

ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้น  
ยางพารา



นางสาวกุลนันท์ รุ่งนาไร่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DOUBLE-STRANDED RNA VIRUS OF *Phytophthora botryosa* AND *Pythium cucurbitacearum* FROM PARA RUBBER TREE

Miss Kunlanun Rungrarai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ <i>Phytophthora botryosa</i> และ <i>Pythium cucurbitacearum</i> จากต้นยางพารา
โดย	นางสาวกุลนันท์ รุ่งนาไร่
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.ประภคิต์สิน สีहनนท์)

กุลนันท์ รุ่งนาไร่ : ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้นยางพารา (DOUBLE-STRANDED RNA VIRUS OF *Phytophthora botryosa* AND *Pythium cucurbitacearum* FROM PARA RUBBER TREE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ธัญชัช เกรียงไกรพิพัฒน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.วันชัย อัครลาภสกุล, หน้า.

การใช้ไวรัสในการควบคุมโรคพืชเป็นวิธีที่น่าสนใจ ยังไม่มีการศึกษาไวรัสในไฟทอปธอราที่ก่อโรคในยางพาราซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย งานวิจัยนี้คัดแยกไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ได้จาก *Phytophthora botryosa* ไอโซเลท R152 จากไฟทอปธอราทั้งหมด 81 ไอโซเลท ซึ่งเก็บตัวอย่างจากก้านใบยางพาราที่มีอาการของโรคใบร่วงจากสวนยางในจังหวัดระยอง และจังหวัดจันทบุรี ผลการทดลองจากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราไอโซเลท R152 จากสวนยางพาราในจังหวัดระยอง มีจำนวน 4 แถบ มีขนาดประมาณ 3.4, 2.9, 2.5 และ 1.3 กิโลเบส เมื่อตรวจสอบชนิดของสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยการย่อยด้วย S1 nuclease, DNase I และ RNase A พบว่าทนต่อการถูกย่อยด้วย S1 nuclease, DNase I และทนต่อการถูกย่อยด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง แต่ถูกย่อยด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ ซึ่งแสดงว่าไวรัสที่พบในไฟทอปธอราไอโซเลท R152 มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ และคาดว่าไม่ใช่ไวรัสที่มีรายงานไว้ก่อน เนื่องจากไม่พบผลิตภัณฑ์ cDNA จากการทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไวรัสในไฟทอปธอราที่เคยมีรายงานไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ไม่พบการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, V8, V8 ที่มีสารปฏิชีวนะ และ black bean แต่พบการสร้างสปอร์ในไอโซเลทอื่นๆ ที่ไม่พบไวรัส จากการพยายามเหนี่ยวนำให้ *P. botryosa* ไอโซเลท R152 สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ทำให้ทราบว่าไอโซเลท R152 มี *Pythium cucurbitacearum* เจริญปนอยู่ด้วย เนื่องจากไอโซเลท R152 ไม่สร้างสปอร์จึงทำให้ไม่สามารถแยกไฟทอปธอราออกจากพืเทียมได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบอาร์เอ็นเอสายคู่ในพืเทียม จึงสรุปได้ว่า *P. botryosa* เป็นราเจ้าบ้านของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ งานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นรายงานการพบอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่แยกได้จากยางพาราในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ซึ่งจากผลการวิจัยครั้งนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาไวรัสในไฟทอปธอราเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5772227023 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS:

KUNLANUN RUNGNARAI: DOUBLE-STRANDED RNA VIRUS OF *Phytophthora botryosa* AND *Pythium cucurbitacearum* FROM PARA RUBBER TREE. ADVISOR: THANYANUCH KRIANGKRIPIPAT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., pp.

The biological control of fungal plant pathogens using mycovirus is interesting. However, *Phytophthora* virus in Para rubber tree, one of the most important economic plants of Thailand, has not been reported. In this study 81 isolates of *Phytophthora* from plantations in Rayong and Chantaburi Province of Thailand were screened for dsRNA virus. Only one, *Phytophthora botryosa* strain R152, was found to carry dsRNA elements with estimated size of 3.4, 2.9, 2.5 and 1.3 Kb by agarose gel electrophoresis. The viral genome is dsRNA because it is resistant to S1 nuclease, DNase I and RNase A digestion in high salt buffer but is sensitive to RNase A digestion in low salt buffer. Moreover, the virus might not be *Phytophthora* viruses which have been published because RT-PCR with specific primers from published *Phytophthora* viruses failed to generate any cDNAs. The isolate R152 did not produce any type of spores on PDA, V8, V8 with antibiotic and black bean agar but other isolates formed abundant sporangia on these media. In an attempt to induce sporangium formation in the strain R152, *Pythium cucurbitacearum* was found co-exist with the strain R152. The strain R152 is sterile and could not be separated from the *Pythium*. However, the *P. cucurbitacearum* is devoid of any dsRNA elements. This concludes that the strain R152 is the host of the dsRNA virus. This is the first report of dsRNA virus in *P. botryosa* isolated from Para rubber tree in Thailand. Thus, the result may lend knowledge to biological control by using *Phytophthora* virus and a new virus discovery.

Department: Microbiology Student's Signature .....

Field of Study: Microbiology and Advisor's Signature .....

Microbial Technology Co-Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างสูงจากอาจารย์ ดร. ธัญนุช เกரியงไกรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ท่านได้ให้ความรู้ คำแนะนำและช่วยแก้ปัญหาต่างๆตลอดการทำงานวิจัย

อีกทั้งยังกรุณาตรวจทาน แก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ทางผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ และศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์ ที่กรุณามาเป็นประธาน กรรมการ และคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆตลอดจนถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สมาชิกในห้องวิจัยรา 2019 และภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยตลอดการดำเนินงาน ทั้งการให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย จนทำให้ งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและเอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนนักวิจัยใหม่ของศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจ เสมอมา จนทำให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	5
บทที่ 2 ปรัชมนัรกรรม .....	6
2.1 ยางพารา.....	6
2.1.1 ความสำคัญของยางพารา.....	6
2.1.2 ลักษณะทั่วไปของยางพารา.....	6
2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพาราและผลผลิตยาง.....	8
2.2 ไฟทอพธอรา .....	10
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของไฟทอพธอรา .....	10
2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอพธอรา .....	11
2.2.3 การจำแนกไฟทอพธอรา .....	14
2.2.4 ความแตกต่างระหว่างไฟทอพธอราและพืเทียม .....	16
2.2.5 วงชีวิตของไฟทอพธอรา.....	17
2.2.6 ไฟทอพธอราที่พบในประเทศไทย.....	17
2.2.7 ไฟทอพธอราที่มีรายงานพบในยางพารา.....	19

2.2.8 โรคในยางพาราที่มีสาเหตุมาจากไฟทอปธอรา .....	23
2.3 ไมคอไวรัส.....	25
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของไมคอไวรัส.....	25
2.3.2 การจัดจำแนกไมคอไวรัส .....	26
2.3.3 ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ .....	26
2.3.4 ไวรัสใน Oomycetes.....	29
2.3.5 ไวรัสในไฟทอปธอรา.....	29
2.3.6 ผลของไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อราที่อาศัย .....	31
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	33
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	33
3.1.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	34
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	35
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย .....	36
3.2.1 การตัดแยกไฟทอปธอราจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช .....	36
3.2.2 การตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่.....	36
3.2.3 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ .....	38
3.2.4 การตรวจสอบสกุลและชนิดของไฟทอปธอราที่พบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่.....	40
3.2.5 การจำแนกชนิดของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ .....	43
3.2.6 การวิเคราะห์ผลของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไฟทอปธอราที่พบไวรัส .....	48
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	50
4.1 การตัดแยกไฟทอปธอราจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช .....	50
4.2 การตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่แยกได้ .....	53



4.3 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์.....	55
4.4 การตรวจสอบสกุลและชนิดของไฟทอพธอราที่พบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่.....	57
4.5 การจำแนกชนิดของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่.....	62
4.6 การวิเคราะห์ผลของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไฟทอพธอราที่พบไวรัส.....	65
บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	72
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	81
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	113



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	แสดงไฟโทพธอร่าที่มีรายงานพบในประเทศไทย .....	18
ตารางที่ 2.2	แสดงสปีชีส์ของไฟโทพธอร่าที่พบในยางพารา .....	19
ตารางที่ 2.3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟโทพธอร่าที่มักพบในยางพารา.....	21
ตารางที่ 2.4	แสดงการจัดจำแนกไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ตาม ICTV .....	28
ตารางที่ 4.1	แสดงพิกัดสวนยางพาราและไอโซเลทของไฟโทพธอร่าที่แยกได้ .....	51
ตารางที่ 4.2	แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลท R152 .....	59
ตารางที่ 4.3	แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ .....	63
ตารางที่ 4.4	แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลท R152 .....	68
ตารางที่ 4.5	แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของพีเทียมในไอโซเลท R152 .....	69
ตารางที่ 4.6	แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไฟโทพธอร่าไอโซเลทอื่นๆ.....	71

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 แสดงรูปแบบของโคโลนีรูปแบบต่างๆที่พบในไฟทอพธอรา .....	11
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมที่พบในไฟทอพธอรา .....	12
รูปที่ 2.3 แสดงสปอร์แรงเจียมที่เจริญอยู่บนก้านชูสปอร์แรงเจียมแบบต่างๆที่พบในไฟทอพธอรา ..	13
รูปที่ 2.4 แสดงรูปแบบการวางตัวของแอนเทอริเดียมและโอโอโกเนียมที่พบในไฟทอพธอรา .....	14
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะ papillae แบบต่างๆของสปอร์แรงเจียมที่พบในไฟทอพธอรา .....	15
รูปที่ 2.6 แสดงความแตกต่างของการเกิดซีสสปอร์ของไฟทอพธอราและพิเทียม .....	17
รูปที่ 4.1 แผนที่แสดงตำแหน่งสวนยางพาราที่ทำการเก็บตัวอย่าง .....	50
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีที่พบในไฟทอพธอราไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 .....	53
รูปที่ 4.3 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอพธอราไอโซเลท R152.....	54
รูปที่ 4.4 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอพธอราไอโซเลท R117.....	54
รูปที่ 4.5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอพธอราไอโซเลท R159.....	55
รูปที่ 4.6 แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมไวรัสด้วยเอนไซม์ RNase A.....	56
รูปที่ 4.7 แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ DNase I .....	56
รูปที่ 4.8 แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมไวรัสด้วยเอนไซม์ S1 nuclease .....	57
รูปที่ 4.9 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคูไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2..	58
รูปที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ของไอโซเลท R152 .....	60
รูปที่ 4.11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไฟทอพธอราไอโซเลท R152 .....	61
รูปที่ 4.12 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณ ITS ยีนของไฟทอพธอราไอโซเลท R152 ..	62
รูปที่ 4.13 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ cDNA ของไวรัสด้วยคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ไวรัสในไฟทอพธอราที่จะให้ผลิตภัณฑ์ขนาดใหญ่.....	64
รูปที่ 4.14 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ cDNA ของไวรัสด้วยคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ไวรัสในไฟทอพธอราที่จะให้ผลิตภัณฑ์ขนาดเล็ก .....	64
รูปที่ 4.15 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเกิด primer self-priming ของไพรเมอร์ PiRV4.....	65

รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของที่พบในไอโซเลท R152 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 66

รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะโคโลนีของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างๆ..... 67

รูปที่ 4.18 กราฟแสดงการเจริญของไอโซเลท R152..... 68

รูปที่ 4.19 กราฟแสดงการเจริญของของพิเทียมในไอโซเลท R152 ..... 69

รูปที่ 4.20 กราฟเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับพิเทียมในไอโซเลท R152..... 70

รูปที่ 4.21 กราฟเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับไฟทอปธอราไอโซเลทอื่นๆ..... 71



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ยางพาราเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งผลิตภัณฑ์จากยางและยางพาราเป็นสินค้าส่งออกใน 10 อันดับแรกของประเทศ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา ประเทศไทยมีการส่งออกยางพาราและผลิตภัณฑ์จากยางพาราเป็นอันดับ 1 ของโลก (Danteravanich, 2010) ในปี 2558 ประเทศไทยมีศักยภาพการผลิตประมาณ 4.5 ล้านตันต่อปี คิดเป็น 1 ใน 3 ของผลผลิตยางพาราทั่วโลก (สมาคมยางพาราไทย, 2559) ผลผลิตยางพาราส่วนใหญ่ส่งออกในรูปแบบ น้ำยาง ยางแผ่นรมควัน และผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น เฟอร์นิเจอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ประเทศไทยจะผลิตยางพาราเพื่อส่งออกแล้ว ยังมีอุตสาหกรรมยางพาราที่ผลิตเพื่อขายในประเทศ เช่น ยางแท่ง ยางแผ่น ถูมือยาง และยางรถยนต์ เป็นต้น สภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพารายังส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำยาง โดยพื้นที่ที่เหมาะสมแก่การปลูกยางพาราและให้ผลผลิตที่ดีคือ บริเวณเขตร้อนชื้นใกล้เส้นศูนย์สูตรของโลก ได้แก่ ประเทศไทย อินโดนีเซียและมาเลเซีย ซึ่งเป็น 3 ประเทศที่ผลิตยางรายใหญ่ของโลก ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพารา 18.85 ล้านไร่ ในปี 2558 ซึ่งมากเป็นอันดับที่ 2 ของโลกรองจากอินโดนีเซียที่มีพื้นที่ 22 ล้านไร่ (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ยางพาราในประเทศไทยโดยส่วนใหญ่นิยมปลูกในภาคใต้และภาคตะวันออก ยางพาราเจริญได้ดีในพื้นที่ที่มีฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 2,000 มิลลิเมตรต่อปี มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28 °C (กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่, 2548) เนื่องจากยางพาราจะเจริญได้ดีในสภาพอากาศแบบร้อนชื้น ฝนตกชุก จึงทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายและการแพร่ระบาดของจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนั้นเกษตรกรสวนยางส่วนใหญ่ประสบปัญหาพบโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ หากมีการจัดการสวนยางไม่ดีจะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ

ปัญหาที่เกษตรกรสวนยางพาราส่วนใหญ่พบคือ ในช่วงฤดูฝนยางพารามักเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ ต้นยางพาราที่มีเรือนยอดทรงพุ่มหนาแน่นจะทำให้อากาศถ่ายเทไม่สะดวก สวนยางจะมีความชื้นสูงทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากราได้ง่าย และถ้ากรีดยางในช่วงที่ฝนตก

ขณะที่เปลือกของต้นยางยังเปียกอยู่จะทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเข้าสู่บาดแผลทางหน้ากรีดได้ (สถาบันวิจัยยาง, 2555) เมื่อต้นยางพาราเป็นโรคจะทำให้ผลผลิตยางลดลงและอาจเกิดการแพร่ระบาดของโรคไปทั่วสวนยาง โรคที่เกิดจากราแล้วสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรสวนยาง เช่น โรคเส้นดำ โรคใบจุดก้างปลา โรคราแป้ง โรคใบร่วง เป็นต้น (สถาบันวิจัยยาง, 2555) โรคระบาดที่พบเป็นประจำในสวนยางพาราและผู้วิจัยมีความสนใจในศึกษา คือ โรคใบร่วง ที่มีสาเหตุมาจากราไฟทอปธอรา (*Phytophthora* spp.)

*Phytophthora* spp. คือ ราจำพวกหนึ่ง เป็นสาเหตุของโรคใบร่วง (leaf fall) และโรคเส้นดำ (black stripe) โดยต้นยางที่ติดโรคใบร่วงจะมีอาการฝักเน่าดำค้างอยู่บนต้น ใบร่วงหล่นทั้งที่ยังเป็นสีเขียวอยู่ มีรอยช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำที่บริเวณก้านใบและมักมีน้ำยางไหลซึมออกมาจากบริเวณรอยแผลช้ำ โรคเส้นดำจะมีอาการของโรคคือ ราจะเข้าทำลายตรงบริเวณรอยที่มีการกรีดยาง ทำให้เห็นเป็นสีดำตลอดแนวกรีด หากรุนแรงมากเปลือกหน้ายางจะแตกออก ทำให้น้ำยางไหลออกตลอดเวลา (Ho และคณะ, 1984) นอกจากนี้ไฟทอปธอรายังก่อโรคน้ำดำ (black rot) และโรคปลายกิ่งแห้ง (shoot die-back disease) ในยางพารา (นันทา เขิงเขาว์ และคณะ, 2546) ซึ่งไฟทอปธอราเป็นราจำพวกที่อยู่ในอาณาจักร Stramenopila ไฟลัม Oomycota ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสาหร่ายสีน้ำตาลและไดอะตอมมากกว่ารา (Ristaino และ Gumpertz, 2000) ไฟทอปธอรา มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว เส้นใยเป็นทอกลงไม่มีผนังกัน ไม่สร้างรงควัตถุ ในสภาวะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) ซึ่งแต่ละสปอร์จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไป เช่น รูปร่าง ขนาด การเกิด papillation บนสปอร์แรงเจียม (Liyange และ Wheeler, 1989) ภายในสปอร์แรงเจียมจะมีชูโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ทำให้สามารถเคลื่อนที่อย่างมีทิศทางไปในน้ำได้ จึงแพร่กระจายไปได้ด้วยฝน น้ำในดิน ดินและลม และในบางสปอร์จะมีการสร้างคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) ที่มีผนังหนา ทำให้เชื้อสามารถพักตัวอยู่ในดินและซากพืชที่ตายแล้วได้เป็นเวลานาน เมื่อได้รับความชื้นหรือสภาวะเหมาะสมก็จะสร้างเส้นใยและสปอร์แรงเจียมเจริญต่อไป ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้อีกครั้ง ส่วนช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างโอโอสปอร์ (oospore) ซึ่งมีผนังหนาเช่นเดียวกับคลาไมโดสปอร์จึงทำให้สามารถพักตัวอยู่ในดินหรือในซากพืชที่ตายได้เช่นกัน เนื่องจากสปอร์ของไฟทอปธอราสามารถแพร่กระจายได้ง่าย

และยังสามารถคงอยู่ในดิน น้ำและซากพืชได้เป็นเวลานาน จึงทำให้การควบคุมโรคที่เกิดจากไฟทอปธอราสามารถทำได้ยาก (Chee, 1973)

โดยทั่วไปเกษตรกรจะนิยมควบคุมและป้องกันการระบาดของไฟทอปธอราในสวนยางด้วย 2 วิธีหลัก วิธีที่ 1 คือ การจัดการสวนที่ดีเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค คือ ปลูกยางให้ห่างกัน ไม่ปลูกพืชอิงอาศัยของราก่อโรคพืชร่วมกับยางพารา ตัดแต่งกิ่งยางเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงการกรีดยางในช่วงที่มีฝนตกมากหรือช่วงที่มีการระบาดของโรค ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับป้องกันก่อนมีการระบาดของโรค ถ้ามีการระบาดแล้วจะต้องใช้วิธีนี้ร่วมกับวิธีอื่น วิธีที่ 2 คือ การใช้สารเคมีกำจัดราโดยสารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ เมทาแลกซิล (metalaxyl) หรือ ออกโซไดซิล (oxodixyl) ร่วมกับแมนโคเซบ (mancozeb) ใช้ทาบริเวณหน้ากรีดยางทุก 5-7 วัน และหลังกรีดยางภายใน 12 ชั่วโมงทาบริเวณหน้ากรีดยางด้วยฟอสอีธิล อะลูมิเนียม (fosetyl-aluminium) ซึ่งการใช้สารเคมีให้ผลได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ แต่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและตัวเกษตรกร (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) ถ้าหากใช้ไปเป็นเวลานานก็อาจจะทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อได้ ดังนั้นวิธีการควบคุมทางชีวภาพจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่สามารถควบคุมราได้โดยที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและปลอดภัยต่อตัวเกษตรกร หนึ่งในวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่น่าสนใจคือ ใช้ไวรัสในรา หรือ ไมคอไวรัส (mycovirus) ที่มีความสามารถในการลดความรุนแรงในการก่อโรคของราเจ้าบ้านได้ (hypovirulence mycovirus)

ไมคอไวรัส (mycovirus) คือไวรัสที่อาศัยอยู่ในรา หรือไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในรา (Pearson และคณะ, 2009) ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไมคอไวรัสมากมาย ซึ่งมีอย่างน้อย 250 ชนิดที่มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุชนิดของไมคอไวรัสพร้อมทั้งจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยมีรายงานการพบไมคอไวรัสในราทุกไฟลัม (Xie และ Jiang, 2014) ไมคอไวรัสอาจพบเป็นอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particles) แบบที่มีโปรตีนห่อหุ้ม (capsid protein) หรือแบบที่พบแต่สารพันธุกรรมอย่างเดียว ซึ่งสารพันธุกรรมของไมคอไวรัสพบได้ทั้งชนิดที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอทั้งแบบสายเดี่ยวและสายคู่ แต่โดยส่วนใหญ่จะพบเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ มีเพียง 1 ใน 3 เท่านั้นที่พบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Yu และคณะ, 2013) ไมคอไวรัสที่พบในราก่อโรคบางชนิดสามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคของราเจ้าบ้านได้ เช่น ในรายงานของ (Grasse และคณะ, 2013) ที่พบ *Plasmopara halstedii* virus (PhV) เป็น

ไมคอไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวใน *Plasmopara halstedii* ซึ่งก่อโรคราน้ำค้าง ในดอกทานตะวัน โดยพบว่าราสายพันธุ์ที่มีไวรัสจะมีระยะเวลาในการสร้างสปอร์ช้ากว่าและการแพร่กระจายของราก็จากบริเวณส่วนใต้ใบเลี้ยงไปยังส่วนเหนือใบเลี้ยงลดลง 1 ใน 3 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัส ส่วนการพบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่มีรายงานการพบมากมาย เช่นในรายงานของ Xiao และคณะ (2014) พบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Sclerotinia sclerotiorum* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืชและได้มีการระบุชื่อไวรัสเป็น *Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1 (SsPV1)* ซึ่งพบว่าไมคอไวรัสชนิดนี้สามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคได้โดยลดการเจริญของรา ผงเส้นใยรา ส่วนปลายถูกทำลายทำให้มีการไหลออกของไซโทพลาซึม และไมโทคอนเดรียมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบราที่มีการติดไวรัสร่วมกัน 2 ชนิดใน *Botrytis cinerea* และเมื่อมีการติดไวรัสทั้ง 2 ชนิดแล้วความรุนแรงในการก่อโรคของราลดลงเมื่อเทียบกับราที่ไม่ติดไวรัส (Potgieter และคณะ, 2013)

ในประเทศไทยเคยมีรายงานการพบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma spp.* โดย Jom-in และ Akarapisan (2009) พบจำนวน 2 ไอโซเลทจากทั้งหมด 165 ไอโซเลทที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่ ขนาดของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบคือ 1000 bp ส่วนอีกไอโซเลทมี 2 ชิ้น ขนาด 700 และ 1100 คู่เบส นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma spp.* จำนวน 7 ไอโซเลทจาก 93 ไอโซเลทที่แยกได้ และหนึ่งใน 7 ไอโซเลทได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดจำแนกว่าเป็นไวรัสสกุล *Partitivirus* (บุญยฤทธิ์ จันทวิมล, 2554)

ไวรัสในไฟทอปธอรามีการค้นพบมาเป็นเวลานานแล้ว โดยในปี 1985 มีรายงานการพบไวรัสใน *P. drechsleri* แต่ไม่ได้มีการแยกและระบุชนิดของไวรัส (Roos และ Shaw, 1985) ต่อมา Tooley และคณะ (1989) ได้พบอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *P. infestans* จำนวน 14 ไอโซเลทจากทั้งหมด 40 ไอโซเลทและได้มีการศึกษาขนาดของสารพันธุกรรมของไมคอไวรัส เช่นเดียวกับ (Cai และ Hillman, 2013) ที่พบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ 4 ชิ้นจาก *P. infestans* และได้มีการกำหนดชื่อไวรัสว่า *Phytophthora infestans RNA virus 1 (PiRV-1)*, *PiRV-2*, *PiRV-3* และ *PiRV-4* ตามลำดับ นอกจากนี้ (Hacker และคณะ, 2005) ได้พบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาด 13,883 คู่เบสจากไฟทอปธอราที่แยกจากต้นสนแดง (Douglas Fir) และได้กำหนดชื่อให้ไมคอไวรัสว่า *Phytophthora endornavirus 1 (PEV1)* จากงานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่า ไมคอไวรัสมีความน่าสนใจในการศึกษา



เพราะมีความสำคัญในการควบคุมราทางชีวภาพ และโดยเฉพาะไมคอไวรัสในรากลุ่ม Oomycota ที่มีความแตกต่างจากไปจากรากลุ่มอื่นๆ (Xie และ Jiang, 2014) และปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับไมคอไวรัสที่แยกได้จากไฟทอปธอราในยางพารา จึงทำให้ทางผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาไมคอไวรัสดังกล่าว

ไฟทอปธอราเป็นโรคพืชที่มีความสำคัญ การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสในไฟทอปธอรายังมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับรายงานเกี่ยวกับไวรัสในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ องค์กรความรู้ที่เพิ่มขึ้นจากการศึกษาไวรัสอาจนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมราชนิดนี้ ไวรัสในไฟทอปธอราที่ก่อโรคในยางพารายังไม่มีการศึกษา ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่จากไฟทอปธอราที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของยางพาราที่มีอาการของโรคใบร่วง ศึกษาการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของยางพาราที่มีอาการของโรคใบร่วงในสวนยางจังหวัดระยองและจันทบุรี

1.2.2 ศึกษาการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ยางพารา

##### 2.1.1 ความสำคัญของยางพารา

ยางพารา (Para rubber) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ผลผลิตที่ได้จากต้นยางพารา คือ น้ำยางธรรมชาติซึ่งได้จากท่อน้ำยางในส่วนเปลือกในของต้นยางพารา ยางพาราเป็นพืชที่ให้น้ำยางมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่สามารถผลิตน้ำยางได้ซึ่งมีมากกว่า 2,500 ชนิด นอกจากนี้ยางพารายังมีพืชอีก 2 ชนิด ที่ให้ผลผลิตน้ำยางที่มีสมบัติทางเคมีที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมได้ คือ ไม้พุ่มวายุเล่ (Guayule; *Parthenium argentatum* Gray) ซึ่งเป็นพืชทะเลทรายที่พบในแถบตอนเหนือของประเทศเม็กซิโก ซึ่งให้ผลผลิตน้ำยางคิดเป็นร้อยละ 10 ของโลกและดอกแดนดิไลออนรัสเซีย (Russian dandelion; *Taraxacum koksaghyz*) เป็นไม้พุ่มที่ผลิตน้ำยางบริเวณราก (Venkatachalam และคณะ, 2013) แต่เนื่องจากน้ำยางที่ได้จากพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติทางเคมีที่ยังไม่ดีพอและผลิตได้ในปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการใช้งานเมื่อเทียบกับน้ำยางที่ได้จากยางพารา จึงทำให้ยางพารายังคงเป็นพืชที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมยางทั่วโลก นอกจากนี้ยางพารายังเป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน คือ น้ำยางเป็นผลผลิตของต้นยางพาราที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมยางต่างๆ ส่วนไม้ยางใช้สำหรับก่อสร้างหรือทำเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ เศษไม้ที่เหลือสามารถนำมาทำฟืนที่ให้ความร้อน ใบยางก็ใช้ทำหัตถกรรมพื้นบ้าน (จำลอง จิตต์หาญ และคณะ, 2550) ส่วนของเมล็ดยางสามารถนำไปสกัดน้ำมันใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ และกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันสามารถนำมาทำอาหารสัตว์หรือปุ๋ยได้ (กรรณิการ์ ธีรวัฒน์สุข, 2556)

##### 2.1.2 ลักษณะทั่วไปของยางพารา

ยางพาราหรือต้นยางบราซิลเป็นไม้ยืนต้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนชื้น มีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ทวีปอเมริกาใต้ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Hevea brasiliensis* เป็นพืชในวงศ์ Euphobiacea สกุล *Hevea* ซึ่งในสกุลนี้มีทั้งหมด 10 สปีชีส์ ที่มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ในประเทศต่างๆ บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ทวีปอเมริกาใต้ทั้งหมด แต่ที่ประเทศบราซิลสามารถพบได้ทั้ง

10 สปีชีส์ โดย *Hevea brasiliensis* จัดเป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะสามารถผลิตยางที่มีคุณสมบัติที่ดี ให้ผลผลิตสูงและสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมในทวีปเอเชียและแอฟริกา ยางพาราถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2444 ที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรังเป็นครั้งแรก โดยในช่วงแรกยางพารานิยมปลูกกันในเขตภาคใต้ ต่อมาได้มีการปลูกอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงกลายเป็นสินค้าเศรษฐกิจของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และปัจจุบันได้มีการปลูกแทบทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Venkatachalam และคณะ, 2013; จำลอง จิตต์หาญ และคณะ, 2550)

เปลือกไม้ของต้นยางพาราเป็นส่วนสำคัญเพราะเป็นบริเวณที่ให้น้ำยาง โดยเปลือกไม้จะแบ่งเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเปลือกแห้งชั้นนอกสุด (cock) จะมีสีเทาถึงสีน้ำตาล ไม่มีท่อน้ำยางอยู่ในชั้นนี้ เป็นเนื้อเยื่อพวก periderm เมื่ออายุมากจะมีพวกสารลิกนินและซูเบอร์ลินมาสะสม ถัดเข้ามาจะเป็นส่วนของเปลือกไม้แข็ง (hard bark) จะประกอบด้วย เนื้อเยื่อ parenchyma ท่อน้ำยางที่มีอายุมากจะจัดกระจายอยู่และมี stone cell ที่ไปกันทำให้ท่อน้ำยางขาดและไม่สมบูรณ์ ส่วนเปลือกไม้ชั้นในสุดเป็นเปลือกไม้อ่อน (soft bark) จะอยู่ติดกับ cambium ซึ่งจะแยกส่วนของเปลือกไม้ออกจากส่วนของเนื้อไม้ ชั้นเปลือกไม้อ่อนจะมีส่วนของท่อลำเลียงอาหาร (phloem) และส่วนของท่อน้ำยาง (latex vessel) ที่เรียงเป็นวงเชื่อมต่อกันตลอดทั้งต้นและเอียงทำมุม 2-7 องศากับแนวตั้ง (Verhey, 2010) ดังนั้นถ้าต้องการกรีดยางให้ได้น้ำยางในปริมาณมากจะต้องกรีดลงจากซ้ายบนไปขวาล่างเพื่อตัดท่อน้ำยางให้ได้มากที่สุด เปลือกไม้ชั้นนี้จึงเป็นชั้นที่สำคัญมากที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณน้ำยางที่จะได้รับ โดยความหนาบางของเปลือกไม้และสัดส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆนั้นของต้นยางพาราจะมีความแตกต่างกันตามพันธุ์และอายุของต้นยางพารา ซึ่งพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงจะมีจำนวนวงของท่อน้ำยางมาก

น้ำยางเป็นผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการทางเคมีที่ต้นยางพาราผลิตขึ้น เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลง เมื่อมีแมลงมากัดกินต้นยางพาราแล้วทำให้เกิดบาดแผล ต้นยางก็จะหลั่งน้ำยางออกมาปิดบาดแผล อีกทั้งน้ำยางผลิตจากส่วนของเปลือกไม้จึงทำให้รสชาติไม่เป็นที่ดึงดูดของแมลง (Delabarre และ Serrier, 2000) น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้นยางพาราจะมีลักษณะเป็นสารแขวนลอย สีขาวหรือสีครีม ประกอบไปด้วยส่วนน้ำยางร้อยละ 55 เนื้อยางแห้งประมาณร้อยละ 35 และสารอื่นๆ ประมาณร้อยละ 10 เมื่อเกษตรกรกรีดน้ำยางออกแล้วท่อน้ำยางจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึมสังเคราะห์น้ำยางขึ้นมาใหม่ทดแทนภายในเวลา 48 – 72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่

