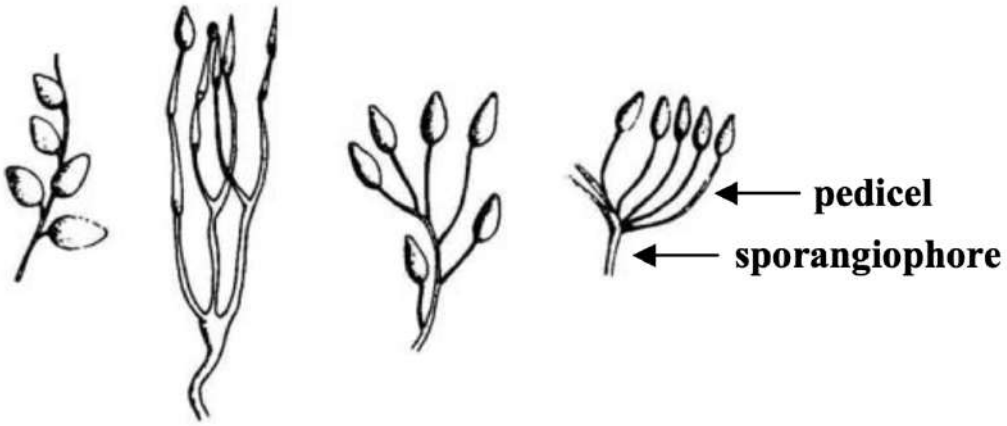
(Drenth และ Sendall, 2001)

รูปที่ 1.4 รูปร่างของสปอร์แรงเจียม



(Drenth และ Sendall, 2001)

รูปที่ 1.5 การสร้าง papillum บนสปอร์แรงเจียม



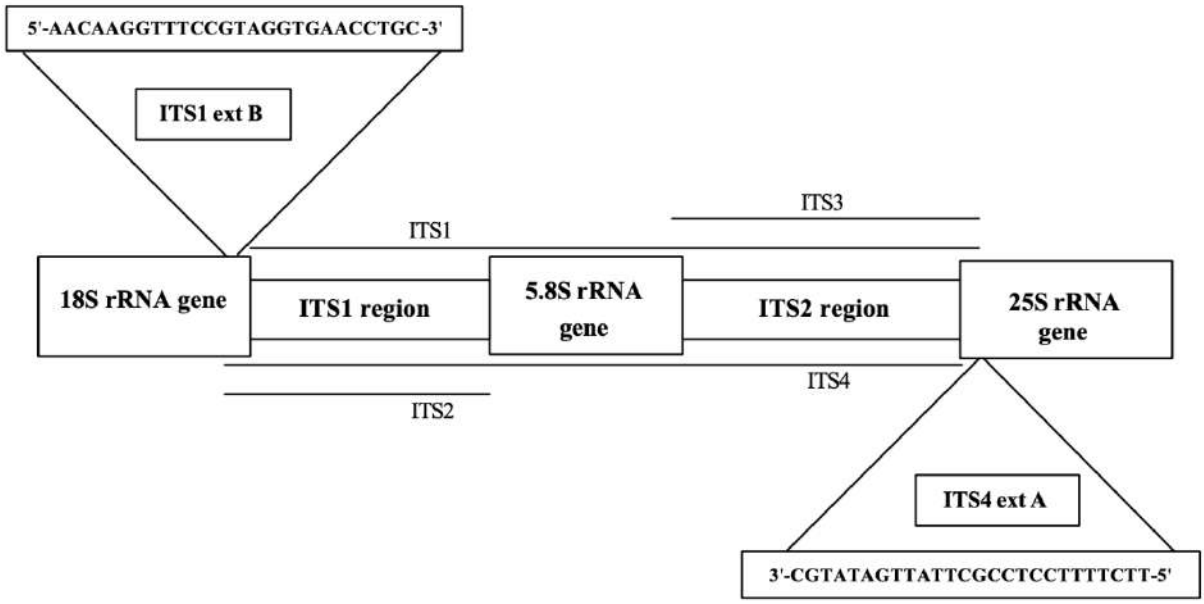
A B C (Drenth และ Sendall, 2001)

รูปที่ 1.6 ลักษณะการเรียงตัวของก้านชูสปอร์แรงเจียม (A) simple sympodium; (B) Compound sympodia; (C) umbellate sympodium

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสกุลไฟโทพิเที่ยม (Phytopythium) มีลักษณะคล้ายกันกับสกุลไฟทอฟธอรา (Phytophthora) และสกุล พิเที่ยม (Pythium) โดยลักษณะการพัฒนาและการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียมของทั้งสองสกุลเหมือนกันคือ สร้างถุง (vesicle) จากนั้นดัน protoplasm จากสปอร์แรงเจียมทั้งหมดเข้าไปในถุงvesicleแล้วจึงพัฒนาซูโอสปอร์ภายในถุงก่อนที่จะสลายผนังของถุงแล้วปล่อยซูโอสปอร์ออกไป ในขณะที่ไฟทอฟธอรา (Phytophthora) จะพัฒนาซูโอสปอร์ภายในสปอร์แรงเจียมแล้วจึงปล่อยซูโอสปอร์ออกไป (de Cock และ Lévesque, 2004) (de Cock และคณะ, 2015)

นอกจากการจำแนกจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจัดจำแนก ทำให้สามารถระบุชนิดของราได้รวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น ซึ่งวิธีที่นิยมในการจัดจำแนกกลุ่มของราในชั้น oomycetes คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งยีนที่สนใจของราน้ำแต่ละชนิดด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction หรือพีซีอาร์ (PCR) เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบให้มีปริมาณมากขึ้น หลังจากนั้นนำมาตรวจหาผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยมีตำแหน่งของดีเอ็นเอบนจีโนมที่จำเพาะซึ่งนิยมนำมาใช้ตรวจสอบราในชั้น oomycetes คือ Internal transcribed spacer (ITS) (รูปที่ 1.7) เป็นบริเวณ 870-900 คู่เบส ซึ่งอยู่ระหว่าง 18s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (18s rRNA) และ 25s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (25s rRNA) โดยมียีน 5.8s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (5.8s rRNA) อยู่ระหว่าง ITS1 และ ITS2 ซึ่งยีนนี้เป็นยีนส่วนที่อนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิต (conserved gene) การทราบลำดับเบสของยีนบริเวณนี้จะช่วยให้สามารถหาความสัมพันธ์และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตได้ (White และคณะ, 1990) และยังมีการใช้ยีนหรือบริเวณบนจีโนมที่มีความจำเพาะอื่นมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของราในชั้น oomycetes เพื่อทำให้มีผลที่มีความชัดเจนและน่าเชื่อถือมากขึ้นพอที่จะสามารถระบุได้ว่าเป็นราน้ำชนิดใด โดยนำยีนหลายยีนมาใช้ในการตรวจสอบร่วมกัน ซึ่งเป็นยีนคนละบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องกัน เช่น beta-tubulin (*β-tub*), 60S ribosomal protein L10 (Yang

และ Hong, 2018) หรือใช้ตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome-c oxidase 1 (*cox1*) (Martin และคณะ, 2014) เป็นต้น



(Yadav, 2008)

รูปที่ 1.7 ตำแหน่งของยีนและไพรเมอร์ ITS1 ext B และ ITS4 ext A ที่ใช้ตรวจสอบราในชั้น oomycetes

การระบาดของราน้ำในกลุ่มของไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*), พิเที่ยม (*Pythium*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium*) พบการระบาดในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก เช่น *Phytophthora palmivora* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคตาเน่าในปาล์มน้ำมัน (Torres และคณะ, 2016), *Phytopythium vexans* เป็นสาเหตุของโรครากเน่าสีน้ำตาลในต้นป่านรามี (Yu และคณะ, 2020) และ *Pythium ultimum* เป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าคอดินในบีตรูต (Khan และคณะ, 2020) ในประเทศไทยมีรายงานพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้แพร่ระบาดในพืชเศรษฐกิจอย่างต้นยางพารา เช่น โรคใบร่วงในยางพารามีสาเหตุสำคัญจาก *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryosa* (เสมอใจ และคณะ, 2551), รายงานพบ *Phytopythium cucurbitacearum* คัดแยกได้จากต้นยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทย (Chanoknan และคณะ, 2020) และ รายงานพบ *Phytophthora citrophthora* เป็นสาเหตุใบร่วงในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย (Laohasakul และคณะ, 2017) เป็นต้น

