โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora meadii* จากต้นยางพารา

Morphological and molecular identification of *Phytophthora meadii* from para rubber tree

ชื่อนิสิต นางสาวเบญญาภา รักท้วม **เลขประจำตัว** 5832331123

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora meadii* จากต้นยางพารา
โดย	นางสาวเบญญาภา รักท้วม รหัสนิสิต 5832331123
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยา ของ *Phytophthora meadii* จากต้นยางพารา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาวเบญญาภา รักท้วม

รหัสประจำตัว 5832331123

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ	การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora meadii* จากต้นยางพารา
นิสิตผู้เสนอโครงการ	นางสาวเบญญาภา รักท้วม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

การคัดแยกรา *Phytophthora meadii* จากไอโซเลตที่มี *Phytophthora* สปีชี่ย์อื่นผสมอยู่ซึ่งมาจากจังหวัดตราด และ ระยอง โดยแยกได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปแบบโคโลนี แบบกระจาย ลักษณะซูโอสปอร์แรงเจียมมี papillum ชัดเจน มีรูปร่างแบบ obpyriform ขนาด ยาว 39.42 ถึง 47.69 ไมโครเมตร (เฉลี่ย 43.56 ไมโครเมตร) กว้าง 27.95 ถึง 31.33 ไมโครเมตร (เฉลี่ย 29.64 ไมโครเมตร) อัตราส่วนความยาวและความกว้าง 1.41-1.59 ความง่ายในการหลุดจากก้านชูสปอร์ (caducity) พบว่าเป็นแบบ caducus มี pedicel ยาว 14.67 ถึง 16.33 ไมโครเมตร (เฉลี่ย 15.56 ไมโครเมตร) การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้วิธี Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) เลือกใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ ITS1/ITS4 และ A2/I2 พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตอยู่ในจีนัส *Phytophthora* หลังยืนยันด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล สร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ neighbor joining tree พบว่ามีความคล้ายกับ *P. meadii* และ *Phytophthora colocasiae* ซึ่งอยู่ใน clade 2a แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาคาดว่าทั้ง 3 ไอโซเลตเป็นรา *P. meadii* นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเจริญของรา *P. meadii* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าราสามารถเจริญได้ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเจริญอยู่ที่ 10.99-14.32 มิลลิเมตรต่อวัน และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 7 และ 37 องศาเซลเซียส การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคโดยวิธี Detached leaf assay ด้วยซูโอสปอร์ พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในใบยางพารา

TITILE	Morphological and molecular identification of *Phytophthora meadii* from para rubber tree
INVESTIGATOR	Miss Benyapa Ruktuam
ADVISOR	Dr. Thanyanuch Kriangkripipat
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University

This study identify *P. meadii* from laboratory collections of *Phytophthora* infecting para rubber tree from Trat and Rayong Provinces, Thailand. Three isolates named L116-1-1, 77-1-2-2 and 77-1-2-4 were studied. Colony patterns of all isolates were stellate The sporangia were papillate with obpyriform shape, 39.42 to 47.69 µm long (average 43.74) x 27.95 to 31.33 µm wide (average 28.99 µm) and length:width ratio was 1.41-1.59 and caducus (pedicel is 14.67 to 16.33 µm). Molecular study using Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) with ITS1 / ITS4 primers specific to fungi and fungus-like organism and A2 / I2 primers specific to the genus *Phytophthora* found that all 3 isolates belong to genus *Phytophthora* . Phylogenetic tree using nucleotide sequence of ITS region showed that all 3 isolates were closely related to *P. meadii* and *Phytophthora colocasiae* of clade 2a. However, combining with morphology, the 3 isolates were identified as *P. meadii*. The 3 isolates grew best 28^{o}C. at the rate of 10.99-14.32 mm/day. Study on pathogenesis using Detached leaf assay by zoospore infection showed that all 3 isolates could infect the rubber leaves.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ทางผู้จัดทำโครงการขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงาน รวมถึงให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับผู้วิจัย

ขอขอบคุณทุนเพิ่มศักยภาพส่วนงานในด้านการวิจัยที่ให้การสนับสนุนการทำศึกษาครั้งนี้

ขอบพระคุณคุณนางสาววิรัชนันท์ วุฒาและนางสาววนัชพร หะขุนทด ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และแนะนำความรู้อันเป็นประโยชน์ รวมไปถึงกำลังใจในการทำงานจนงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอบคุณเพื่อน ๆ จุลชีววิทยารุ่น 42 ที่ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจให้กันตลอดภาคการศึกษา

ขอบคุณห้อง 2019 ที่เป็นทั้งห้องทำงานและห้องพักทำให้ได้พบปะเพื่อน ๆ

สุดท้ายขอบพระคุณบิดา มารดาที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ อย่างและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

เบญญาภา รักท้วม

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญกราฟ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง	6
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	45

สารบัญกราฟ

เรื่อง หน้า

กราฟที่ 1 แสดงการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 30

กราฟที่ 2 แสดงการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 30

กราฟที่ 3 แสดงอัตราการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 31

สารบัญตาราง

เรื่อง หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงราในวงศ์ *Phytophthora* ที่ใช้ในการทดลองและสถานที่เก็บตัวอย่าง 11