ต้นยางเจริญเติบโต ซึ่งถ้าเซลล์ที่ผลิตน้ำยางอยู่ในสภาวะเครียดอาจทำให้ผลิตน้ำยางได้ลดลง (พิชิต สพอโชค และคณะ, 2550) ดังนั้นพันธุ์ยาง สภาพแวดล้อมและการดูแลรักษาต้นยางจึงมีส่วนสำคัญในการให้ผลผลิตน้ำยางที่ดี

### 2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพาราและผลผลิตยาง

ต้นยางพาราที่มีการเจริญเติบโตดีก็จะให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อยางในปริมาณสูง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลผลิตยางของต้นยางพารามี 3 ปัจจัยหลักๆได้แก่ พันธุ์ของยางพารา สภาพภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศและการจัดการสวนยาง

#### 2.1.3.1 พันธุ์ยางพารา

พันธุ์ของยางพาราเป็นปัจจัยภายในของต้นยางพาราที่จะต้องพิจารณาจากลักษณะประจำพันธุ์ โดยดูที่การเจริญของต้นยาง ปริมาณผลผลิตยางที่จะได้รับ สภาพแวดล้อมที่จะเจริญเติบโตได้ และความต้านทานโรค โดยพันธุ์ยางพาราที่ทางสถาบันวิจัยยางแนะนำให้ปลูกแบ่งเป็น 3 ชั้น พันธุ์ยางชั้นที่ 1 เป็นพันธุ์ยางชั้นดี ที่ผ่านการศึกษาลักษณะต่างๆแล้ว จึงแนะนำให้ปลูกโดยไม่จำกัดพื้นที่ปลูก พันธุ์ยางพาราชั้นที่ 2 คืออยู่ในระหว่างการทดลองศึกษาสมบัติบางประการ ส่วนพันธุ์ยางพาราชั้นที่ 3 คืออยู่ในระหว่างการทดลองและยังมีข้อมูลจำกัด ซึ่งในแต่ละชั้นจะแบ่งออกเป็นกลุ่มตามวัตถุประสงค์ในการปลูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตยางสูง กลุ่มพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง และกลุ่มพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง พันธุ์ยางพาราที่อยู่ในพันธุ์ยางชั้น 1 ที่สถาบันวิจัยยางแนะนำให้ปลูกสำหรับกลุ่มผลผลิตน้ำยางสูงมี 4 พันธุ์คือ RRIT 251, RRIT 226, BPM 24 และ RRIM 600 กลุ่มพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง คือ PB 235, PB 255 และ PB 260 ส่วนกลุ่มพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง คือ ฉะเชิงเทรา 50, AVRDS 2037 และ BPM 1 พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกในแถบภาคตะวันออกเฉียงและภาคใต้เขตฝั่งตะวันตกคือ RRIT 251, BPM 24, PB 255 และ PB 260 เพราะเนื่องจากบริเวณนี้มีฝนตกชุกจึงมักพบมีการระบาดของโรคที่เกิดจากรา โดยเฉพาะโรคใบร่วงและโรคเส้นดำที่เกิดจากราไฟทอปธอราที่มักมีการระบาดรุนแรงในทุกๆปี (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

### 2.1.3.2 สภาพภูมิประเทศ

สภาพภูมิประเทศที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นยางพารา คือ เป็นพื้นที่ราบมีความลาดชันไม่เกิน 35 องศา หากพื้นที่ที่มีความลาดชันเกิน 15 องศาจะต้องทำเป็นขั้นบันได เพราะหากมีความลาดชันมากจะทำให้ดินเก็บความชื้นได้น้อยลงและหน้าดินจะถูกชะล้างได้ง่าย ความสูงของพื้นที่ปลูกยางจะต้องอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 200 เมตร เพราะความสูงที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 100 เมตร จะมีผลทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศและอุณหภูมิลดลง ซึ่งจะมีผลทำให้ยางพาราเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติประมาณ 6 เดือน ในประเทศไทยพื้นที่ปลูกยางที่มีสภาพภูมิประเทศเหมาะสม คือ บริเวณภาคใต้และบางจังหวัดของภาคตะวันออก ซึ่งจัดเป็นพื้นที่ปลูกยางเดิม ส่วนในพื้นที่ปลูกยางใหม่ คือ บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีความสูงของพื้นที่ไม่ค่อยเหมาะสมและดินขาดความอุดมสมบูรณ์จึงทำให้ได้ผลผลิตน้อยกว่า จึงต้องมีการดูแลรักษาที่ดีเพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้น (ศุภมิตร ลิ้มปิชัย, 2550)

### 2.1.3.3 สภาพภูมิอากาศ

ยางพาราจะเจริญได้ดีในสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 2,000 มิลลิเมตรต่อปีและไม่ต่ำกว่า 1,250 มิลลิเมตรต่อปี อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 26 - 30 °C ซึ่งอุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C จะทำให้ยางพาราหยุดการเจริญเติบโต จึงไม่ควรปลูกในที่สูงเพราะความสูงที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อุณหภูมิลดลง ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่างร้อยละ 65 - 90 ซึ่งในเขตพื้นที่ปลูกยางใหม่จะมีปริมาณน้ำฝนและการกระจายของฝนต่ำกว่าพื้นที่ปลูกยางเดิม แต่เป็นข้อดีที่จะทำให้ไม่ค่อยเกิดการระบาดของโรคที่เกิดจากรา เมื่อเทียบกับพื้นที่ปลูกยางเดิมที่มักพบมีการระบาดของโรคที่เกิดจากราหากมีการจัดการสวนยางไม่ดี โดยเฉพาะโรคใบร่วงและโรคเส้นดำที่เกิดจากไฟทอปธอรา (กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พิซไร่, 2548)

### 2.1.3.4 การดูแลรักษาและการจัดการสวนยาง

เมื่อเกษตรกรปลูกยางพาราแล้วก็ต้องดูแลรักษาและจัดการสวนยางให้สะอาดปราศจากโรคเพื่อต้นยางพาราสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ ให้ผลผลิตได้มากและสามารถกรีดยางได้นาน 25 - 30 ปี ซึ่งวิธีการดูแลต้นยางพารา ได้แก่ การปลูกซ่อมต้นยางที่ตายจากการปลูกหรือจากโรคต่างๆ โดยจะต้องปลูกซ่อมก่อนที่ยางพาราจะมีอายุเกิน 2 ปีและควรเลือกต้นปลูกซ่อมที่มีการเจริญเติบโต

ใกล้เคียงกัน การคลุมโคนด้วยฟางข้าวหรือเศษซากพืชเพื่อรักษาความชื้นในดินและป้องกันวัชพืช การทาปูนขาวบริเวณลำต้นที่เป็นสีน้ำตาลปนเขียวที่เกิดจากการไหม้จากแสงแดด การตัดแต่งกิ่งของต้นยางพาราโดยจะตัดแต่งกิ่งตั้งแต่ต้นยางอายุประมาณ 1 ปี เพื่อจะเพิ่มพื้นที่กรีดยางและเพิ่มพื้นที่ใบรวมซึ่งจะส่งผลให้ขนาดลำต้นเพิ่มขึ้น ซึ่งการตัดแต่งกิ่งจะช่วยทำให้สวนยางไม่อับชื้น อากาศถ่ายเทได้สะดวก ทำให้ลดโอกาสในการเกิดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากราได้ (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

การคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ดี สภาพแวดล้อมที่ปลูกยางพารามีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และมีการจัดการดูแลสวนยางพาราที่ดีนั้นนอกจากจะทำให้ยางพารามีการเจริญเติบโตที่ดีและให้ผลผลิตได้มากแล้ว ยังสามารถป้องกันการเกิดโรคต่างๆที่จะสร้างความเสียหายให้กับสวนยางได้หากมีการแพร่ระบาด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากราที่มักจะพบมีการแพร่ระบาดในสวนยางพาราแล้วทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่ามาก หนึ่งในนั้นคือโรคที่เกิดจากราไฟทอปธอรา

## 2.2 ไฟทอปธอรา

### 2.2.1 ลักษณะทั่วไปของไฟทอปธอรา

ไฟทอปธอรา (*Phytophthora* spp.) เป็นราน้ำ ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำ ดินหรือบนส่วนต่างๆของพืช เช่น ยางพารา แอปเปิ้ล ส้ม มันฝรั่ง เป็นต้น ซึ่งการดำรงชีวิตมีทั้งเป็น saprophyte และ parasite ไฟทอปธอรามีการจำแนกทางอนุกรมวิธานคือ (Hawksworth และคณะ, 1996)

Kingdom : Chromista

Class : Oomycetes

Order : Peronosporales

Family : Pythiaceae

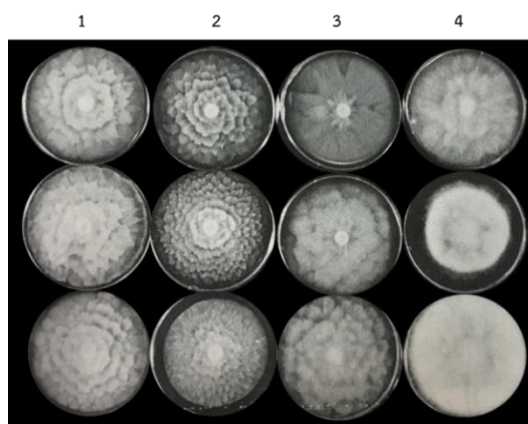
Genus : *Phytophthora*

ไฟทอปธอราจัดอยู่ในอาณาจักร Chromista ไฟลัม Oomycota วงศ์ Pythiaceae ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสาหร่ายพวก heterokont algae หรือสาหร่ายสีน้ำตาลและไดอะตอมมากกว่ารา (Ristaino และ Gumpertz, 2000) เนื่องจากผนังเซลล์มีส่วนประกอบหลักคือ เซลลูโลส และเบต้ากลูแคน ( $\beta$ -glucan) ซึ่งต่างจากราอื่นๆที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบหลักเป็นไคติน และ

ซูโอสปอร์ประกอบด้วยแฟลกเจลลา 2 เส้นคือ tinsel flagella ที่ชี้ไปทางด้านหน้าและมี cilia ส่วนอีกเส้นคือ whiplash flagella ที่ชี้ไปทางด้านหลัง ซึ่งลักษณะของแฟลกเจลลาแบบนี้คล้ายกับแฟลกเจลลาที่พบในสาหร่ายจำพวก heterokont นอกจากนี้ยังมีการเจริญส่วนใหญ่อยู่ในช่วงชีวิตที่เป็น diploid มากกว่า haploid (Rossman และ Palm, 2006) ไม่สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ได้เองเหมือนรากลุ่มอื่น และมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจำพวก polyene เช่น pimarinin ซึ่งรากลุ่มอื่นจะไม่มี ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ จึงสามารถใช้ยาปฏิชีวนะจำพวก polyene ในการแยกรากลุ่มนี้ออกจากรากลุ่มอื่นได้ (Drenth และ Sendall, 2001)

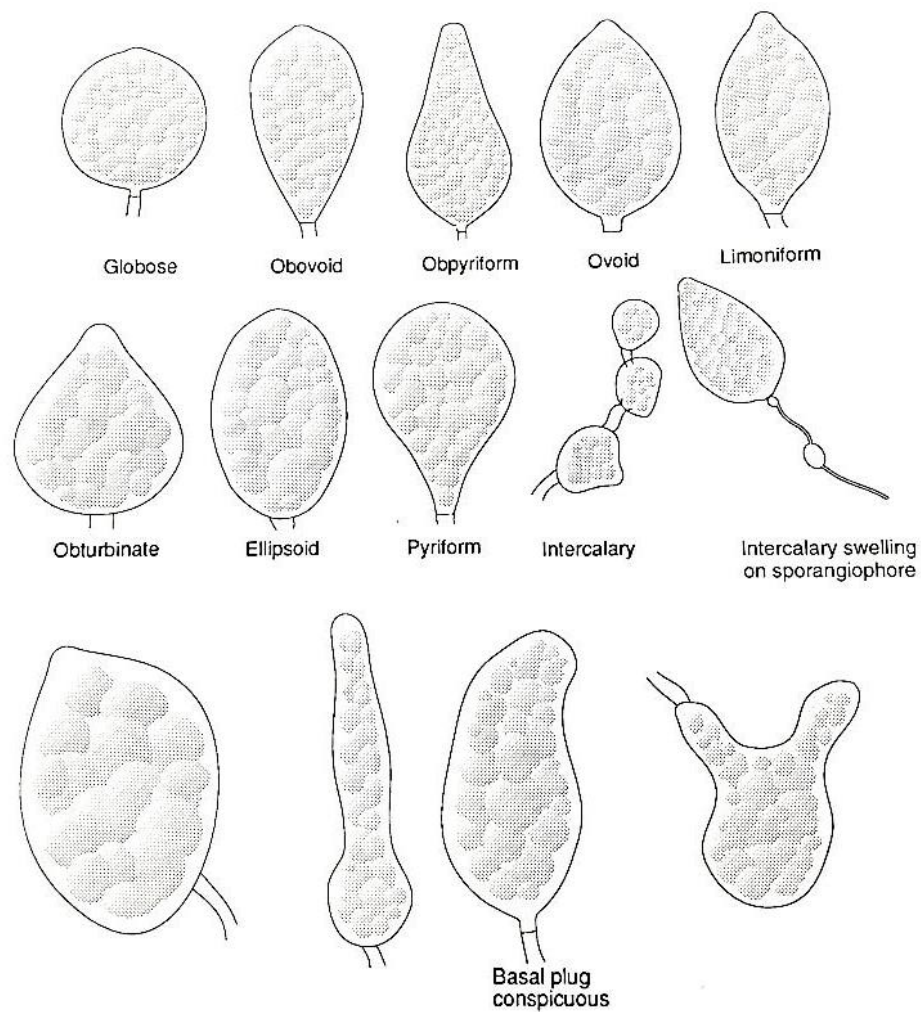
### 2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอรา

ลักษณะเส้นใยของไฟทอปธอราเป็นทอกลวงไม่มีผนังกัน (Coenocytic mycelium) แต่อาจพบผนังกัน (Septate) ได้ในเส้นใยที่มีอายุมาก ส่วนใหญ่แตกแขนงกิ่งก้านเป็นมุมฉากและตรงจุดที่แตกแขนงจะมีลักษณะคอด เส้นใยของไฟทอปธอราจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 8 ไมโครเมตรขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและไม่มีการสร้างรงควัตถุจึงทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นสีขาว รูปแบบการเจริญของเส้นใยไฟทอปธอรากับอาหารแข็งจะมีรูปแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์และอาหารดังแสดงในรูปที่ 2.1 เมื่อไฟทอปธอราเจริญอยู่บนเซลล์พืชจะมีการสร้าง haustorium ลักษณะคล้ายนิ้วมือแทงเข้าไปในเซลล์พืชเพื่อดูดอาหารและแร่ธาตุจากพืช นอกจากนี้ในบางสปีชีส์ที่มีการเจริญอยู่ในน้ำ เส้นใยจะเกิด hyphal Swelling ซึ่งจะคล้ายกับคลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore) ที่คงทนและอยู่ได้เป็นเวลานาน (Erwin และ Ribeiro, 1996)



รูปที่ 2.1 แสดงรูปแบบของโคโลนีรูปแบบต่างๆที่พบในไฟทอปธอรา (1) stellate (2) rosaceous (3) stellate – rosaceous (4) petallate – cottony (Mills และคณะ, 1991)

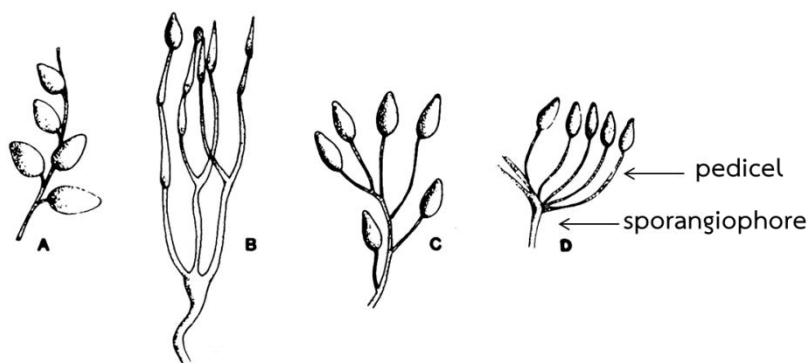
สปอร์แรงเจียม (Sporangium) ของไฟทอปธอราจะมีรูปร่างต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ แต่ส่วนใหญ่ที่พบมีรูปร่างแบบผลเลมอน ในบางสปีชีส์จะพบ papillae ที่บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียม ซึ่งลักษณะหนาและนูนออกมา



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะสปอร์แรงเจียมที่พบในไฟทอปธอรา (วาดโดย Vasiri, 1996)



สปอร์แรงเจียมจะเจริญอยู่บนก้านชูสปอร์แรงเจียม (Sporangiophore) ซึ่งจะพบทั้งที่เป็นแบบเจริญงอกออกมาจากข้อเดียวกัน (Sympodium) หรือเจริญแยกกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 สำหรับไฟทอปธอราที่ไม่ได้เจริญในน้ำ ก้านชูสปอร์แรงเจียมจะมีการบิดตัวทำให้สปอร์แรงเจียมหลุดออกจากก้าน จึงสามารถแพร่ไปได้โดยทางลมก่อนจะไปตกบนเนื้อเยื่อพืช แล้วงอก germ tube และเจริญต่อไป ส่วนในพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำ สปอร์แรงเจียมจะไม่หลุดออกแต่จะปล่อยชูโอสปอร์ที่สร้างขึ้นจากการแบ่งตัวของไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) ภายในสปอร์แรงเจียมออกมา (Waterhouse, 1963)



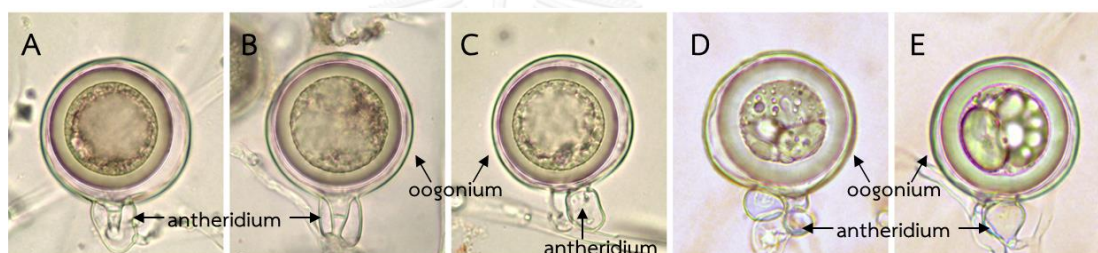
**รูปที่ 2.3** แสดงสปอร์แรงเจียมที่เจริญอยู่บนก้านชูสปอร์แรงเจียมแบบต่างๆที่พบในไฟทอปธอรา (A) Simple sympodium (B) และ (C) Compound sympodium (D) Umbellate sympodium (Drenth และ Sendall, 2001)

ชูโอสปอร์ของไฟทอปธอราจะมีรูปร่างตั้งแต่เป็นรูปไต (Reniform) จนถึงเป็นรูปชมพู่ (Pyriform) ประกอบด้วยแฟลกเจลลา 2 เส้นคือ tinsel flagella และ whiplash flagella ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ในน้ำ ด้วยเหตุที่ไฟทอปธอราไม่มีชูโอสปอร์ที่ว่ายน้ำได้จึงทำให้ไฟทอปธอราสามารถแพร่ระบาดไปได้โดยใช้น้ำเป็นตัวพา ไม่ว่าจะเป็นหยดน้ำฝน น้ำในแหล่งน้ำหรือน้ำในดิน และมักพบการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากไฟทอปธอรารุนแรงในช่วงฤดูฝน

นอกจากนี้ยังมีการสร้างคลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore) บริเวณปลายเส้นใย (Terminal) หรืออยู่ระหว่างเส้นใย (Intercalary) คลาไมโดสปอร์จะมีลักษณะกลมและส่วนใหญ่จะมีผนังหนา จึงทำให้สามารถอยู่ตามดินหรือซากพืชที่ตายแล้วได้เป็นเวลานาน เมื่อมีสภาพแวดล้อม

เหมาะสมก็พร้อมที่ออกเส้นใยและเจริญต่อไปได้ เช่นเดียวกับ โอโอสปอร์ที่จะสร้างขึ้นในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

โอโอสปอร์ (Oospore) ของไฟทอปธอราจะมีผนังหนา ภายในโอโอสปอร์จะมีนิวเคลียสและก้อนไขมัน (Ooplast) สะสมอยู่ โอโอสปอร์เกิดจากการผสมกันของนิวเคลียสในแอนเทอริเดียม (Antheridium) เคลื่อนที่มาผสมกับนิวเคลียสของโอโอสเฟียร์ (Oosphere) ซึ่งตำแหน่งการวางตัวของแอนเทอริเดียมและโอโอโกเนียมในไฟทอปธอรานั้นมี 2 แบบ คือ แบบ Paragynous คือ แอนเทอริเดียมจะเกาะอยู่ที่ด้านข้างของโอโอโกเนียม และแบบ Amphigynous คือ โอโอโกเนียมเจริญแทงผ่านและอยู่ด้านบนของแอนเทอริเดียม ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งรูปแบบการวางตัวของแอนเทอริเดียมและโอโอโกเนียมขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของไฟทอปธอราด้วย (วิจัย รักรักษาศาสตร์, 2551)



**รูปที่ 2.4** แสดงรูปแบบการวางตัวของแอนเทอริเดียมและโอโอโกเนียมที่พบในไฟทอปธอรา (A) และ (B) แบบ Amphigynous (C), (D) และ (E) แบบ Paragynous compound syndodium (D) และ (E) Aborted Oospore (Scanu และคณะ, 2015)

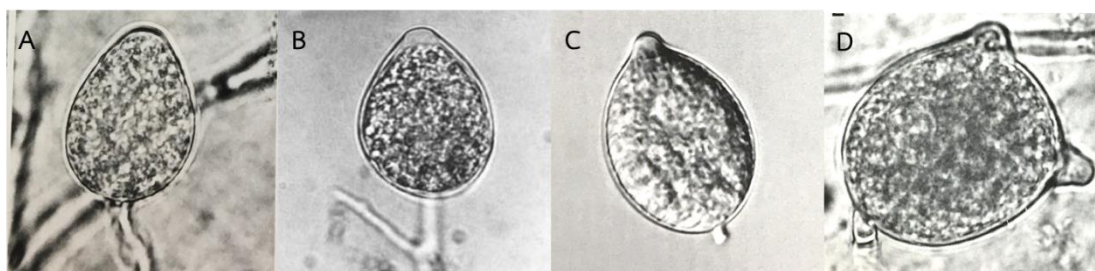
### 2.2.3 การจำแนกไฟทอปธอรา

การจัดจำแนกไฟทอปธอราสามารถทำได้โดยวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology identification) ร่วมกับการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (molecular identification)

#### 2.2.3.1 การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology identification)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราที่สามารถใช้จัดจำแนกได้คือ ลักษณะของโคโลนี และลักษณะของสปอร์แรงเจียม ซึ่งในแต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างกันคือ การแผ่ของโคโลนีรูปแบบต่างๆ และลักษณะต่างๆของสปอร์แรงเจียม ได้แก่ ขนาด รูปร่าง ลักษณะ papillae ซึ่งบางสปีชีส์จะไม่มีการสร้าง papillae เช่น *P. drechsleri*, *P. cambivora* และ *P. erythroseptica* เป็นต้น ส่วน

ในสปีชีส์ที่มีการสร้าง papillae ก็สามารถแบ่งรูปแบบ papillae เป็น semipapillate ซึ่งมีขนาดไม่เกิน 3 ไมโครเมตร พบใน *P. citricola* และ *P. infestans* เป็นต้น ถ้า papillae มีขนาดมากกว่า 3 ไมโครเมตรจัดเป็นแบบ papillate เช่นใน *P. palmivora*, *P. cactorum* และ *P. nicotianae* เป็นต้น และยังพบแบบ bipapillate ใน *P. nicotianae* ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะ papillae แบบต่างๆของสปอร์แรงเจียมที่พบในไฟทอปธอรา (A) Non-papillate (B) Semi-papillate (C) Papillate (D) Bipapillate (Erwin และ Ribeiro, 1996)

นอกจากลักษณะสปอร์แรงเจียมแล้ว การหลุดออกของสปอร์ (caducity), ความยาวของ pedicel, การเกิด proliferation ของสปอร์แรงเจียมที่เป็นแบบ internal หรือ external proliferation, การแตกแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียม ซึ่งจะพบทั้งที่เป็นแบบเจริญงอกออกมาจากข้อเดียวกัน (sympodium) หรือเจริญแยกกัน, การสร้างคลาไมโดสปอร์, ตำแหน่งการจับของแอนเทอริเดียมกับโอโอโกเนียมแบบ paragynous หรือแบบ amphigynous ก็ยังใช้จัดจำแนกสปีชีส์ของไฟทอปธอราได้ (Liyanage และ Wheeler, 1989)

### 2.2.3.2 การจำแนกด้วยการวิเคราะห์ระดับชีวโมเลกุล (molecular identification)

การจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีการจำแนกไฟทอปธอราเบื้องต้น ซึ่งต้องใช้วิธีทางชีวโมเลกุลร่วมด้วยเพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำ ซึ่งวิธีทางชีวโมเลกุลที่นิยมใช้กันคือ การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction; PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อราสกุลไฟทอปธอรา คือ คู่ไพรเมอร์ A2-I2 ที่จำเพาะต่อยีนในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ที่อยู่ระหว่าง 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (18S rRNA) และ 25S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (25S rRNA) ซึ่งยีนในตำแหน่ง ITS เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (Drenth และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังมีคู่ไพรเมอร์

FM75-FM 78 ที่จำเพาะต่อยีน cytochrome oxidase II (Martin และคณะ, 2012) และ คู่ไพรเมอร์ BT5-BT6 ที่จำเพาะต่อยีน  $\beta$ -tubulin ของไฟทอปธอรา (Villa และคณะ, 2006)

#### 2.2.4 ความแตกต่างระหว่างไฟทอปธอราและพิเทียม

ไฟทอปธอรา (*Phytophthora*) และพิเทียม (*Pythium*) เป็นราในวงศ์ Pythiaceae ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก โดยยีนสปีชีสพิเทียมได้เริ่มมีมาก่อนยีนสปีชีสไฟทอปธอรา ซึ่งพิเทียมเป็นราน้ำ มีลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น (coenocytic mycelium หรือ non-septate hypha) มีการสร้างซุโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลล่า 2 เส้นและสร้างโอโอสปอร์เช่นเดียวกับไฟทอปธอรา แต่ราทั้ง 2 ยีนสปีชีสมีลักษณะที่แตกต่างกันที่สามารถใช้จัดจำแนกได้แก่ (Drenth และ Sendall, 2001)

##### 2.2.4.1 การเกิดซุโอสปอร์

ไฟทอปธอราจะสร้างซุโอสปอร์ภายในสปอร์แรงเจียมที่ไม่มีถุงเวสิเคิล (vesicle) แต่พิเทียมจะสร้างซุโอสปอร์ในถุงเวสิเคิลที่สปอร์แรงเจียมสร้างขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.6

##### 2.2.4.2 ลักษณะของสปอร์แรงเจียม

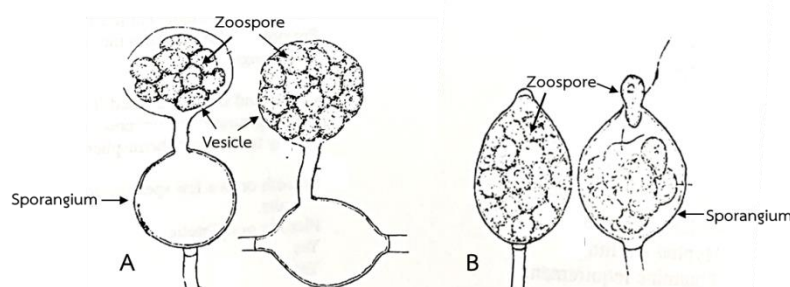
สปอร์แรงเจียมของไฟทอปธอราส่วนมากจะมีรูปร่างแบบ ovoid หรือแบบ obpyriform และสร้างอยู่ที่บริเวณปลายเส้นใย (terminal) ส่วนในพิเทียมจะมีรูปร่างแบบ globulose, lobate หรือ filamentous และส่วนมากจะสร้างอยู่ระหว่างเส้นใย (intercalary) ดังแสดงในรูปที่ 2.6

##### 2.2.4.3 ตำแหน่งของแอนเทอริเดียม

แอนเทอริเดียมของไฟทอปธอราส่วนมากจะวางตัวกับโอโอโกเนียมแบบ amphigynous มีบางสปีชีส์ที่เป็นแบบ paragynous แต่พิเทียมจะมีเพียงแบบเดียวคือแบบ paragynous

##### 2.2.4.4 การสร้าง haustorium

ไฟทอปธอราจะมีการสร้าง haustorium บนพืชที่อาศัย ส่วนพิเทียมจะไม่สร้างโครงสร้างนี้ บนพืชที่อาศัย



**รูปที่ 2.6** แสดงความแตกต่างของสปอร์แรงเจียมและการเกิดซุโอสปอร์ของไฟทอฟธอราและฟิเทียม (A) ฟิเทียม (B) ไฟทอฟธอรา (Frezzi, 1950)

### 2.2.5 วงชีวิตของไฟทอฟธอรา

ไฟทอฟธอรา มีวงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้างสปอร์แรงเจียม ซึ่งสปอร์แรงเจียมจะงอกเป็นสายใยหรือสร้างซุโอสปอร์นั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ถ้าอยู่ในสภาพที่มีน้ำมาก สปอร์แรงเจียมจะสร้างซุโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำให้สามารถแพร่กระจายไปได้ด้วยน้ำฝนและน้ำในดิน หลังจากซุโอสปอร์ว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งแล้วจะเข้าเกราะ (encyst) แล้วจึงงอกและสร้าง haustorium เมื่อไปตกลงบนเนื้อเยื่อพืช (Brooks, 2004) แต่ถ้าอยู่ในสภาพที่แห้งแล้ง สปอร์แรงเจียมก็จะหลุดออกจากก้านแล้วปลิวไปตามลม เมื่อสปอร์ทั้ง 2 ไปตกลงบนเนื้อเยื่อพืช ก็จะสร้างโครงสร้าง haustorium เจาะเข้าไปในพืชเพื่อดูดน้ำและแร่ธาตุจากพืช ส่วนช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะสร้างโอโอสปอร์ที่เกิดจากการรวมกันของนิวเคลียสของแอนเทอริเดียม (antheridium) กับ โอโอโกเนียม (oogonium) ซึ่งจะพบทั้งแบบที่เป็น homothallic และ heterothallic ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ โอโอสปอร์ที่สร้างขึ้นจะมีผนังหนาเช่นเดียวกับคลาไมสปอร์ที่สร้างขึ้นในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้สามารถพักตัวอยู่ในดินหรือในซากพืชที่ตายแล้วได้เป็นเวลานาน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเส้นใยแล้วเจริญต่อไป (Chee, 1973)

### 2.2.6 ไฟทอฟธอราที่พบในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบไฟทอฟธอราครั้งแรก โดยหม่อมเจ้า สิทธิพร กฤดากร ในปี พ.ศ. 2470 รายงานพบความผิดปกติของต้นพลูที่มีอาการรากเน่าโคนเน่า ซึ่งต่อมาได้มีการ

ศึกษาวิจัยแล้วพบว่า เชื้อสาเหตุของโรค คือ *P. palmivora* และ *P. parasitica* (มรรรัตน์ และคณะ, 2555) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับไฟทอปธอราและมีรายงานการพบไฟทอปธอราในประเทศไทยในพืชต่าง ๆ มากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** แสดงไฟทอปธอราที่มีรายงานพบในประเทศไทย (ดัดแปลงจาก Sangchote และคณะ (2004) )