ยางพารา หรือชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากรายงานของสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ได้วิเคราะห์สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญในปี พ.ศ. 2563 และคาดการณ์แนวโน้มปี พ.ศ. 2564 พบว่า ในปี พ.ศ. 2563 มีเนื้อที่ปลูกยางพาราในไทย 20.58 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นจากปีก่อนหน้า โดยปัจจุบันไทยมีเนื้อที่ปลูกยางพารามาก

เป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากอินโดนีเซีย แต่ไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตยางมากที่สุดในโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2563)

โรคและอาการผิดปกติของยางพาราสามารถทำความเสียหายให้กับต้นยางได้ทุกช่วงระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของต้นยาง เป็นเหตุให้เกษตรกรต้องสูญเสียรายได้และเพิ่มค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา โดยโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งคือ โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. (*Phytophthora* leaf fall) เชื้อรา *Phytophthora* sp. เข้าทำลายได้ทั้งใบ ก้านใบ กิ่งแขนงสีเขียว ฝักยาง นอกจากนี้เข้าทำลายหน้ากรีด จนสามารถทำให้เกิดอาการโรคเส้นดำได้ ในช่วงที่มีฝนตกติดต่อกัน ใบของต้นยางจะร่วงทำให้ผลผลิตลดลง ลักษณะอาการของโรคคือ ใบยางร่วงทั้งที่ยังมีสีเขียวสด ใบย่อยหลุดออกจากก้านใบได้ง่าย ที่ก้านใบมีรอยแผลช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำ และมีน้ำยางจับเป็นหยดเล็ก ๆ สีขาวเกาะติดอยู่ (สถาบันวิจัยยาง, 2555) หากเกษตรกรเอาใจใส่ดูแลรักษาสวนยาง หมั่นสังเกตและหาสาเหตุของความผิดปกตินั้นจะสามารถควบคุมและป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายกับต้นยางเพิ่มมากขึ้น

Erwin และ Ribeiro รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับ *Phytophthora* sp. 58 ชนิด ตั้งแต่ *Phytophthora infestans* ในปีค.ศ.1876 ถึง *Phytophthora idaei* ในปีค.ศ.1995 และในช่วงท้ายของปีค.ศ.2011 มีการระบุชนิดของ *Phytophthora* sp. อย่างเป็นทางการประมาณ 114 ชนิด (Hansen และคณะ, 2012) และในปีค.ศ.1858 Pringshiem มีการรายงานว่าพบ *Pythium* sp. มีมากกว่า 200 ชนิดทั่วโลก ปัจจุบันมีการระบุชนิด *Pythium* sp. ได้แล้ว 327 ชนิดและ *Phytopythium* sp. 29 ชนิด (Miao และคณะ, 2020) การเพิ่มขึ้นของความหลากหลายนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงแนวความคิดเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต, การประยุกต์ใช้เครื่องมือระดับโมเลกุลในการจัดอนุกรมวิธานใหม่ และมีการค้นหาแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ของเชื้อรา (Hansen และคณะ, 2012) เมื่อนำความรู้และเทคนิควิธีการในปัจจุบันมาประยุกต์ใช้อาจทำให้ค้นพบราน้ำในอันดับ Peronosporales ชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในต้นยางพาราได้ เพื่อให้ทราบสาเหตุของความผิดปกติและสามารถหาวิธีควบคุมและป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายกับต้นยางเพิ่มขึ้นได้

บทที่ 2
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) กรรไกร
2) กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
3) กระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร
4) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) รุ่น SZ-PT ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
5) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
6) ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
7) ขวดดูแรน (duran) ของบริษัท Schott ประเทศเยอรมัน
8) ขวดพลาสติกสำหรับปั่นตกตะกอน
9) ขวดรูปชมพู่ (flask) ของบริษัท Pyrex ประเทศเยอรมัน
10) เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (hook)
11) คีมคีบ (forceps)
12) เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova2300 ของบริษัท NewBrunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
13) เครื่องชั่งไฟฟ้ารุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledon ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
14) เครื่องชั่งไฟฟ้ารุ่น PG2002-5 ของบริษัท Mettler Toledon ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
15) เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kokusan ประเทศญี่ปุ่น
16) เครื่องปั่นตกตะกอนขนาดใหญ่ (centrifuge) บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน
17) เครื่องปั่นตกตะกอนแบบตั้งโต๊ะ (micro-centrifuge) รุ่น WiseSpin CF-10 ของบริษัท DAIHAN Scientific ประเทศเกาหลี
18) เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น VM-10 ของบริษัท DAIHAN Scientific ประเทศเกาหลี
19) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) รุ่น T100 Thermal Cycle ของบริษัท Bio-Rad ประเทศไทย
20) จานเลี้ยงเชื้อแก้ว
21) จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกของบริษัท Greiner bio-one ประเทศไทย
22) ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis system) รุ่น Minis-150 ของบริษัท Major science ประเทศไต้หวัน

23) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ (freezer) -20 องศาเซลเซียส บริษัท Panasonic ประเทศญี่ปุ่น
24) ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO ประเทศญี่ปุ่น
25) ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ (refrigerator) 4 องศาเซลเซียส บริษัท Mitsubishi ประเทศญี่ปุ่น
26) ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท BossTech จากสหราชอาณาจักร
27) ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น Cleanmodel V.6 ของบริษัท Lab service ประเทศสหรัฐอเมริกา
28) ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
29) ตู้อบแห้ง (dryer) ของบริษัท Contherm ประเทศนิวซีแลนด์
30) ถุงพลาสติกใสหรือถุงร้อน
31) ถุงมือยาง
32) ถุงมือไนไตร (nitrile gloves)
33) ทิป (tip) ขนาด 2.5 ไมโครลิตร
34) ทิป (tip) ขนาด 20 ไมโครลิตร ของบริษัท Trefflab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
35) ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Treffab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
36) ทิป (tip) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Bioline
37) ทิป (tip) ขนาด 10 มิลลิลิตร
38) ที่ตั้งหลอดพลาสติก
39) แท่งแก้วหยดสาร (dropper)
40) แท่งแก้วกระจายเชื้อ (glass spreader)
41) บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท Pyrex ประเทศเยอรมัน
42) แผ่นปิดสไลด์ (coverslip) ขนาด 22x22 มิลลิเมตร ของบริษัท Menzel-Glaser
43) พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)
44) อะลูมิเนียมฟอยล์
45) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2.5 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
46) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
47) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
48) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
49) หลอดเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR tubes) ของบริษัท QSP ประเทศสหรัฐอเมริกา
50) หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen ประเทศสหรัฐอเมริกา

51) Gel Documentation ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1) วุ้นผง (agar) ผลิตโดยบริษัท Productora de agar S.A. ประเทศชิลี
2) ชุดสกัดพลาสมิด PureDirex Plasmid miniprep Kit ของบริษัท bio-helix ประเทศไต้หวัน
3) น้ำกลั่น (distilled water)
4) น้ำผักพร้อมดื่มยี่ห้อ V8 สูตร Original ผลิตโดยบริษัท Campbell soup ประเทศสหรัฐอเมริกา
5) น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ
6) อะกาโรส (agarose) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
7) เอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ผลิตโดยบริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา
8) Absolute ethanol
9) Ampicillin ของบริษัท M & H manufacturing ประเทศไทย
10) Lactophenol cotton blue
11) LB broth (Luria-Bertani) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
12) DNA polymerase ของบริษัท Apsalagen ประเทศไทย
13) DNA marker ของบริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
14) BioFACT^{TM} Gel & PCR Purification System ของบริษัท Biofactory ประเทศเกาหลี
15) T&A^{TM} Cloning Kit ของบริษัท Yeastern biotech ประเทศไต้หวัน
16) S.O.C medium (super optimal broth with catabolic repressor)

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 คัดแยกราน้ำจากก้านใบยางตัวอย่าง

นำก้านใบยางที่แสดงลักษณะอาการของโรค ซึ่งเก็บตัวอย่างจากสวนยางพาราในจังหวัดพัทลุงและจังหวัดระยอง รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) ที่มีสารยับยั้งแบคทีเรียและราที่เจริญเร็ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน ก่อนจะทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงปราศจากเชื้อกดลงบนผิวหน้าของอาหารใช้เข็มเขี่ยปลายงอเกี่ยว agar plug วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 จานใหม่