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 13

ตารางที่ 3.3 ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 14

ตารางที่ 3.4 ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 14

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 15

ตารางที่ 3.6 ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 16

ตารางที่ 3.7 ไพรเมอร์ A2 และ I2 16

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็น *Phytophthora meadii* 22

ตารางที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 29
ของวันที่ 1-5

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1.1 วงจรชีวิตของ *Phytophthora infestans*	2
ภาพที่ 1.2 รูปร่างของอับสปอร์	2
ภาพที่ 1.3 ลักษณะของ papillation	3
ภาพที่ 1.4 ลักษณะของก้านชูอับสปอร์	3
ภาพที่ 1.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Nested-PCR	4
ภาพที่ 4.1 ภาพรูปแบบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 หลังจากบ่ม 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	20
ภาพที่ 4.2 ไอโซเลต L116-1-1 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	23
ภาพที่ 4.3 ไอโซเลต 77-1-2-2 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	23
ภาพที่ 4.4 ไอโซเลต 77-1-2-4 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	24
ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงก้านชูซูโอสปอร์แรงเจียม(pedicel) ไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า	24
ภาพที่ 4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	25
ภาพที่ 4.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2	26
ภาพที่ 4.8 การตรวจสอบการโคลนโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2	27
ภาพที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้แบบ neighbor joining tree	28
ภาพที่ 4.10 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 0 ชั่วโมง	32
ภาพที่ 4.11 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 16 ชั่วโมง	33
ภาพที่ 4.12 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 24 ชั่วโมง	34
ภาพที่ 4.13 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 40 ชั่วโมง	35
ภาพที่ 4.14 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 46 ชั่วโมง	36
ภาพที่ 4.15 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 62 ชั่วโมง	37
ภาพที่ 4.16 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 86 ชั่วโมง	38
ภาพที่ 4.17 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลตต่าง ๆ ที่ 110 ชั่วโมง	39
ภาพที่ 4.18 แสดงการทดสอบ Koch's postulate	40

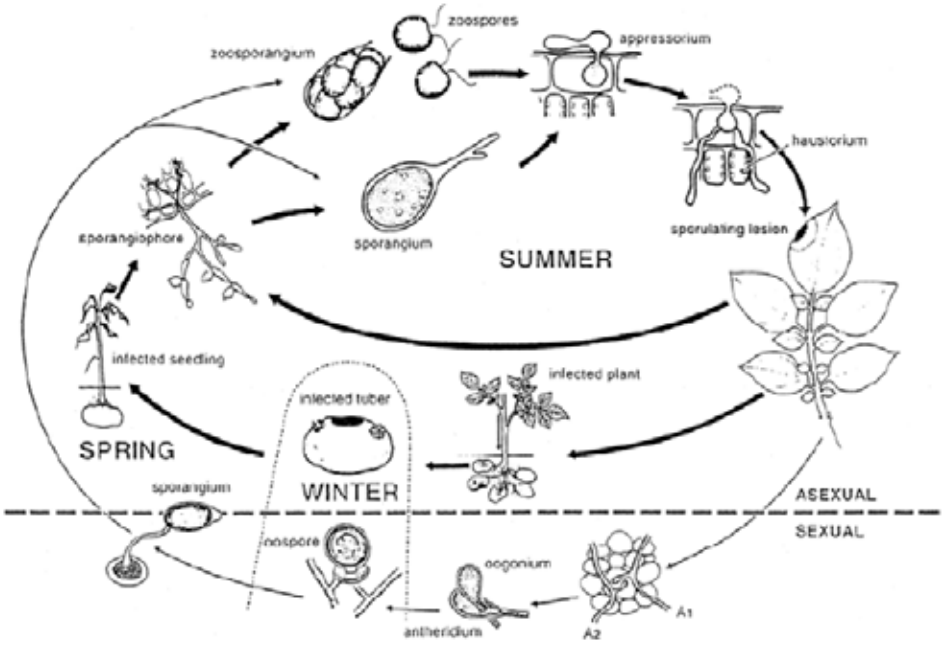
บทที่ 1
บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*; para rubber) เป็นพืชที่ให้น้ำยางมากที่สุดในบรรดาพืชที่ให้น้ำยาง 12,500 ชนิด เป็นไม้ยืนต้นซึ่งมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แต่ปัจจุบันทวีปเอเชียเป็นแหล่งที่ปลูกยางพารามากที่สุด และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งทำรายได้ให้แก่เกษตรกรไทยอย่างมหาศาล โดยมีการปลูกในภาคใต้มากที่สุด รองลงมาคือภาคตะวันออก (อโนทัย งานทวี, 2538)

โรคของยางพาราที่เกิดขึ้นรุนแรงในประเทศไทย คือซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วง (leaf fall) และโรคเส้นดำ (black stripe) ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและเป็นอันตรายแก่ต้นยางพารามากที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย เพราะทำให้ผลผลิตยางลดลงประมาณร้อยละ 30-50 เกิดจากเชื้อราในกลุ่มไฟทอฟธอรา (Phytophthora) โดยที่เชื้อรา *Phytophthora meadii* ก็เป็นราสายพันธุ์หนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา (Chee 1969)

รา genus *Phytophthora* เป็น 1 ใน 9 genera ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ในกลุ่ม Oomycetes ซึ่งเป็นพวกที่มีลักษณะรูปร่าง และการเจริญคล้ายรา (fungus-like) และถูกกำหนดให้เป็นพวก Stramenopiles ซึ่งเป็นพวกที่สร้างซูโอสปอร์ (zoospores) มี 2 แฟลกเจลลาที่มีความยาวไม่เท่ากัน การสร้างซูโอสปอร์ของ *Phytophthora* เกิดจากการแบ่งตัวของไซโทพลาซึมภายในอับสปอร์ (sporangia) ซูโอสปอร์ดังกล่าวไม่มีผนังเซลล์แต่มีเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อซูโอสปอร์ว่ายน้ำ หรือเคลื่อนที่ไปเจอพืชอาศัยจะปลดแฟลกเจลลาทิ้งและเข้าเกราะ (encyst) พร้อมกับมีการสร้างผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสทันที สปอร์ดังกล่าวพร้อมที่จะงอกเส้นใยเข้าทำลายพืชโดยตรง (Amornrat Poopaibool 2003)