สปีชีส์ <i>Phytophthora</i>	พืชอาศัย (Host)		เอกสารอ้างอิง
<i>P. infestans</i>	มันฝรั่ง	<i>Solanum tuberosum</i>	Tucker (1933)
<i>P. meadii</i>	ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i>	Chee และ Greenwood (1968)
<i>P. capsici</i>	พริกไทยดำ	<i>Piper nigrum</i>	Tsao และ Tummakate (1977)
<i>P. botryosa</i>	ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i>	Suzui และคณะ (1979)
<i>P. nicotianae</i>	ส้ม	<i>Citrus spp.</i>	Suzui และคณะ (1979)
	ทุเรียน	<i>Durio zibethinus</i>	Suzui และคณะ (1979)
	สับปะรด	<i>Ananas comosus</i>	Suzui และคณะ (1979)
	พริกไทยดำ	<i>Piper nigrum</i>	Silayoi และคณะ (1983)
	ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i>	Rubber Reserch Institute of Thailand (2010)
<i>P. palmivora</i>	พริกไทยดำ	<i>Piper nigrum</i>	Kunloun (1967); Tsao และ Tummakate (1977) ; Krenghiem และคณะ (1989)
	ทุเรียนป่า	<i>Durio lowianus</i>	Kumjaipai (1974)
	ทุเรียน	<i>Durio zibethinus</i>	Suzui และคณะ (1979)
	ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i>	Tsao และคณะ (1976)
	โกโก้	<i>Theobroma cacao</i>	Chomenansilpe และคณะ (1983)
	ลองกอง	<i>Euphorbia longana</i>	Bhavakul และคณะ (1997)
	มะม่วง	<i>Mangifera indica</i>	Kueprakone และคณะ (1986)
สับปะรด	<i>Ananas comosus</i>	Suzui และคณะ (1979)	
<i>P. citrophthora</i>	ยางพารา	<i>Hevea brasiliensis</i>	Laohasakul และคณะ (2017)

## 2.2.7 ไฟทอปธอราที่มีรายงานพบในยางพารา

ไฟทอปธอราที่พบในต้นยางพาราสามารถพบได้แทบทุกส่วนของต้นยางพาราได้แก่ ใบ เปลือกไม้ ผลและยอดของต้นอ่อน โดยไฟทอปธอราเป็นสาเหตุที่ทำให้ยางพาราเกิดอาการของโรคต่างๆ ได้แก่ โรคใบร่วง (leaf fall) โรคยอดตาย (shoot dieback) โรคเส้นดำ (black stripe) โรคฝักเน่า (pod rot) และโรคแคงเกอร์ (patch canker) (Liyanage และ Wheeler, 1989) ไฟทอปธอราที่มีรายงานพบในยางพารามีหลายสปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ประเทศไทยมีรายงานพบไฟทอปธอราในยางพาราเพียง 5 สปีชีส์ คือ *P. meadii*, *P. palmivora*, *P. botryosa*, *P. citrophthora* และ *P. nicotianae* var. *parasitica* แต่มี 3 สปีชีส์ที่พบแพร่ระบาดบ่อยในประเทศไทยคือ *P. palmivora*, *P. botryosa* และ *P. nicotianae* var. *parasitica* ซึ่งก่อโรคใบร่วงและเส้นดำในต้นยางพารา (Promwee และคณะ, 2016)

**ตารางที่ 2.2** แสดงสปีชีส์ของไฟทอปธอราที่พบในยางพารา (ดัดแปลงจาก Jayasuriya และคณะ (2003); Laohasakul และคณะ (2017))

สปีชีส์ <i>Phytophthora</i>	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
<i>P. meadii</i>	อินเดีย	McRae W. (1918)
	ไทย	Chee และ Greenwood (1968)
<i>P. faberi</i>	ศรีลังกา	Gadd C.H. (1924)
<i>P. heveae</i>	มาเลเซีย	Thompson A. W. (1929)
<i>P. palmivora</i>	มาเลเซีย	Chee และคณะ (1967)
	ไทย	Tsao และคณะ (1976)
<i>P. botryosa</i>	มาเลเซีย	Chee (1969)
	ไทย	Tsao และคณะ (1975)
<i>P. cirticola</i>	ศรีลังกา	Liyanage และคณะ (1989)
<i>P. phaseoli</i>	อินเดีย	Ho และคณะ (1984)
<i>P. cactorum</i>	จีน	Ho และคณะ (1984)
<i>P. citrophthora</i>	จีน	Ho และคณะ (1984)
	ไทย	Laohasakul และคณะ (2017)
<i>P. capsici</i>	บราซิล	Jayasinghe (1999)
<i>P. colocasiae</i>	จีน	Ho และคณะ (1984)

ตารางที่ 2.2 แสดงสปีชีส์ของไฟทอปธอราที่พบในยางพารา (ต่อ)

สปีชีส์ <i>Phytophthora</i>	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
<i>P. nicotianae</i>	อินเดีย ไทย	Thomson และ George (1976) Rubber Reserch Institute of Thailand (2010)

ไฟทอปธอราที่ก่อโรคในยางพารา ส่วนใหญ่ที่พบมีสาเหตุมาจาก *P. palmivora* และมีบางส่วนที่เกิดจาก *P. meadii* *P. botryosa* *P. citrophthora* *P. capsici* และ *P. nicotianae* var. *parasitica* (Promwee และคณะ, 2016) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3





ตารางที่ 2.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟืองฟอซอราที่มีกพบในยางพารา (ตัดแปลงมาจาก Martin และคณะ (2012))

Species	Asexual phase								Sexual phase				Growth tem.		Waterhouse group <sup>p</sup>	clade <sup>q</sup>	
	sporangium shape <sup>a</sup>	sporangium size average <sup>b</sup> (µm)	Papillae <sup>c</sup>	Caducity <sup>d</sup>	Pedicle <sup>e</sup>	Proliferation <sup>f</sup>	Sporangiospore <sup>g</sup>	chlamydospore <sup>h</sup>	Hyphal swelling <sup>i</sup>	Reproductive strategy <sup>j</sup>	Oogonial wall <sup>k</sup>	Antheridial attachment <sup>l</sup>	oospore & oogonial wall <sup>m</sup>	Optimum <sup>n</sup> (°C)			maximum <sup>o</sup> (°C)
<i>P. nicotianae</i>	Ell. Ovo. Pyr. Opy. Sph.	42 x 29	P	C/-	S	-	SS	CH	HS	HT	S	A	P/A	24-33	>35	III	1
<i>P. botryosa</i>	Ova. Ovo.(st)	28 x 15	P	C	M	-	SS	CH/-	-	HT	S	A	P	21-25	<32	II	2a
<i>P. citrophthora</i>	Sph. Ovo. Obpy. Obtu. Ell.	45 x 30	SP	-	-	-	IB	CH/-	-	HT	S	A	P	24-30	<33	IV	2a
<i>P. meadii</i>	Ell. Opy. Sph.(st) dist.(st)	F: 48 x 21 W: 32 x 23	P/SP	C	M	-	SS/UN	CH/-	-	HO/HT	S	A	S/A	25-30	<33	II	2a
<i>P. capsici</i>	Subsp. Ovo. Oov. Ell. Fus. Pyr. Dis.	45 x 30	P	C	L	-	SS	-	HS	HT	S	A	P	27-33	>35	II	2b
<i>P. palmivora</i>	Ell. Ovo. Sph.	50 x 30	P	C	S	-	SS	CH	HS	HT	S	A	P/SA	24-30	<33	II	4

- <sup>a</sup> รูปร่างของสปอร์แรงเจียม Ell.= ellipsoid, Ovo.= ovoid, Pyr.= pyriform, Opy.= obpyriform, Sph.= spherical, Obt.= obturbunate, dis.= distorted, Subsp.= subspherical, Fus.= fusiform, (st.) = sometimes
- <sup>b</sup> ขนาดของสปอร์แรงเจียม F.= on fruit, W.= in water
- <sup>c</sup> รูปแบบ papillae ของสปอร์แรงเจียม P = papillate ( $\geq 3.5 \mu\text{m}$ ), SP = semipapillate ( $< 3.5 \mu\text{m}$ ), NP = nonpapillate
- <sup>d</sup> การหลุดของสปอร์แรงเจียม (Caducity) C = caduceus, C/- = sometimes caduceus, - = non caduceus
- <sup>e</sup> ความยาวของ pedicle S = short ( $< 5 \mu\text{m}$ ) M = medium (5-20  $\mu\text{m}$ ), L = long ( $> 20 \mu\text{m}$ ), - = no pedicle
- <sup>f</sup> Proliferation ของสปอร์แรงเจียม PR = Proliferating sporangia, - = nonproliferating
- <sup>g</sup> รูปแบบของก้านชูสปอร์แรงเจียม (sporangiophore) UN = unbranched, SS = simple Sympodium, IB = irregularly branched
- <sup>h</sup> การเกิด chlamydospores CH = formed, CH/- = sometime formed, - = not formed
- <sup>i</sup> การเกิด hyphal swellings HS = formed, HS/- = sometime formed, - = not formed
- <sup>j</sup> การสืบพันธุ์ Ho = homothallic, HT = heterothallic
- <sup>k</sup> ลักษณะผนังของโอโอโกเนียม S = smooth
- <sup>l</sup> รูปแบบการจับของแอนเทอริเทียมบนโอโอโกเนียม P = paragynous, A = amphigynous
- <sup>m</sup> ช่องว่างระหว่างโอโอสปอร์และผนังของโอโอโกเนียม P = plerotic, A = aplerotic, SA = slightly aplerotic
- <sup>n</sup> อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (optimum temper)
- <sup>o</sup> อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ (maximum temper)
- <sup>P</sup> กลุ่มที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาตาม Waterhouse
- <sup>q</sup> Phylogenetic clade

สปีชีส์ส่วนใหญ่ที่พบในยางพาราทั่วโลกคือ *P. meadii* และ *P. palmivora* เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำ โรคฝักเน่า และโรคใบร่วง ซึ่งโรคเส้นดำเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากไฟทอปธอราที่พบได้บ่อยที่สุดในยางพารา (Erwin และ Ribeiro, 1996) รองลงมาเป็นโรคใบร่วงที่มักพบในเขตพื้นที่ฝนตกชุกเขตร้อน (wet tropical area) เช่น บริเวณภาคใต้ของประเทศไทยที่พบโรคใบร่วงแพร่ระบาดบ่อยและทำให้ผลผลิตลดลงร้อยละ 40 ซึ่งการควบคุมโรคที่เกิดจากการแพร่ระบาดของไฟทอปธอราคิดเป็นร้อยละ 5 – 10 ของต้นทุนการผลิต (Sangchote และคณะ, 2004)

## 2.2.8 โรคในยางพาราที่มีสาเหตุมาจากไฟทอปธอรา

### 2.2.8.1 โรคใบร่วง

โรคใบร่วง (leaf fall) เป็นโรคที่มีความสำคัญ เพราะยางพาราที่ติดโรคใบร่วงจะส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำยาง ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ซึ่งเมื่อเกิดการระบาดของโรคใบร่วงจนทำให้ใบต้นยางร่วงมากกว่า 20 % จะทำให้ผลผลิตยางลดลง ถ้าหากไม่ควบคุมแล้ว ปล่อยให้ใบร่วงจนถึง 75 % จะทำให้ผลผลิตลดลง 30 – 50 % ถ้าในพันธุ์ยางที่อ่อนแอและสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออาจทำให้ใบร่วงหมดต้นได้ (พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, 2550) โรคใบร่วงจากไฟทอปธอรา จะเกิดการระบาดหนักในช่วงฤดูฝนหรือช่วงอากาศเย็น ความชื้นสูงและฝนตกชุกติดต่อกันอย่างน้อย 4 วัน โรคใบร่วงมีสาเหตุมาจาก *P. botryosa*, *P. palmivora* และ *P. nicotianae* (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ต้นยางพาราเมื่อติดเชื้อดังกล่าวจะแสดงอาการ ก้านใบมีรอยชำรุดน้ำตาลเข้มถึงดำตามความยาวของก้านใบ มีน้ำยางซึมออกมาเป็นหยดเล็กๆเกาะอยู่ ซึ่งเป็นบริเวณทางเข้าของเชื้อ เนื่องจากเชื้อเข้าทำลายที่บริเวณก้านใบจึงทำให้ใบหลุดร่วงทั้งที่ใบยังคงเป็นสีเขียวสดอยู่ เมื่อสะบัดใบเบาๆ ใบย่อยจะหลุดออกจากก้านใบโดยง่าย หากเชื้อเข้าทำลายปลายใบหรือขอบใบ จะทำให้เกิดแผลชำรุดน้ำตาลและขยายติดต่อกันจนเป็นแผลขนาดใหญ่ได้ จึงทำให้บางใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแดงก่อนหลุดร่วง ไฟทอปธอราสามารถเข้าทำลายฝักได้ทุกระยะ ฝักที่ติดเชื้อจะมีเส้นใยราสีขาวปกคลุมอยู่ และจะเน่าดำค้างอยู่บนต้น ไม่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ ทำให้ฝักยางเป็นแหล่งสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อ นอกจากนี้ในฝักยางและส่วนของพืชที่ตายแล้วจะพบโอโอสปอร์และคลาไมโดสปอร์อยู่ ทำให้เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูและกลับมาแพร่ระบาดเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมได้ ซึ่งถ้าเชื้อจากฝักและใบโดนน้ำฝนชะไปตกลงบนหน้ากรีดยางจะทำให้เกิดโรคเส้นดำได้ (พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, 2556)

### 2.2.8.2 โรคเส้นดำ

โรคเส้นดำเป็นโรคที่มักจะเกิดหลังจากมีการระบาดของโรคใบร่วง และมักเกิดการแพร่ระบาดของโรคนี้เมื่อมีความชื้นสูงหรือฝนตกประจำ ซึ่งจะทำให้หน้ากรีดยางเปียกอยู่ตลอดเวลา ถ้าหากกรีดยางในช่วงที่หน้ากรีดยางเปียกโดยไม่มีกำบังจะทำให้เชื้อเข้าสู่หน้ากรีดยางได้ และช่วงที่ฝนตก เชื้อบนฝักหรือใบที่ถูกชะโดยน้ำฝนแล้วไหลลงมาที่หน้ากรีดยาง โรคเส้นดำมีสาเหตุมาจาก *P. botryosa* และ *P. palmivora* (เพเยอร์ ร่มรื่นสุขารมย์, 2550) เมื่อเชื้อเข้าทำลายหน้ากรีดยาง จะเกิดรอยชำที่บริเวณเหนือรอยกรีด ต่อมาจะเป็นรอยบุ๋มน้ำตาลดำและขยายตัวไปตามแนวยาวของลำต้น เมื่อเปิดเปลือกบริเวณรอยบุ๋มออก จะพบสายสีดำที่เนื้อไม้และอาจรุกรามไปยังบริเวณหน้ากรีดยางได้ ถ้าอาการรุนแรงเปลือกจะเน่าปริแตกออกมาและมีน้ำยางไหลออกมาตลอด (จำศักดิ์ ธงฤทธิ์, 2557)

เนื่องจากโรคที่เกิดจากไฟทอปธอรา มักพบมีการแพร่ระบาดทุกปีและแทบทุกพื้นที่ปลูกยางพารา นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ระบาดไปยังพืชชนิดอื่นได้ ดังนั้นวิธีการจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากไฟทอปธอราจึงมีความสำคัญและน่าสนใจ วิธีการควบคุมโรคพืชที่ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์และเกษตรกรให้ความสนใจเป็นอย่างมาก นั่นคือ การควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ซึ่งเป็นวิธีทางเลือกที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและต่อตัวเกษตรกร และหนึ่งในวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่ปัจจุบันได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยคือ การใช้ไมคอไวรัส (mycovirus) ดังนั้นการหาไมคอไวรัสในราก่อโรคจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคทางชีวภาพ

## 2.3 ไมคอไวรัส

### 2.3.1 ลักษณะทั่วไปของไมคอไวรัส

ไมคอไวรัส (mycovirus) คือไวรัสที่อาศัยอยู่ในรา หรือไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในรา จุดเริ่มต้นและวิวัฒนาการของไมคอไวรัสมีข้อสันนิษฐาน 2 ข้อคือ สันนิษฐาน ancient co-evolution คือราติดเชื้อไมคอไวรัสแล้วทั้งไมคอไวรัสและราเจ้าบ้านมีวิวัฒนาการร่วมกันมายาวนาน ตั้งแต่ในอดีต ซึ่งจากสันนิษฐานข้อนี้ทำให้เข้าใจถึงความหลากหลายของไมคอไวรัส และสันนิษฐาน plant virus คือไมคอไวรัสมีวิวัฒนาการย้ายจากไวรัสในพืชมาสู่ราที่ก่อโรคในพืช ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้ใช้อธิบายถึงไมคอไวรัสโดยเฉพาะกลุ่มที่พบในราก่อโรคที่จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสในพืช (Pearson และคณะ, 2009) ไมคอไวรัสมีรายงานพบครั้งแรกในช่วงปี 1940 โดยพบว่าเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) ที่ปลูกในฟาร์มมีการสร้างดอกเห็ดที่รูปร่างผิดปกติและมีการเจริญเติบโตช้าทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในตอนนั้นได้เรียกว่าโรค La France ต่อมาได้มีการศึกษาจนพบว่าอาการนั้นเกิดจากไมคอไวรัส ต่อมาในปี 1962 ได้พบอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particle) รูปร่าง spherical และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 ไมโครเมตรในเห็ดดังกล่าว (Hollings, 1962) ซึ่งการค้นพบครั้งนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นของไมคอไวรัสและตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและจัดจำแนกไมคอไวรัสสปีชีส์ต่างๆเรื่อยมา จนปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไมคอไวรัสมากมาย ซึ่งมีอย่างน้อย 250 ชนิดที่มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุชนิดของไมคอไวรัสพร้อมทั้งจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยมีรายงานการพบไมคอไวรัสในราทุกไฟลัม (Xie และ Jiang, 2014) ไมคอไวรัสที่พบมีทั้งแบบที่มีโปรตีนห่อหุ้ม (capsid protein) หรือแบบที่พบแต่สารพันธุกรรมอย่างเดียว ซึ่งสารพันธุกรรมของไมคอไวรัสพบได้ทั้งชนิดที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่พบทั้งแบบสายเดี่ยวและสายคู่ แต่โดยส่วนใหญ่จะพบเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ มีเพียงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ที่พบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (King และคณะ, 2011)

### 2.3.2 การจัดจำแนกไมโคไวรัส

จากข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะของอนุภาคไมโคไวรัสได้มีการจัดจำแนกไมโคไวรัสออกเป็น 16 แฟมิลี (family) ประกอบด้วย 7 แฟมิลีที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่แบบเส้นตรง (linear dsRNA) ได้แก่ *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* และ *Totiviridae* 5 แฟมิลีที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก (linear positive-sense ssRNA) ได้แก่ *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae* และ *Narnaviridae* (Ghabrial และคณะ, 2015) และ 2 แฟมิลีที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายรีเวิร์ส (Reverse-transcribing ssRNA) ได้แก่ *Pseudoviridae* และ *Metaviridae* (Ghabrial และ Suzuki, 2009) จากรายงานการประชุมของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ครั้งที่ 10 ในปี 2016 ได้มีการจัดจำแนกไมโคไวรัสเพิ่ม 2 แฟมิลีคือ แฟมิลี *Mycomonone* เป็นไมโคไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายลบ (linear negative-sense ssRNA) และแฟมิลี *Genomoviridae* เป็นไมโคไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นวงดีเอ็นเอสายเดี่ยว (circular ssDNA) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016) นอกจากนี้ยังมีไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่จัดอยู่ในจีนัส *Rhizidiovirus* ซึ่งพบในราน้ำที่ปัจจุบันได้จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ใช่รา จากรายงานการพบไมโคไวรัสเกือบทั้งหมดของไมโคไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอและส่วนใหญ่พบเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ ซึ่งมีอีกหลายสปีชีส์ที่ยังไม่ได้มีการจัดจำแนกจีนัสหรือแฟมิลี

### 2.3.3 ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบในรามิมีรายงานการพบมากมาย ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 7 แฟมิลีที่กล่าวไปข้างต้น และมีบางสปีชีส์ที่ยังไม่ได้รับการจัดจำแนก โดยแต่ละแฟมิลีของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่จะมีลักษณะชิ้นส่วนสารพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.4

ส่วนในประเทศไทยมีรายงานพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* spp. จำนวน 2 ไอโซเลทจากทั้งหมด 156 ไอโซเลทที่ได้จากดินในฟาร์ม อาหารเลี้ยงเห็ดและผลิตภัณฑ์ชีวภาพจาก 24 ตำบลในจังหวัดเชียงใหม่ ไวรัสที่แยกได้มีจีโนมขนาด 1000 คู่เบส ส่วนอีกไอโซเลทมีจีโนมที่ประกอบด้วย 2 segment ขนาด 700 และ 1100 คู่เบส ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทที่พบไวรัสแสดงอัตราการเจริญเติบโต การสร้างสปอร์และความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control

activity) ลดลง (Jom-in และ Akarapisan, 2009) เช่นเดียวกับ บุญยฤทธิ์ จันทวิมล (2554) ที่ รายงานพบไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* spp. จำนวน 7 ไอโซเลทจาก 93 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดิน กิ่งไม้ และเห็ดหึ่งจาก 13 จังหวัดในประเทศไทย หนึ่งใน 7 ไอโซเลทที่พบอาร์เอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 2.19 และ 2.04 กิโลเบส ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดจำแนกว่าเป็นไวรัส สกกุล *Partitivirus*



ตารางที่ 2.4 แสดงการจัดจำแนกไมโครไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ตาม International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (ตัดแปลงจาก บุญฤทธิ์ จันทวิมล (2554); Ghabrial และคณะ (2015))

Family	Genus	Genome		Morphology	Species	Accession no.	Reference
		Segment	Size (Kb)				
<i>Chysoviridae</i>	<i>Chysovirus</i>	4	2.7 - 3.5	Isometric, 30 - 35 nm, not enveloped, multiple components	<i>Penicillium chrysogenum virus</i>	AF29639	Caston et al. (2003)
<i>Endornaviridae</i>	<i>Endornavirus</i>	1	14 - 17.6	No true particles, nucleoprotein complex, not enveloped	<i>Helicobasidium mompa endornavirus 1</i>	AB218287	Osaki et al. (2006)
<i>Megabirnaviridae</i>	<i>Megabirnaviridae</i>	2	8.9 , 4.2	Isometric, ~50 nm, not enveloped	<i>Rosellinia necatrix megabirnavirus 1</i>	NC_013462	Chiba et. al., 2009
<i>Quadriviridae</i>	<i>Quadriviridae</i>	4	3.7 - 4.9	Isometric, ~48 nm, not enveloped	<i>Rosellinia necatrixquadrivirus1</i>	NC_016757	Lin et. al. (2013)
<i>Partitiviridae</i>	<i>Partivirus</i>	2	1.4 - 2.4	Isometric, 30 - 40 nm, not enveloped	<i>Atkinsonella hypoxylon virus</i>	L_39125	Oh and Hillman (1995)
<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus</i>	11 - 12	0.7 - 4.1	Isometric, ~80 nm, not enveloped	<i>Cryphonectria parasitica Mmycoreovirus 1</i>	AY277888	Hillman et al. (2004)
<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i>	1	4.6 - 7.0	Isometric, 60 nm, not enveloped	<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A</i>	J04692	Icho and Wickner (1989)
	<i>Victorivirus</i>	1	4.6 - 6.7	Isometric, 40 nm, not enveloped	<i>Helminthosporium victoriae 1905V</i>	U41345	Huang and Ghabrial (1996)



### 2.3.4 ไวรัสใน Oomycetes

นอกจากไมคอไวรัสในราก่อโรคพืชกลุ่มต่างๆที่เคยมีรายงานและจัดจำแนกแล้ว ไวรัสในกลุ่ม Oomycetes ก็มีความน่าสนใจเช่นกัน เนื่องจากไวรัสในรากกลุ่มนี้มีความแตกต่างไปจากไมคอไวรัสในรากทั่วไป (Xiao และคณะ, 2014) ไวรัสใน Oomycetes เคยมีรายงานพบ Sclerophthora macrospora virus A (SmV A) ใน *Sclerophthora macrospora* ที่ก่อโรคราน้ำค้างในต้นข้าว ซึ่งไวรัสที่มีรูปร่าง icosahedral ขนาด 30 นาโนเมตร และมี spike 4 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวกสายเดี่ยว 3 segments (Shirako และ Ehara, 1985) เช่นเดียวกับที่ Yokoi และคณะ (1999) ที่รายงานว่า พบ Sclerophthora macrospora virus B (SmV B) เป็นไวรัสที่มีรูปร่าง icosahedral ขนาด 32 นาโนเมตร และมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวท่อนเดี่ยว ซึ่งไวรัสทั้ง 2 ยังไม่ได้รับการจัดจำแนกจีโนม นอกจากนี้ยังมีรายงานพบ Plasmopara halstedii virus (PhV) เป็นไวรัสอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 2 segments ใน *Plasmopara halstedii* ที่ก่อโรคราน้ำค้างในต้นทานตะวัน (Mayhew และคณะ, 1992) ส่วนในพื้เทียมมีรายงานพบอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Pythium butleri* (Buck, 1986) เช่นเดียวกับใน *Pythium irregular* ที่พบอนุภาคคล้ายไวรัสขนาด 45 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ พบใน 33 ไอโซเลทจากทั้งหมด 39 ไอโซเลท (Gillings และคณะ, 1993)

### 2.3.5 ไวรัสในไฟทอปธอรา

ไวรัสในไฟทอปธอรา มีรายงานการพบครั้งแรกในปี 1985 โดยพบอนุภาคคล้ายไวรัสที่มีขนาด 41 นาโนเมตรในนิวเคลียสของ *P. drechsleri* แต่ไม่ได้มีการแยกและระบุชนิดของไวรัส (Roos และ Shaw, 1985) เช่นเดียวกับ Hacker และคณะ (2005) ที่พบอนุภาคคล้ายไวรัสใน *P. nicotianae* ต่อมาได้มีรายงานพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ใน *P. infestans* ที่แยกได้จำนวน 14 ไอโซเลทจากทั้งหมด 40 ไอโซเลท (Tooley และคณะ, 1989) ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาไวรัสในไฟทอปธอราได้มีผู้สนใจศึกษาเรื่อยมา จนกระทั่งปัจจุบันมีไวรัสในไฟทอปธอราเพียง 5 ตัวที่มีการศึกษาอย่างละเอียดและระบุชนิดของไวรัส ได้แก่ Phytophthora endornavirus 1 (PEV1) (Hacker และคณะ, 2005), Phytophthora infestans RNA virus 1 (PiRV-1), PiRV-2, PiRV-3 และ PiRV-4 (Cai และ Hillman, 2013) ซึ่งไวรัสทั้ง 4 ตัวยกเว้น PiRV-2 มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล NCBI

### 2.3.3.1 *Phytophthora endornavirus 1*

*Phytophthora endornavirus 1* (PEV1) พบครั้งแรกในไฟทอปธอราที่แยกได้จากต้นสน มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (unencapsitated dsRNA) ขนาด 13,883 คู่เบส ที่มี 1 open reading frame (ORF) ถอดรหัสไปเป็น RNA - helicases ที่ปลายด้าน N (N-terminal), viral RNA-dependent RNA polymerases (RdRp) ที่ปลายด้าน C (C-terminal) และ UDP glycosyltransferases (UGT) ที่อยู่ตรงกลางระหว่าง 2 ยีน (Hacker และคณะ, 2005) ต่อมาได้ ออกแบบคูปริเมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะต่อยีนโพลีโปรตีนของไวรัส PEV1 (Kozlakidis และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาด 13 Kb ที่สันนิษฐานว่าเป็น PEV1 พบทั้งหมด 5 ไอโซเลทของ *Phytophthora* spp. ที่รักษาไว้ใน World *Phytophthora* Collection (WPC) (Mayhew และคณะ, 1992)

### 2.3.3.2 *Phytophthora infestans* RNA virus 1

*Phytophthora infestans* RNA virus 1 (PiRV-1) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอที่ประกอบด้วย 2 segment คือ ขนาด 2.9 และ 3.3 kb แบ่งออกเป็น RNA1 และ RNA2 ที่ประกอบด้วย 3,160 และ 2,776 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ โดย ORF1 จะอยู่บน RNA1 ซึ่งจะถอดรหัสไปเป็น RdRp ส่วนบน RNA2 จะมี ORF2 อยู่ที่ปลายด้าน C ซึ่งจะถอดรหัสเป็น protease และ ORF3 ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ ซึ่ง RNA2 จะมี 2 รูปแบบที่พบคือ RNA2A และ RNA2B โดย RNA2A จะมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 19 ตัวที่ใน RNA2B จะถูกแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ 9 ตัวซึ่งจะแบ่ง ORF2A ออกเป็น ORF3B-1 และ ORF3B-2 (Cai และคณะ, 2009)

### 2.3.3.3 *Phytophthora infestans* RNA virus 2

*Phytophthora infestans* RNA virus 2 (PiRV-2) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอขนาด 11,170 คู่เบสที่ถอดรหัสไปเป็นโพลีโปรตีน (polyprotein) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3,710 ตัว ซึ่งตำแหน่งของยีนที่ถอดรหัสไปเป็น cysteine protease จะอยู่บริเวณปลายด้าน N และ RdRp จะอยู่บริเวณปลายด้าน c ซึ่ง PiRV-2 คาดว่าจะเป็นไวรัสในแฟมิลีใหม่เพราะเนื่องจากมีความสัมพันธ์ที่ไกลไปจากไวรัสที่เคยมีรายงาน ไวรัส PiRV-2 อาจมีความสำคัญต่อการเกิดการแพร่ระบาดของโรคใบแห้ง (late blight) ในต้นมันฝรั่งและมะเขือเทศในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ โดยใน *P. infestans*

ที่มี PiRV-2 พบว่ามีการผลิตสปอร์มากกว่าไอโซเลทอื่นที่ไม่พบไวรัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ rye ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า PiRV-2 มีผลต่อการผลิตสปอร์ของรา (Cai และ Hillman, 2013)

#### 2.3.3.4 Phytophthora infestans RNA virus 3 (PiRV-3)

Phytophthora infestans RNA virus 3 (PiRV-3) พบใน *Phytophthora infestans* ที่มีการติดเชื้อร่วมกันกับ PiRV-4 เพียงไอโซเลทเดียวที่แยกจากต้นมะเขือเทศในฟลอริดา (Cai และคณะ, 2012) PiRV-3 มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอขนาด 8,112 คู่เบสที่ประกอบด้วย 2 ORF ที่ overlap กัน โดย ORF1 ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ ส่วน ORF2 ถอดรหัสเป็น RdRp ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลทที่มีการแยก PiRV-4 ออกแล้วพบว่า PiRV-3 เป็นสาเหตุทำให้รูปร่างโคโลนีไฟโทธอราเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่อัตราการเจริญและการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ rye ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Cai และคณะ, 2013)

#### 2.3.3.5 Phytophthora infestans RNA virus 4 (PiRV-4)

Phytophthora infestans RNA virus 4 (PiRV-4) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ 2,984 นิวคลีโอไทด์ ที่มีเพียง 1 ORF ที่ ถอดรหัสเป็น RdRp ซึ่ง PiRV-4 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* narnavirus 20S (ScNV-20S) และ ScNV-23S ที่อยู่ในยีสต์ *Narnavirus* ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. infestans* ไอโซเลทที่มีไวรัส PiRV-4 จะมีการผลิตสปอร์น้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ rye ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติของ *P. infestans* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cai และคณะ, 2012) ในปี 2016 ที่ผ่านมามีรายงานพบไวรัส PiRV-4 ใน *P. infestans* จำนวน 3 ไอโซเลทที่แยกได้จากยูนนาน ประเทศจีน (Zhan และคณะ, 2016)

#### 2.3.6 ผลของไมคอไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อราที่อาศัย

ไมคอไวรัสมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากราที่มีรายงานพบไมคอไวรัสส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุของโรคที่มีความรุนแรงในพืชทางการเกษตร หรือราที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ เช่น ผลิตสารปฏิชีวนะ สารพิษ และยา (Chowdhury และ Sen, 2000) ไมคอไวรัสบางตัวที่อยู่ในแฟมิลี *Megabirnaviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae* และ ไมคอไวรัสที่ไม่ได้จัดจำแนกบางตัวสามารถทำให้ราเจ้าบ้านเกิดอาการผิดปกติได้ เช่น การเจริญเติบโตของราลดลง