3.2 คัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เมื่อได้โคโลนีของราจึงทำเป็น agar plug 2 ชิ้น ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำ P3 ใส่เมล็ดงา จำนวน 3 เมล็ด บ่มที่มีแสงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังบ่มครบกำหนดจึงเกี่ยวสายใยที่เจริญรอบเมล็ดงาใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนน้ำใหม่ ก่อนนำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกระตุ้นให้มีการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากซูโอสปอร์แรงเจียม สังเกตการปล่อยซูโอสปอร์โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วปิเปตน้ำบริเวณที่พบว่ามีการปล่อยซูโอสปอร์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่มีสารยับยั้งแบคทีเรีย จากนั้นใช้แท่งแก้วกระจายเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว บ่นที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากการแยกโดยใช้ซูโอสปอร์เดี่ยว

3.3 ตรวจสอบสกุลราโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ใช้เส้นใยของราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แต่ละไอโซเลทนำมาเกี่ยวเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยตรง มาผสมกับสารส่วนประกอบต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.1 ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (ตารางที่ 3.2) โดยจะใช้ตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่นและใช้ตัวแปรควบคุมบวกเป็น *Pythium* sp. หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง gel documentation

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ส่วนประกอบ		ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Nuclease-free water		18.625
10X PCR buffer		2.5
50 mM $MgCl_2$		0.75
50 mM dNTPs mix		0.5
ไพรเมอร์	10 μM ITS1 (Forward)	1.25
	10 μM ITS4 (Reverse)	1.25
Taq Polymerase		0.125
เส้นใยจากรานำ้แต่ละไอโซเลท		0
ปริมาตรรวม		25

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ชื่อ	ฟังก์ชัน	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’-3’)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธี PCR (bp)	อุณหภูมิหลอมเหลว (℃)
ITS1	Forward	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	870-900	65
ITS4	Reverse	ITS2	TCCTCCGCTTATTGATATGC		58

(White และคณะ, 1990)

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 3.3 โดยทำซ้ำจำนวน 30 รอบ ในขั้นตอน denaturation, annealing และ extension

ตารางที่ 3.3 ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initiation denaturation	94.0	3.00
Denaturation	94.0	0.30
Annealing	55.0	0.30
Extension	72.0	1.00
Final extension	72.0	5.00

วิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสเจลให้มีความเข้มข้น 1% โดยชั่งอะกาโรส 0.5 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1X TAE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อน แล้วจึงเทเจลที่ละลายลงในแม่พิมพ์ โดยวางหวีตามขนาดที่เหมาะสมกับการใช้งาน วางไว้จนเจลแข็งตัว ดึงหวีออกแล้วนำไปใส่ในเครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเติม 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยผสม 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้ากับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของราน้ำจากแต่ละไอโซเลทให้เข้ากัน และใส่ลงในช่องเจลแต่ละช่อง โดยมี 1 kb DNA Ladder เป็นตัวระบุขนาดผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอ กำหนดให้เครื่องมีความต่างศักย์ 100 โวลต์ ตั้งเวลา 30 นาที แล้วนำเจลที่ได้มาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและถ่ายรูปด้วยเครื่อง gel documentation

3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป

ศึกษาลักษณะของซูโอสปอร์แรงเจียมที่ราน้ำสร้างโดยนำ agar plug 2 ชิ้น ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำ P3 ใส่เมล็ดงาจำนวน 3 เมล็ด บ่มที่มีแสงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังบ่มครบกำหนดจึงเกี่ยวสายใยที่เจริญรอบเมล็ดงาใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนน้ำใหม่ ก่อนนำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกระตุ้นให้มีการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากซูโอสปอร์แรงเจียม สังเกตการปล่อยซูโอสปอร์

โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และลักษณะของเส้นใย สปอร์แรงเจียม โอโอโกเนียม โดยการเกี่ยวสายใยมาวางบนสไลด์ ย้อมด้วยสี Lactophenol Cotton Blue ปิดกระจกปิดสไลด์แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 40X

ศึกษารูปแบบของโคโลนีของราน้ำแต่ละไอโซเลท โดยทำเป็น agar plug แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตรูปแบบการเจริญของโคโลนี

3.5 ศึกษาอุณหภูมิในการเจริญ

นำ agar plug ของราน้ำแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อหาอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) และอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) ที่ราน้ำแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญได้ โดยทำการทดลองเป็น 3 ซ้ำต่อตัวอย่างราน้ำที่บ่มในแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในแต่ละวัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง

3.6 ระบุสายพันธุ์ของราน้ำจากลำดับสารพันธุกรรม

3.6.1 เตรียม competent cell

เตรียม *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายห่วงเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดแก้วขนาดเล็กซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มโดยนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายสารแขวนลอยเซลล์จากขวดแก้วเล็กลงขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเหลว LB ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มโดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที วัดค่าที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.35-0.40 เมื่อได้ค่าที่เหมาะสม จึงแบ่งสารแขวนลอยเซลล์ลงขวดเซนติฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร แช่ขวดเซนติฟิวจ์ลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย $MgCl_2 \cdot CaCl_2$ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.1M $CaCl_2$ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เติม 85% glycerol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2 เตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพเมอร์ ITS1 ละ ITS4 โดยใช้เส้นใยของราน้ำที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แต่ละไอโซเลท เกี่ยวสายใยของราโดยผสมกับสารส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.6.3 ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทดสอบ BioFACT™ Gel & PCR Purification ทำการทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ

3.6.4 โคลนชิ้นดีเอ็นเอลงในพลาสมิด

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาโคลนลงในพลาสมิด ใช้ชุดทดสอบสำเร็จ T&A™ Cloning Kit โดยทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ

3.6.5 นำพลาสมิดเข้าเซลล์ *E. coli*

นำ competent cell ที่เตรียมไว้มาใช้ในกระบวนการ transformation เพื่อนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ *E. coli* นำ competent cell ที่เก็บอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปิเปตใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นแช่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อมาใส่พลาสมิดปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เติม S.O.C medium ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มโดยนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยด้วยแท่งแก้วกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.6.6 คัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีหลังจากนำเข้าพลาสมิด

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินมาแยกด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวจึงนำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินตามช่องกริด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เจริญมา 3 โคโลนีต่อตัวอย่างราน้ำ 1 ไอโซเลท โดยแบ่งแต่ละโคโลนีเป็นครึ่งหนึ่ง นำไปแยกด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวไว้สำหรับสกัดพลาสมิด และนำอีกครึ่งหนึ่งของโคโลนีนำไปเพื่อปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 วิเคราะห์ผลด้วย

วิธี agarose gel electrophoresis เป็นการตรวจสอบก่อนที่จะสกัดพลาสมิดเพื่อยืนยันว่าโคโลนีที่เลือกมามีชิ้นส่วนพลาสมิดของตัวอย่างรานำ้

3.6.7 สกัดพลาสมิด

นำโคโลนีเดี่ยวอีกครึ่งหนึ่งที่เหลือไปลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวด้วยวิธีด้วยวิธี streak plate แล้วนำมาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ PureDirex Plasmid miniprep ทำการทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ จากนั้นวัดความเข้มข้นที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ให้ได้ความเข้มข้นอย่างน้อย 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วจึงแบ่งพลาสมิดที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่งไปหาลำดับสารพันธุกรรม

3.6.8 วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย BLASTn จากนั้นนำมาเรียงโดยใช้ ClustalW ในโปรแกรม MEGA 7 สร้างเป็นแผนรูปวิวัฒนาการของลำดับเบสที่ได้จากยีนบริเวณ ITS

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ไอโซเลทของราน้ำที่คัดเลือก

เมื่อนำก้านใบยางพาราตัวอย่างที่มีลักษณะของรอยโรคใบร่วง คือ ก้านใบมีรอยช้ำสีดำ มาคัดแยกราน้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 พบว่าได้ไอโซเลทของราน้ำทั้งหมด 4 ไอโซเลท โดยเป็นไอโซเลทที่แยกจากก้านใบยางพาราตัวอย่างในพื้นที่ภาคใต้ ในจังหวัดสงขลา 2 ไอโซเลท และจากพื้นที่ภาคตะวันออก ในจังหวัดระยอง 2 ไอโซเลท โดยมีพื้นที่เก็บตัวอย่างตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างและไอโซเลทของราน้ำ