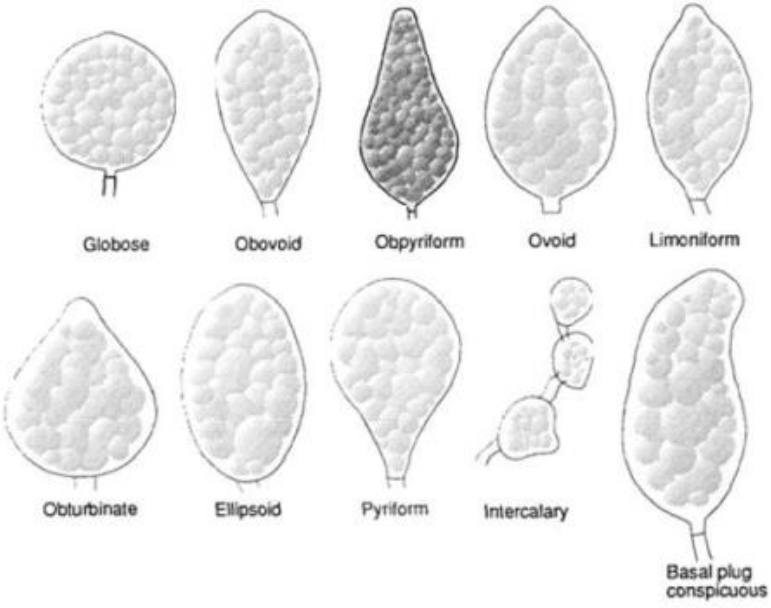
ในส่วนของวงจรชีวิตมีช่วงที่เป็น diploid เด่นซึ่งเป็นช่วงที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งสามารถสร้าง asexual spore ได้ถึงสามแบบคือ asexual sporangia ที่สามารถเจริญเป็นเส้นใย ได้โดยตรงหรือเปลี่ยนไปสร้าง zoospore แทนซึ่งจะมี encystment ก่อนจะสร้างเส้นใยเจริญ และในบาง สปีชีส์สามารถสร้าง chlamydospore เพื่อความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นอากาศหนาวได้ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้าง oospore ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้เช่นเดียวกับ chlamydospore (Drenth และ Sendall 2001)



(Drenth และ Sendall 2001)

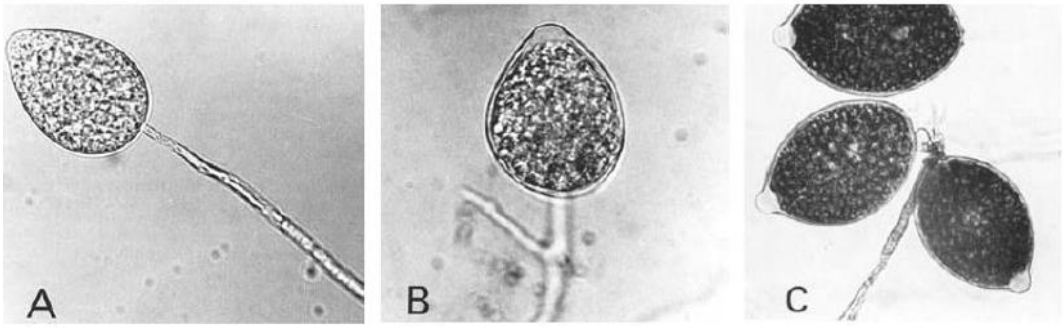
ภาพที่ 1.1 วงจรชีวิตของ *Phytophthora infestans*

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Phytophthora* เพื่อใช้ในการจัดจำแนก สามารถศึกษาได้จากหลายอย่าง เช่น รูปร่างอับสปอร์ ดังแสดงในภาพที่ 1.2 ลักษณะของ papilla ดังแสดงในภาพที่ 1.3 ลักษณะของก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ดังแสดงในภาพที่ 1.4 และ การสร้าง chlamydospore เป็นต้น



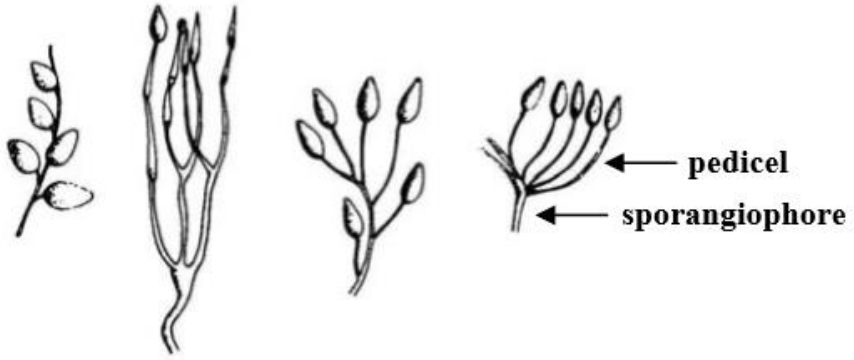
(Drenth และ Sendall 2001)

ภาพที่ 1.2 รูปร่างของอับสปอร์



(Drenth และ Sendall 2001)

ภาพที่ 1.3 ลักษณะของอับสปอร์แบบ non-papillatlate (A), semi-papillate (B) และ papillate (C)



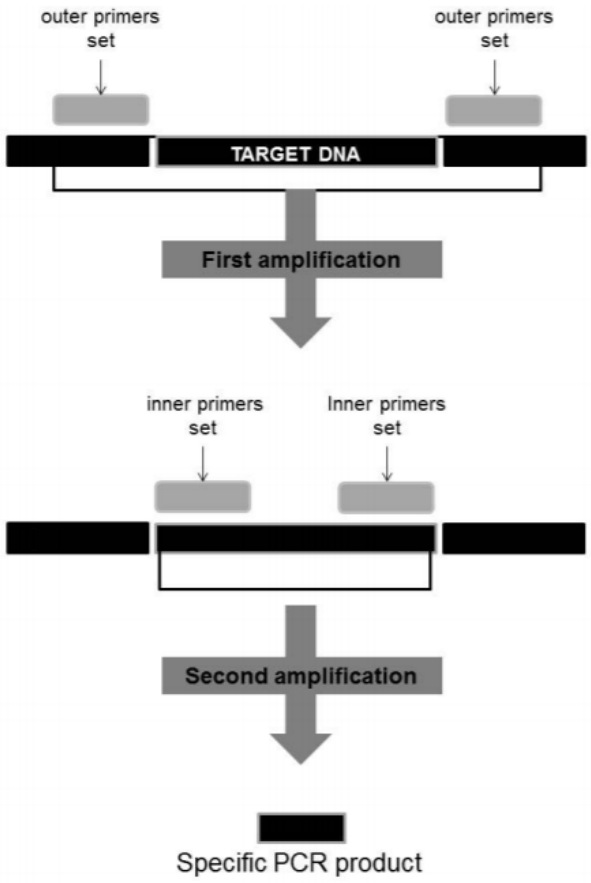
Simple sympodium (left) **Compound sympodia** (middle)
Umbellate sympodium (right)