การสร้างสปอร์ลดลง การสังเคราะห์ secondary metabolites ถูกยับยั้ง และความรุนแรงของโรคที่เกิดจากราลดลง (Wang และคณะ, 2016) โดยเฉพาะไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบในราก่อโรคส่วนใหญ่จะสามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคของราเจ้าบ้านลง (hypovirulence) โดยลดการเจริญเติบโตของราหรือทำลายอวัยวะบางอย่างของราก่อโรค จึงทำให้ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (Xie และ Jiang, 2014) ดังเช่น sclerotium partitivirus 1 (SsPV1) เป็นไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบใน *Sclerotinia sclerotiorum* เป็นราที่ก่อให้เกิดอาการเน่าในพืช ซึ่งราที่ติดไวรัสนี้จะมีการเจริญของเส้นใยลดลง ผนังเส้นใยบางส่วนถูกทำลายทำให้มีการไหลของไซโทพลาซึมออกมาที่บริเวณปลายเส้นใย ไมโทคอนเดรียมีลักษณะผิดปกติและพืชทดสอบที่ติดราสายพันธุ์ที่มีไวรัสแสดงอาการของโรคลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัส (Xiao และคณะ, 2014)

ส่วนในไฟทอปธอราคี่มีรายงานความผิดปกติของราเจ้าบ้านเมื่อติดไวรัส เช่น รูปร่างโคโลนีของ *P. infestans* ที่มี PiRV-3 มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย โดยจะมีลักษณะ aerial mycelium เป็นวงกลมรอบ agar plug ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆที่ไม่พบไวรัส (Cai และคณะ, 2013) (Cai และคณะ, 2013) *Phytophthora* spp. ใน World *Phytophthora* Collection ที่พบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่มีการเจริญเติบโตที่ลดลง (Mayhew และคณะ, 1992) *P. infestans* ไอโซเลทที่มีไวรัส PiRV-4 มีการผลิตสปอร์ปริมาณน้อย ซึ่งโดยปกติ *P. infestans* จะผลิตสปอร์มากเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง rye (Cai และคณะ, 2012) แต่ในบางกรณีไวรัสอาร์เอ็นเอในไฟทอปธอราคี่อาจทำให้เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคได้ เช่น PiRV-2 ที่พบใน *P. infestans* ที่ก่อโรคใบไหม้ในต้นมันฝรั่ง ในไอโซเลทที่พบ PiRV-2 จะมีการผลิตสปอร์มากกว่าไอโซเลทอื่นที่ไม่พบไวรัส และนอกจากนี้ยังพบมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการต้านทานต่อ Metalaxyl ที่เป็นสารเคมีกำจัดไฟทอปธอราที่ใช้ทั่วไป (Cai และ Hillman, 2013)

ถึงแม้จะมีวิจัยต่างๆมากมายเกี่ยวกับไวรัสในรา แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับไวรัสในรากกลุ่ม Oomycota ที่มีความแตกต่างจากไปจากรากลุ่มอื่นๆ มีอยู่น้อย และปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาไวรัสที่แยกได้จากไฟทอปธอราในยางพารา

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท (ประเทศ)
1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง รุ่น CH30	Olympus (ญี่ปุ่น)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ รุ่น SZ30	Olympus (ญี่ปุ่น)
3. เครื่อง Electrophoresis รุ่น MUPID-2 plus	Advance (ญี่ปุ่น)
4. เครื่อง Gel Documentation	Bio-Rad (อิตาลี)
5. เครื่อง heat box	Bioer technology (จีน)
6. เครื่อง nanodrop 200 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo scientific (สหรัฐอเมริกา)
7. เครื่อง PCR Thermal cycler รุ่น T100	BIO-RAD (สหรัฐอเมริกา)
8. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น UV-240	Shimadzu (ญี่ปุ่น)
9. เครื่อง vortex รุ่น Genie 2	ScientificIndustries (สหรัฐอเมริกา)
10. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330	NewBrunswick (สหรัฐอเมริกา)
11. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-S	Mettler Toledo (สวิสเซอร์แลนด์)
12. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285	Mettler Toledo (สวิสเซอร์แลนด์)
13. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น ES-215	Tommy (ญี่ปุ่น)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก รุ่น Force 1418	Select Bioproducts (สหรัฐอเมริกา)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น mikro 22 R	Hettich (เยอรมัน)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น allegra 25 R	beckman coulter (เยอรมัน)
17. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง รุ่น SevenEasy S20	Mettler Toledo (สวิสเซอร์แลนด์)
18. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 °C	Panasonic (ไทย)
19. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 °C	SANYO (ญี่ปุ่น)

- |  |                            |
|--|----------------------------|
| 20. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06064                            | Memmert (เยอรมัน)          |
| 21. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น Cleanmodel V.6                | Lab service (สหรัฐอเมริกา) |
| 22. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น model 006                      | Memmert (เยอรมัน)          |
| 23. ไมโครปิเปต (Micropipette)<br>ขนาด 2.5, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร | Eppendorf (สหรัฐอเมริกา)   |

### 3.1.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เคมีภัณฑ์	บริษัท (ประเทศ)
1. Agarose	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
2. Ampicillin sodium	Kos introtech (ไทย)
3. Calcium chloride	Merck (เยอรมัน)
4. Cellulose C6288	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
5. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
6. Chloroform	Merck (เยอรมัน)
7. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Amresco (สหรัฐอเมริกา)
8. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck (เยอรมัน)
9. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Biobasic (แคนาดา)
10. Ethanol	RCI labscan (ไทย)
11. Ethidium bromide	Amresco (สหรัฐอเมริกา)
12. Hymexazol (Tachigaren)	เทพวัฒนา (ไทย)
13. Isoamyl alcohol	RCI labscan (ไทย)
14. Magnesium chloride	Merck (เยอรมัน)
15. N-lauryl sarcosine	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
16. Pentachloronitrobenzene (Terraclor)	เทพวัฒนา (ไทย)
17. Phenol	Amresco (สหรัฐอเมริกา)
18. Rifampicin	Siam (ไทย)
19. Sodium acetate	Merck (เยอรมัน)

20. Sodium bisulfite	Merck (เยอรมัน)
21. Sodium chlorite	Merck (เยอรมัน)
22. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
23. sodium hypochlorite (Haite)	Kao (ไทย)
24. Sorbitol	Sigma (สหรัฐอเมริกา)
25. Tris	Research organic (สหรัฐอเมริกา)
26. $\beta$ -mercaptoethanol	Sigma (สหรัฐอเมริกา)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัท (ประเทศ)
1. น้ำผักพร้อมตีมีหยีห่อ V8 สูตรดั้งเดิม	Campbell (สหรัฐอเมริกา)
2. Tryptone	Himedia (อินเดีย)
3. Peptone	Himedia (อินเดีย)
4. Yeast extract	Bio springer (ฝรั่งเศส)
5. Potato dextrose agar	Himedia (อินเดีย)

## 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.2.1 การคัดแยกไฟทอปธอราจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

#### 3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชและฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อพืช

เก็บตัวอย่างก้านใบยางพาราที่ร่วงหล่นบริเวณรอบลำต้น โดยเลือกก้านใบยางพาราที่มีลักษณะอาการใบร่วงทั้งที่ใบยังเขียวสดอยู่และก้านใบมีรอยช้ำสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ จากสวนยางพาราในจังหวัดระยองและจังหวัดจันทบุรีของประเทศไทย ในช่วงเดือนกันยายนและตุลาคมของปี พ.ศ. 2558 นำตัวอย่างยางพาราที่ได้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด แล้วตัดชิ้นส่วนก้านยางพาราขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.5 % เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกรองปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงนำมาวางบนผ้าขาวบางปลอดเชื้อเพื่อทำให้แห้ง

#### 3.2.1.2 การแยกไฟทอปธอราจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

นำชิ้นส่วนก้านใบยางพาราที่ผ่านการล้างฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาคัดแยกไฟทอปธอรา โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) ที่เติมสารปฏิชีวนะ rifampicin 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและ ampicillin 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสารเคมี hymexazol 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ pentachloronitrobenzene 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของราสายใยและราน้ำขุ่นอื่น จากนั้นบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C เมื่อมีการเจริญให้สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวแผ่กระจายบนอาหาร และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากลักษณะสปอร์แรงเจียมที่มีรูปร่างคล้ายผลเลมอน และเส้นใยไม่มีผนังกัน จากนั้นคัดแยกราที่คาดว่าป็นไฟทอปธอราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.2.2 การตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

#### 3.2.2.1 การเลี้ยงและเก็บเส้นใยราไฟทอปธอรา

เลี้ยงเส้นใยราที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 20% V8 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดย้ายเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 บ่มแบบเขย่าที่



150 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเส้นใยราด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ แล้วเก็บรักษาเส้นใยราไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C สำหรับใช้วิเคราะห์หาอาร์เอ็นเอสายคู่และสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

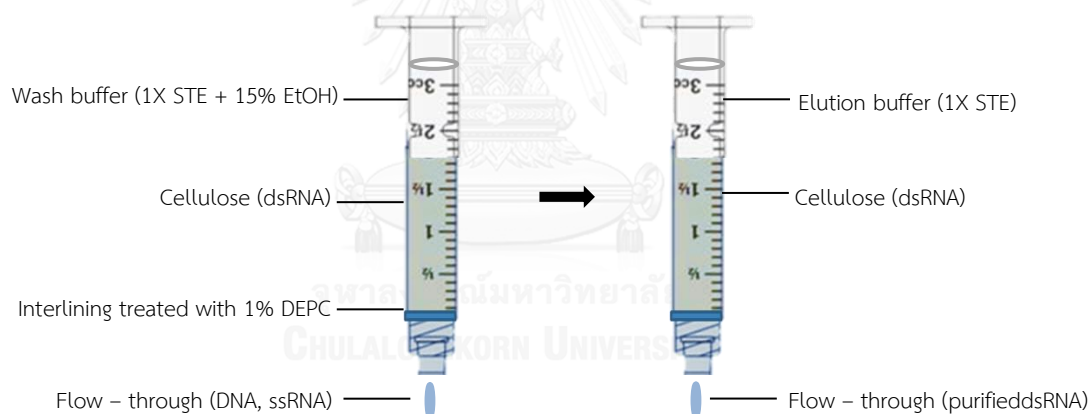
### 3.2.2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (total nucleic acid extraction)

ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมดัดแปลงจากวิธีของ Okada และคณะ (2015) ทำโดยบดเส้นใยรา 200 มิลลิกรัม ในโกร่งที่ทำให้เย็นด้วยไนโตรเจนเหลว เมื่อบดจนละเอียดแล้ว เติม extraction buffer ที่ประกอบด้วย 2X STE (100mM tris-HCl, 200mM NaCl, 2mM EDTA) และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 1% (v/v) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในโกร่งคนให้เข้ากัน แล้วดูดสารสกัดหยาบที่ตกลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ เติม  $\beta$ -mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) โดยเติม phenol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ตามด้วย chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่ตกลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย cellulose column chromatography ในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย cellulose column chromatography

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย cellulose column chromatography ดัดแปลงจากวิธี Das และคณะ (2014) และ บุญยฤทธิ์ จันทวิมล (2554) เตรียมเซลล์ูโลสสำหรับบรรจุลงในคอลัมน์โดย ผสมเซลล์ูโลส (Sigma C6288) 0.5 กรัมกับสารละลาย 1X STE buffer ที่มี ethanol ความเข้มข้น 15% (v/v) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนการสกัดกรดนิวคลีอิกในข้อ 3.3.2.2 มาเติม ethanol เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 15 % (v/v) ethanol แล้วจึงเติมลงในเซลล์ูโลสที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ระหว่างนั้นเตรียมคอลัมน์โดยใช้กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 3 มิลลิลิตร ดึงส่วนลูกสูบของกระบอกฉีดยา (plunger) ออก แล้วรองปากกระบอกฉีดยาด้วยผ้าวีราเน่ (Interlining) ปลอดเชื้อที่แช่ไว้ใน 1% DEPC เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นค่อยๆบรรจุเซลล์ูโลสที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ สารละลายที่ใส่ลงคอลัมน์จะค่อยๆไหลออกมาตามแรงโน้มถ่วง ส่วนเซลล์ูโลสจะนอนตัวอยู่ที่ก้นคอลัมน์ เมื่อ

สารละลายไหลหมดจึงค่อยๆล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1X STE buffer ที่มี ethanol ความเข้มข้น 15% (v/v) 50 มิลลิลิตร ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจะถูกล้างออกมาด้วย wash buffer ส่วนอาร์เอ็นเอสายคู่จะจับอยู่กับเซลลูโลสในคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 หลังจาก wash buffer ไหลออกจนหมดแล้วจึงชะอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 1X STE buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนติฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าและ ethanol 2.5 เท่าของสารละลาย บ่มที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอน 2 รอบด้วย 80% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วย 1X STE 50 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจหาอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เติม 1% bleach ใน Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 3.1 แสดง cellulose column chromatography

### 3.2.3 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์

#### 3.2.3.1 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ RNase A

วัดปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 ด้วยเครื่อง nanodrop แล้วเปิดอาร์เอ็นเอสายคู่ 600 นาโนกรัม แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย 1X STE จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย บ่มที่  $-20^{\circ}\text{C}$

เป็นเวลา 1 คีน แบ่งสารละลายปริมาตรเท่ากันใส่หลอดไมโครเซนติพิวจ์จำนวน 3 หลอด ได้แก่ ชุดควบคุม ชุด low salt และ ชุด high salt buffer นำสารละลายทั้ง 3 หลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอน 2 รอบด้วย 80% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 0.1X SSC (15 mM NaCl) และ 2X SSC (300 mM NaCl) สำหรับชุด low salt และ ชุด high salt buffer ตามลำดับ แล้วเติม RNase A (Bio Basic, แคนาดา) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 µg/ml ลงทั้ง 2 หลอดบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ส่วนชุดควบคุมละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย RNase-free water จากนั้นนำทั้ง 3 หลอดมาตรวจสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

### 3.2.3.2 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ DNase I

ปีเปตอาร์เอ็นเอสายคู่ 500 นาโนกรัม ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพิวจ์ จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 คีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอน 2 รอบด้วย 80% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease-free water แล้วเติม 1X DNase I buffer และ DNase I 0.1 ยูนิต (Bio Basic, แคนาดา) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที สำหรับชุดควบคุมละลายตะกอนด้วย RNase-free water จากนั้นนำมาตรวจสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

### 3.2.3.3 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ S1 nuclease

ปีเปตอาร์เอ็นเอสายคู่ 500 นาโนกรัม ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพิวจ์ แล้วตกตะกอนด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 คีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง

แล้วล้างตะกอน 2 รอบด้วย 80% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย RNase-free water แล้วเติม 1X S1 nuclease buffer และ S1 nuclease 0.1 ยูนิต์ต่อไมโครลิตร (Promega, สหรัฐอเมริกา) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที สำหรับชุดควบคุมละลายตะกอนด้วย RNase-free water จากนั้นนำมาตรวจสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

### 3.2.4 การตรวจสอบสกุลและชนิดของไฟทอพธอร่าที่พบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

#### 3.2.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของไฟทอพธอร่าที่พบไวรัส

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยราของไฟทอพธอร่าถูกดัดแปลงจากวิธีการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) เป็นองค์ประกอบตามวิธีของ Shen และคณะ (2005) โดยบดเส้นใยรา 50 มิลลิกรัมในโถงที่ทำให้เย็นด้วยไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris, 5 mM EDTA, 0.02 M sodium bisulfite) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงในโถงคนให้เข้ากัน แล้วดูดสารสกัดหยาบที่ได้ลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ เติม nuclei lysis buffer (0.2 M Tris, 0.05 M EDTA, 2 M sodium chloride, 2% CTAB) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 5% sakosyl 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าของสารละลายในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ แล้วสกัดด้วย chloroform ซ้ำอีกครั้ง นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2.0 เท่าของปริมาตรสารละลาย เขย่าขึ้นลงเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 3.2.4.2 การระบุสกุลของราที่พบไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุลไฟทอพธอร่า

การระบุสกุลของราที่พบไวรัสด้วยวิธี Nested-PCR amplification โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1/ITS4 (ตารางที่ 3.1) ที่จำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายราซึ่งรวมถึงไฟทอพธอร่า (White และ

คณะ, 1990) และ A2/I2 (ตารางที่ 3.1) ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง ITS1-5.8s-ITS2 ของราสกุลไฟทอปธอรา (Drenth และคณะ, 2006) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกจะใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 โดยปฏิกิริยา PCR reaction ประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.4.1 ปริมาณ 50 นาโนกรัม 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.625 Unit *Taq* polymerase (Apsalagen, ไทย) 0.5 μM Fw-primer 0.5 μM Rv-primer และ nuclease-free water สำหรับสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ (1) initial denaturation ที่ 94°C เวลา 3 นาที (2) denaturation 94°C เวลา 30 วินาที, annealing 55°C เวลา 30 วินาที สำหรับ ITS1/ITS4 และ 56°C เวลา 30 วินาที สำหรับ A2/I2, extension 72°C เวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ (3) final extension 72°C เวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก ITS1/ITS4 มาลดความเข้มข้นลง 100 เท่า แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบที่สองด้วยคู่ไพรเมอร์ A2/I2 จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน TBE buffer สำหรับชุดควบคุมคือ *Aspergillus nidulans* MSCU 0053 เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) และ *P. botryosa* เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control)

**ตารางที่ 3.1** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ทำ Nested-PCR amplification

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	Tm (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
ITS1 <sup>a</sup>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55.75	900
ITS4 <sup>a</sup>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55.75	900
A2 <sup>b</sup>	ACTTCCACGTGAACCGTTTCAA	58.39	752 – 832
I2 <sup>b</sup>	GATATCAGGTCCAATTGAGATGC	58.39	752 – 832

(White และคณะ, 1990)<sup>a</sup>, (Drenth และคณะ, 2006)<sup>b</sup>

### 3.2.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

#### 3.2.4.3.1 การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบแรกด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ในขั้นตอนที่ 3.2.4.2 มาต่อปลาย A-tail โดยบ่มที่ 70 °C เวลา 30 นาที ต่อจากขั้นตอน final extension หลังจากนั้นไลเกตชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่อปลาย A-tail เรียบร้อยแล้วเข้ากับ TA cloning

vector ที่มาพร้อมกับชุด RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan) บ่ม 4 °C เวลาหนึ่งคืน

### 3.2.4.3.2 การทำ transformation

นำส่วนผสมของดีเอ็นเอได้จากขั้นตอน 3.2.4.3.1 มาทรานสฟอร์ม โดยใช้ดีเอ็นเอผสม 1 ไมโครกรัมเติมลงใน competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาแช่ในน้ำแข็งทันที แช่ไว้อย่างน้อย 2 นาที แล้วเติมอาหารเหลว 2X YT (ภาคผนวก ข) 900 ไมโครลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 1 ชั่วโมงนำ competent cell ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2X YT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) ที่ผสม ampicillin 50  $\mu$ g/ml และผิวหน้าอาหารเกลี่ยด้วย 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ 50 mg/ml X-gal 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคลนโดยทำ colony PCR ด้วยไพรเมอร์ A2/I2 ตามสภาวะในขั้นตอน 3.2.5.2 แล้วเลือกเก็บเฉพาะโคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 752-832 คู่เบส ซึ่งมีชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการไว้ในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.4.3.3 การสกัดพลาสมิด

นำโคลนของ *E. coli* ที่ได้เลือกโคลนไว้แล้วจากขั้นตอน 3.2.4.3.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ที่ผสม ampicillin 50  $\mu$ g/ml บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุด HiYield plasmid mini kit (RBC Bioscience, ไต้หวัน)

### 3.2.4.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท MacroGen (เกาหลี) โดยให้เลือกอ่านที่ตำแหน่งไพรเมอร์ M13F –pUC universal primer จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่

ได้มา blast กับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology (NCBI) แล้วเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟทอพธอร่าในฐานข้อมูล โดยเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่ม (Multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega แล้วสร้าง phylogenetic trees โดยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม Mega6

### 3.2.5 การจำแนกชนิดของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

#### 3.2.5.1 การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอและกำจัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย

##### S1 nuclease

นำสารพันธุกรรมของไฟทอพธอร่าที่พบไวรัส ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 มากำจัดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้สารพันธุกรรมที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอเริ่มต้น 10 ไมโครกรัม เติม 1X S1 nuclease buffer และ S1 nuclease 0.1 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Promega, สหรัฐอเมริกา) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วย nuclease-free water ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดการทำงานของ S1 nuclease ด้วย phenol 0.5 เท่าของสารละลาย และ chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 0.5 เท่าของสารละลาย แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2.0 เท่าของปริมาตรสารละลาย เขย่าขึ้นลงเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย nuclease-free water 20 ไมโครลิตร แล้วตรวจหา RNA ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

#### 3.2.5.2 การสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำสารพันธุกรรมของไวรัสที่ได้จากขั้นตอน 3.2.5.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) เพื่อสังเคราะห์ first-strand complementary DNA (cDNA) ด้วยชุด SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้ปริมาณ อาร์เอ็นเอเริ่มต้น 5 ไมโครกรัมและใช้ random hexamer primers ส่วนชุดควบคุม HeLa RNA ใช้ oligo-dT primer

### 3.2.5.3 การสังเคราะห์ second-strand cDNA

ขั้นตอนการสังเคราะห์ second-strand cDNA ดัดแปลงมาจากวิธีของ D'Alessio และ Gerard (1988) นำ first-strand cDNA ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2.5.2 มาสังเคราะห์ second strand cDNA โดยปฏิกิริยา PCR 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย first-strand cDNA 20 ไมโครลิตร 1X NEB PCR buffer, 25 Unit DNA polymerase I (New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา), 0.85 Unit RNase H (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา), T4 DNA ligase buffer, 1 Unit T4 DNA ligase (RBC Bioscience, ไต้หวัน) และ nuclease-free water บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำ cDNA ให้บริสุทธิ์โดยสกัดด้วย Phenol Chloroform ตามขั้นตอนที่ 3.2.2.2 แล้วละลายตะกอนด้วย nuclease-free water

### 3.2.5.4 การเชื่อมชิ้นส่วน cDNA กับพลาสมิดและ transformation

นำ cDNA ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.5.2 มาเชื่อมเข้ากับ pMiniT 2.0 vector ตามขั้นตอนของชุด NEB PCR cloning kit (New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา) โดยปริมาตร insert ที่ใช้ 4 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรมากที่สุดที่ชุด kit แนะนำให้ใช้ จากนั้นทรานฟอร์มโดยนำดีเอ็นเอลูกผสมที่อยู่ใน ligation reaction ปริมาตร 2 ไมโครลิตรมาทรานฟอร์มเข้า NEB10-β competent *E. coli* (New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา) แล้วนำ competent ที่ผ่านการทรานฟอร์มแล้วมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสม ampicillin 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลาหนึ่งคืน จากนั้นเลือกโคลนโดยทำ rapid size screening และ colony PCR ในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.5.5 การคัดเลือกโคลน

#### 3.2.5.5.1 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี Rapid size screening

เชื้อโคลนของ *E. coli* ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.5.4 ลงใน lysis buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 13,00 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวไปวิเคราะห์ขนาดโดยประมาณของพลาสมิดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1%



(น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเลือกเฉพาะโคลนที่มีขนาดมากกว่า 3 Kb ไปทำ colony PCR ในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.5.5.2 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี Colony PCR

นำโคลนที่มีขนาดรีคอมบิแนนท์มากกว่า 3 Kb ที่เลือกได้จากขั้นตอนที่ 3.2.5.5.1 มาหาขนาดโดยประมาณของชิ้นส่วน cDNA โดยทำ colony PCR ด้วย cloning analysis Forward-Reverse primer (New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา) ที่จำเพาะต่อ pMiniT 2.0 vector โดยปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.625 Unit *Taq* polymerase (Apsalagen, ประเทศไทย) 0.5 μM Fw-primer 0.5 μM Rv-primer และ nuclease-free water สำหรับสภาพที่ใช้ทำปฏิกิริยา คือ (1) initial denaturation ที่ 94°C เวลา 3 นาที (2) denaturation 94°C เวลา 30 วินาที, annealing 55°C เวลา 30 วินาที, extension 72°C เวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ (3) final extension 72°C เวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเลือกโคลนที่มีขนาดผลิตภัณฑ์มากกว่า 309 คู่เบสขึ้นไป ซึ่งขนาด 309 คู่เบสเป็นขนาดของพลาสมิดเปล่า มาสกัดพลาสมิดตามขั้นตอน 3.2.4.3.3 แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.2.5.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท MacroGen (เกาหลี) โดยให้เลือกอ่านที่ตำแหน่งไพรเมอร์ cloning analysis forward primer จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มา blast กับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology (NCBI)

### 3.2.5.7 การสกัดสารพันธุกรรมและกำจัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ด้วย DNase I

นำสารพันธุกรรมของไฟทอปธอราที่พบไวรัส ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2.2 มากำจัดดีเอ็นเอโดยใช้สารพันธุกรรมที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอเริ่มต้น 10 ไมโครกรัม 1X DNase I buffer, DNase I 0.01 U (Bio Basic, แคนาดา) RNase out 100 U (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วย nuclease-free water บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดการทำงานของ DNase I ด้วย phenol 0.5 เท่าของสารละลาย และ

chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 0.5 เท่าของสารละลาย แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย เขย่าขึ้นลงเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย nuclease-free water 20 ไมโครลิตร แล้วตรวจหา RNA ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

### 3.2.5.8 การสังเคราะห์ second-strand cDNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสใน

#### ไฟทอปธอราที่เคยมีรายงาน

ไวรัสในไฟทอปธอราที่เคยมีรายงานการค้นพบ ได้แก่ *Phytophthora endornavirus 1* (PEV1) ซึ่งเป็นไวรัสในไฟทอปธอราที่แยกได้จากต้นสน (Hacker และคณะ, 2005), *Phytophthora infestans RNA virus 1* (PiRV1), PiRV3, PiRV4 ซึ่งพบใน *P. infestans* (Cai และ Hillman, 2013) โดยคู่ไพรเมอร์จะแบ่งออกเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดเล็ก ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีน RNA dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส แต่ละตัวได้แก่ PEV1-FRd/RRd, PiRV1-FRd/RRd, PiRV3-FRd/RRd และ PiRV4-FRd/RRd ส่วนชุดที่ 2 คือคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดใหญ่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ Udp-F2/R2 ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ UGT ไปจนถึงตำแหน่งยีน *helicase* ของไวรัส PEV1 คู่ไพรเมอร์ PiRV1-F/R , PiRV3-F/R และ PiRV4-F/R ที่จำเพาะต่อยีน ORF1, ORF2 และทั้งหมดของ ORF ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ครอบคลุมบริเวณที่ถอดรหัสไปเป็น RdRP ของไวรัสแต่ละตัว ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยนำสารพันธุกรรม (Total nucleic acid) ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2.2 มาสังเคราะห์ first-strand cDNA ตามขั้นตอนที่ 3.2.5.2 จากนั้นสังเคราะห์ second strand cDNA โดย PCR reaction 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย first-strand cDNA 2 ไมโครลิตร 1x KOD buffer, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.02 Unit KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen, สหรัฐอเมริกา) 0.3 μM Fw-primer 0.3 μM Rv-primer และ nuclease-free water สำหรับสถานะที่ใช้ทำปฏิกิริยา คือ (1) Polymerase Activation 95°C เวลา 2 นาที (2) denaturation 95°C เวลา 20 วินาที, annealing สำหรับ PiRV1-FRd/RRd และ PiRV3-FRd/RRd ใช้อุณหภูมิ 47°C เวลา 10 วินาที สำหรับ PEV1-FRd/RRd และ PiRV4-FRd/RRd ใช้อุณหภูมิ 55 °C เวลา 10 วินาที และสำหรับ BT5/BT-pyt ใช้

อุณหภูมิ 50 °C เวลา 10 วินาที , extension 70°C เวลา 15 วินาที จำนวน 40 รอบ ส่วนชุดควบคุม HeLa ใช้ไพรเมอร์ที่มาพร้อมกับชุด SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) และชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin ใช้ไพรเมอร์ BT5/BT-pyt ที่จำเพาะต่อยีน  $\beta$ -tubulin ของราไฟทอปธอรา ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน TBE buffer

**ตารางที่ 3.2** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสในไฟทอปธอราที่เคยมีรายงาน และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน  $\beta$ -tubulin ของไฟทอปธอรา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')	Tm (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
BT5	GTATCATGTGCACGTA CTCCG	55	568
BT-pyt	GCCTTGATGTTGTTCCGGGAT	55	
PEV1-FRd	GATGGGA ACTGGAGACTGCC	58	558
PEV1-RRd	ATACCCTTAGCCTGCCACAC	57	
Udp-F2 <sup>a</sup>	GTCAGAGCCACTTTCTCGCG	63	941
Udp-R2 <sup>a</sup>	CTCCTGCGTAGGTGGAGTAGG	63	
PiRV1-FRd	ACTCTCAGGTGTGGACTG	53	475
PiRV1-RRd	CTCAGATTGTCATCGCCAT	52	
PiRV1-F	ATGCAGATAAACGTCGGAGGG	61	2,934
PiRV1-R	TCAAAACATGACTTCAGTCGGG	58	
PiRV3-FRd	ACAGGCGTCGTTTTTATGGG	55	716
PiRV3-RRd	CCGTTCTACCAAATATCTCACC	52	
PiRV3-F	TCTAGCTTTCCAGGTTGCGG	61	3,028
PiRV3-R	ATCCGACAAATGGGTGATACC	58	
PiRV4-FRd	ACTGAGGTAAAGGCGAAGGC	57	519
PiRV4-RRd	CTCAGGCACCGTAGAAGCTC	58	
PiRV4-F <sup>b</sup>	GTGGAAAGCACGTTTTATGCAGG	60	2,901
PiRV4-R <sup>b</sup>	GTATCTACGCCTCACCTAC	58	

(Kozlakidis และคณะ, 2010)<sup>a</sup>, (Zhan และคณะ, 2016)<sup>b</sup>

### 3.2.6 การวิเคราะห์ผลของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไฟทอปธอราที่พบไวรัส

#### 3.2.6.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

##### 3.2.6.1.1 การแยกเชื้อโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (baiting technique)

หน้า P3 ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ก) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปลา แล้วใส่เมล็ดงาลงไปทางด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเขี่ยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อไฟทอปธอราใส่ลงด้านตรงข้ามกับเมล็ดงา แล้วปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อสังเกตเมล็ดงาพบว่า มีการเจริญของเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ของราเกิดขึ้น จึงย้ายเมล็ดงาไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8

##### 3.2.6.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอปธอราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำสไลด์โดยเขี่ยเชื้อที่แยกได้มาวางบนสไลด์ แล้วย้อมด้วย Lacto phenol cotton blue จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ รอให้แห้งแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงที่ กำลังขยาย 40 เท่า แล้วบันทึกภาพสปอร์และเส้นใยราที่พบ

#### 3.2.6.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

##### 3.2.6.2.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของไฟทอปธอราที่พบไวรัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

วิเคราะห์การเจริญเติบโตของไฟทอปธอราโดยนำ agar plug ของไฟทอปธอราที่พบไวรัสมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ได้แก่ PDA, V8, V8 ที่มีสารปฏิชีวนะ และ black bean (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไฟทอปธอรานบนอาหารต่างๆโดยวิเคราะห์จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและลักษณะโคโลนีของไฟทอปธอราที่พบไวรัส

### 3.2.6.2.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสกับ

#### ไฟทอปธอร่าที่ไม่พบไวรัส

เปรียบเทียบการเจริญของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสกับไฟทอปธอร่าไอโซเลทอื่นๆที่ไม่พบไวรัสโดยเลี้ยง agar plug ของไฟทอปธอร่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 แล้ววิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทุกวันจนครบ 5 วัน