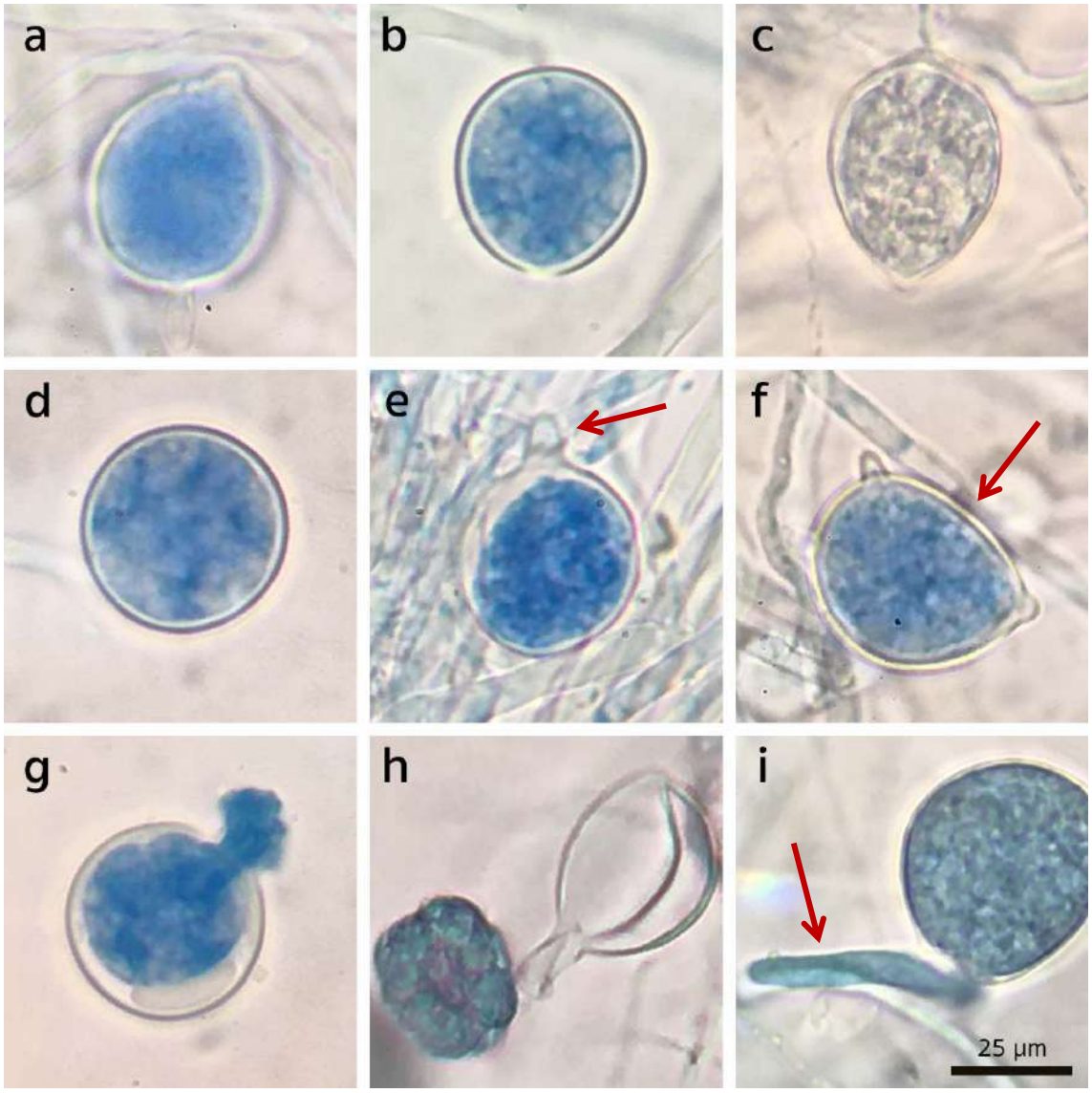
พิกัด	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง
6.694056, 100.352417	สวนยางพาราในพื้นที่ จ.สงขลา	S.1
		S.2
12.934774, 101.516959	สวนยางพาราใกล้กับ สถานีตำรวจภูธรวังจันทร์ จ.ระยอง	S.3
		S.4

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป

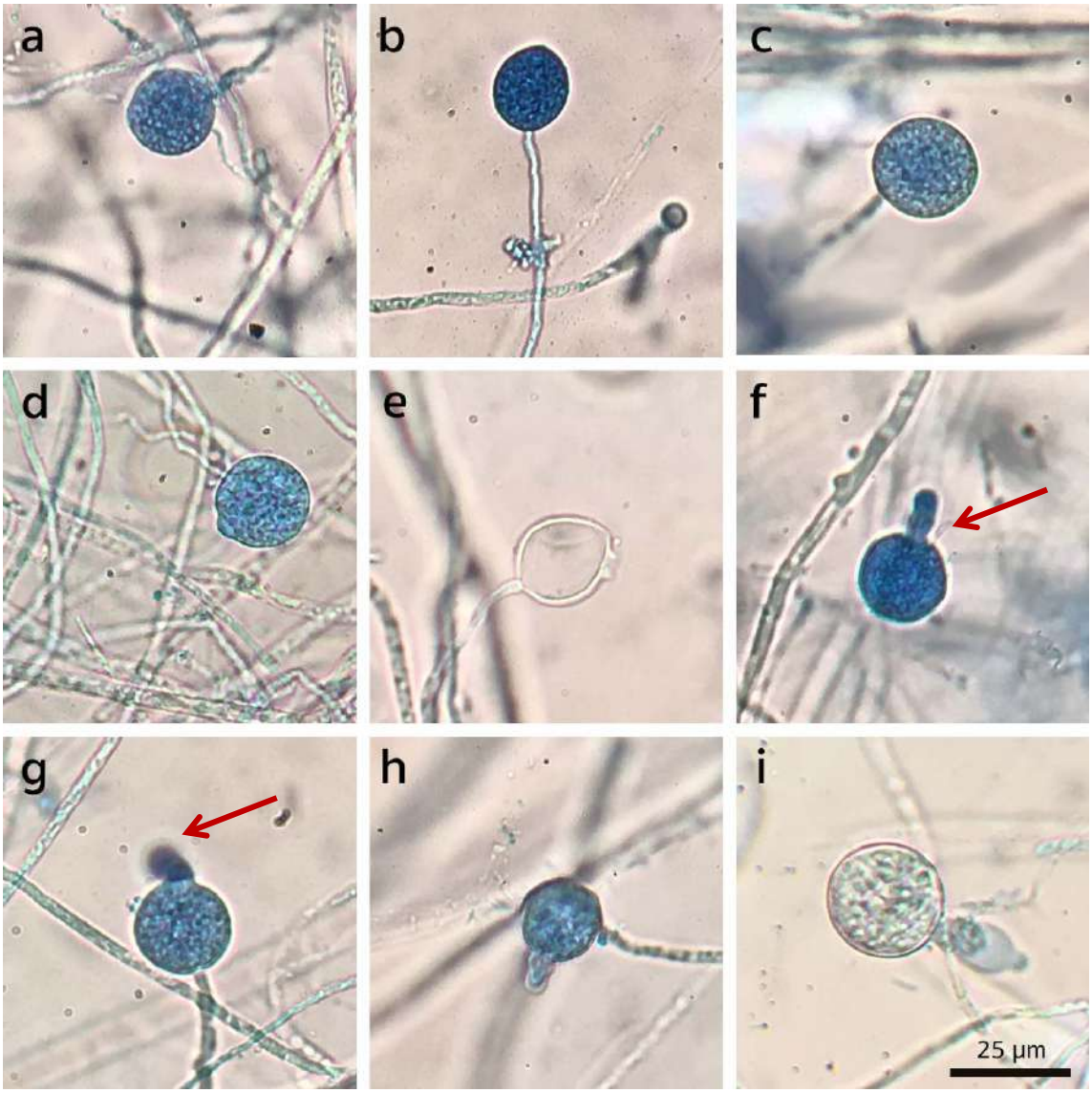
เมื่อคัดแยกราน้ำจากตัวอย่างแต่ละไอโซเลทจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำไอโซเลทที่คาดว่าจะเป็น ไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*), พิเที่ยม (*Pythium*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium)* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นบันทึกข้อมูลสปอร์แรงเจียม 50 สปอร์ ได้ผลตามตารางที่ 4.2 และแต่ละไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงตามรูปที่ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสปอร์แรงเจียมของไอโซเลทรานำ้ที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	ลักษณะของสปอร์แรงเจียม								
	ขนาดสปอร์แรงเจียม (ไมโครเมตร)						การสร้าง papilla	รูปทรง	อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง
	ความยาว			ความกว้าง					
	สูงสุด	ต่ำสุด	เฉลี่ย	สูงสุด	ต่ำสุด	เฉลี่ย			
S.1	48.6	31.7	40.0	43.7	27.8	37.0	สร้าง papilla	Globose, Obturbinate, Ovoid	1.08
S.2	23.8	15.9	20.0	23.5	15.1	18.6	ไม่สร้าง papilla	Globose, Obturbinate, Ovoid	1.07
S.3	40.2	25.7	33.5	36.0	21.2	27.5	ไม้สร้าง papilla	Obturbinate, Ovoid, Obovoid	1.22
S.4	38.1	23.4	31.8	32.4	21.3	27.4	ไม่สร้าง papilla	Globose, Obturbinate , Ovoid	1.16