(Drenth และ Sendall 2001)

ภาพที่ 1.4 ลักษณะของก้านชูอับสปอร์

นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีทางการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล หรือ อณูชีววิทยา เพื่อช่วยในการจัดจำแนกทำให้ผลว่าเป็นวงศ์อะไร เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) แบบ nested-PCR ซึ่งเป็นวิธีเพิ่มสารพันธุกรรมในบริเวณตำแหน่งยีนที่ต้องการซึ่งมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ต้องการ 2 คู่ ไพรเมอร์คู่แรกจะจับกับบริเวณรอบนอกของตำแหน่งที่สนใจ เมื่อผ่านการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์คู่แรกแล้ว ใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองซึ่งจะจับกับตำแหน่งที่ต้องการที่อยู่บนผลิตภัณฑ์จากไพรเมอร์แรก ทำให้เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณที่ ต้องการได้อย่างแม่นยำมากขึ้น และลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะออกไปในการใช้ไพรเมอร์คู่แรก ในการจัดจำแนก *Phytophthora* นี้ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ คู่แรก ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตใน กลุ่มราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในช่วง 870-900 bp

(White et al. 1990) และ ไพรเมอร์คู่ที่สองคือ I2 และ A2 ที่มีความจำเพาะต่อ *Phytophthora* ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในช่วง 752-832 bp (Drenth et al. 2006) ในงานวิจัยนี้ใช้ 1kb plus DNA ladder เป็น marker ใช้ *Phytophthora* sp. เป็นตัวแปรควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้น้ำ DI เป็นตัวแปรควบคุมที่ให้ผลลบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)



(Ziembińska-Buczyńska, Wiszniowski และ Ciesielski 2014)

ภาพที่ 1.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Nested-PCR

และเพื่อสามารถระบุสปีชีส์ที่แน่ชัดการหาลำดับสารพันธุกรรม จากยีนต่าง ๆ ร่วมด้วยซึ่งยีนที่นิยมใช้ในการระบุสปีชีส์ของ *Phytophthora* ได้แก่ cytochrome-c oxidase 1 (cox1), internal transcribed spacer region (ITS), 60S ribosomal protein L10, beta-tubulin (β-tub), elongation factor 1 alpha, enolase, heat shock protein 90, 28S ribosomal DNA, และ tigA gene fusion protein (tigA) โดยยีน cox1 เหมาะสำหรับการหาลำดับสารพันธุกรรมของ *Phytophthora* clade 2, β-tub เหมาะกับ *Phytophthora* clade 1 และ tigA เหมาะกับ *Phytophthora* clades 7 และ 8 ในการระบุสปีชีย์ที่แน่ชัดควรใช้ยีนสองยีนหรือมากกว่านั้นเนื่องจากใน clade เดียวกันมีความใกล้ชิดกันมาก (Yang and Hong

2018) โดยการหาลำดับสารพันธุกรรมเริ่มแรกควรใช้บริเวณ ITS เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์จับ ITS6/ITS4 ซึ่งเหมาะสมในการใช้ระบุวงศ์ว่าเป็น *Phytophthora* (Martin, Blair and Coffey 2014)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาสัณฐานวิทยาและอนุพันธุศาสตร์ของ *Phytophthora meadii* ด้วยการศึกษา ลักษณะโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่าง ๆ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และการก่อโรคบนใบยางพารา

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระดาษทิชชู

2. กรรไกร

3. กรวยกรองแก้ว

4. กระบอกตวงปริมาตร 500 มิลลิลิตร

5. กระบอกตวงปริมาตร มิลลิลิตร

6. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Steromicroscope) รุ่น SZ-PT ของบริษัท Olympus (ประเทศญี่ปุ่น)

7. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus (ประเทศญี่ปุ่น)

8. เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (Hook)

9. ขวดดูแรน (Durans) ขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Schott (ประเทศเยอรมัน)

10. ขวดพลาสติกสำหรับการปั่นตกตะกอน

11. ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex (ประเทศเยอรมัน)

12. คีมคีบ (Forceps)

13. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova2300 ของบริษัท NewBrunswick Scientific (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

14. μCuvette รุ่น G1.0 ของบริษัท Eppendorf

15. เครื่องชั่งไฟฟ้า รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo (ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

16. เครื่องชั่งไฟฟ้า รุ่น PG2002-S ของบริษัท Mettler Toledo (ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

17. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ของบริษัท Kokusan (ประเทศญี่ปุ่น)

18. เครื่องปั่นตกตะกอน (Centrifuge) ขนาดใหญ่

19. เครื่องปั่นตกตะกอนแบบตั้งโต๊ะ (Micro-Centrifuge) รุ่น WiseSpin CF-10 ของบริษัท DAIHAN Scientific (ประเทศเกาหลี)
20. เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixture) รุ่น VM-10 ของบริษัท DAIHAN Scientific (ประเทศเกาหลี)
21. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) รุ่น T100 Thermal Cycler ของบริษัท BIO-RAD (ประเทศไทย)
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle)
23. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop)
24. เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel Documentation) ของบริษัท Bio-Rad (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
25. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ของบริษัท Greiner bio-one (ประเทศไทย)
26. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis System) รุ่น Minis-150 ของบริษัท Major Science (ประเทศไต้หวัน)
27. ช้อนตักสาร
28. ตะเกียงแอลกอฮอล์
29. ตู้แช่แข็งจุดเยือกต่ำ (Deep Freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสของบริษัท SANYO (ประเทศญี่ปุ่น)
30. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Panasonic
31. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi
32. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) ของบริษัท BossTech (ประเทศอังกฤษ)
33. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น Clreanmodel V.6 ของบริษัท Lab Service Ltd., Part (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
34. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven) ของบริษัท Memmert (ประเทศเยอรมัน)
35. ถุงพลาสติกชนิดทนร้อน
36. ถุงมือยาง