### 3.2.6.2.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสในอาหาร

#### เลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ

เปรียบเทียบการเจริญของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่ไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสสามารถเจริญได้ โดยเลี้ยง agar plug บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 และ V8 ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ โดยปรับความเข้มข้นของสารเคมี hymexazol ให้มี 5 ความเข้มข้นได้แก่ 50, 100, 200, 300, 400 mg/L แล้ววิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทุกวันจนครบ 5 วัน

### 3.2.6.2.4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสกับ

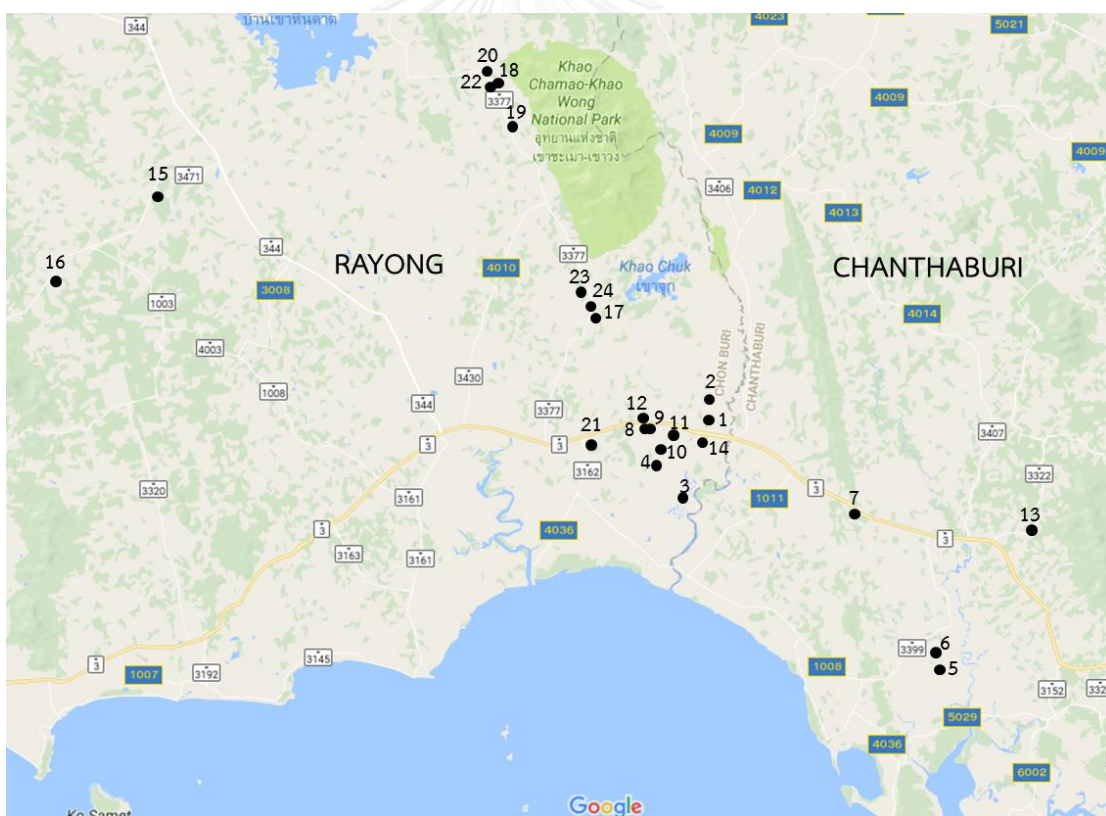
#### ไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสที่ผ่านการแยกเชื้อโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ

นำไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสที่ได้ผ่านการแยกเชื้อโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อในขั้นตอนที่ 3.2.7.1.1 มาเปรียบเทียบการเจริญกับไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยง agar plug บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 และ V8 ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ โดยปรับความเข้มข้นของสารเคมี hymexazol ให้มี 5 ความเข้มข้นได้แก่ 50, 100, 200, 300, 400 mg/L แล้ววิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทุกวันจนครบ 5 วันและลักษณะโคโลนีของไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญที่แตกต่างกัน

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การคัดแยกไฟทอพธอรจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

จากการแยกไฟทอพธอรจากตัวอย่างก้านใบยางพาราที่เก็บจากสวนยางในจังหวัดจันทบุรี และจังหวัดระยอง ในช่วงเดือนกันยายนและตุลาคม ปี 2548 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่ใส่ สารปฏิชีวนะ แล้วคัดเลือกไฟทอพธอรด้วยลักษณะโคโลนีและลักษณะสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถคัดแยกไฟทอพธอรได้จำนวนทั้งหมด 81 ไอโซเลท ได้แก่ 24 ไอโซเลทจาก 4 สวนในจังหวัดจันทบุรี และ 57 ไอโซเลทจาก 24 สวนในจังหวัดระยอง ดังแสดงบนแผนที่ในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนที่แสดงตำแหน่งสวนยางพาราที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.1 แสดงพิกัดสวนยางพาราและไอโซเลทของไฟทอปธอราที่แยกได้

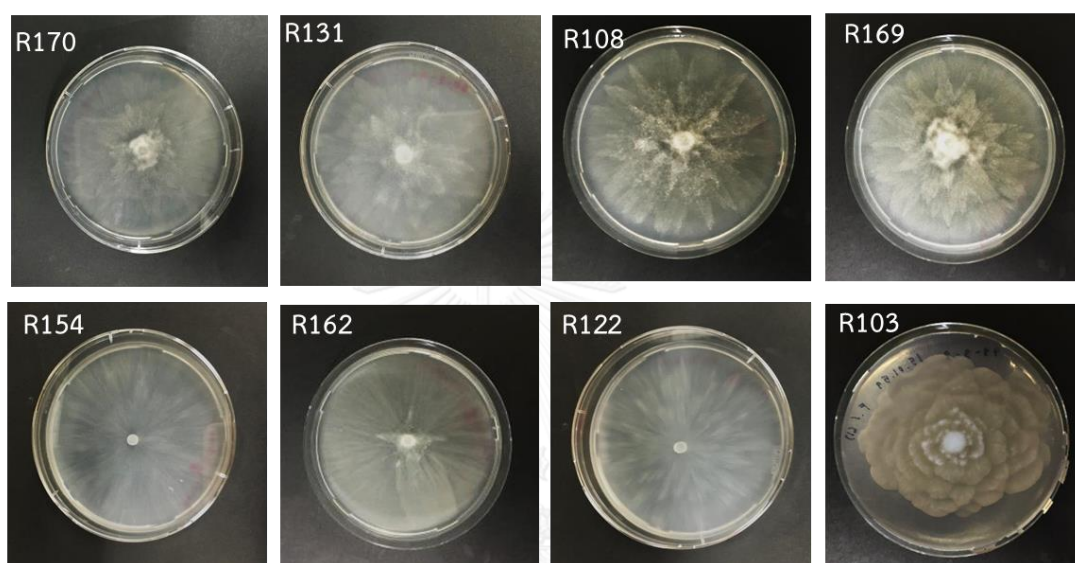
ตำแหน่ง	แหล่งที่มา	พิกัด	ไอโซเลท
1	ถนนสาย 3433 ห่างจากถนนสุขุมวิท 500 เมตร ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'14.5"N 101°48'28.4"E	R92 - R97
2	ชุมชนบ้านเขายายพริ้ง ซ.1 หมู่ 8 ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'51.9"N 101°48'34.7"E	R98 - R102
3	ถนน อบจ.รย.0209 สายเขาน้อย-ทุ่งเสาธง ต.พังราด อ.แกลง จ.ระยอง	12°45'02.0"N 101°46'55.2"E	R103
4	ถนนบ้านเกาะลอย ปากซอยบ้านซาก-ขุนวิเศษ ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°46'23.0"N 101°46'53.4"E	R104 - R111
5	ศาลาประชาคม ถ.บนเนิน-รำพัน ม.4 ต.รำพัน อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี	12°38'59.3"N 101°56'14.8"E	R112 - R115
6	20/1 ม.9 ถ. บนเนิน-รำพัน ต.โขมง จ.จันทบุรี	12°39'27.2"N 101°56'15.7"E	R116 - R118
7	ปากทางเข้าวัดหนองสีงา ถ.สุขุมวิท ต.วังใหม่ อ.นายายอาม จ.จันทบุรี	12°44'21.4"N 101°53'35.4"E	R119 - R131
8	สวนโอภาส ซ.โรงขนมจีน ถ.ซากขุน-วิเศษ ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'10.2"N 101°46'56.4"E	R132
9	ตรงข้ามสวนโอภาส ถ.ซากขุนวิเศษ ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'10.2"N 101°46'56.4"E	R133 - R134
10	91 ม.6 ถ.ซากขุนวิเศษ ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°46'39.4"N 101°47'00.4"E	R135 - R137
11	ตรงข้ามบ้านเลขที่ 69 ม.9 ถ.บ้านเกาะ-ลอย ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'04.8"N 101°47'18.8"E	R138
12	ตรงข้ามห้องแถวหลังคาสีเขียว ถ.โพธิ์ไทร ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°47'17.6"N 101°46'54.7"E	R139 - R142
13	ตุ้ยามสภ.ทุ่งเบญจา ถ.ตลิ่งทอง-เขาสุก-ริม ต.ทุ่งเบญจา อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี	12°43'30.9"N 101°59'39.4"E	R143 - R146

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงพิกัดสวนยางพาราและไอโซเลทของไฟทอพธอราที่แยกได้

ตำแหน่ง	แหล่งที่มา	พิกัด	ไอโซเลท
14	สี่แยกกองดิน ซ.กองดิน 3 ทางเข้า วัดกองดิน ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	12°46'40.5"N 101°48'28.2"E	R147 - R151
15	ปากทางเข้าวัดเขาตาอิน ม.5 ต.ชุมแสง อ.วังจันทร์ จ.ระยอง	12°54'55.0"N 101°28'52.4"E	R152 -R153
16	ตรงข้ามวัดเนินสว่าง อ.บ้ายค่าย จ.ระยอง	12°52'44.2"N 101°25'40.6"E	R154
17	1/2 ต.น้ำเป็น อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°51'29.2"N 101°44'20.2"E	R155 - R156
18	102/2 ม.1 ต.ห้วยทับมอญ อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°58'56.2"N 101°40'50.1"E	R157 - R158
19	201 บ้านเผาถ่าน ซ.น้ำใส17 ต.น้ำเป็น อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°58'23.3"N 101°41'06.1"E	R159
20	95/4 ม.1 ต.ห้วยทับมอญ อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°59'01.4"N 101°40'45.0"E	R160
21	124/3 ม.8 ต.คลองปูน อ.แกลง จ.ระยอง	12°46'49.2"N 101°43'58.8"E	R161 - R163
22	77/3 ม.1 ต.ห้วยทับมอญ อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°58'55.2"N 101°40'48.2"E	R164 - R168
23	สามแยกน้ำเป็น-น้ำใส ซ.9 ต.น้ำเป็น อ.แกลง จ.ระยอง	12°51'46.3"N 101°44'13.8"E	R169 - R170
24	90 ม.1 ถ.สามแยกน้ำเป็น-น้ำใส ซ.7 ต.น้ำเป็น อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	12°51'36.1"N 101°44'16.6"E	R171 - R172



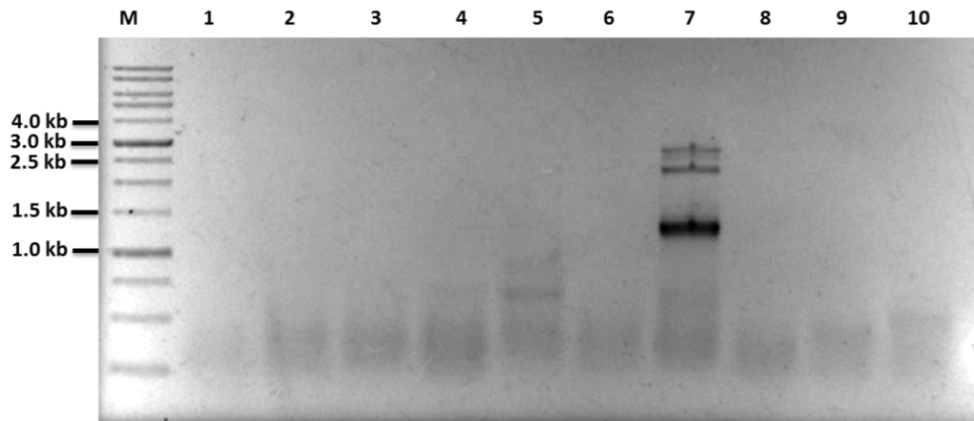
ไฟทอพรอราที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท โดยรูปแบบโคโลนีที่พบมี 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ stellate, รูปแบบ Radiate และรูปแบบ Rosaceous โดยรูปแบบ stellate มีลักษณะแผ่ออกไปเป็นแฉกคล้ายดาวกระจาย ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ในไอโซเลท R108, R131, R169 และ R170 รูปแบบ Radiate มีลักษณะแผ่ออกไปในแนวรัศมี ในไอโซเลท R122, R162 และ R154 รูปแบบ Rosaceous มีลักษณะแผ่เป็นชั้นๆคล้ายดอกกุหลาบ ในไอโซเลท R169



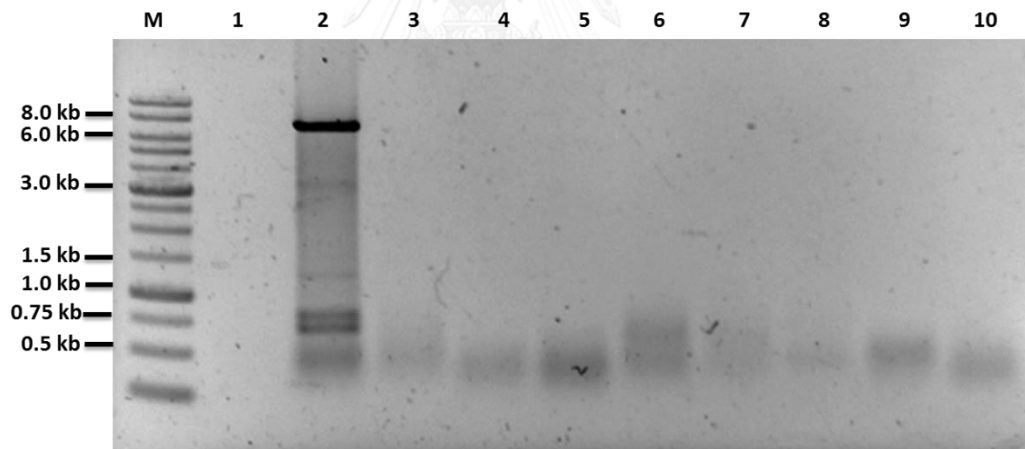
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีที่พบในไฟทอพรอราไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน

#### 4.2 การตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นสายคู่ในไฟทอพรอราที่แยกได้

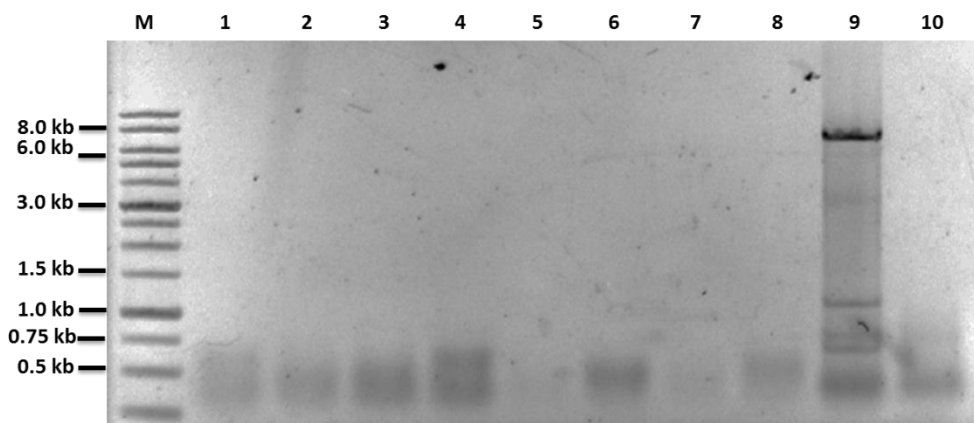
จากการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นสายคู่ด้วย cellulose column chromatography ในทุกไอโซเลทของไฟทอพรอราที่คัดแยกได้ พบว่า ไอโซเลท R152 ซึ่งแยกได้จากอำเภอวังจันทร์ จังหวัดระยอง พบแถบอาร์เอ็นสายคู่จำนวน 4 แถบบนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 3.4, 2.9, 2.5 และ 1.3 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4.3 นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลท R117 และ R159 ที่แยกจากจังหวัดจันทบุรีและอำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง ตามลำดับ พบแถบอาร์เอ็นสายคู่จำนวน 5 แถบบนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 7.5, 3.3, 1.2, 0.7 และ 0.6 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่คัดแยกได้บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Lane M: 1 Kb DNA ladder RTU (Genedirex<sup>®</sup>) Lane 1-6 และ 8-10: ไอโซเลทที่ไม่มี dsRNA Lane 7: อาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราไอโซเลท R152



รูปที่ 4.4 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่คัดแยกได้บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Lane M: 1 Kb DNA ladder RTU (Genedirex<sup>®</sup>) Lane 1 และ 3-10: ไอโซเลทที่ไม่มี dsRNA Lane 2: อาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราไอโซเลท R117



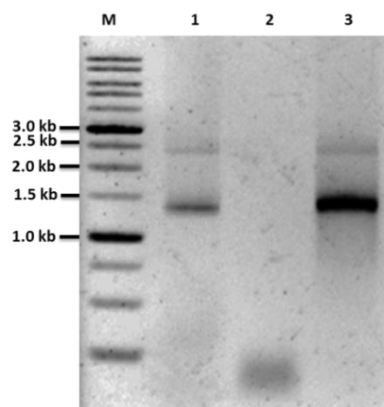
รูปที่ 4.5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่คัดแยกได้บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Lane M: 1 Kb DNA ladder RTU (Genedirex<sup>®</sup>) Lane 1-8 และ 10: ไอโซเลทที่ไม่มี dsRNA Lane 9: อาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราไอโซเลท R159

#### 4.3 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์

จากการพบสารพันธุกรรมที่คาดว่าเป็นไวรัสในไอโซเลท R152 ของไฟทอปธอราที่แยกได้ จึงนำสารพันธุกรรมดังกล่าวมาตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยการย่อยโดยเอนไซม์ได้แก่ RNase A, DNase I และ S1 nuclease

##### 4.3.1 การทดสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ RNase A

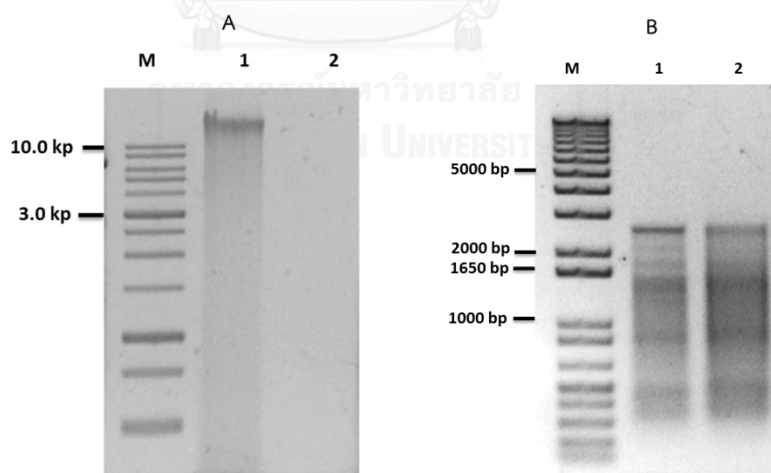
จากการทดลองย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสที่คัดแยกได้ด้วยเอนไซม์ RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเข้มข้นน้อยและเข้มข้นมาก ได้แก่ 0.1 X SSC (15 mM NaCl) และ 2X SSC (300 mM NaCl) ตามลำดับ พบว่า อาร์เอ็นเอถูกย่อยด้วยเอนไซม์ RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเข้มข้นน้อย แต่ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเข้มข้นมาก การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารพันธุกรรมของไวรัสเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



**รูปที่ 4.6** แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมไวรัสด้วยเอนไซม์ RNase A **Lane M:** 1 Kb DNA ladder RTU (Genedirex<sup>®</sup>) **Lane 1-3:** สารพันธุกรรมไวรัส (1) ไม่ได้บ่มด้วย RNase A (2) บ่มด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ (3) บ่มด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง

#### 4.3.2 การทดสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ DNase I

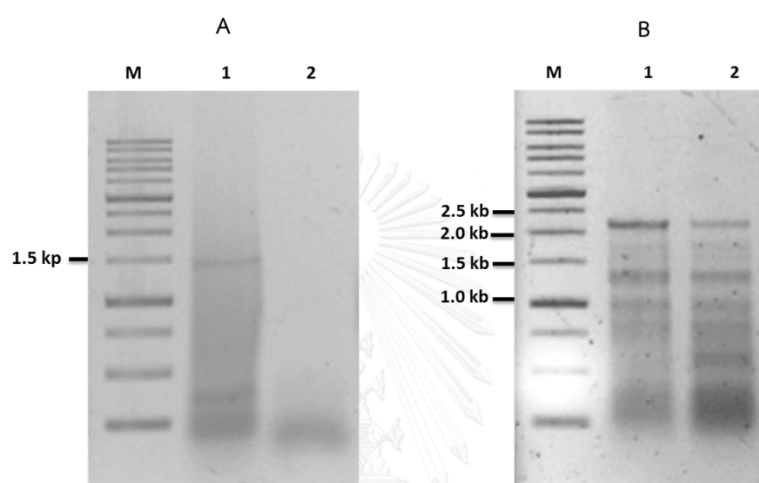
จากการทดลองย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสที่คัดแยกได้ด้วยเอนไซม์ DNase I พบว่า สารพันธุกรรมไวรัสที่พบทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I โดยมีชุดควบคุมเป็นดีเอ็นเอของ *P.botryosa* การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารพันธุกรรมของไวรัสไม่ใช่ดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



**รูปที่ 4.7** แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ DNase I **A:** ชุดควบคุม คือ ดีเอ็นเอของ *P.botryosa* **B:** สารพันธุกรรมไวรัสไอโซเลท R152 **Lane M:** 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) **Lane 1-2:** สารพันธุกรรม (1) ไม่ได้บ่มด้วย DNase I (2) บ่มด้วย DNase I

### 4.3.3 การทดสอบการย่อยสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ S1 nuclease

จากการทดสอบการย่อยสารพันธุกรรมไวรัสที่พบด้วยเอนไซม์ S1 nuclease พบว่า สารพันธุกรรมไวรัสที่พบทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ S1 nuclease โดยมีชุดควบคุมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวของ *P.botryosa* การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารพันธุกรรมของไวรัสไม่ใช่ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 4.8



**รูปที่ 4.8** แสดงผลการย่อยสารพันธุกรรมไวรัสด้วยเอนไซม์ S1 nuclease **A:** ชุดควบคุม คือ mRNA ของ *P.botryosa* **B:** สารพันธุกรรมไวรัสไอโซเลท R152 **Lane M:** 1 Kb DNA ladder RTU (Genedirex<sup>®</sup>) **Lane 1-2:** สารพันธุกรรม (1) ไม่ได้บ่มด้วย S1 nuclease (2) บ่มด้วย S1 nuclease

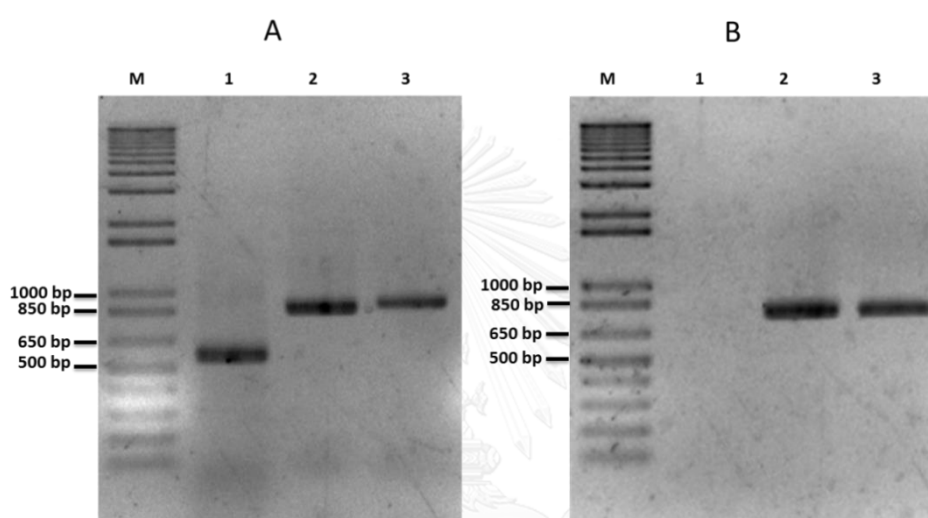
### 4.4 การตรวจสอบสกุลและชนิดของไฟทอปธอราที่พบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

จากการพบสารพันธุกรรมไวรัสในไฟทอปธอราไอโซเลท R152 จึงตรวจสอบสกุลของไฟทอปธอราที่พบไวรัสโดยวิธี Nested-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุลไฟทอปธอรา และระบุชนิดของไฟทอปธอราที่พบไวรัสด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 4.4.1 การระบุสกุลของราที่พบไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุลไฟทอปธอรา

จากการทำ Nested-PCR ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2 ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบแรกด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับผลิตภัณฑ์ของชุดควบคุมที่ให้ผลบวก คือ

*P. botryosa* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 870 คู่เบส และมีขนาดแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ของชุดควบคุมที่ให้ผลลบ คือ *A. nidulans* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 530 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.9 A จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบที่ 2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ A2/I2 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลทที่พบไวรัสมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์ของชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และไม่พบผลิตภัณฑ์ในชุดควบคุมที่ให้ผลลบ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าราที่เป็นเจ้าบ้านของไวรัสคือจิ้นส์ไฟทอพอธอรา ดังแสดงในรูปที่ 4.9 B



รูปที่ 4.9 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย A: คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 B: คู่ไพรเมอร์ A2/I2 Lane M: 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) Lane 1-3: ผลิตภัณฑ์ที่ได้ของ (1) *A. nidulans* เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (2) *P. botryosa* เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (3) ไฟทอพอธอราไอโซเลท R152

#### 4.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของไฟทอพอธอราที่พบไวรัส

จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไฟทอพอธอราพบไวรัส จำนวน 3 โคลนที่คัดเลือกโคลนด้วยไพรเมอร์ A2/I2 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟทอพอธอราไอโซเลท R152 ที่ตำแหน่ง ITS1-5.8s rDNA-ITS2 จำนวน 2 ใน 3 โคลนมีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 ส่วนอีก 1 โคลนมีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ *P. botryosa* isolate BSDL 191 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลท R152 ทั้ง 3 โคลน

Clone no.	Length (bp)	Identification	Identity (%)	GenBank Accession no.
1	780	<i>P. botryosa</i> isolate BSDL 191	730/784 (93%)	KC247928.1
2	782	<i>P. botryosa</i> isolate BSDL 191	778/782 (99%)	KC247928.1
3	781	<i>P. botryosa</i> isolate LFDL 1.1.1	778/782 (99%)	KC247900.1

จากการเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่ม (Multiple sequence alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ไอโซเลท R152 ทั้ง 3 โคลนและนิวคลีโอไทด์ของ *P. botryosa* ทั้ง 2 ไอโซเลทที่ blast ได้ด้วย โปรแกรม Clustal Omega ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟทอปธอรา ไอโซเลท R152 บริเวณ ITS ที่สร้างจากไพรเมอร์ A2/I2 มีความยาว 782 เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.11

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

R152_clone1_A2      -CTTCCACGTGAACCGTTTCAAACCCCTTTAGTTGGGGGTGTGCTTGGCATTITGATG      59
R152_clone3_A2      ACTTCCACGTGAA-CCGTTTCAACCCCTTTAGTTGGGGGTGTGCTTGGCGTTTTGCTG      59
R152_clone2_A2      ACTTCCACGTGAA-CCGTTTCAACCCCTTTAGTTGGGGGTGTGCTTGGCGTTTTGCTG      59
P_botryosa_BSDL191  ACTTCCACGTGAA-CCGTAATCAACCCCTTTAGTTGGGGGTGTGCTTGGCATTITGATG      59
P_botryosa_LFDL      ACTTCCACGTGAA-CCGTAATCAACCCCTTTAGTTGGGGGTGTGCTTGGCGTTTTGCTG      59
***** * * *****

R152_clone1_A2      AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTGTTT      119
R152_clone3_A2      AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTG-GCTAGTAGCTTTTTGTTT      118
R152_clone2_A2      AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTGTTT      119
P_botryosa_BSDL191  AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTGTTT      119
P_botryosa_LFDL      AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTGTTT      119
*****

R152_clone1_A2      AAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGA      179
R152_clone3_A2      TAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGA      178
R152_clone2_A2      TAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGA      179
P_botryosa_BSDL191  TAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGA      179
P_botryosa_LFDL      TAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGA      179
** *****

R152_clone1_A2      TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGC      239
R152_clone3_A2      TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGC      238
R152_clone2_A2      TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGC      239
P_botryosa_BSDL191  TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGC      239
P_botryosa_LFDL      TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGC      239
*****