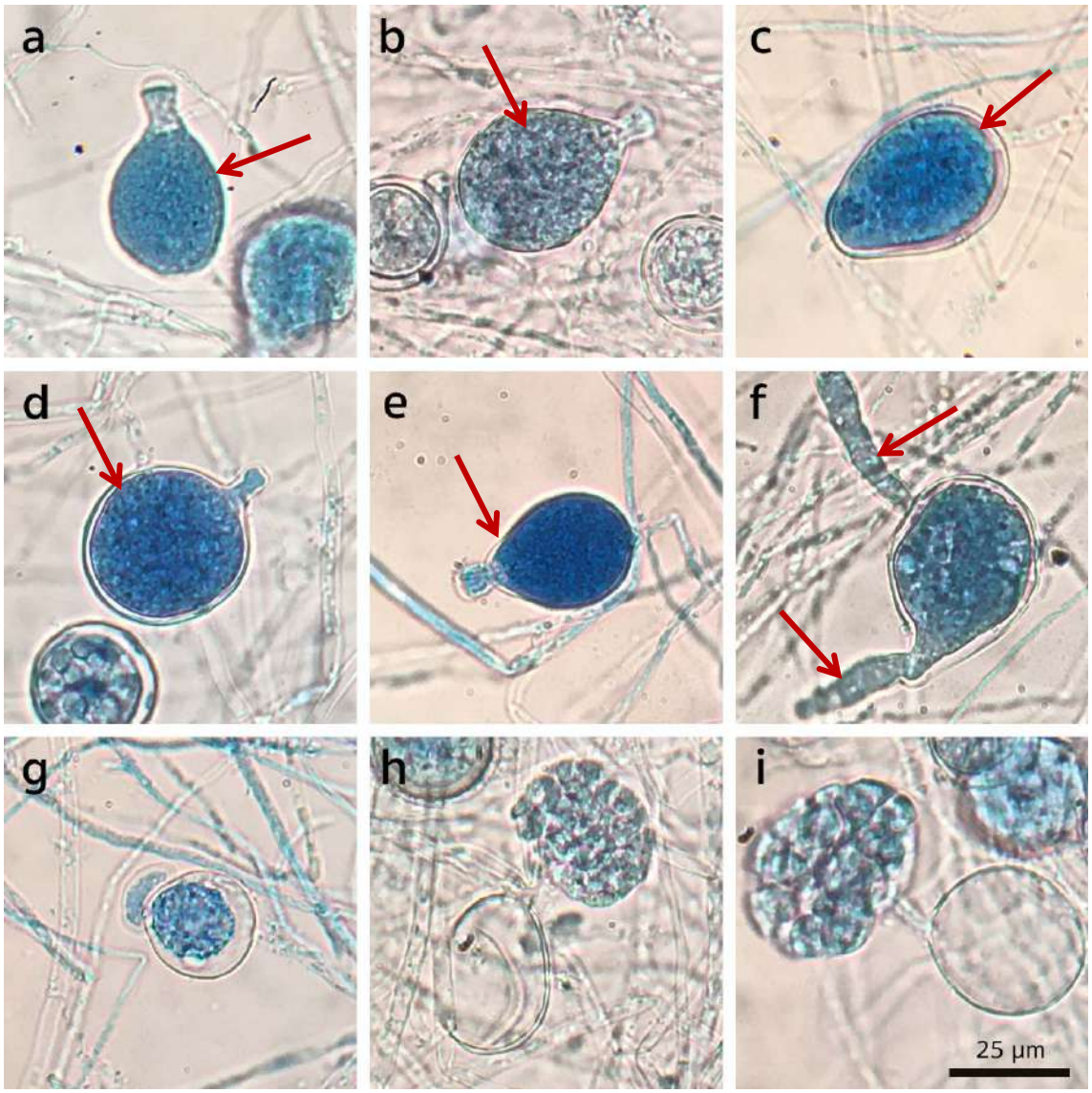


รูปที่ 4.1 ไอโซเลท S.1 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า **(a-c)** สปอร์แรงเจียมรูปทรง ovoid; **(d)** สปอร์แรงเจียมรูปทรง globose; **(e)** สปอร์แรงเจียมสร้าง papilla; **(f)** สปอร์แรงเจียมสร้าง 2 papilla; **(g)** protoplasm ถูกดันออกจากสปอร์แรงเจียมเข้าสู่ vesicle; **(h)** สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนาภายใน vesicle; **(i)** Outgrowing papilla

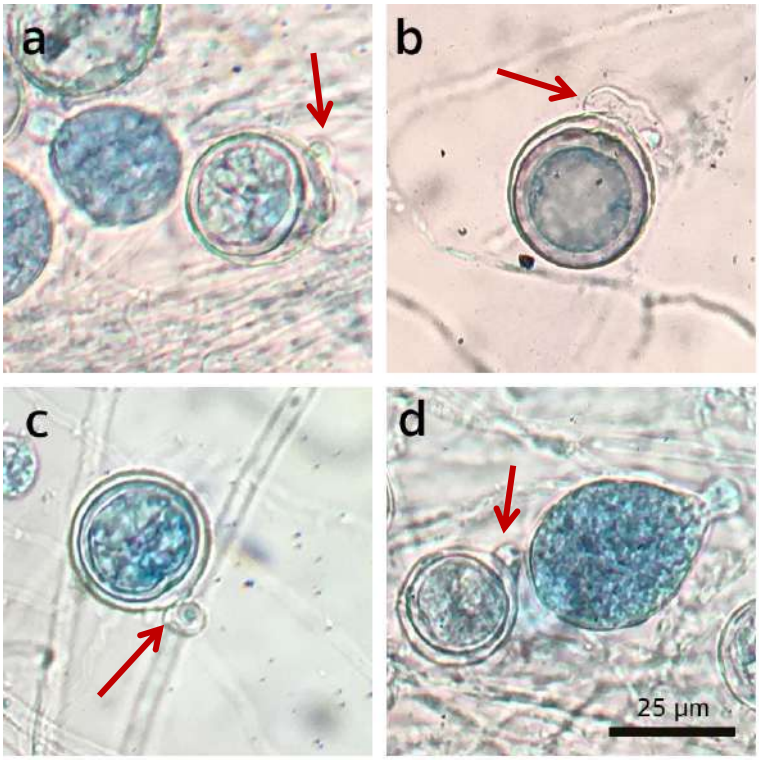


รูปที่ 4.2 ไอโซเลท S.2 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า **(a-d)** สปอร์แรงเจียม; **(e)** สปอร์แรงเรียมที่ว่างเปล่า; **(f)** Outgrowing papilla; **(g-i)** vesicle กำลังพัฒนา