37. ทิปปิเปต (Pipette Tips) ขนาด 10 ไมโครลิตร ของบริษัท Neptune

38. ทิปปิเปต (Pipette Tips) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Neptune

39. ทิปปิเปต (Pipette Tips) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Bioline

40. แท่งแก้วกลวงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

41. บีกเกอร์ (Beakers) ขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex (ประเทศเยอรมัน)

42. แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil)

43. แผ่นปิดสไลด์ (Coverslip) ขนาด 22x22 มิลลิเมตร ของบริษัท Menzel-Glaser

44. พาราฟิล์ม (Parafilm)

45. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2.5 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

46. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

47. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

48. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf North America (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

49. ไม้บรรทัด

50. ลูป (Loop)

51. สไลด์ (Slide)

52. สำลี

53. หนังยาง

54. หลอดเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Tubes)

55. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุด PureLink™ Quick Gel Extraction Kit
    1.1 Wash Buffer (W1)
    1.2 Elution Buffer (E5)
2. ชุด TA Cloning Vector
    2.1 Ligation Buffer A
    2.2 Ligation Buffer B
    2.3 T&A™ Cloning Vector
    2.4 yT_4 DNA Ligase
3. ชุด BioFACTTM Plasmid Mini Prep Kit (Ver.2.0)
    3.1 B1 : Blue Indicator
    3.2 B2
    3.3 Help B
    3.4 WB : 80% Ethanol
    3.5 Buffer EB
4. น้ำกลั่น (Distilled Water)
5. น้ำผักพร้อมดื่มยี่ห้อ V8 สูตรดั้งเดิม ผลิตโดย บริษัท แคมเบลล์ ซุปคัมปานี จำกัด
6. วุ้นผง (Agar)
7. อะกาโรส (Agarose)
8. เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ของบริษัท Amresco (USA)
9. 70% Ethanol
10. Absolute Ethanol
11. Ampicillin
12. Hymexazol
13. Master Mix สำหรับ PCR

13.1 น้ำกลั่นปลอดประจุ (Double Distill Water)

13.2 10X PCR Buffer

13.3 Deoxynucleotide Triphospates (dNTPs)

13.4 Primer ITS1 และ ITS4 สำหรับการทำ PCR ครั้งที่ 1

13.5 Primer A2 และ I2 สำหรับการทำ PCR ครั้งที่2

13.6 Taq Polymerase

14. Propiconazole
15. Rifamycin
16. Sodium Chloride (NaCl)
17. Tryptone
18. Yeast Extract
19. น้ำกรอง (Deionized Water)
20. Luria Bertani (LB) broth
21. Potassium chloride (KCl)
22. Magnesium chloride hexahydrate
23. Sucrose

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเลือกไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง

ราในวงศ์ *Phytophthora* ที่คาดว่ามี *P. meadii* ปนอยู่ที่จะใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต L116-1 และ 77-1-2 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัสทุกไอโซเลตถูกแยกได้จากใบยางพาราที่เป็นโรค เชื้อที่แยกได้นำมาเลี้ยงบนอาหาร 5% V8 สถานที่เก็บตัวอย่างและผู้คัดแยก แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงราในวงศ์ *Phytophthora* ที่ใช้ในการทดลองและสถานที่เก็บตัวอย่าง

ไอโซเลท	สถานที่เก็บ	คัดแยกโดย
L116-1	12.438111, 102.618854 ซอยคลองลื้อ3 ต.ด่านชุมพล อ.บ่อไร่ จ.ตราด	อัชวัฒน์ วงศ์เกษมศิริ
77-1-2	12.780333, 101.733000 124/3 ม.8 ต.คลองปูน อ.แกลง จ.ระยอง	กุลนันทน์ รุ่งนาไร่

3.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป

แยกโคโลนีเดี่ยวให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่คาดว่าเป็น มี *P. meadii*

ใช้วิธี Baiting Technique โดยใส่ agar plug 2-3 ชิ้น ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ใส่เมล็ดงา 3 เมล็ดต่อจาน และใส่น้ำ P3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มในที่สว่าง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 3-5 วันแล้วเทน้ำเก่าออก เติมน้ำ P3 ใหม่รอให้ซูโอสปอร์ปล่อยออกมา ดูดซูโอสปอร์ที่ถูกปล่อยมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มในที่มืด 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวลงอาหารใหม่

อับสปอร์

ใช้วิธี Baiting Technique บ่มในที่สว่าง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 3-5 วัน เขี่ยสายใยแล้ววางลงบนกระจกสไลด์ ย้อมด้วยสี Lacto phenol aniline blue ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย 400 เท่า

รูปแบบโคโลนี

ทำ Agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกดลงบนผิวหน้าอาหารบริเวณปลายเส้นใยของรา ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่าย Agar plug วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 5 วัน

3.3 ตรวจสอบสกุลรา

3.3.1 เลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

จากการทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กดลงบนอาหารที่มีเชื้อเจริญโดยเลือกบริเวณปลายเส้นใย ใช้เข็มเขี่ยถ่าย agar plug วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 5-7 วัน

3.3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

โดยวิธี Direct Colony PCR ใช้ตัวอย่างที่ต้องการและตัวแปรควบคุมมาเพิ่มปริมาณเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 870-900 คู่เบส โดยใช้ปลายปิเปตทิปพลาสติกปลอดเชื้อเขี่ยเอาเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็ง 5% V8 โดยพยายามมิให้มีอาหารปน หลังจากนั้นใส่ลงไปใน PCR mixture ดังตารางที่ 3.2 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น (DI type I)	17.625
10X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl2	0.75
10 mM dNTPs mix	0.5
10 µM ITS1 (forward)	1.25
10 µM ITS4 (reward)	1.25
Taq DNA Polymerase	0.125
Colony PCR	1
ปริมาตรรวม	25

สำหรับภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตารางที่ 3.2 โดยทำซ้ำจำนวน 30 รอบในขั้น denaturation, annealing และ extension

ตารางที่ 3.3 ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
Initiation denaturation	94.0	3.00
denaturation	94.0	0.30
annealing	55.0	0.30
extension	72.0	1.00
Final extention	72.0	5.00

ตารางที่ 3.4 ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

Primer	Sequence (5’→ 3’)	Tm ($^{\circ}$C)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	61
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56

((White et al. 1990)

1.) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

นำดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างรวมถึงตัวแปรควบคุมที่ผ่านการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 100 เท่ามาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนของเป้าหมายที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ขนาดผลิตภัณฑ์ 752-852 คู่เบส ผสมสารทั้งหมดในปริมาณตามตารางที่ 3.5 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น (DI type I)	17.625
10X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl2	0.75
10 mM dNTPs mix	0.5
10 µM A2 (forward)	1.25
10 µM I2 (reward)	1.25
Taq DNA Polymerase	0.125
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1
ปริมาตรรวม	25

สำหรับภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตารางที่ 3.5 โดยทำซ้ำจำนวน 30 รอบในขั้น denaturation, annealing และ extension

ตารางที่ 3.6 ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
Initiation denaturation	94.0	3.00
denaturation	94.0	0.30
annealing	56.0	0.30
extension	72.0	1.00
Final extention	72.0	5.00

ตารางที่ 3.7 ไพรเมอร์ A2 และ I2

Primer	Sequence (5’→ 3’)	Tm ($^{\circ}$C)
A2	ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA	61
I2	GATATCAGGTCCAATTGAGATGC	61

(Drenth et al. 2006)

3.3.3 การตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0% โดยชั่งวุ้นอะกาโรส 0.5 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.8 M TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อน เทเจลลงในแม่พิมพ์แล้วใส่หวีให้ได้จำนวนช่องตามที่ ต้องการสำหรับการใช้งาน เมื่อเจลแข็งนำไปใส่เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากนั้นเท 0.5 M TBE buffer (running buffer) ให้ท่วมเจล นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนจากทั้งไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 กับไพรเมอร์ A2T และ I2 มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยผสมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 5 มิลลิลิตร กับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ส่วนตัวระบุขนาดผลิตภัณฑ์ใช้ 1 kb plus DNA Ladder จากนั้นหยดลงในแต่ละช่องของเจล ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยการแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ ผลโดยใช้เครื่อง gel documentation

3.3.4 การเตรียมแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell)

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertanii (LB,ภาคผนวก ก) ที่ 16-20 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์แบคทีเรียที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใหม่ที่ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ค่าระหว่าง 2.5-3.0 แล้วแช่เชื้อในน้ำแข็ง 10 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารออกและละลายเซลล์ด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วยสารละลายของแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ 60 มิลลิลิตร ที่เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออกละลายเซลล์ด้วย 0.1 M $CaCl_2$ 4 มิลลิลิตร เก็บเซลล์โดยแบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 150 ไมโครลิตร และใส่ 20% กลีเซอรอล 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.5 การทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR มีความบริสุทธิ์

ทำบริสุทธิ์ด้วยการใช้ชุด PureLink™ Quick Gel Extraction Kit โดยนำดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงใน Quick Gel Extraction Column ที่อยู่ในมี Wash Tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสออกและวาง column ลงใน Wash Tube แล้วล้างโดยการเติม Wash Buffer (W1) ที่มีเอทานอล 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสออกและวาง column ลงใน Wash Tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1-2 นาที เทส่วนใสออก ละลายดีเอ็นเอออกมาโดยวาง column ลงใน Recovery Tube เติม Elution Buffer (E5) 50 ไมโครลิตร ตรงบริเวณกลาง column แล้วบ่มหลอด 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงในพลาสมิด

ใช้ชุด TA Cloning Kit โดยใส่ Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร T&ATM Cloning Vector 2 ไมโครลิตร PCR product 3 ไมโครลิตร yT4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร และ

น้ำ DI 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-15 นาที

3.3.7 การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

ละลายแบคทีเรียเจ้าบ้านที่อยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ใส่พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากข้อ 3.3.6 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และแช่หลอดในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว S.O.C. (super optimal broth with catabolic repressor, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์เชื้อมา 100 ไมโครลิตรกระจาย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีตัวยาแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.3.8 การเตรียมแบคทีเรียสำหรับสกัดพลาสมิด

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตัวอย่าง จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีตัวยาแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรมาขีดในจานเพาะเชื้อ (Streak plate) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมาแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารออก 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.3.9 การสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิดด้วยการใช้ชุด BioFACT^{TM} Plasmid Mini Prep Kit (Ver.2.0) นำแบคทีเรียจากการเตรียมสกัดพลาสมิด ใส่ B1 (Blue Indicator) 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม B2 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเตรียม column โดยนำ spin column วางลงในหลอด 2 มิลลิลิตร collection ใส่ Help B 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง column แล้วนำ spin column วางลงในหลอดcollection อีกครั้ง ใส่ของเหลวจากขั้นก่อนลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำ spin column วางลงในหลอดcollection อีกครั้ง เติม WB 750 ไมโครลิตร ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำ spin column วางลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร micro tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เติม Buffer EB 30-50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง spin column เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับสารพันธุกรรมที่บริษัท DNA macrogen ประเทศเกาหลีใต้

3.4 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของรา *P. meadii* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

โดยนำราไอโซเลตต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 มาทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่มีเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อกดลงบนผิวหน้าอาหารบริเวณปลายเส้นใย แล้วใช้เข็มเขี่ย agar plug วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% V8 บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวันแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.5 ศึกษาการก่อโรคของรา *P. meadii* บนใบยางพารา (Detached Leaf Assay)