R152_clone1_A2      GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCAC      299
R152_clone3_A2      GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCAC      298
R152_clone2_A2      GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCAC      299
P_botryosa_BSDL191  GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCAC      299
P_botryosa_LFDL      GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCAC      299
*****

```



R152_clone1_A2	TTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCT	359
R152_clone3_A2	TTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCT	358
R152_clone2_A2	TTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCT	359
P_botryosa_BSDL191	TTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCT	359
P_botryosa_LFDL	TTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCT	359
*****		
R152_clone1_A2	TCCTTCCGAGTAGTCGGTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGAGC-GGTTTTTGTGCC	418
R152_clone3_A2	TCCTTCCGAGTAGTCGGTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGAGC-GGTTTTTGTGCC	418
R152_clone2_A2	TCCTTCCGAGTAGTCGGTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGAGC-GGTTTTTGTGCC	419
P_botryosa_BSDL191	TCCTTCCGAGTAGTCGGTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGAGC-GGTTTTTGTGCC	419
P_botryosa_LFDL	TCCTTCCGAGTAGTCGGTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGAGC-GGTTTTTGTGCC	419
*****		
R152_clone1_A2	TTCCGGCCGTGGGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAA	478
R152_clone3_A2	TTCCGGCCGTGGGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAA	478
R152_clone2_A2	TTCCGGCCGTGGGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAA	479
P_botryosa_BSDL191	TTCCGGCCGTGGGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAA	479
P_botryosa_LFDL	TTCCGGCCGTGGGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAA	479
*****		
R152_clone1_A2	AGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGCTGTGATG	538
R152_clone3_A2	AGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGCTGTGATG	538
R152_clone2_A2	AGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGCTGTGATG	539
P_botryosa_BSDL191	AGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGCTGTGATG	539
P_botryosa_LFDL	AGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGCTGTGATG	539
***** * *****		
R152_clone1_A2	TTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTGGCTTCGGCTGAACAGGC	598
R152_clone3_A2	TTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTGGCTTCGGCTGAACAGGC	598
R152_clone2_A2	TTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTGGCTTCGGCTGAACAGGC	599
P_botryosa_BSDL191	TTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTGGCTTCGGCTGAACAGGC	599
P_botryosa_LFDL	TTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTGGCTTCGGCTGAACAGGC	599
**** *****		
R152_clone1_A2	GCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGTGAGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTTG	658
R152_clone3_A2	GCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGTGAGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTTG	658
R152_clone2_A2	GCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGTGAGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTTG	659
P_botryosa_BSDL191	GCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGTGAGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTTG	659
P_botryosa_LFDL	GCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGTGAGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTTG	659
*****		
R152_clone1_A2	CTTGGCTAACGAATAGGCTTTTCTGCTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTCGGCTGTGAGTG	718
R152_clone3_A2	CTTGGCTTTTGAATCGGCTTTTCTGCTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTCGGCTGTGAGTG	718
R152_clone2_A2	CTTGGCTTTTGAATCGGCTTTTCTGCTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTCGGCTGTGAGTG	719
P_botryosa_BSDL191	CTTGGCTTTTGAATCGGCTTTTCTGCTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTCGGCTGTGAGTG	719
P_botryosa_LFDL	CTTGGCTTTTGAATCGGCTTTTCTGCTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTCGGCTGTGAGTG	719
*****		
R152_clone1_A2	TCGATCCATTAAAGGAACCTTCAAC-ACCCCAAGAGAGTGCATCTCAATTGGACATGAT	777
R152_clone3_A2	TCGATCCATTTTGGGAAATTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAATTGGACCTGAT	778
R152_clone2_A2	TCGATCCATTTTGGGAAACTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAATTGGACCTGAT	779
P_botryosa_BSDL191	TCGATCCATTTTGGGAAACTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAATTGGACCTGAT	779
P_botryosa_LFDL	TCGATCCATTTTGGGAAATTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAATTGGACCTGAT	779
*****		
R152_clone1_A2	ATC	780
R152_clone3_A2	ATC	781
R152_clone2_A2	ATC	782
P_botryosa_BSDL191	ATC	782
P_botryosa_LFDL	ATC	782
***		

รูปที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลท R152 ทั้ง 3 โคลน กับ *P. botryosa* isolate BSDL191 และ isolate LFDL 1.1.1



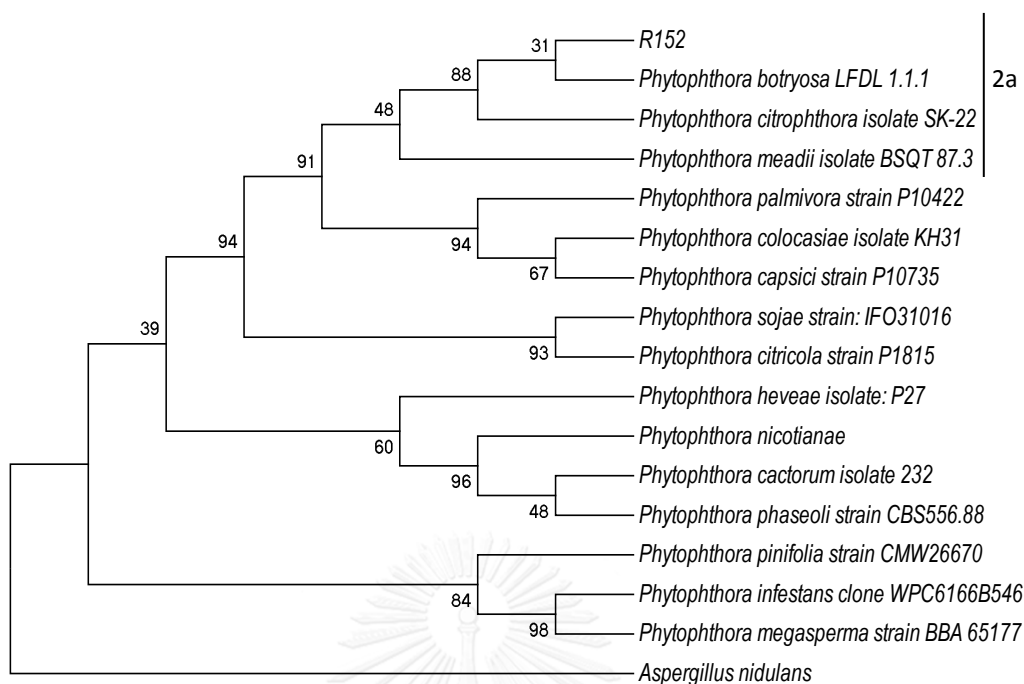
```

ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCGTTTTGCTGAGCCGCGCCCTATCAT
GGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGT
GGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAA
GAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTG
CACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTCCGTGTA
GTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGTTTTTGTGCCTTCGGGCCGTGGCTGCGAGTCCTTTG
AAATGTA CTGAACTGTA CTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCA
GTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAGGAGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGA
ACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTT
TTGAATCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGTGTGCATCCATTTTGGGAAATTT
GTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAATTGGACCTGATATC

```

**รูปที่ 4.11** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ที่พบอาร์เอ็นเอสายคู่

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดกับ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 ที่ 781 ลำดับ (99%) จึงทำการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 กับ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 ไฟทอปธอราอื่นๆที่มีรายงานพบในยางพารา และไฟทอปธอราใน clade 2a ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ *P. botryosa* ด้วยโปรแกรม Mega6 โดยวิธี Neighbor-Joining พบว่า ไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 ดังแสดงในรูปที่ 4.12



**รูปที่ 4.12** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ยีนของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 กับไฟทอปธอราสปีชีส์อื่นๆ จำนวน 17 สปีชีส์ ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยมี *A. nidulans* (KP749196.1) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม และตัวเลขที่ node แสดงเปอร์เซ็นต์ของ bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง

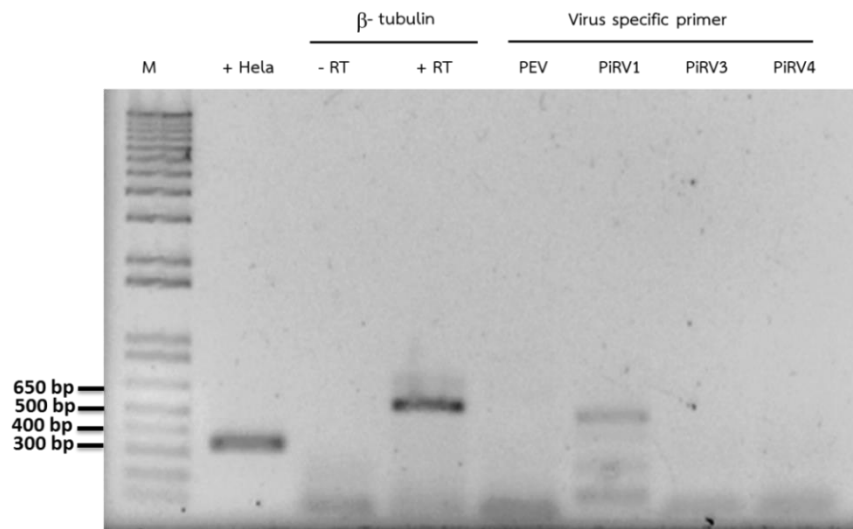
#### 4.5 การจำแนกชนิดของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่

จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 9 โคลน แล้วนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จำนวน 8 โคลน มีความคล้ายคลึงกับ rRNA ของรา ส่วน 1 โคลนไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนใดๆในฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบว่ามีความคล้ายคลึงกับพิเทียมนั้นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราบางโคลนที่ไม่ได้คัดเลือกโคลนด้วยไพรเมอร์ A2/I2 (ไม่แสดงข้อมูล) จึงคาดว่า ไฟทอปธอราไอโซเลท R152 มีการเจริญอยู่ร่วมกับพิเทียม

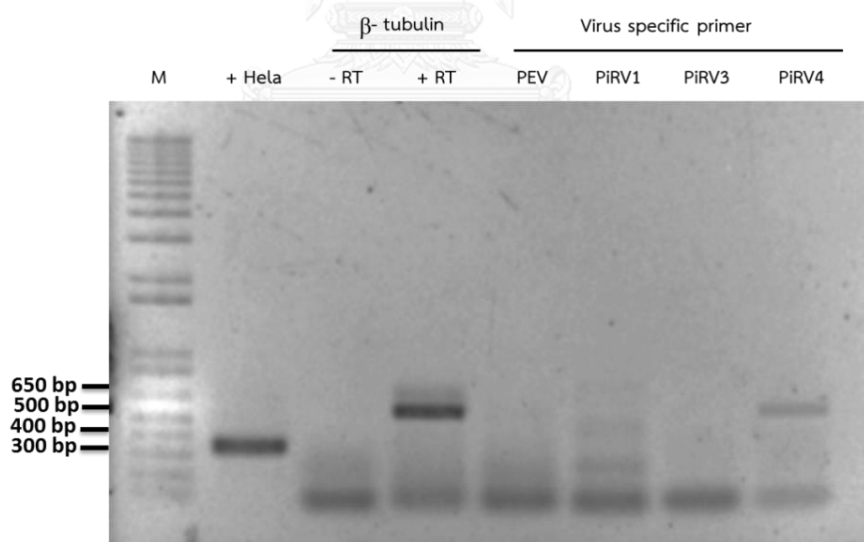
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้

Clone no.	Length (bp)	Identification	Nucleotide Identity (%)	GenBank Accession no.
1	117	No significant	-	-
2	1492	<i>Pythium sp. amazonianum</i> 18s rRNA	959/960(99%)	JN635130.1
3	695	<i>Pythium sp. amazonianum</i> 18s rRNA	695/695(100%)	JN635130.1
4	773	<i>P. pinifolia</i> 18s rRNA	691/691(100%)	JN635272.1
5	275	<i>P. megaspema</i> 28s rRNA	260/278(94%)	X75631.1
6	365	<i>Phytophthium vexans</i> 28s rRNA	365/367(99%)	KR092144.1
7	674	<i>Phytophthium vexans</i> 18s rRNA	673/674(99%)	HQ643400.2
8	255	<i>Phytophthium vexans</i> 28s rRNA	255/255(100%)	KR092144.1
9	543	<i>P. sojae</i> hypothetical protein mRNA	519/541(96%)	XM009541429

จากการสังเคราะห์ second-strand cDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสในโพทอปธอราที่เคยมีรายงาน ได้แก่ PEV, PiRV1, PiRV3 และ PiRV4 พบว่า ไม่พบผลิตภัณฑ์เมื่อสังเคราะห์ second-strand cDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ Udp-F2/R2, PiRV3-F/R และ PiRV4-F/R ถึงแม้จะพบผลิตภัณฑ์เมื่อสังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ PiRV1-F/R ขนาดประมาณ 450 คู่เบส แต่ไม่ตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ 2,934 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.13 เช่นเดียวกับ ผลการสังเคราะห์ second-strand cDNA ด้วยชุดไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาดเล็ก คือ ไม่พบผลิตภัณฑ์เมื่อสังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ PEV1-FRd/RRd, PiRV1-FRd/RRd และ PiRV3-FRd/RRd พบผลิตภัณฑ์เมื่อสังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ PiRV4-FRd/RRd ขนาดประมาณ 650 คู่เบส ซึ่งไม่ตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ 519 คู่เบส โดยมีชุดควบคุมที่ให้ผลบวกเป็นยีน Hela และ ชุดควบคุมที่ยืนยันคุณภาพของอาร์เอ็นเอคือ  $\beta$ -tubulin ที่ใส่และไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase ดังแสดงในรูปที่ 4.14

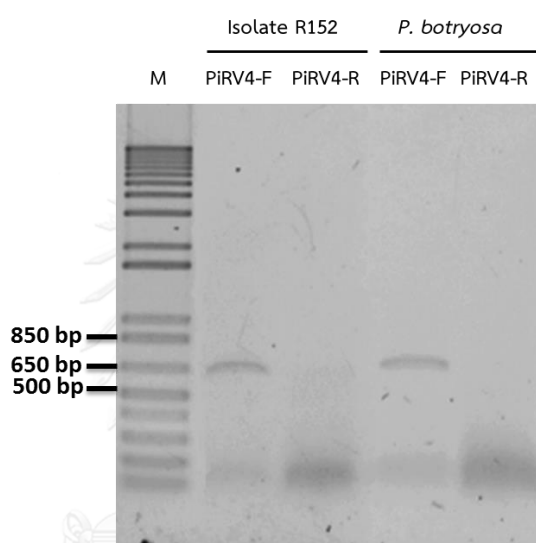


**รูปที่ 4.13** แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ second-strand cDNA ของไวรัสที่พบด้วยคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสในไฟทอพธอร่าที่จะให้ผลิตภัณฑ์ขนาดใหญ่ Lane M: 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) Lane +Hela : Hela gene เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก Lane -RT และ +RT: ชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin ที่ไม่ใส่และใส่เอนไซม์ RT ตามลำดับ Lane PEV, PiRV1, PiRV3 และ PiRV4: ชุดการทดลองที่ใช้คูไพรเมอร์ Udp-F2/R2, PiRV1-F/R , PiRV3-F/R และ PiRV4-F/R ตามลำดับ



**รูปที่ 4.14** แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ second-strand cDNA ของไวรัสที่พบด้วยคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน RdRp ของไวรัสในไฟทอพธอร่าที่จะให้ผลิตภัณฑ์ขนาดเล็ก Lane M: 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) Lane +Hela : Hela gene เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก Lane -RT และ +RT: ชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin ที่ไม่ใส่และใส่เอนไซม์ RT ตามลำดับ Lane PEV, PiRV1, PiRV3 และ PiRV4: ชุดการทดลองที่ใช้คูไพรเมอร์ PEV1-FRd/RRd, PiRV1-FRd/RRd, PiRV3-FRd/RRd และ PiRV4-FRd/RRd ตามลำดับ

ถึงแม้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ PiRV4-FRd/RRd ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดผลิตภัณฑ์ที่ควรได้ แต่จากการทดสอบการเกิดไพรเมอร์ self-priming โดยนำ first-strand cDNA ของไอโซเลท R152 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ forward หรือ reverse เพียงอย่างเดียว พบว่า มีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ forward ทั้งไอโซเลท R152 และ *P. botryosa* นั้นแสดงว่าผลิตภัณฑ์เมื่อสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ PiRV4 ที่พบเกิดจาก self-priming ของไพรเมอร์ forward กับ cDNA ของไฟทอฟธอรา ดังแสดงในรูปที่ 4.15



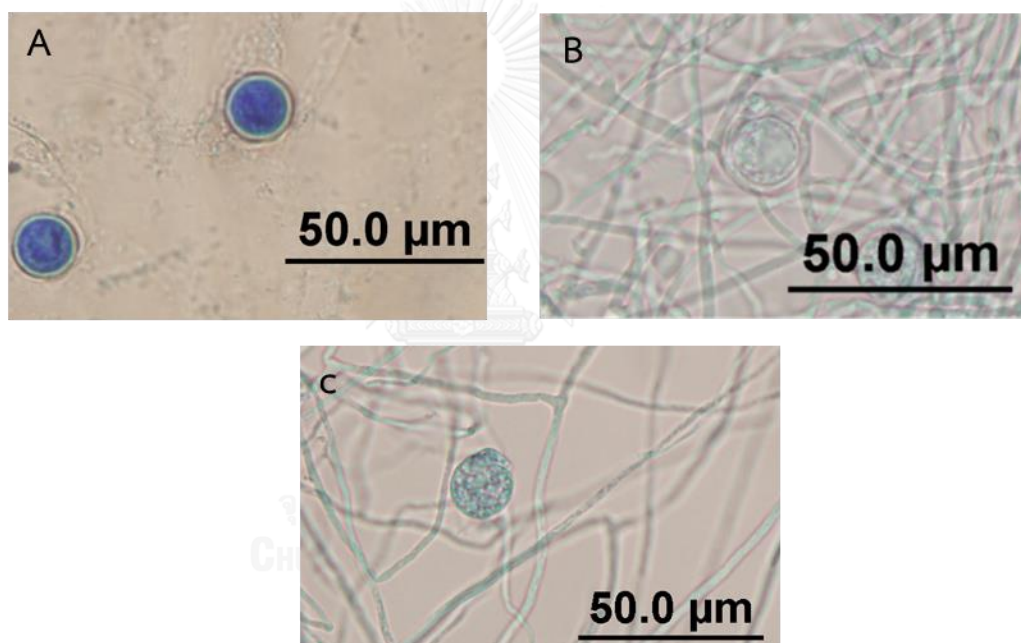
รูปที่ 4.15 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเกิด self-priming ของไพรเมอร์ PiRV4 ของไอโซเลท R152 และ *P. botryosa* Lane PIRV4-F: PiRV4 forward primer Lane PIRV4-R: PiRV4 reward primer

#### 4.6 การวิเคราะห์ผลของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไฟทอฟธอราที่พบไวรัส

##### 4.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอฟธอราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอฟธอราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เมื่อนำไฟทอฟธอราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน มาย้อมด้วย Lacto phenol cotton blue แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า ไม่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมในไอโซเลท R152 แต่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมในไอโซเลทอื่นๆ แต่เมื่อเลี้ยงไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง black bean เป็นเวลา 8 วัน แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการสร้างคลาไมโดสปอร์ลักษณะกลมและมีผนังหนาขนาด

ประมาณ 24 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูป 4.16A นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงไฟทอปธอราไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% V8 ที่ใส่สารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 4 เดือน พบโอโอโกเนียมขนาดประมาณ 23.9 ไมโครเมตรและสปอร์แรงเจียมที่มีลักษณะกลมคล้ายสปอร์แรงเจียมของพิเทียมปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงพยายามแยกไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ออกจากพิเทียมโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ หลังจากผ่านไป 4 วัน พบเส้นใยขึ้นบนเมล็ดงา จึงนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของไอโซเลท R152 ที่เจริญบนเมล็ดงาสปอร์แรงเจียมขนาดประมาณ 15.2 ไมโครเมตร ที่มีลักษณะกลมแบบ globose คล้ายสปอร์แรงเจียมของพิเทียม แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท R152 มีรา 2 ชนิดปนกันอยู่แต่ไฟทอปธอราไม่สร้างสปอร์ชนิดใดๆ จึงไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.16

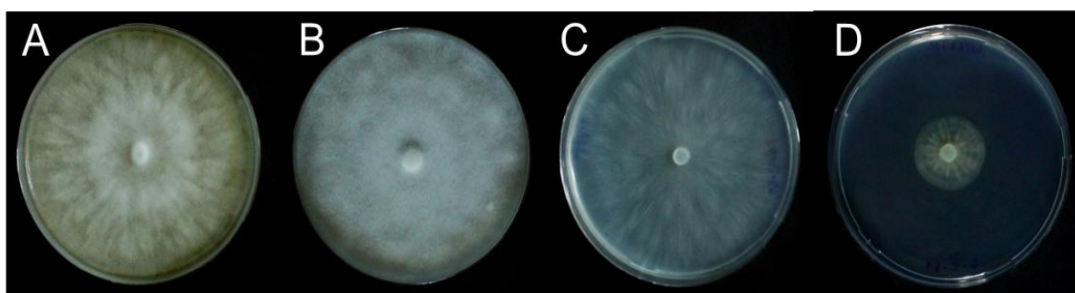


รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของที่พบในไอโซเลท R152 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์  
(A) คลาไมโดสปอร์ (B) โอโอสปอร์ (C) สปอร์แรงเจียม

#### 4.6.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของไอโซเลท R152

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA, black bean, V8 และ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน พบว่า โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, V8 และ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ มีลักษณะเป็นแบบ Faintly radian คือโคโลนีจะแผ่เส้นใยออกไปเป็นแฉกแหลมในแนวรัศมี แต่โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีเส้นใยฟูจากการ

สร้างเส้นใยในอากาศ (aerial mycelium) ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ black bean โคลนนี้จะมีลักษณะฟูเป็นรูปแบบ cottony นอกจากนี้พบการเจริญของไอโซเลท R152 ลดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะและไม่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหารทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.17



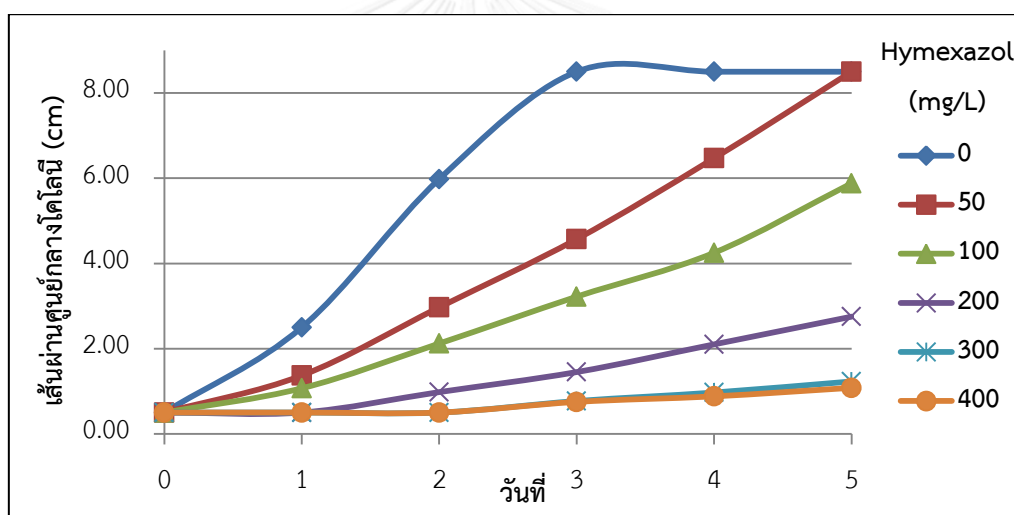
รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะโคโลนีของไฟทอธอราไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (A) PDA (B) black bean (C) V8 และ (D) V8 ผสมสารปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน

จากการเจริญที่ลดลงของไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารปฏิชีวนะ จึงศึกษาการเจริญเติบโตของไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารเคมี hymexazol 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0, 50, 100, 200, 300, 400 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทุกวันจนครบ 5 วัน ได้ผลตามตารางที่ 4.4 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ไม่ผสม hymexazol จะมีการเจริญของไอโซเลท R152 เร็วที่สุด โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 และรองลงมาเป็นไอโซเลท R152 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีความเข้มข้นของ hymexazol 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 5 ส่วนที่ความเข้มข้น hymexazol 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญน้อยลงตามลำดับ และเจริญไม่เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อครบ 5 วัน เมื่อนำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18 พบว่า การเจริญของไอโซเลท R152 มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ hymexazol แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีความเข้มข้นของ hymexazol 50, 100, 200, 300, 400 มิลลิกรัมต่อลิตรจะการเจริญลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผสมไฮมิซาซอล โดยที่ความเข้มข้นของ hymexazol 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงมากและมีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารเคมี hymexazol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ hymexazol (mg/L)	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
0	0.50	2.50	5.98	8.50*	8.50*	8.50*
50	0.50	1.37	2.97	4.57	6.47	8.50*
100	0.50	1.07	2.12	3.22	4.25	5.88
200	0.50	0.50	0.98	1.45	2.10	2.75
300	0.50	0.50	0.50	0.77	0.97	1.23
400	0.50	0.50	0.50	0.75	0.88	1.08

\* มีการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงการเจริญของไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารเคมี hymexazol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการแยกไอโซเลท R152 โดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อทำให้ได้พีเทียมที่คาดว่าเจริญอยู่ร่วมกับไฟทอปธอราไอโซเลท R152 จึงนำมาวิเคราะห์การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีสารปรับความเข้มข้นของสารเคมี hymexazol 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0, 50, 100, 200, 300, 400 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทุกวันจนครบ 5 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ไม่ผสมสารเคมี hymexazol มีการเจริญเร็วที่สุด รองลงมาเป็นที่ความเข้มข้นสารเคมี

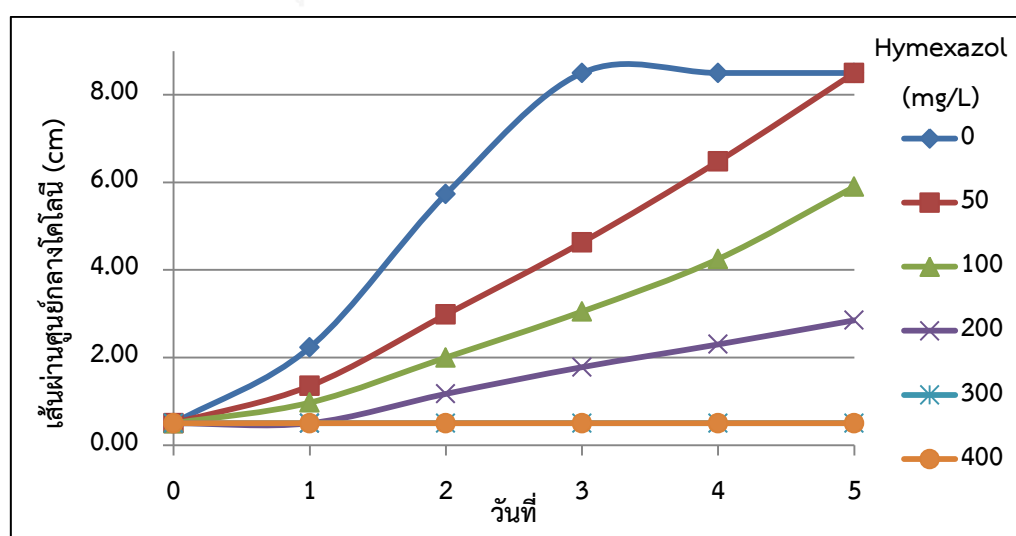


hymexazol 50, 100, 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นของ hymexazol 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า พิเทียม R152 ถูกยับยั้งการเจริญ เมื่อนำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่า การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีความเข้มข้นของ hymexazol 50, 100, 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันและมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hymexazol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และถูกยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้น hymexazol 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

**ตารางที่ 4.5** แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของพิเทียมในไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารเคมี hymexazol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

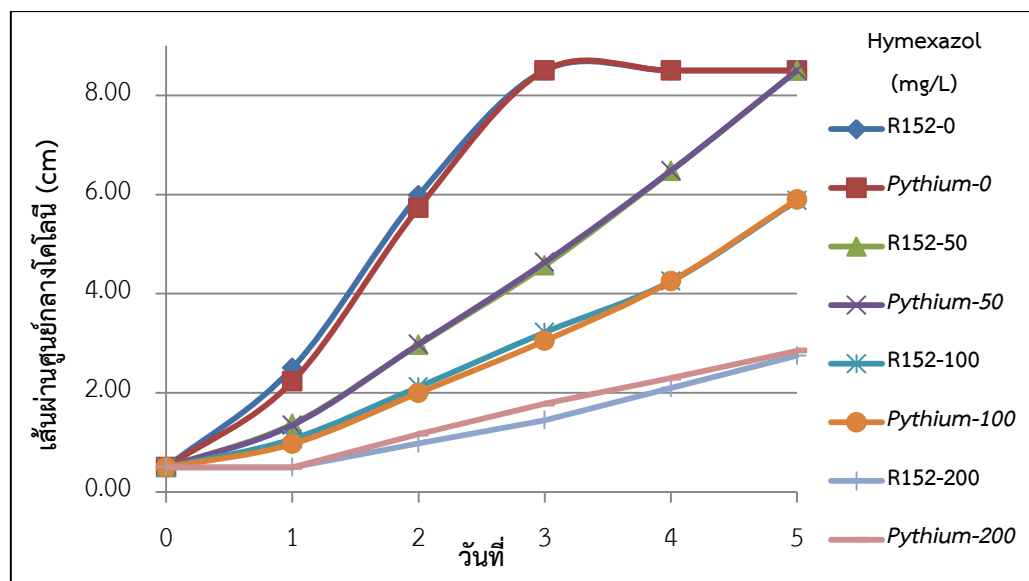
ความเข้มข้นของ hymexazol (mg/L)	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
0	0.50	2.23	5.73	8.50*	8.50*	8.50*
50	0.50	1.35	2.98	4.63	6.48	8.50*
100	0.50	0.97	2.00	3.05	4.25	5.90
200	0.50	0.50	1.17	1.78	2.30	2.85
300	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
400	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

\* มีการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



**รูปที่ 4.19** กราฟแสดงการเจริญของของพิเทียมในไอโซเลท R152 ที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารเคมี hymexazol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการนำค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลท R152 และพิเทียมในไอโซเลท R152 มาเปรียบเทียบกับกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.20 พบว่าทั้ง 2 มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน แต่พิเทียมมีแนวโน้มการเจริญเร็วกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีความเข้มข้น hymexazol 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อไฟทอปธอร่าออกมาได้ด้วยการใช้ hymexazol ที่ความเข้มข้นสูง



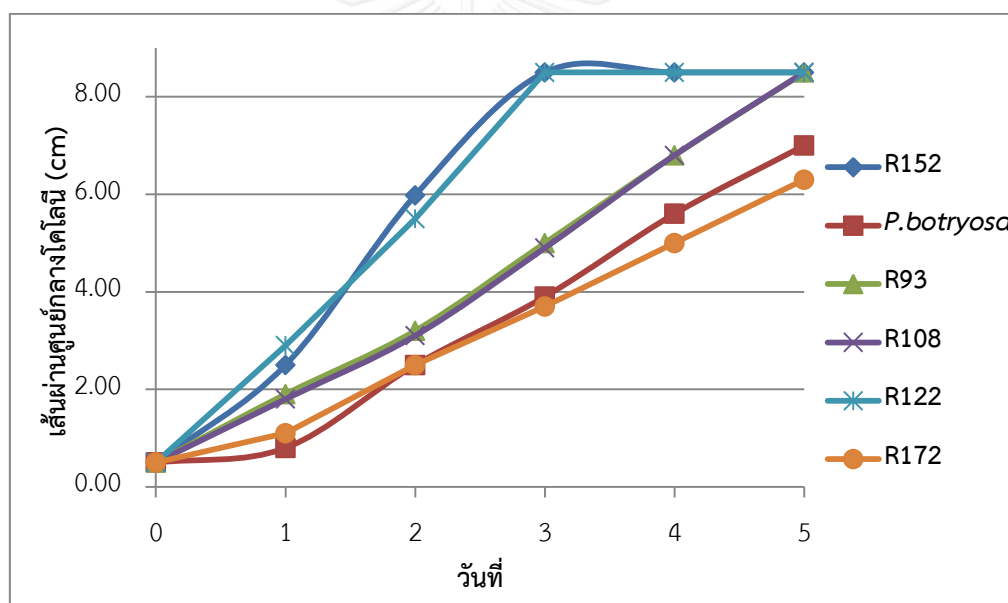
รูปที่ 4.20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับพิเทียมในไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารเคมี hymexazol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการวิเคราะห์การเจริญของไอโซเลท R152 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆแล้วพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ใส่สารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญ จึงศึกษาการเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับ *P. botryosa* และไฟทอปธอร่าไอโซเลทอื่นที่ไม่พบไวรัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ *P. botryosa* และไฟทอปธอร่าไอโซเลทอื่นๆ แสดงในตารางที่ 4.6 และจากการเปรียบเทียบการเจริญกับไฟทอปธอร่าที่พบไวรัส พบว่า ไฟทอปธอร่าที่พบไวรัสมีการเจริญใกล้เคียงกับไฟทอปธอร่าไอโซเลท R122 ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าไอโซเลทอื่นๆ รวมทั้งมีการเจริญเติบโตเร็วกว่า *P. botryosa* ดังแสดงในรูปที่ 4.21

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไฟทอปธอราไอโซเลทอื่นๆที่ไม่พบไวรัส และ *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
<i>P.botryosa</i>	0.50	0.80	2.50	3.90	5.60	7.00
R93	0.50	1.90	3.20	5.00	6.80	8.50*
R108	0.50	1.80	3.10	4.90	6.80	8.50*
R122	0.50	2.90	5.50	8.50*	8.50*	8.50*
R172	0.50	1.10	2.50	3.70	5.00	6.30

\* มีการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.21 กราฟแสดงเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับไฟทอปธอราไอโซเลทอื่นๆที่ไม่พบไวรัสและ *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8

## บทที่ 5

### อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการคัดแยกไฟทอปธอราจากตัวอย่างใบยางพาราที่แสดงอาการของโรคใบร่วงที่มีสาเหตุจากไฟทอปธอรา โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากสวนยางบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี 4 สวน และจังหวัดระยอง 20 สวน ในช่วงเดือนกันยายน – ตุลาคม ปี 2558 ได้นำตัวอย่างยางพาราดังกล่าวมาคัดแยกราบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและ ampicillin 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และสารเคมี hymexazol 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและ pentachloronitrobenzene 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของราสายใยและราน้ำชนิดอื่น การคัดแยกไฟทอปธอราพิจารณาจากลักษณะโคโลนีที่มีสีขาวแผ่ราบไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาจมีลักษณะฟูเล็กน้อย ร่วมกับการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะเส้นใยที่เป็นท่อกลวงไม่มีการสร้างผนังกัน (Coenocytic mycelium) และลักษณะสปอร์แรงเจียมที่มีรูปร่างรีหรือรูปหยดน้ำ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปของไฟทอปธอรา พบว่า สามารถคัดแยกไฟทอปธอราได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น 24 ไอโซเลทจากสวนยางในจังหวัดจันทบุรี และ 57 ไอโซเลทจากสวนยางในจังหวัดระยอง โดยในงานวิจัยนี้ได้เน้นเก็บตัวอย่างเฉพาะก้านใบยางพาราที่มีลักษณะก้านใบมีแผลช้ำและมีน้ำยางติดอยู่ ซึ่งเป็นอาการของโรคใบร่วงที่มีสาเหตุมาจากไฟทอปธอราและเป็นบริเวณแหล่งอาศัยของไฟทอปธอรา จึงทำให้สามารถแยกไฟทอปธอราส่วนใหญ่ได้จากตัวอย่าง และถึงแม้ในขั้นตอนการคัดแยกไฟทอปธอราจะมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะและมีการใส่สารยับยั้งแบคทีเรีย และราน้ำอื่นๆ ก็ยังพบราและแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเจริญมาพร้อมกับไฟทอปธอรา หนึ่งในนั้นคือ พิเทียม (*Pythium* spp.) ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวแผ่บนอาหารคล้ายกับลักษณะโคโลนีของไฟทอปธอราและอยู่ในวงศ์ Pythiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับไฟทอปธอราและทั้ง 2 จินัสมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (Drenth และ Sendall, 2001) ดังนั้นการพิจารณาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงยังไม่เพียงพอในการคัดแยกไฟทอปธอรา จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ระดับชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันสกุลของราที่แยกได้ว่าเป็นสกุลไฟทอปธอราต่อไป

ตัวอย่างไฟทอปธอร่าที่แยกได้ทั้งหมดได้นำมาตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี cellulose column chromatography ซึ่งจะอาศัยความมีขี้ของตัวทำละลายในการแยกอาร์เอ็นเอสายคู่ โดยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจะหลุดออกจากโมเลกุลของเซลลูโลส เมื่อชะด้วยสารละลายที่มีแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 15% ซึ่งใช้เป็น wash buffer ส่วนโมเลกุลอาร์เอ็นเอสายคู่จะจับกับโมเลกุลของ cellulose และจะหลุดออกเมื่อชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ STE ที่ไม่มีแอลกอฮอล์ (Franklin, 1966) นอกจากนี้ เซลลูโลสที่มีคุณภาพดีจะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกอาร์เอ็นเอสายคู่เพิ่มมากขึ้น แต่อัตราการไหลผ่านของบัฟเฟอร์จะช้าลงจึงทำให้เพิ่มระยะเวลาในการล้างคอลัมน์ และถึงแม้อุณหภูมิที่ต่ำจะช่วยในการรักษาสารพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Morris และ Dodds, 1979) ดังนั้นวิธีการแยกอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย cellulose column chromatography จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้ทั่วไปในการตรวจหาไมโคไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ แต่อย่างไรก็ตามอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ผ่านการแยกด้วยวิธีนี้จะตรวจสอบชนิดของสารพันธุกรรมด้วยการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆเพื่อยืนยันชนิดของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายคู่

จากตัวอย่างไฟทอปธอร่าที่ผ่านการตรวจหาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี cellulose column chromatography ทั้งหมด 81 ไอโซเลท พบไอโซเลทที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ในไอโซเลท R152 พบแถบอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 4 แถบ บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ขนาดประมาณ 3.4, 2.9, 2.5 และ 1.3 กิโลเบส ไอโซเลท R152 แยกได้จากตัวอย่างก้านใบยางพาราจากสวนยางในอำเภอวังจันทร์ จังหวัดระยอง และในไอโซเลท R117 และ R159 พบแถบอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 5 แถบที่มีขนาดโดยประมาณ 7.5, 3.3, 1.2, 0.7 และ 0.6 กิโลเบส ทั้ง 2 ไอโซเลทแยกได้จากสวนในจังหวัดจันทบุรีและอำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง ตามลำดับ ซึ่งก่อนหน้านี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอร่าที่แยกได้จากยางพาราในประเทศไทย โดยอัตราการพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในงานวิจัยนี้คิดเป็น 3.7 % ของไฟทอปธอร่าทั้งหมด 81 ไอโซเลทที่แยกได้ ซึ่งมากกว่าอัตราการพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เคยมีรายงานพบ 1.3% ใน *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากฟาร์มเห็ดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย (Jom-in และ Akarapisan, 2009) สำหรับไวรัสในไฟทอปธอร่ามีรายงานการพบไม่มากเท่าไวรัสในราอื่นๆและไวรัสในพืช โดยมีรายงานพบอนุภาคคล้ายไวรัสครั้งแรกในนิวเคลียสของ

*Phytophthora drechsleri* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Roos และ Shaw, 1985) และรายงานพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราครั้งแรกใน *P. infestans* ที่แยกได้จากต้นสนจำนวน 14 ไอโซเลทจากทั้งหมด 40 ไอโซเลท (Tooley และคณะ, 1989) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาระดับชีวโมเลกุลของไวรัสในไฟทอปธอราที่มีรายงานน้อย ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานไวรัสในไฟทอปธอราเพียง 5 ชนิดที่มีการศึกษาระดับโมเลกุลอย่างละเอียดและระบุชื่อไวรัส ได้แก่ *Phytophthora endornavirus 1* (PEV1) (Hacker และคณะ, 2005) *Phytophthora infestans RNA virus 1* (PiRV-1), PiRV-2, PiRV-3 และ PiRV-4 (Cai และ Hillman, 2013)

อาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบในไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ได้ยืนยันชนิดของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ RNase A, DNase I และ S1 nuclease โดยทั่วไป RNase A จะย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวและสายลูกผสมระหว่าง RNA และ DNA ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ (0 - 100 mM NaCl) แต่ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (ตั้งแต่ 300 mM NaCl ขึ้นไป) จะย่อยเฉพาะอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Raines, 1998) ส่วน s1 nuclease จะย่อยสารพันธุกรรมที่เป็นสายเดี่ยวทั้งอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ DNase I จะย่อยสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสายคู่และดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Newhouse และคณะ, 1991) จากการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า อาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบทนต่อการถูกย่อยด้วย DNase I, S1 nuclease และ RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (300 mM NaCl) แต่ถูกย่อยด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ (15 mM NaCl) ซึ่งยืนยันได้ว่า สารพันธุกรรมไวรัสที่แยกได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่

ลักษณะอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบในไอโซเลท R152 มีลักษณะใกล้เคียงกับจีโนมของไมคอไวรัสในจีนัส *Chrysovirus* ที่มีจีโนมประกอบด้วย 4 ท่อนขนาดประมาณ 2.7 – 3.5 กิโลเบส แต่ละท่อนจะประกอบไปด้วย 1 ORF ซึ่ง dsRNA1 และ dsRNA2 จะถอดรหัสไปเป็น RdRP และ capsid protein ตามลำดับ ส่วน dsRNA3 และ dsRNA4 จะถอดรหัสไปเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่คือโปรตีน P3 และ P4 ตามลำดับ ซึ่งไวรัสที่อยู่ในจีนัสนี้และพบในราก่อโรคในพืชคือ *Helminthosporium victoriae virus 145S* (HvV145S) ซึ่งก่อโรค Victoria blight ในต้นข้าวโอ๊ต (Ghabrial และคณะ, 2015) แต่เนื่องจากไม่ได้มีการศึกษาโครงสร้างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัสในไอโซเลท R152 จึงไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มตามลักษณะที่พบได้ จึงต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเพื่อจัด

จำแนกกลุ่มของไวรัส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสในไอโซเลท R152 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 10 โคลนพบว่า ได้ชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของราเจ้าบ้าน ซึ่งพบทั้งไฟทอปธอรา พิเทียมและไฟโตพิเทียมนั้น เนื่องจากทั้ง 3 อยู่ในวงศ์เดียวกันและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก โดยไฟโตพิเทียมนั้นเดิมจัดจำแนกอยู่ในพิเทียม clade K ซึ่งมีวิวัฒนาการอยู่ระหว่างพิเทียมและไฟทอปธอรา (Cooke และคณะ, 2000) และจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA นั้นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ที่พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pythium cucurbitacearum* isolate 1241Pc (HQ237483.1) ซึ่งเป็นพิเทียมที่ก่อโรค damping-off และผลเน่าในแตงกวา (Takimoto, 1941) นอกจากนี้รายงานพบ *Pythium cucurbitacearum* isolate 1241Pc ในตัวอย่างดินบริเวณสวนทุเรียนในประเทศไทย อินโดนีเซียและพบที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pythium vexans* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Santoso และคณะ, 2015) จึงคาดว่าไฟทอปธอราไอโซเลท R152 มีพิเทียมเจริญร่วมด้วย จึงทำการแยกเชื้อโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อเพื่อจะแยกไฟทอปธอราออกจากพิเทียม พบว่า ไฟทอปธอราไม่มีการสร้างสปอร์จึงทำให้ไม่สามารถแยกไฟทอปธอราออกจากพิเทียมได้ แต่พิเทียมมีการสร้างสปอร์จึงแยกพิเทียมออกมาได้แล้วนำมาสกัดหาไวรัสก็ไม่พบแถบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในเส้นใยพิเทียมที่แยกออกมา ซึ่งแสดงว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบนั้นอยู่ในไฟทอปธอรา

เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของราอาศัยนั้น เกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ อาร์เอ็นเอไวรัสที่พบในเส้นใยราที่ผ่านการ subculture หลายครั้งเกิดการหายไปบางส่วน และมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอไวรัสที่สกัดได้น้อย ถึงแม้จะนำไฟทอปธอรามาจาก stock เชื้อที่เก็บไว้ในน้ำปลอดประจุ ก็พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับในตอนแรกที่พบไวรัส ซึ่งอาจเป็นได้ว่า พิเทียมที่เจริญร่วมกับไฟทอปธอราเจริญได้ดีกว่าจนกดการเจริญของไฟทอปธอรา เนื่องจากปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสที่สกัดได้มีปริมาณน้อย จึงทำให้โอกาสที่จะสังเคราะห์ cDNA ของชิ้นส่วนของไวรัสลดลง และนอกจากนี้อาจเกิดจากมีอาร์เอ็นเอของราเจ้าบ้านปนอยู่ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสที่จะนำไปสังเคราะห์ cDNA ทางผู้วิจัยจึงลองย่อยตัวอย่างอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ต่างๆ ก่อนนำไปสังเคราะห์ cDNA ได้แก่ S1 nuclease พบชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของราเจ้า

บ้านเช่นกันในผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนการย่อยด้วย RNase A นั้นไม่สามารถนำตัวอย่างที่ได้ผ่านการย่อยไปสังเคราะห์ cDNA ได้ เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยจะต้องมีการตกตะกอน 2 รอบ เพื่อนำบัฟเฟอร์ที่ละลายอยู่ในอาร์เอ็นเอออกและต้องตกตะกอนอีกครั้งเพื่อหยุดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ จึงทำให้อาร์เอ็นเอบางส่วนเกิดการสูญเสียไปในขั้นตอนนี้ ปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสที่เหลือ หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์จึงมีปริมาณน้อยมากจนแทบไม่สามารถมองเห็นได้บน อะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) วิธีที่แนะนำในงานวิจัยต่อไป สำหรับการกำจัดอาร์เอ็นเอของราเจ้าบ้านออกจาก อาร์เอ็นเอของราไวรัสคือ สกัดอาร์เอ็นเอไวรัสออกจากเจลแล้วจึงนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ซึ่งเป็นวิธีที่ Cai และคณะ (2009) ใช้สกัดอาร์เอ็นเอไวรัสในไฟทอพธอราเพื่อนำไปสังเคราะห์ cDNA และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทางผู้วิจัยได้ทดลองปฏิบัติแล้วพบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัด ได้จากเจลนั้นมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสของผู้วิจัยมีปริมาณน้อย จึงควร ต้องสกัดครั้งละปริมาณมากๆ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้น่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการจัดการปนเปื้อนของ อาร์เอ็นเอของราเจ้าบ้านได้

เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สามารถระบุชนิดของไวรัสได้ ทางผู้วิจัยจึงใช้วิธีระบุชนิดของไวรัสด้วย การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอไวรัสที่เคยมีรายงาน ในไฟทอพธอรา ได้แก่ ไพรเมอร์ Udp-F2/R2 ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ UGT ไปจนถึงตำแหน่งยีน helicase ของไวรัส PEV1 (Kozlakidis และคณะ, 2010) คู่ไพรเมอร์ PiRV4-F/R ที่จำเพาะต่อบริเวณ ORF2 ซึ่งครอบคลุมบริเวณ RdRp ของไวรัส (Zhan และคณะ, 2016) ส่วน PiRV1-F/R และ PiRV3-F/R ออกแบบให้จำเพาะต่อ ORF1 และทั้งหมดของ ORF ตามลำดับ ซึ่งจะครอบคลุมบริเวณ ที่ถอดรหัสไปเป็น RdRP ของไวรัสแต่ละตัว ส่วนไวรัส PiRV-2 ไม่มีรายงานไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส และไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจึงทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสนี้ได้ จากการสังเคราะห์ second-strand cDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดตามที่ ต้องการ ถึงแม้จะพบผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ PiRV1-F/R ซึ่งไม่ตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ 2,935 คู่เบส ซึ่งคาดว่าเป็นแบนด์ที่ไม่มีความจำเพาะ (nonspecific band) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีขนาดใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก คู่ไพรเมอร์ของชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin จึงสังเคราะห์ไพรเมอร์ใหม่ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กใกล้เคียง ชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin เพื่อยืนยันว่า ผลของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ขึ้นแถบนั้นไม่ได้มีผลมาจากสังเคราะห์



cDNA ที่มีขนาดใหญ่มาก โดยคู่ไพรเมอร์ที่ใช้คือ PEV1-FRd/RRd, PiRV1-FRd/RRd, PiRV3-FRd/RRd และ PiRV4-FRd/RRd จำเพาะต่อตำแหน่งยีน RdRp ของไวรัส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ 4 คู่แรกคือ ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดตามที่ต้องการ โดยแถบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ PiRV4-FRd/RRd เกิดจากการเกิด self-priming ของไพรเมอร์ ซึ่งในกรณีนี้เกิดขึ้นกับไพรเมอร์ PiRV4-forward ซึ่งจับกับ cDNA ของไฟทอปธอรา โดยยืนยันผลด้วยชุดควบคุมคือ *P. botryosa* นอกจากนี้ผลการไม่พบผลิตภัณฑ์ cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด ได้ยืนยันคุณภาพและการมีสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอที่นำมาทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดควบคุม  $\beta$ -tubulin และเมื่อเปรียบเทียบขนาดและจำนวนท่อนของสารพันธุกรรมของไวรัสทั้ง 4 ชนิด พบว่าอาร์เอ็นเอไวรัสที่พบมีรูปแบบแบนที่แตกต่างจากไวรัสอาร์เอ็นเอในไฟทอปธอราที่พบทั้ง 4 ดังนั้นจากผลที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ cDNA เมื่อทำ RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ที่จำเพาะต่อไวรัสในไฟทอปธอราทั้ง 4 ชนิด ร่วมกับการวิเคราะห์ขนาดและรูปแบบสารพันธุกรรมของไวรัส แสดงว่า อาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบในไฟทอปธอราไอโซเลท R152 เป็นไวรัสที่ไม่ใช่ชนิดเดียวกับไวรัสในไฟทอปธอราที่เคยมีรายงาน

สำหรับไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ได้มีการยืนยันจีโนมไฟทอปธอราโดยวิธี Nested-PCR amplification ด้วยคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1/ITS4 และ A2/I2 โดย ITS1/ITS4 จำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายราซึ่งรวมถึงไฟทอปธอรา (White และคณะ, 1990) และ A2/I2 จำเพาะต่อตำแหน่ง ITS1-5.8s-ITS2 ของราสกุลไฟทอปธอราที่จะให้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 752 – 832 คู่เบส (Drenth และคณะ, 2006) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 ด้วยคู่ไพรเมอร์ A2/I2 มีขนาดประมาณ 780 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ *P. botryosa* ที่เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและอยู่ในช่วงเดียวกับขนาดอ้างอิง จึงแสดงได้ว่า ราเจ้าบ้านของไวรัสเป็นราจีโนมไฟทอปธอรา และจากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ A2/I2 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 (99%) เป็นไฟทอปธอราที่มีรายงานพบในยางพาราในประเทศเวียดนาม (Ha และคณะ, 2012) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณ ITS ของไฟทอปธอราไอโซเลท R152 กับไฟทอปธอรากลุ่ม clade 2a และไฟทอปธอราที่มีรายงานพบในยางพาราที่พบว่า ไฟทอปธอราไอโซเลท R152 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. botryosa* isolate LFDL 1.1.1 ที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *P. citrophthora* isolate SK-22 และ

*P. meadii* isolate BSQT 87.3 ที่จัดอยู่ใน clade 2a เช่นกัน (*Phytophthora* database, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chee (1973) ที่พบ *P. botryosa* ที่แยกได้จากก้านใบยางพาราในประเทศไทยมาเลเซียและประเทศไทย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฟทอฟธอราที่พบไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ไม่มีการสร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA, V8, V8 ผสมสารปฏิชีวนะ และ black baen ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมในไอโซเลทอื่นๆ ถึงแม้จะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง black bean ซึ่งเป็นอาหารที่จะชักนำให้สร้างสปอร์ (Sopee และคณะ, 2012) และ V8 ที่นิยมใช้สำหรับเลี้ยงเพื่อเก็บสปอร์ของไฟทอฟธอรา (Ferguson และ Jeffers, 1999) ก็ไม่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมในไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cai และ Hillman (2013) ที่พบว่า *P. infestans* ที่ติดไวรัส PIRV-4 มีการผลิตสปอร์ลดลงที่โดยปกติจะผลิตสปอร์มากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง rye ซึ่งอัตราการผลิตสปอร์เป็นตัวแปรหนึ่งที่บ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อโรคของราก่อโรค ราก่อโรคที่พบการติดไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ส่วนใหญ่จะมีความรุนแรงในการก่อโรคลดลง (Potgieter และคณะ, 2013) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 ที่ติดไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่มีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงจากการที่ไม่ผลิตสปอร์และมีอาการของโรคใบร่วงน้อยในสวนยางพาราที่เก็บตัวอย่างมา ถึงแม้จะไม่พบการผลิตสปอร์แรงเจียมของไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 บนอาหารเชื้อแข็ง black bean แต่พบการผลิตคลาไมโดสปอร์ที่มีลักษณะกลมและผนังหนาขนาดประมาณ 24 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วงคลาไมโดสปอร์ของ *P. botryosa* ที่มีขนาดประมาณ 14 – 30 ไมโครเมตร (Erwin และ Ribeiro, 1996) นอกจากนี้ในไฟทอฟธอราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 4 เดือนพบโอโอโกเนียมและสปอร์แรงเจียมที่มีรูปร่าง globose ซึ่งคล้ายกับลักษณะสปอร์แรงเจียมของพิเทียม จึงพยายามแยกไฟทอฟธอราออกจากพิเทียมโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ เมื่อนำเส้นใยมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยที่เจริญบนเมล็ดงามีการสร้างสปอร์แรงเจียมรูปร่างกลมคล้ายกับสปอร์แรงเจียมของพิเทียมที่มีขนาดประมาณ 15.5 ไมโครเมตร ซึ่งตรงกับลักษณะของ *P. cucurbitacearum* ที่มีสปอร์แรงเจียมรูปร่างกลมแบบ globose และอาจจะพบรูปแบบ ovoid, ellipsoid, obpyriform และ lemon บ้างเล็กน้อย ไม่มี papillae และจะมีขนาดเล็กสุด 7 x 6 ไมโครเมตร และใหญ่สุด 22 x 23 ไมโครเมตร (Santoso และคณะ, 2015) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะของสปอร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท R152 มีพิเทียมปนอยู่ แต่ไม่สามารถแยกไฟทอปธอร่าออกมาได้ เนื่องจากไม่สร้างสปอร์

ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท R125 มีลักษณะโคโลนีเป็นแบบ Faintly radian บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA, V8 และ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ แต่โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA จะมีเส้นใยฟูจากการสร้างเส้นใยในอากาศ (aerial mycelium) ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง black bean โคโลนีจะมีลักษณะฟูเป็นรูปแบบ cottony ซึ่งคล้ายกับลักษณะโคโลนีของ *P. botryosa* ที่จะมีลักษณะแผ่แบบ radian และมีเส้นใยอากาศเล็กน้อย (Erwin และ Ribeiro, 1996) ส่วนการเจริญเติบโตพบว่า มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่มีการผสมสารปฏิชีวนะ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ V8, black bean และ PDA เนื่องจากสารเคมี hymexazol และ pentachloronitrobenzene ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shen และ Tsao (1983) ที่รายงานว่า การเจริญของเส้นใยของ *P. infestans* จะถูกยับยั้งมากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมทั้ง hymexazol และ pentachloronitrobenzene และรองลงมาเป็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสม pentachloronitrobenzene เมื่อเปรียบเทียบกับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Tsao และ Guy (1977) รายงานว่า hymexazol จะลดการเจริญและความหนาแน่นของโคโลนีไฟทอปธอร่าในบางไอโซเลท แต่อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะก็เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดแยกไฟทอปธอร่า โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของพิเทียมส่วนใหญ่ได้ (Jeffers และ Martin, 1986) จึงนำไฟทอปธอรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ hymexazol ต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่ไฟทอปธอร่าสามารถเจริญได้และพิเทียมถูกยับยั้งการเจริญพบว่า ทั้งไฟทอปธอร่าและพิเทียมจะมีการเจริญลดลงเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ hymexazol เพิ่มขึ้น โดยพบว่าที่ความเข้มข้น hymexazol 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทอปธอร่ามีการเจริญลดลงมากและให้ผลไม่ค่อยแตกต่างกัน แต่พบว่าไฟทอปธอร่าถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ 2 ความเข้มข้นนี้ และเมื่อนำค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของไฟทอปธอร่าและพิเทียมไอโซเลท R152 มาเปรียบเทียบการเจริญพบว่า ทั้ง 2 มีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่พิเทียมมีแนวโน้มการเจริญเร็วกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีความเข้มข้น hymexazol 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้ไม่สามารถแยกไฟทอปธอร่าออกมาได้จากการใช้ความเข้มข้นของ hymexazol สูง และจากการเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลท R152 กับ *P. botryosa* และไฟทอปธอร่าไอโซเลทอื่นที่ไม่พบไวรัสบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ V8 พบว่า ไอโซเลท R152 มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าไอโซเลทอื่นๆ รวมทั้ง *P. botryosa* อาจเกิดจากการที่มีพีเทียมปนอยู่ ซึ่งโดยปกติพีเทียมจะเจริญเติบโตเร็วกว่าไฟทอปธอรา



## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้คัดแยกได้ไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่จาก *P. botryosa* ไอโซเลท R152 ไวรัสที่คัดแยกได้ประกอบด้วยสารพันธุกรรม 4 ชิ้นและมีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นไวรัสที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน เนื่องจากไม่พบผลิตภัณฑ์ cDNA จากการทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไวรัสในไฟทอปธอราที่เคยมีรายงานมาแล้ว จากการพยายามเหนี่ยวนำให้ *P. botryosa* ไอโซเลท R152 สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ทำให้พบว่า ไอโซเลท R152 มี *Pythium cucurbitacearum* เจริญปนอยู่ด้วยส่วน *P. botryosa* ไอโซเลท R152 ไม่สร้างสปอร์ชนิดใดๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการชักนำให้ไฟทอปธอราสร้างสปอร์ จึงไม่สามารถแยก *P. botryosa* ซึ่งเป็นเจ้าบ้านของไวรัสออกจากพิเทียมได้ อย่างไรก็ตาม *Pythium cucurbitacearum* ที่แยกออกมาได้จากไอโซเลท 152 ไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัส ดังนั้นสรุปได้ว่า *P. botryosa* ไอโซเลท R152 เป็นราเจ้าบ้านของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่พบ งานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานการพบอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอปธอราที่แยกได้จากประเทศไทยเป็นครั้งแรก ซึ่งจากผลการวิจัยในครั้งนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาไวรัสในไฟทอปธอราเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของไวรัสที่พบต่อไป

## รายการอ้างอิง

- Brooks, F. (2004). *Phytophthora palmivora*. pests and diseases of American Samoa Number 12.1-2.
- Buck, K. W. (1986). Fungal virology—An overview. Fungal virology, CRC-Press, California.
- Cai, G., and Hillman, B. I. (2013). *Phytophthora* viruses. *Advances in Virus Research*. 86. 327-350.
- Cai, G., Krychiw, J. F., Myers, K., Fry, W. E., and Hillman, B. I. (2013). A new virus from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans* with an 8 kb dsRNA genome: the sixth member of a proposed new virus genus. *Virology*. 435(2). 341-349.
- Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., and Hillman, B. I. (2012). A member of the virus family Narnaviridae from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Archives of Virology*. 157(1). 165-169.
- Cai, G., Myers, K., Hillman, B. I., and Fry, W. E. (2009). A novel virus of the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*. 392(1). 52-61.
- Chee, K. H. (1973). Phenotypic differences among single-oospore cultures of *Phytophthora palmivora* and *P. botryosa* from *Heavea brasiliensis*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 50(275). 275-292.
- Chowdhury, A., and Sen, C. (2000). Mycoviruses: A Novel Option for Managing Some Plant Diseases. p. 81-94. In Upadhyay R.K., Mukerji K.G., Chamola B.P. (ed), Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture. Springer, Boston, MA.
- Cooke, D. E., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., and Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30(1). 17-32.
- D' Alessio, J. M., and Gerard, G. F. (1988). Second-strand cDNA synthesis with *E. coli* DNA polymerase I and RNase H: the fate of information at the mRNA 5'

- terminus and the effect of *E. coli* DNA ligase. *Nucleic Acids Research*. 16(5). 1999-2014.
- Danteravanich, S. (2010). Management of effluent from STR20 industry in Southern Thailand. *Southeast Asian Water Environment* 4. 167.
- Das, S., Falloon, R. E., Stewart, A., and Pitman, A. R. (2014). Molecular characterisation of an endornavirus from *Rhizoctonia solani* AG-3PT infecting potato. *Fungal Biology*. 118(11). 924-934.
- Delabarre, M. A., and Serrier, J. B. (2000). Propagation of planting materials. Rubber. *The Tropical Agriculturalist*. 22-79.
- Drenth, A., and Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. Australian Centre for International Agricultural Research, ACIAR.
- Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., and Irwin, J. A. G. (2006). Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology*. 35(2). 147.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society, APS Press.
- Ferguson, A., and Jeffers, S. (1999). Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease*. 83(12). 1129-1136.
- Franklin, R. M. (1966). Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 55(6). 1504-1511.
- Frezzi, M. J. (1950). The species of *Phytophthora* in Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. 4(1).
- Ghabrial, S. A., Caston, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., and Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*. 479. 356-368.
- Ghabrial, S. A., and Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*. 47. 353-384.

- Gillings, M., Tesoriero, L., and Gunn, L. (1993). Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathology*. 42(1). 6-15.
- Grasse, W., Zipper, R., Totska, M., and Spring, O. (2013). Plasmopara halstedii virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology*. 57. 42-47.
- Ha, C. V., Pham, D. N., Ha, G., and Tran, H. T. N. (2012). Identification of *Phytophthora* on rubber in Vietnam. Research Center for Tropical Plant Diseases, Hanoi University of Agriculture, Vietnam.
- Hacker, C. V., Brasier, C. M., and Buck, K. W. (2005). A double-stranded RNA from a *Phytophthora* species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. *Journal of general virology*. 86(5). 1561-1570.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P., Sutton, B., and Pegler, D. N. (1996). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38(4). 272-272.
- Ho, H. H., Liang, Z. R., Zhuang, W. Y., and Yu, Y. N. (1984). *Phytophthora* spp. from rubber tree plantations in Yunnan Province of China. *Mycopathologia*. 86(2). 121-124.
- Hollings, M. (1962). Viruses Associated with A Die-Back Disease of Cultivated Mushroom. *nature*. 196(4858). 962-965.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV. [online]. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/) Accessed 9 November 2016
- Jayasuriya, K., Wijesundera, R., and Deraniyagala, S. (2003). Isolation of anti-fungal phenolic compounds from petioles of two *Hevea brasiliensis* (rubber) genotypes and their effect on *Phytophthora meadii*. *Annals of applied biology*. 142(1). 63-69.



- Jeffers, S., and Martin, S. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70(11). 1038-1043.
- Jom-in, s., and Akarapisan, A. (2009). Characterization of double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. isolates in Chiang Mai province. *Journal of Agricultural Technology*. 5(2). 261-270.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., and Carstens, E. B. (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Kozlakidis, Z., Brown, N. A., Jamal, A., Phoon, X., and Coutts, R. H. (2010). Incidence of endornaviruses in *Phytophthora taxon douglasfir* and *Phytophthora ramorum*. *Virus Genes*. 40(1). 130-134.
- Laohasakul, B., Boonyapipat, P., and Plodpai, P. (2017). First Report of *Phytophthora citrophthora* Causing Leaf Fall of Para Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) in Thailand. *Plant Disease*. 101(6). 1057-1057.
- Liyanage, N. I. S., and Wheeler, B. E. J. (1989). Comparative morphology of *Phytophthora* species on rubber. *Plant Pathology*. 38(4). 592-597.
- Martin, F. N., Abad, Z. G., Balci, Y., and Ivors, K. (2012). Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease*. 96(8). 1080-1103.
- Mayhew, D., Cook, A., and Gulya, T. (1992). Isolation and characterization of a mycovirus from *Plasmopara halstedii*. *Canadian journal of botany*. 70(9). 1734-1737.
- Mills, S. D., Förster, H., and Coffey, M. D. (1991). Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analyses. *Mycological Research*. 95(1). 31-48.
- Morris, T., and Dodds, J. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. 69(8). 854-858.
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., and Natsuaki, T. (2015). A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *Journal of General Plant Pathology*. 81(2). 103-107.

- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., and Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 10(1). 115-128.
- Phytophthora database (2017). Species list. [online].  
<http://www.phytophthoradb.org/species.php>. Accessed 6 January 2017
- Potgieter, C. A., Castillo, A., Castro, M., Cottet, L., and Morales, A. (2013). A wild-type *Botrytis cinerea* strain co-infected by double-stranded RNA mycoviruses presents hypovirulence-associated traits. *Virology journal*. 10(1). 220.
- Promwee, A., Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., and Chamswang, C. (2016). Efficacy of indigenous *Trichoderma harzianum* in controlling *Phytophthora* leaf fall (*Phytophthora palmivora*) in Thai rubber trees. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 124(1). 41-50.
- Raines, R. T. (1998). Ribonuclease A. *Chemical Reviews*. 98(3). 1045-1066.
- Ristaino, J. B., and Gumpertz, M. C. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics cause by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*. 38. 541-576.
- Roos, U. P., and Shaw, D. S. (1985). Intranuclear virus-like particles in a laboratory strain of *phytophthora drechsleri*. *Transactions of the British Mycological Society*. 84(2). 340-344.
- Rossmann, A., and Palm, M. (2006). Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi ?. *Outlooks on Pest Management*. 17(5). 217.
- Sangchote, S., Poonpolgul, S., Sdoodee, R., Kanjanamaneesathian, M., Baothong, T., and Lumyong, P. (2004). *Phytophthora* Diseases in Thailand. *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. 77.
- Santoso, P. J., Aryantha, I. N. P., Pancoro, A., and Suhandono, S. (2015). Identification of *Pythium* and *Phytophthora* associated with durian (*Durio* sp.) in Indonesia: their molecular and morphological characteristics and distribution. *Asian Journal of Plant Pathology*. 9(2). 59-71.
- Scanu, B., Linaldeddu, B. T., Deidda, A., and Jung, T. (2015). Diversity of *Phytophthora* Species from Declining Mediterranean Maquis Vegetation, including Two New

- Species, *Phytophthora crassamura* and *P. ornamentata* sp. nov. *PLOS ONE*. 10(12). e0143234.
- Shen, C. Y., and Tsao, P. H. (1983). Sensitivity of *Phytophthora infestans* to hymexazol in selective media. *Transactions of the British Mycological Society*. 80(3). 567-570.
- Shen, G., Wang, Y. C., Zhang, W. L., and Zheng, X. B. (2005). Development of a PCR Assay for the Molecular Detection of *Phytophthora boehmeriae* in Infected Cotton. *Journal of Phytopathology*. 153(5). 291-296.
- Shirako, Y., and Ehara, Y. (1985). Composition of northern cereal mosaic virus and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay with anti-nucleocapsid serum. *Phytopathology*. 75(4). 453-457.
- Sopee, J., Sangchote, S., and Stevenson, W. R. (2012). Modified agar-based media for culturing *Phytophthora infestans*. *Phytoparasitica*. 40(3). 269-278.
- Takimoto, S. (1941). On the *Pythium* causing damping-off of seedling and fruit rot of cucumber. *Japanese Journal of Phytopathology*. 11(2). 89-91.
- Tooley, P. W., Hewings, A. D., and Falkenstein, K. F. (1989). Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans* *Phytopathology*. 79. 470 -474.
- Tsao, P. H., and Guy, S. O. (1977). Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora*-isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology*. 67. 796-801.
- Vasiri, A. (1996). Morphology and identification of *Phytophthora* species. In Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. (ed), *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society, APS Press.
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Sangeetha, P., and Thulaseedharan, A. (2013). Natural rubber producing plants: An overview. *African Journal of Biotechnology*. 12(12). 1297-1310.
- Verheye, W. (2010). Growth and production of rubber. In *Land use, land cover and soil sciences*. UNESCO-EOLSS Publishers.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., and Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Mycologia*. 98(3). 410-422.

- Wang, L., Zhang, J., Zhang, H., Qiu, D., and Guo, L. (2016). Two Novel Relative Double-Stranded RNA Mycoviruses Infecting *Fusarium poae* Strain SX63. *International journal of molecular sciences*. 17(5). 641.
- Waterhouse, G. M. (1963). Key to the species of Phytophthora de Barry Commonwealth Mycological Institute, England.
- White, J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor., J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *PCR - protocols and applications - a laboratory manual*. 315-322.
- Xiao, X., Cheng, J., Tang, J., Fu, Y., Jiang, D., Baker, T. S., Ghabrial, S. A., and Xie, J. (2014). A Novel Partitivirus That Confers Hypovirulence on Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Virology*. 88(17). 10120-10133.
- Xie, J., and Jiang, D. (2014). New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 52. 45-68.
- Yokoi, T., Takemoto, Y., Suzuki, M., Yamashita, S., and Hibi, T. (1999). The nucleotide sequence and genome organization of Sclerophthora macrospora virus B. *Virology*. 264(2). 344-349.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., Li, G., Yi, X., and Jiang, D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(4). 1452-1457.
- Zhan, F., Zhu, W., and Zhan, J. (2016). First Report of an RNA Virus in the Plant Pathogenic Oomycete *Phytophthora infestans* in China. *Plant Disease*. 100(6). 1253-1253.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2557). โรคเส้นดำ. *จดหมายข่าวส่งเสริมการเกษตร*. สำนักงานเกษตรอำเภอวังสะพุง.
- กรรณิการ์ ธีรวัฒนสุข. (2556). พฤกษศาสตร์และพันธุ์ยาง. *การจัดการสวนยางอย่างยั่งยืน*. สถาบันวิจัยยาง, กรมวิชาการเกษตร. 1-25.
- กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่. (2548). *เอกสารวิชาการ ยางพารา*. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, กรมพัฒนาที่ดิน.

- จำลอง จิตต์หาญ, บรรเลง จันทร์วาวาม, จุมพล ด้วงผดุง, ธนัท แอ้วสกุลทอง และ ธาณินท์ ทิมมะ.  
(2550). คู่มือการปลูก บำรุงรักษา และเก็บเกี่ยวผลผลิตยางพารา. *คู่มือการปลูก บำรุงรักษา  
และเก็บเกี่ยวผลผลิตยางพาราขององค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ ฉบับปี พ.ศ. 2550.* 1-81.
- จำศักดิ์ ธงฤทธิ์. (2557). โรคเส้นดำยางพารา. *จดหมายข่าวส่งเสริมการเกษตร. สำนักงานเกษตร  
อำเภอวังสะพุง.*
- นันทา เจริญเชาว์, เมธินี รัตตสาร, and นิลุบล บุญหวังช่วย. (2546). ปฏิบัติการตอบสนองของยางพารา  
ต่อสปอร์และท็อกซินจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. *เอกสารการประชุมวิชาการการ  
อารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6.* 973-981.
- บุญยฤทธิ์ จันทร์ทิมล. (2554). อาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เพียวว์ ร่มรื่นสุขารมย์. (2550). โรคและศัตรูยางพารา. *เอกสารประกอบการฝึกอบรมพนักงานบรรจุ  
ใหม่. สำนักกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางจังหวัดกระบี่.* 139-167.
- เพียวว์ ร่มรื่นสุขารมย์. (2556). การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยางพารา. *การจัดการสวนยาง  
อย่างยั่งยืน. สถาบันวิจัยยาง, กรมวิชาการเกษตร.* 95-111.
- พิชิต สฟโชค, พิศมัย จันทร์พามา, and พันัส แพชนะ. (2550). การกรีดยางและการใช้สารเคมีเร่งน้ำยาง.  
*เอกสารประกอบการฝึกอบรมพนักงานบรรจุใหม่. สำนักกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง  
จังหวัดกระบี่.* 113-138.
- วิจัย รักรักษาศาสตร์. (2551). ไฟทอปธอรา. น. 351. ราวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2,  
กรุงเทพมหานคร. CHULALONGKORN UNIVERSITY
- ศุภมิตร ลิ้มปิชัย. (2550). เทคโนโลยีการปลูกสร้างสวนยาง. *เอกสารประกอบการฝึกอบรมพนักงาน  
บรรจุใหม่. สำนักกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางจังหวัดกระบี่.* 20-32.
- สถาบันวิจัยยาง. (2555) ข้อมูลวิชาการยางพารา 2555. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและ  
สหกรณ์.
- สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2558). ยางพารา. *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม  
ปี 2559.* 77-86.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 (Jeffers and Martin, 1986)

#### Clarified V8

น้ำผักผลไม้ V8 รสดั้งเดิม	340	มิลลิลิตร
Calcium carbonate (CaCO <sub>3</sub> )	3.4	กรัม

ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ -20 °C

#### อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8

Clarified V8	50	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	950	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนผสมต่างๆเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะไม่เติม Agar

#### อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 20% V8

Clarified V8	200	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	800	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนผสมต่างๆเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่เติม Agar

### อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ปริมาตร 1 ลิตร ตามขั้นตอนในข้อที่ 1 หลังจากอบฆ่าเชื้อรอให้เย็นแล้วจึงเติมสารเคมีและสารปฏิชีวนะต่อไปนี้

#### สารเคมีและสารปฏิชีวนะ

Ampicillin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร

ความเข้มข้น stock 1 g/10 ml <sup>a</sup>	2.5	มิลลิลิตร
--	-----	-----------

Rifamycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร

ความเข้มข้น stock 20 mg/ml <sup>b</sup>	0.5	ไมโครลิตร
---	-----	-----------

Pentachloronitrobenzene/Terraclor ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร

ความเข้มข้น stock 24% w/v	208	ไมโครลิตร
---------------------------	-----	-----------

Hymexazol ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร

ความเข้มข้น stock 30% w/v	139	ไมโครลิตร
---------------------------	-----	-----------

<sup>b</sup> Sodium ampicillin (0.1 กรัม/มิลลิลิตร)

Sodium ampicillin	1	กรัม
-------------------	---	------

น้ำปลอดประจุ	10	มิลลิลิตร
--------------	----	-----------

ละลาย sodium ampicillin ด้วยน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บให้ปลอดแสงที่อุณหภูมิ 4 °C



<sup>b</sup> Rifampicin (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

Rifampicin	300	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	15	มิลลิลิตร

ละลาย rifampicin ด้วยปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บให้ปลอดแสง  
ที่อุณหภูมิ 4 °C

## อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

PDB powder	24	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	ลิตร

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Black bean

ถั่วดำ	60	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
Agar	15	กรัม

แช่ถั่วดำในน้ำปลอดประจุ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำแช่ถั่วดำไว้ จากนั้นบดถั่วดำแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คั้นน้ำถั่วดำโดยใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนของเหลว นำน้ำที่ได้ทั้งหมดมารวมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุเป็น 1 ลิตร จากนั้นจึงเติมกลูโคสและ agar แล้วนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้เป็น 1 ลิตร เติม agar แล้วนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2X YT

Tryptone	16	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### น้ำ P3

น้ำจากแหล่งน้ำ	250	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	750	มิลลิลิตร

เก็บน้ำจากแหล่งน้ำที่สะอาด นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง ผสมกับน้ำปลอดประจุแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

#### DEPC-treated (RNase-free) water

Double deionized water	1	ลิตร
Diethyl pyrocarbonate	1	มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มทิ้งไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### Extraction buffer

Sorbitol	9.56	กรัม
Tris-HCl	1.82	กรัม
EDTA	0.22	กรัม
Sodium bisulfate	0.31	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ double deionized water (DDW) ให้เป็น 150 มิลลิลิตร เก็บบัพเฟอร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

#### Nuclei lysis buffer

Cetrimonium bromide	3.00	กรัม
Tris-HCl	3.64	กรัม
EDTA	2.19	กรัม
NaCl	17.53	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ double deionized water (DDW) ให้เป็น 150 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 5% w/v Sarkosyl

N-lauryl sarcosine	5	กรัม
--------------------	---	------

ผสมกับน้ำ double deionized water (DDW) 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 3 M Sodium acetate (pH 5.2)

Sodium acetate	24.61	กรัม
----------------	-------	------

ปรับ pH เป็น 5.2 ด้วย acetic acid glacial แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ double deionized water (DDW) ให้เป็น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### TE buffer

1M Tris (pH 8.0) (Stock solution)

Tris	7.82	กรัม
------	------	------

ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

0.5 M EDTA (pH 8.0) (Stock solution)

EDTA	9.3	กรัม
------	-----	------

ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำ stock ของสารทั้ง 2 มาผสมกันดังต่อไปนี้

1M Tris (pH 8.0)	0.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนิ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2X STE buffer containing 1% (w/v) SDS

4X STE buffer (Stock)

Tris-HCl	24.23	กรัม
NaCl	23.38	กรัม
EDTA	1.49	กรัม

ผสม tris และ NaCl เข้าด้วยกันแล้วปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นเติม EDTA คนให้ละลายจนหมดแล้วจึงปรับ pH เป็น 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนิ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อใช้ปรับความเข้มข้น 4X เป็น 2X STE โดยผสม 4X STE 500 มิลลิลิตรกับน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม SDS 10 กรัมลงใน 2X STE จากนั้นนิ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1X STE buffer

4X STE buffer	250	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	750	มิลลิลิตร

**1X STE buffer containing 15% (v/v) ethanol**

4X STE buffer	250	มิลลิลิตร
Ethanol	150	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	600	มิลลิลิตร

**2X Saline Sodium Citrate (SSC)**

NaCl	1.75	กรัม
Sodium citrate	0.88	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**10X DNase I buffer**

Tris-HCl	7.88	กรัม
MgCl <sub>2</sub>	119	มิลลิกรัม
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	36.76	มิลลิกรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วย nuclease-free water เป็น 50 มิลลิลิตร เก็บที่ อุณหภูมิ -20 °C

**0.1X SSC**

2X SSC	5	มิลลิลิตร
DEPC-treat water	95	มิลลิลิตร

**1 M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7.35	กรัม
Deionized water	50	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วย 0.45 µm disposable syringe filter แล้วเก็บที่ 4 °C

**1 M MgCl<sub>2</sub>**

MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.17	กรัม
Deionized water	50	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วย 0.45 µm disposable syringe filter แล้วเก็บที่ 4 °C

**MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> solution**

1 M CaCl <sub>2</sub>	2	มิลลิลิตร
1 M MgCl <sub>2</sub>	8	มิลลิลิตร
Deionized water	90	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วย 0.45 µm disposable syringe filter เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

**X-gal (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**

X-gal	50	มิลลิกรัม
N,N-dimethylformamide	1	มิลลิลิตร

**100 mM isopropylthio- $\beta$ -D-1-galactoside (IPTG)**

IPTG	119	มิลลิกรัม
Deionized water	10	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วย 0.45  $\mu$ m disposable syringe filter แล้วเก็บที่ -20 °C

**Lysis buffer สำหรับ Rapid size screening**

NaOH	0.2	กรัม
KCl	0.23	กรัม
0.5 M EDTA	0.5	มิลลิลิตร
SDS (Sigma, USA)	125	มิลลิกรัม
Sucrose (MERCK, USA)	5	กรัม
Bromophenol blue	25	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วย deionized water เป็น 50 มิลลิลิตรจากนั้นฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่ -20 °C

**10X TAE buffer**

Tris-base	48.4	กรัม
Acetic acid glacial	11.4	มิลลิลิตร
EDTA	3.7	กรัม
DEPC-treated water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.



**1X TAE buffer**

10X TAE	100	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	900	มิลลิลิตร

**10X TBE buffer**

Tris-base	48.4	กรัม
Boric acid	11.4	กรัม
EDTA	3.7	กรัม
Deionized water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

**0.8X TBE**

10X TBE buffer	80	มิลลิลิตร
Sterile deionized water	920	มิลลิลิตร

**0.5X TBE running buffer**

10X TBE buffer	50	มิลลิลิตร
Sterile deionized water	950	มิลลิลิตร

**1% agarose gel**

Agarose	0.5	กรัม
1X TAE หรือ 0.8X TAE	50	มิลลิลิตร

**Ethidium bromide solution (0.5  $\mu\text{l/ml}$ )**

Ethidium bromide	10	ไมโครลิตร
Sterile deionized water	190	มิลลิลิตร



## ภาคผนวก ค

### การเตรียม Competent cell

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เชื้อโคลนนิ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 15-20 นาที เมื่อมีค่าประมาณ 0.35 นำเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใส่ลงในกระบอกสำหรับปั่นเหวี่ยง แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย MgCl<sub>2</sub> - CaCl<sub>2</sub> (80mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) ที่แช่เย็นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยด้วยสารละลาย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 3.50 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม DMSO ปริมาตร 3.50 มิลลิลิตร และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาทีอีกครั้ง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อแล้วรีบนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

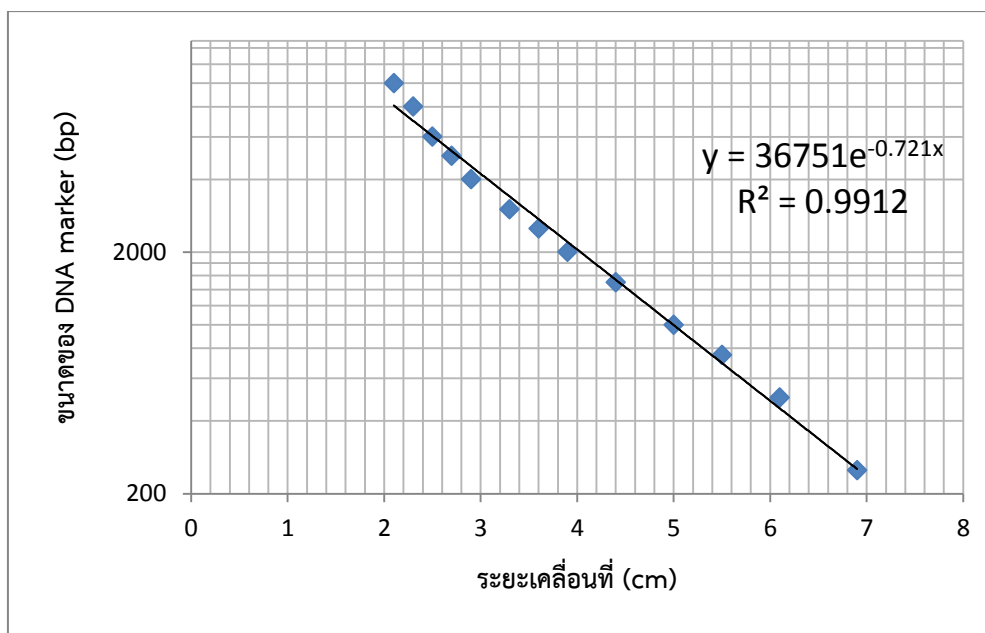
## ภาคผนวก ง

## ข้อมูลการทดลองเพิ่มเติม

## 1. การหาขนาดโดยประมาณของ dsRNA

ตารางที่ ง1 แสดงขนาดของ DNA marker และระยะเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนักร/ปริมาตร)

ระยะการเคลื่อนที่ (cm)	ขนาดของ DNA marker (bp)
2.1	10000
2.3	8000
2.5	6000
2.7	5000
2.9	4000
3.3	3000
3.6	2500
3.9	2000
4.4	1500
5.0	1000
5.5	750
6.1	500
6.9	250



รูปที่ ง1 กราฟหาขนาดของ DNA marker กับระยะเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ตารางที่ ง1 แสดงขนาดของแถบอาร์เอ็นเอไวรัสในไอโซเลท R152 และระยะเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ชิ้น dsRNA	ระยะการเคลื่อนที่ (cm)	ขนาดของอาร์เอ็นเอไวรัส (bp)
1	3.30	3403
2	3.50	2946
3	3.75	2460
4	4.60	1333

## 2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA

### cDNA โคลน ที่ 1