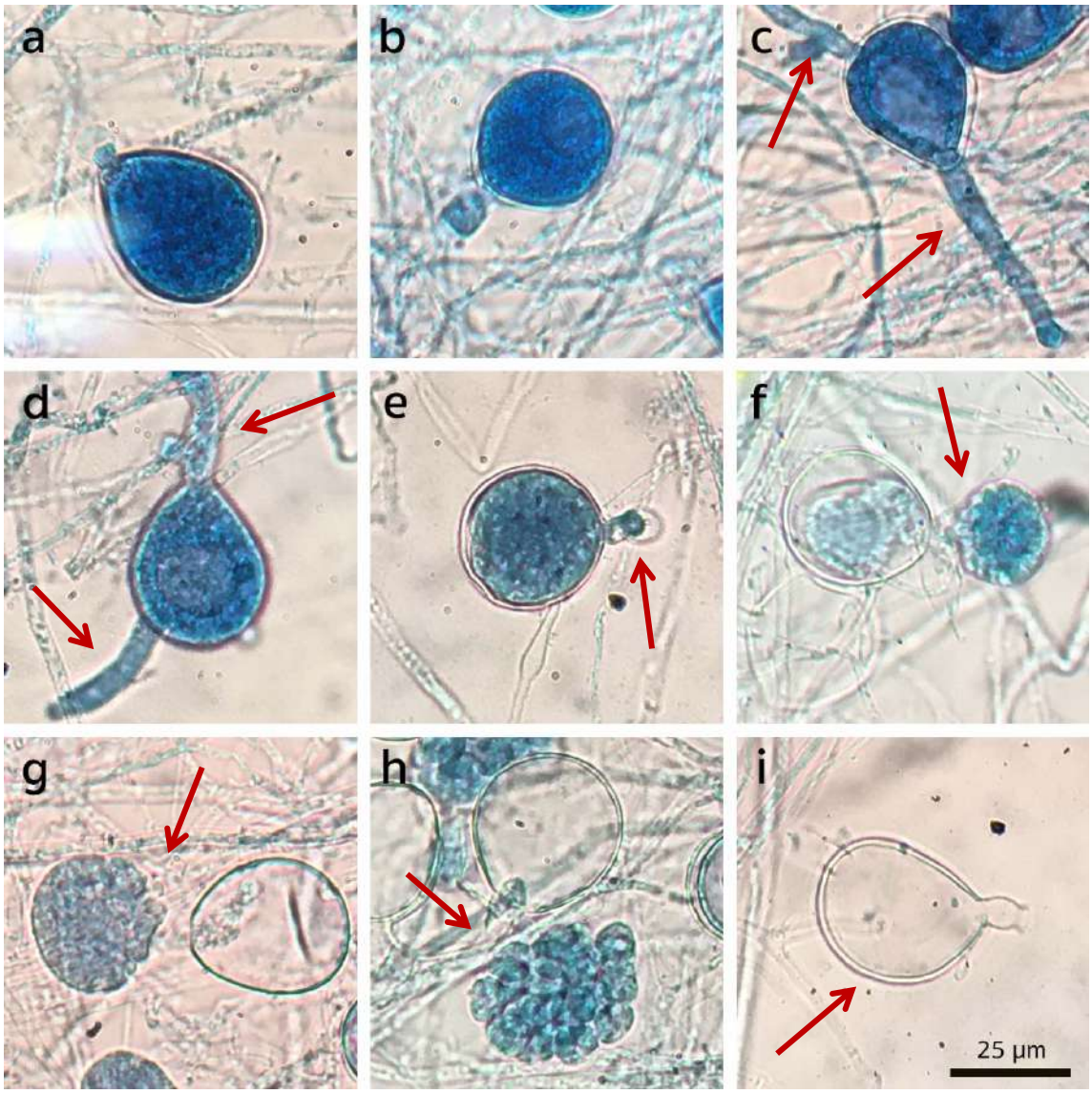
รูปที่ 4.3 ไอโซเลท S.2 แสดงลักษณะโอโอโกเนียมและแอนเทอริเดียม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า **(a-b)** ลูกศรชี้ตำแหน่งของแอนเทอริเดียม



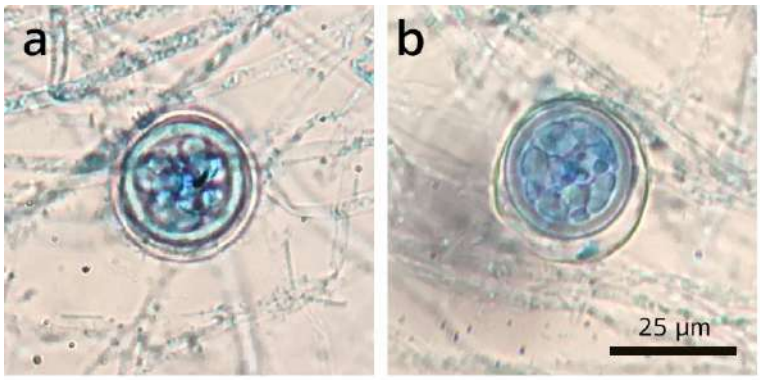
รูปที่ 4.4 ไอโซเลท S.3 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า **(a-e)** สปอร์แรงเจียม; **(f)** Outgrowing และ branching papilla; **(g)** protoplasm ถูกดันออกจากสปอร์แรงเจียมเข้าสู่ vesicle; **(h-i)** สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนาภายใน vesicle



รูปที่ 4.5 ไอโซเลท S.3 แสดงลักษณะโอโอโกเนียมและแอนเทอริเดียม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า **(a-d)** ลูกศรชี้ตำแหน่งของแอนเทอริเดียม

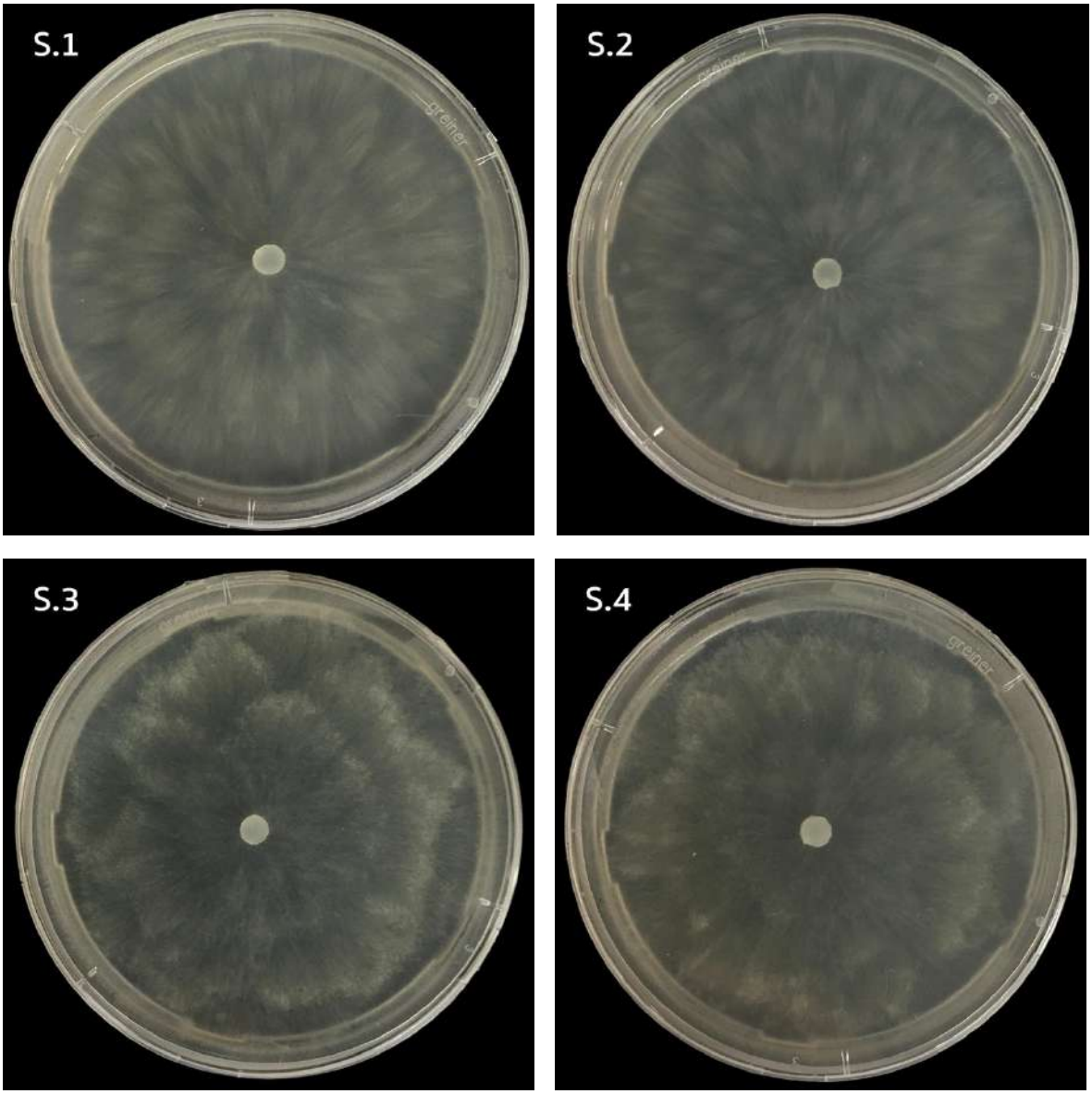


รูปที่ 4.6 ไอโซเลท S.4 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า
(a-b) สปอร์แรงเจียม; **(c-d)** Outgrowing และ branching papilla;
(e-g) protoplasm ถูกดันออกจากสปอร์แรงเจียมเข้าสู่ vesicle;
(h) สปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่กำลังพัฒนาภายใน vesicle; **(i)** สปอร์แรงเจียมที่ว่างเปล่า