ใบยางพาราเก็บจากสวนที่ตั้งอยู่ที่ 3284 ตำบล หมอนนาง อำเภอ พนัสนิคม จังหวัด ชลบุรี 20140 ประเทศไทย (พิกัด 13.388614,101.21883200000001) ล้างใบยางพาราด้วยน้ำประปาและน้ำปลอดเชื้อตามลำดับ แล้วใช้ซูโอสปอร์ในการทดสอบ ด้วยวิธี Baiting Technique โดยใส่ agar plug 2-3 ชิ้น ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ใส่เมล็ดงา 3 เมล็ดต่อจานและใส่น้ำ P3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มในที่สว่าง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 3-5 วันแล้วล้าง หลังจากนั้นใส่น้ำ P3 รอให้ซูโอสปอร์ปล่อยออกมา นับจำนวนซูโอสปอร์ด้วยวิธี viable plate count แล้วดูดซูโอสปอร์ที่ถูกปล่อยออกมาใส่จานปลอดเชื้อแล้วนำใบยางพาราที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นวาง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ไอโซเลต บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และสังเกตลักษณะใบยางพารา

บทที่ 4

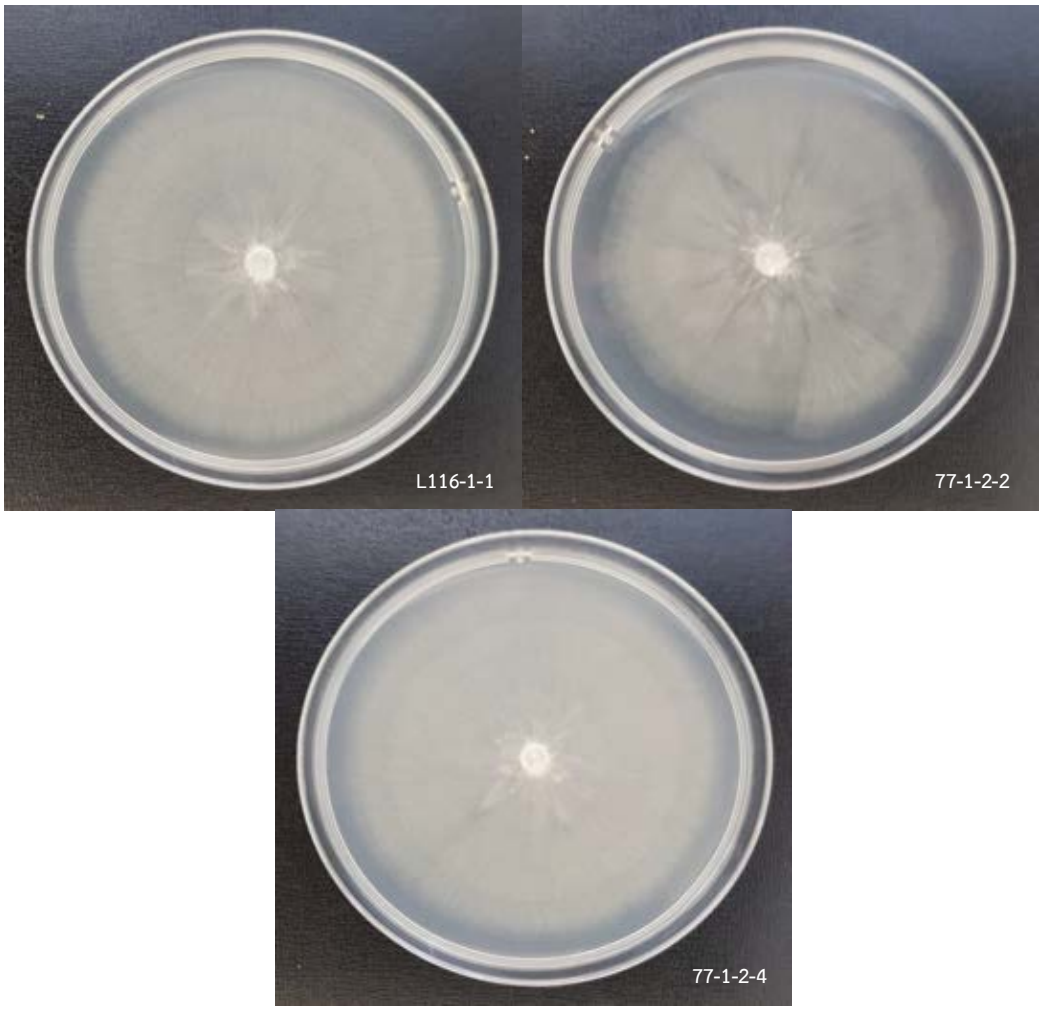
ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของ *P. meadii*

หลังจากคัดแยกราจากตัวอย่างจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็นรา *P. meadii* เลี้ยงบนอาหาร 5% V8

<u>รูปแบบโคโลนี</u>

จากการศึกษารูปแบบโคโลนีบนอาหาร 5% V8 พบว่าแต่ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลองมีลักษณะโคโลนีแบบ stellate patterns ดังภาพที่ 4.1



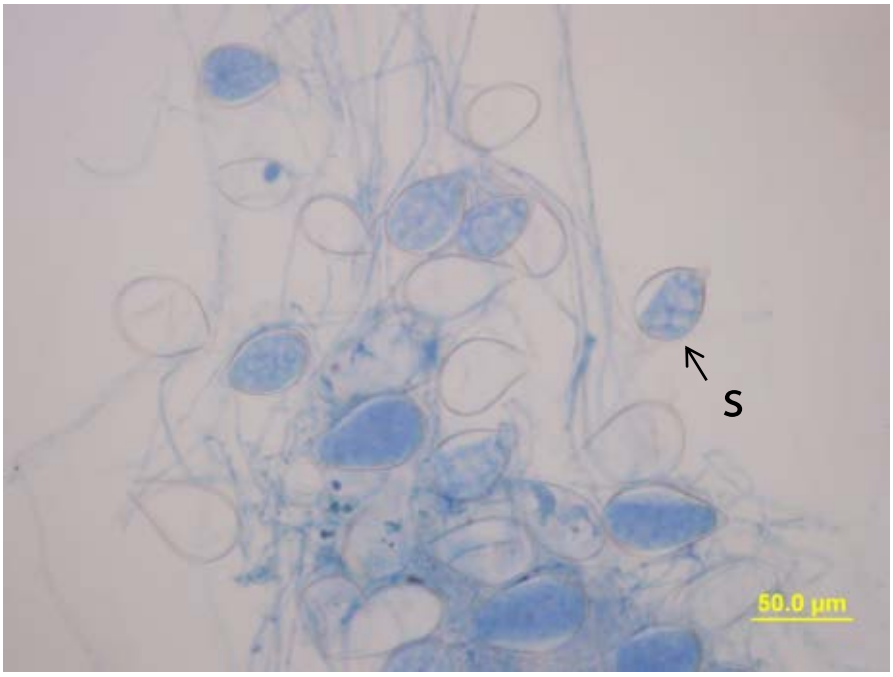
ภาพที่ 4.1 ภาพรูปแบบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 หลังจากบ่ม 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