```
GCCCGTTGCGCCTTGGTGGGTACAACCTTCGCCCTACCTGCCCCCTCCACTATT
TCACATTGCTAGTCGCCTGCCATCTCATTCCAGTCGCTAACTCATCCATACCATAC
CTCGAC
```

รูปที่ ๓2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 1

### cDNA โคลน ที่ 2

```
CCGGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCTGACAAGGTCATTTAAACAAACG
ACTGCCAATCCCAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGATGGTATCTAATCATC
TTCGATCCCCTAACTTTGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGTAAATGCTTTCCGCC
TAAGCTCATCTTTCAGCGATCCAAGAATTTACCTCTGACGCTGAAATATGAATACCC
CCAACTGTCCCTATTAATCATTACCCTGGTGTGCAAACCAACAAAATAGACCACCAAG
GTCGTATCTTATTATTCCATGCTAATGTATTCAACGAGCAAACGCCTGCTTTAAACACT
CTAATTTTTTTCACAGTAAACGATGCAAGTCTGTTCAACCACCAACTTAATGGCAGAAA
AACATCCTCACAAAAAATGCCTCAAACATCCAGAGTACACACTTCACAGAAGCGGAC
CGGACGCTCAAAGCAGAAATCCAACACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACCTTTAATATA
CGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGATC
CTCGTTAAGGGATTTAAATTGTTCTCATTCCAATTGCCGACTCGAAGAGCCAGAGCA
TTGTTATTTATTGTCACTACCTCCCTGTGTGTCAGGATTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGC
CTTCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTAAGGCTCCCTCTCCGGAATCAAACCTAATTCC
CCGTTACCCGTTAATGCCATGGTAGGCCATATCCTACCATCCAAGCTGATAGGGCA
GAAACTCAATCGATTTATCGCGCAAAGCGCGATCCGCACAGTTATTGACTCAACA
CAATACCAGCCCGAAGACTGCATTGGTTTCAATCTAATAAATGCTACCCGCCGACAA
GCAGTTGGGTATTGATGCATGGATTAGCTGAAAATAATGACGTCAGAATTCTCAAGT
CGGGGAAATGTGGGCGGAACCCCAATTTGGTTAATTTTCAAAAACATTCAAAAATG
TATCCCGCCCTGGAAACAATAACCCCGGAAAAAGCGTTCTAAATTTGGAAAAAGGA
GAAGATTTGAGATTTTACAATTTTCCGGGGGCGCCTCTATTCCCTTTTTTCTGGGGGT
TTGCCCCCCCGGTTTTGGTCGCCCCCAAAAACACTGGGGGAGAAAAAAAAGCTGGAA
ATAAATTTGGTGGGCCCAAGGGGGTAATTCCAAACGAATTTCAACACCGGGCATA
ATCCTTGAAGGTTTTCCCAAAAAAGATTTCCAAGTGAGGGAATCTTAAAATATC
TGGGATATGGGCGGCGAGGTTTACCATTTTTGACTGGGAGCCAGCAAATTTGGGGC
CGCAACCCTTTATTCTATAAAAAATAGGTGGAGGTACCCAACCAACAAAATCACATATA
AGGAAGGGGGACAAAATTGAAAAGGTGCGGCACAAAGTTAAAGG
```

รูปที่ ๓3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 2

## cDNA โคลน ที่ 3

```
GCAAACCAACAAAATAGACCACCAAGGTCGTATCTTATTATTCCATGCTAATGTA
TTCAACGAGCAAACGCCTGCTTTAAACACTCTAATTTTTTCACAGTAAACGATGC
AAGTCTGTTCAACCACCAACTTAATGGCAGAAAAACATCCTCACAAAAAATGCCT
CAAACATCCAGAGTACACACTTTCACAGAAGCGGACCGGACGCTCAAAGCAGAA
ATCCAAC TACGAGCTTTTTAACTGCAACAAC TTTAATATACGCTATTGGAGCTGG
AATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGATCCTCGTTAAGGG
ATTTAAATTGTTCTCATTCCAATTGCCGACTCGAAGAGCCAGAGCATTGTTATT
TATTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGCCTTC
CTTGATGTGGTAGCCGTTTCTAAGGCTCCCTCTCCGGAATCAAACCTAATTCC
CCGTTACCCGTTAATGCCATGGTAGGCCATATCCTACCATCAAAGCTGATAGG
GCAGAAACTCAATCGATTTATCGCGCAAAAGCGCGATCCGCACAGTTATTATGA
CTCAACACAATACCAGCCCGAAGACTGCATTGGTTTCAATCTAATAAATGCTACC
CGCCGACAAGCAGTTGGGTATTGATGCATGTATTAGCT
```

รูปที่ ๓4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 3

## cDNA โคลน ที่ 4

```
CCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATCAATACCCAAGTCTTGTCGGGCG
GGTAGCATTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTATTGTGTTGA
GTCATAATAACTGTGCGGATCGCGCTTTTGC GCGATAAATCGATTGAGTTTCTGC
CCTATCAGCTTTGGATGGTAGGATATGGGCCTACCATGGCATTAAACGGGTAACG
GGGAATTAGGGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTTAGAAACGGCTACCACATCC
AAGGAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
CAATAAATAACAATGCTCTGGCTCTTCGAGTCCGGCAATTGGAATGAGAACTTA
GCACACACATTAACATGCCATCGTGCTAACGGCAAAGTATAAGTAACTCGCTT
CAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTTATTCCGGCAGGTGAGTTGTTACACACTC
CTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTCTAAATGAACCAACAC
CTTTTATGGGATCTAGGTGAGCGGGTATTTTGGCACTTTAACTTTGCGTTCCGGAT
CATCCCGCATCGCCAGACGAGCTTACCCCGTATGGCCACTAGCAACTTGATATT
CACATCCGCAAGTTCAATTAAGAAACCTGCAGGTCTTACAGATTTAAAGTTTGA
GAATAGGTCAAGGAAGTTTCTTCCCGAGTCTCTAATCATTGCTTTACCTCAT
AAAAC TATCGTAA
```

รูปที่ ๓5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 4

## cDNA โคลน ที่ 5

```
GCCAAACTCCCCACCTGACGATGTCTTCCACGTAGCTCACCCGAGAATGAACCC
GAGCTTCCAACCAGAACTGGGCGACCGCGAGGCCGGCCAGATGCTACATTATG
GTATAAGTAAAACAACATTAGAAGTAGTGGTATTTCACTTTTGGCAGAGCCTCC
CACTTATCCTACACCTCCTAAGTCATTTCAACAACGTCAGACTAGAGTCAAGCTCA
ACAGGGTCTTCTTCCCCGCTGATTATTCCAAGCCCGTCCCTTGGCTGTGGGTT
CGCT
```

รูปที่ ๖ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 5

## cDNA โคลน ที่ 6

```
TAATCATTGCTTTACCTCATAAACTATCGTAAATAAGTTGCTGCTATCCTAAG
GGAAATTTGCGAGGGAACCAGCTACTTGATGGTTGATTAGTCTTTCGCCCTAT
ACCCAAGTTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAATCGCTACGAGCTCCACCAGA
GTTTCCCCTGGCTTACCCTACTCAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTACCAAC
ATATGTGCTCATACTCAAATCTTTCACCACGAAGGTTTCATGATCGGTGCGATAGTG
CCACCCCTGACGAGCAAAGGTTTCTACCTCAGGCAGCATACTGCCCTTACT
TTCATTTGCGCTCGGGTTTCCACACCCTAACACTTGC
```

รูปที่ ๗ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 6

## cDNA โคลน ที่ 7

```
CACCTTCTCTAAATGGCGAGGTTAAAAAAGTTCCCATAAATCCACTCGCAAT
AAAGCAAACGGACTCACAGTCCCAATTTTTACCGAGTCATTCAATCGGTAGG
TGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAATGCAAGCTGATG
ACTTGCCTTACTAGGAATTCCTCGTTCAAGATGGAAAATTGCAACCATCTATC
CCTAGCACGATGCGCATTCAAAGATTACCCAGACCTGTCGATCAAGGTTGTA
TACTCGTTGAACGCATCAGTGTAGCGCGGTGCGGCCAGAACATCTAAGGGC
ATCACAGACCTGTTATTGCCTCCAACCTCCTTTGGTTTGATTACCCAAAAGTCCC
TCTAAGAAGTCCACAACCTACACAAAGTGTAAGCGGAACTATTTAGCACGCGG
AGGTCTCGTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAA
CGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATC
CTTACTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCCGTGTGCGTCAAATTAAGCCGCA
GGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCG
ACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGAT
```

รูปที่ ๘ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 7



## cDNA โคลน ที่ 8

```

CCAAGTTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAATCGCTACGAGCTTCCACCAGAGT
TTCCCCTGGCTTACCCTACTCAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTACCAACATA
TGTGCTCATACTCAAATCTTTCACCACGAAGGTTTCATGATCGGTCGATAGTGCCA
CCCCTGACGAGCAAAGGTTTCTACCTCAGGCAGCATACACTGCCCTTACTTTC
ATTTGCGCTCGGGTTTCCACACCCTAACACTTGC

```

รูปที่ ง9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 8

## cDNA โคลน ที่ 9

```

CTCCACTTCAGTCTTCAAAGTTCGCATTTGAATATTTGCTACTACCACCAAGATCT
GCACTAAAGGCTGTTTCACTCAGGCTCAGCCAAGAGCTTCCTAACACCTTCCAC
GCCCTCCTACTCATTAGCACACACATTAACATGCCATCGTGCTAACGGCAAAGT
ATAAGTAACTCGCTTCAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTCATTCGGCAGGTG
AGTTGTTACACACTCCTTAGCGGATTCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTC
TAAATGAACCAACACCTTTTATGGGATCTAGGTGAGCGGGTATTTTGGCACTTTA
ACTTTGCGTTCGGATCATCCCGCATCGCCAGACGAGCTTACCCCGTATGGCCCAC
TAGCAACTTGATATTCACATCCGCAAGTTCAATTAAGAAACCTGCAGGTCTTACA
GATTTAAAGTTTGAGAATAGGTCAAGGAAGTTTCTTCCCGAGTCCTCTAATCAT
TCGCTTTACCTCATAAACTATCGTAAATAAGTTGCTGCTATCCTAA

```

รูปที่ ง10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA โคลน ที่ 9

### 3. ไฟโทพธอร์จากฐานข้อมูล NCBI ที่นำมาวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ตารางที่ ง1 แสดงขนาดของ DNA marker และระยะเคลื่อนที่บน อะกาโรสเจล 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

Genbank database	Accession no.
<i>Phytophthora botryosa</i> isolate LFDL 1.1.1	KC247900.1
<i>Phytophthora citrophthora</i> isolate SK-22 18S	KU934210.1
<i>Phytophthora meadii</i> isolate BSQT 87.3 18S	KC247920.1
<i>Phytophthora colocasiae</i> isolate KH31	JN661144.1
<i>Phytophthora nicotianae</i>	HQ433333.1
<i>Phytophthora infestans</i> clone WPC6166B546	FJ801899.1
<i>Phytophthora sojae</i> strain: IFO31016	AB217685.1
<i>Phytophthora capsici</i> strain P10735	JN618708.1
<i>Phytophthora palmivora</i> strain P10422	JN618704.1
<i>Phytophthora citricola</i> strain P1815	GU191218.1
<i>Phytophthora cactorum</i> isolate 232	EU194410.1
<i>Phytophthora phaseoli</i> strain CBS556.88	AY770730.1
<i>Phytophthora megasperma</i> strain BBA 65177	KJ755116.1
<i>Phytophthora pinifolia</i> strain CMW26670	EU725809.1
<i>Phytophthora heveae</i> isolate: P27	LC192811.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	KP749196.1

## 4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท R152 บริเวณ ITS ยีนด้วยไพรเมอร์ A2/I2

## โคลน ที่ 1

```

CTTTCCACGTGAACCGTTTCAAACCCTCTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCATT
TGATGAGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTA
GCTTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAG
TCTCTGCTTCTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGACA
TCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCACT
GAGTCATCGAAATTTGAACGCATATCGCACTTCGGGTTAGTCTGGGAGTA
TGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCTCCTTCCGAGTAGTCG
GTGGCGGATGTGCTAGATGTGAAGTGTGACGGTTTTTGTGCCTTCGGGCCGT
GGATGCGAGTCTCTGAAATGTATTCAACTGTACCTCTCTTTGCTCGAAAAGCG
TGGTGTGCTGGTTGTGGAGGCTGCTGACTCGGCCAGTCGGCGACCGGTCTGT
ATGTTGCGCCGTTTAAAGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG
CTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCATGGTGTGGCGTGATGGGCTGGTGA
ACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTAACGAATAGGCTTTGCTGCTGCGAAGTAG
AGTGGCCGCTTCGCCTGTTGAGTGTGATCCATTAAAGGAACTTCAACACCCC
CAAGAGAGTGCATCTCAATTGGACATGATATC

```

รูปที่ ๑11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท R152 บริเวณ ITS ยีน clone ที่ 1

## โคลน ที่ 2

```

ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCGTTTT
GCTGAGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGC
TTTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTC
TGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGAT
GAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCACTGAGTC
ATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCGGGTTAGTCTGGGAGTATGCCTGT
ATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCTTTCTCCTTCCGTGTAGTCCGTGGAGGA
TGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGTGGTTTTTGTGCCTTCGGGCCGTGGCCGCGA
GTCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTGC
TGGTTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGG
CGTTTAAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGC
GCTTATTGTATGCTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGT
GTGTGGCTTGGCTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCCGCTTC
GGCTGTGAGTGTGATCCATTTTGGGAACTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGC
ATCTCAATTGGACCTGATATC

```

รูปที่ ๑12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท R152 บริเวณ ITS ยีน โคลน ที่ 2

## โคลน ที่ 3

```

ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTG
GCGTTTTGCTGAGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGT
CTGGCTAGTAGCTTTTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAATACTGATTATAC
TGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAG
TGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCCAACTGCGAT
ACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGC
ATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCC
GTACATCAAGCTTGGCTTTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATGT
GCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTTTGTGCCTTCGGGCCGTGGCT
GCGAGTCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGC
GTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACC
GTTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGTGTTTCGATTTCGCGGTAT
GTTTGGCTTCGGCTGAGCAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTG
GCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAA
TCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGTG
TCGATCCATTTTGGGAAATTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGTGCATCTCAA
TTGGACCTGATATC

```

รูปที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท R152 บริเวณ ITS ยีน โคลน ที่ 3



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกุลนันท์ รุ่งนาไร่ เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2535 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2556 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมการนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference : TSB 2015 ในหัวข้อเรื่อง “A double-stranded RNA Virus of Phytophthora sp. Isolated from Para Rubber in Rayong Province, Thailand”