รูปที่ 4.7 ไอโซเลท S.4 แสดงลักษณะโอโอโกเนียม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า
(a-b) โอโอโกเนียม

ลักษณะของโคโลนีเมื่อนำตัวอย่างราน้ำทั้ง 4 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท S.1 และ S.2 มีลักษณะโคโลนีเป็นแบบ stellate และไอโซเลท S.3 และ S.4 มีลักษณะโคโลนีแบบ petaloid ดังแสดงในรูปที่ 4.8

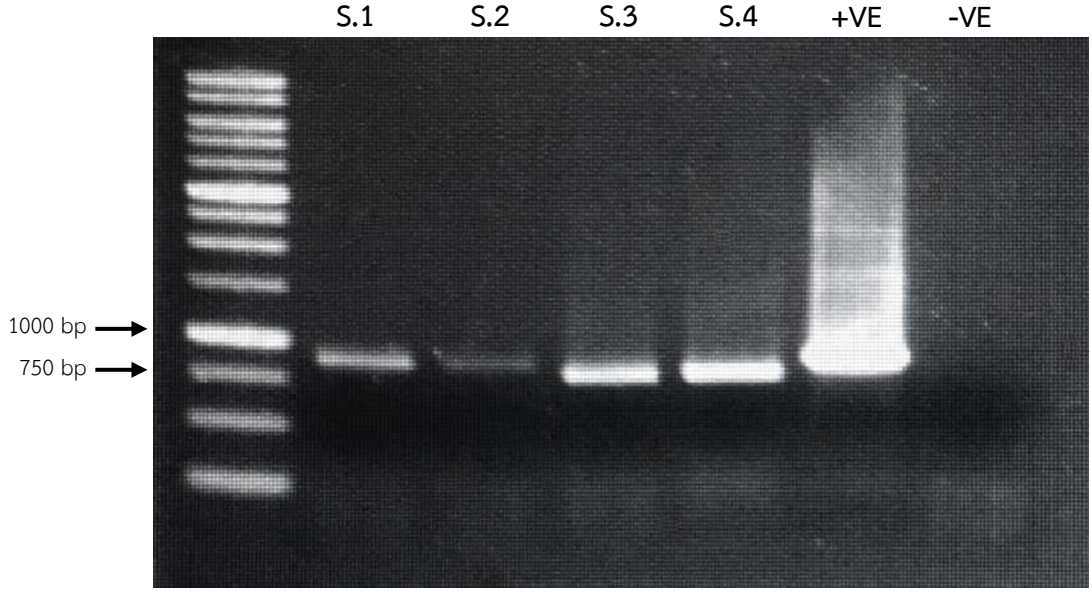


รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของราน้ำ S.1, S.2, S.3 และ S.4
ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 4 วัน

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

เมื่อนำตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลทไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท แสดงแถบตรงกับขนาดดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก (รูปที่ 4.9) ซึ่งใช้ *Phytopythium* species เทียบกับตัวควบคุมลบที่ใช้น้ำกลั่น จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นราหรือสิ่งมีชีวิตคล้ายรา



รูปที่ 4.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท S.1, S.2, S.3 และ S.4 โดยมีตัวแปรควบคุมบวกเป็น *Phytopythium* species ตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

4.5 ศึกษาอุณหภูมิในการเจริญ

ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด-19

4.6 ระบุสายพันธุ์ของราน้ำจากลำดับสารพันธุกรรม

ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด-19

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการนำก้านใบยางตัวอย่างที่มีลักษณะของรอยโรคคือ ก้านใบมีรอยช้ำสีดำ หลุดร่วงจากต้นทั้งที่ใบยังมีสีเขียว มาวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่มีสารยับยั้งแบคทีเรียและสารยับยั้งราที่เจริญเร็ว บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไปก้านใบยางที่มีการติดเชื้อราจะมีสายใยเจริญออกมาจากก้านใบยางนั้น ทำ agar plug บริเวณปลายเส้นใย นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบดูลักษณะการเจริญของโคโลนีเบื้องต้น พร้อมทั้งทดสอบเบื้องต้นว่ารานั้นเป็นราในกลุ่มใดด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 หากผลปรากฏว่าตัวอย่างเส้นใยจากก้านใบยางหนึ่งมีแถบดีเอ็นเอตรงกับแถบของ DNA ladder ขนาดประมาณ 400-500 bp ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอของราแท้ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycota) ซึ่งไม่ใช่กลุ่มของราน้ำที่สนใจในงานวิจัยนี้ก็จะคัดทิ้งไป และเมื่อตรวจสอบสายใยที่เจริญมาจากก้านใบยางและนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ผลปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอตรงกับแถบของ DNA ladder ขนาดประมาณ 800-900 bp ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอของราน้ำในชั้น oomycetes จากนั้นคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จากการแยกโดยใช้ซูโอสปอร์เดี่ยวทำให้ได้ราน้ำ 4 ไอโซเลท คือ S.1, S.2, S.3 และ S.4 นำแต่ละไอโซเลทที่เป็นเชื้อเดี่ยวแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 อีกครั้ง ผลปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอตรงกับแถบของ DNA ladder ขนาดประมาณ 800-900 bp จึงทำให้ยืนยันได้ว่าแต่ละไอโซเลทเดี่ยวนี้อยู่ในกลุ่มของราน้ำ

เมื่อนำราน้ำแต่ละไอโซเลทเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 4 วันก่อนจะทำ agar plug บริเวณปลายเส้นใยนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีเมล็ดงาและน้ำจากธรรมชาติ เป็นเวลา 5 วัน บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า ตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท สร้างเส้นใยสีขาว และสร้างสปอร์แรงเจียม ซึ่งสปอร์แรงเจียมของไอโซเลท S.1 และ S.2 มีรูปทรงที่เหมือนกันเป็นแบบ Globose, Obturbinate และ Ovoid ไอโซเลท S.1 สร้าง papilla มีสปอร์แรงเจียมขนาดเฉลี่ย 40.0 x 37.0 ไมโครเมตร และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 1.08 ส่วนไอโซเลท S.2 ไม่สร้าง papilla มีสปอร์แรงเจียมขนาดเฉลี่ย 20.0 x 18.6 ไมโครเมตร และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 มีการสร้างซูโอสปอร์ภายใน vesicle ในขณะที่ไอโซเลท S.3 สปอร์แรงเจียมรูปทรงเป็นแบบ Obturbinate, Ovoid และ Obovoid ไม่สร้าง papilla มีสปอร์แรงเจียมขนาดเฉลี่ย 33.5 x 27.5 ไมโครเมตร และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 1.22 ส่วนไอโซเลท S.4 มีสปอร์แรงเจียมรูปทรงแบบ Globose, Obturbinate และ Ovoid สร้าง papilla มีสปอร์แรงเจียมขนาดเฉลี่ย 31.8 x 27.4 ไมโครเมตร มีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 1.16 แต่ละไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับไอโซเลทของไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*), พิเที่ยม (*Pythium*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium*) ที่เคยมีการรายงานค้นพบก่อนหน้านี้ในประเทศไทยตามการรายงานของ Suksiri S. และคณะ, 2018 และ Saelee R. และคณะ, 2021 แต่ทุกไอโซเลทมีการสร้างท่อปล่อยซูโอสปอร์ให้มาพัฒนาภายใน vesicle ซึ่งเป็นลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาที่มักพบในพิเที่ยม (*Pythium*) และ ไฟโทพิเที่ยม (*Phytopythium*) จึงอาจจะมีความเป็นไปได้ว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้เป็นราน้ำในสกุลดังกล่าว

จากรายงานก่อนหน้ามีค้นพบ *Phytopythium cucurbitacearum* ที่คัดแยกจากต้นยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทย (Hattapanichaporn C. และคณะ, 2020) (Saelee R. และคณะ, 2021) ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีและสปอร์แรงเจียม คล้ายกันกับไอโซเลท S.2 อีกทั้งมีการรายงานพบ *Phy. cucurbitacearum* ที่คัดแยกจากสวนทุเรียนในพื้นที่ภาคใต้ จ.ชุมพร (Suksiri S. และคณะ, 2018) ซึ่งมีขนาดและลักษณะของสปอร์แรงเจียมใกล้เคียงกับไอโซเลท S.2 แต่วิธีในการเพาะเลี้ยงก่อนดูลักษณะสัณฐานวิทยาต่างกัน โดยในรายงานของ Suksiri S. และคณะ เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) แล้วจึงดูลักษณะสัณฐานวิทยา ส่วนในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงในน้ำจากธรรมชาติก่อนดูลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นวิธีเดียวกับการรายงานของ Hattapanichaporn C. และคณะ และ Saelee R. และคณะ อีกทั้งในการรายงานของ Hattapanichaporn C. และคณะ ระบุว่า *Phy. cucurbitacearum* สร้างสปอร์แรงเจียมเฉพาะในน้ำ

แต่อย่างไรก็ตาม จะต้องมีการศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้ชัดเจน เพื่อยืนยันว่าแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้เป็นชนิดใด โดยเทียบลำดับสารพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลทในฐานข้อมูลแล้วจึงใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด

หากผลการศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมของไอโซเลท S.2 ระบุว่ามีความใกล้ชิดกับ *Phytopythium* sp. งานวิจัยนี้จะเป็นรายงานการค้นพบ *Phytopythium* sp. ที่ก่อโรคในต้นยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยเป็นครั้งแรก

แผนการทดลองต่อไปในอนาคต

เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จะต้องทำการทดลองระบุสายพันธุ์จากลำดับสารพันธุกรรมแล้วนำลำดับสารพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล สร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ และศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยากับสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็ควรศึกษาลักษณะอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น โอโอโกเนียม (oogonium), แอนเทอริเดียม (antheridium) และ การสร้างใหม่ของสปอร์แรงเจียม เป็นต้น พร้อมทั้งศึกษาการเจริญและอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และศึกษาความสามารถในการก่อโรคบนใบยางพารา

เอกสารอ้างอิง

Laohasakul B., Boonyapipat P., and Plodpai P. (2017). First Report of *Phytophthora citrophthora* Causing Leaf Fall of Rubber Tree (Hevea brasiliensis) in Thailand. Plant Disease, 101(6). https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-0973-PDN

Broders K. D., Lipps P. E., Ellis M. L., & Dorrance A. E. (2009). *Pythium delawarii*--a new species isolated from soybean in Ohio. Mycologia, 101(2), 232-238. https://doi.org/10.3852/08-133

De Cock A. W., Lodhi A. M., Rintoul T. L., Bala K., Robideau G. P., Abad Z. G., Coffey M. D., Shahzad S., and Levesque C. A. (2015). *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. Persoonia, 34, 25-39. https://doi.org/10.3767/003158515X685382

De Cock, and Lévesque (2004). New species of Pythium and Phytophthora. Studies in Mycology, 50(2), 481-487.

Drenth A., Guest D. I., et al. (2004). Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Australian Centre for International Agricultural Research, 238, 1863204059.

Drenth A., Sendall B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection.

Fawke S., Doumane M., and Schornack S. (2015). Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79(3), 263-280. https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-15

Fry William E. and Niklaus J. Grünwald. (2010). Introduction to Oomycetes. https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/oomycete/introduction/Pages/IntroOomycetes.aspx

Hansen E. M., Reeser P. W., and Sutton W. (2012). *Phytophthora* beyond agriculture. Annu Rev Phytopathol, 50, 359-378. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172946

Hattapanichaporn C., Hakhunthod W., Wongkasemsiri A., Assavalapsakul W., and Kriangkripipat T. (2020). A novel, virus-like double-stranded RNA in *Phytopythium cucurbitacearum* isolated from para rubber tree (Hevea brasiliensis) in eastern Thailand. Agriculture and natural resources, 54(2), 180-189. https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/242183

Khan M. F., Haque M. E., Hakk P., Bhuyian M. Z. R., Liu Y., Johnson J., and Peters D. (2020). First report of *Pythium ultimum* causing damping-off of Sugar beet (*Beta vulgaris.* L) in Montana, USA. Plant Dis. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2108-PDN

Martin F. N., Blair J. E., and Coffey M. D. (2014). A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. Fungal Genet Biol, 66, 19-32. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.006

McGowan J., and Fitzpatrick D. A. (2020). Recent advances in oomycete genomics. Adv Genet, 105, 175-228. https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.03.001

Miao J., Liu X., Du X., Li G., Li C., Zhao D., and Liu X. (2020). Sensitivity of *Pythium* spp. and *Phytopythium* spp. and tolerance mechanism of *Pythium* spp. to oxathiapiprolin. Pest Manag Sci, 76(12), 3975-3981. https://doi.org/10.1002/ps.5946

Saelee R.,Busrakam K., Koohakan P. (2021). Morphological Characterization and Phylogeny of *Pythium* and Related Genera in Rayong Province, Thailand. Current Applied Science and Technology, 21(1).

Suksiri S., Laipasu P., Soytong K., Poeaim S. (2018). Isolation and Identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from Durian Orchard in Chumphon Province, Thailand. International Journal of Agricultural Technology, 14(30), 389-402.

Torres G. A., Sarria G. A., Martinez G., Varon F., Drenth A., and Guest D. I. (2016). Bud Rot Caused by *Phytophthora palmivora*: A Destructive Emerging Disease of Oil Palm. Phytopathology, 106(4), 320-329. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0243-RVW

White TJ., Bruns T., Lee SJ., and Taylor JL. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1

Yadav M. C. (2008). DNA Markers in Crop Improvement. Recent Advances in Agricultural Sciences, 66-80.

Yang X., and Hong C. (2018). Differential Usefulness of Nine Commonly Used Genetic Markers for Identifying *Phytophthora* Species. Front Microbiol, 9, 2334. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02334

Yu Y., Gao C., Wang T., Chen Y., Cheng Y., Li Z., Chen J., Guo L., Sun X., and Xu, J. (2020). Genome Sequence Resource for the Ramie Oomycete Pathogen *Phytopythium vexans* HF1. Mol Plant Microbe Interact, 33(11), 1270-1273. https://doi.org/10.1094/MPMI-04-20-0085-A

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. (2012). โรคและอาการผิดปกติของยางพาราปี 2555. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. http://elearning.raot.co.th/wp-content/uploads/2020/09/โรคและอาการผิดปกติของยางพารา-หน้า1.pdf

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2020). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2564. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 76-78. http://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/57_trend-2564/#page=90

เสมอใจ ชื่อจิตต์, วสันณ์ เพชรรัตน์, พรศิลป์ จันทวีเมือง. (2008). ประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* ของกล้ายางพารา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Clarified V8

น้ำผักพร้อมดื่มยี่ห้อ V8 สูตร Original	340	มิลลิลิตร
$CaCo_3$	3.4	กรัม

น้ำ V8 ผลิตโดย บริษัท แคมเบลล์ ซุปคัมปานี จำกัด ปริมาตร 340 มิลลิลิตรผสมกับ $CaCo_3$ 3.4 กรัม จากนั้นใส่ขวดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 1,600 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บส่วนใสมาใส่ขวดดูแรนแล้วแช่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8

Clarified V8	15	มิลลิลิตร
Agar	4.5	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	285	มิลลิลิตร

นำ agar 4.5 กรัมผสมกับ clarifed V8 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 285 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. Luria Bertani (LB) broth

แบคโตเปปโทน	10.0	กรัม
ผงสกัดยีตส์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Luria Bertani (LB) agar

แบคโตเปปโทน	10.0	กรัม
ผงสกัดยีตส์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. S.O.C medium (super optimal broth with catabolic repressor)

ทริปโตน	20.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	186.4	มิลลิกรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	2.032	กรัม
ชูโครส	6.846	กรัม

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 จากเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย

1. 50X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer

ทริสอะซิเตต	242.28	กรัม
กรดแอซีติก	57.88	มิลลิลิตร
0.5 M กรดเอทิลีนไดอามีนเตตระอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer

50X TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำ	980	มิลลิลิตร

3. สารละลายสำหรับการเตรียม competent cell

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	5.5495	กรัม
โพแทสเซียมอะซิเตต	0.9815	กรัม

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด -เบสเท่ากับ 6.2 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วน้าไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายสำหรับเก็บรักษา competent cell

สารละลายจากข้อ 3	764.71	มิลลิลิตร
85% กลีเซอรอล	235.29	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วน้ำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค
การตรวจสอบราน้ำด้วยวิธี PCR

DNA Ladder ที่ใช้ในการทดลอง

1 kb DNA Ladder

(OneMARK B ของบริษัท bio-helix)