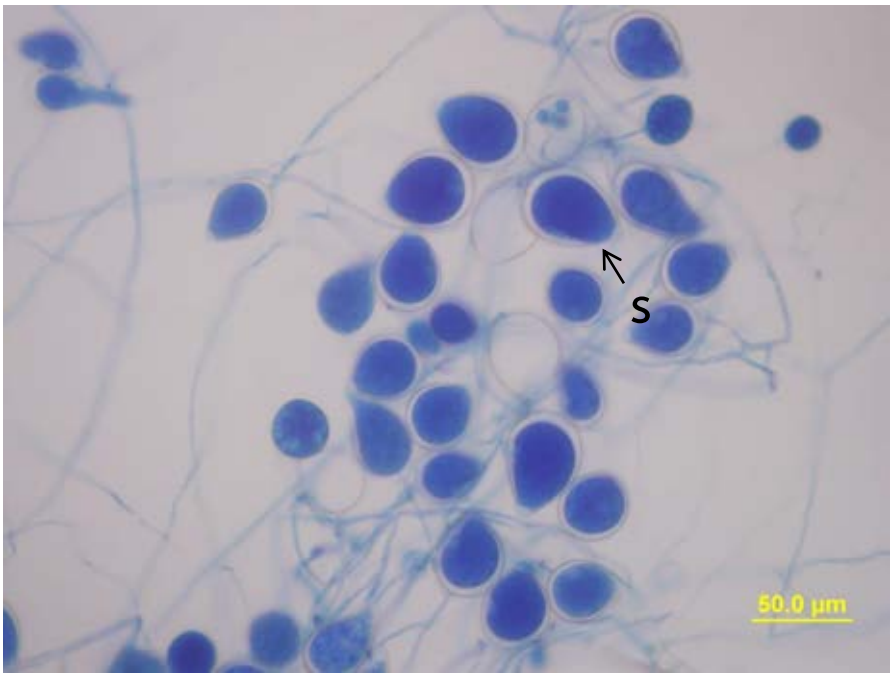
ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นบันทึกข้อมูลอับสปอร์ 50 อับสปอร์ในแต่ละตัวอย่างได้ผลตามตารางที่ 4.1 พบว่าไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 มีลักษณะอับสปอร์แบบ obpyriform และรูปร่างของ papilation เป็นแบบ papillate ความง่ายในการหลุดจากก้านชูสปอร์ (caducity) พบว่าเป็นแบบ caducus

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็น *P. meadii*

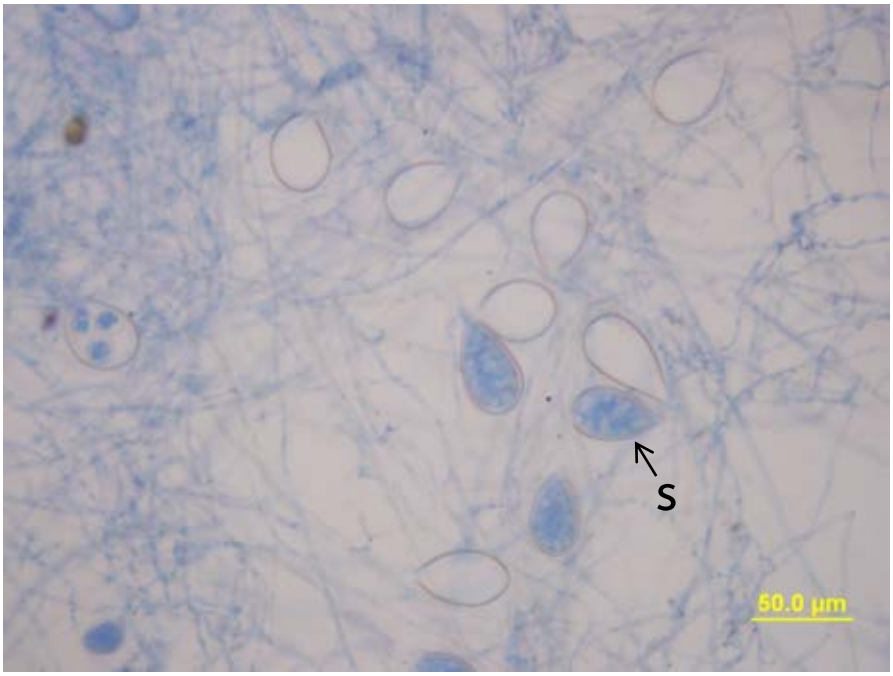
isolate	sporangia morphology										
	Sporangium size (µm)						Pedicel Length (µm)	Caducity	Papillation	shape	Length:width ratio
	Length			Width							
	Maximum	Minimum	Average	Maximum	Minimum	Average					
L116-1-1	65.4	33.8	47.69	39.0	23.5	31.33	15.67	caducus	papilate	obpyriform	1.52
77-1-2-2	51.8	32.4	39.42	35.8	23.6	27.95	14.67	caducus	papilate	obpyriform	1.41
77-1-2-4	57.3	36.2	44.12	34.0	20.4	27.70	16.33	caducus	papilate	obpyriform	1.59



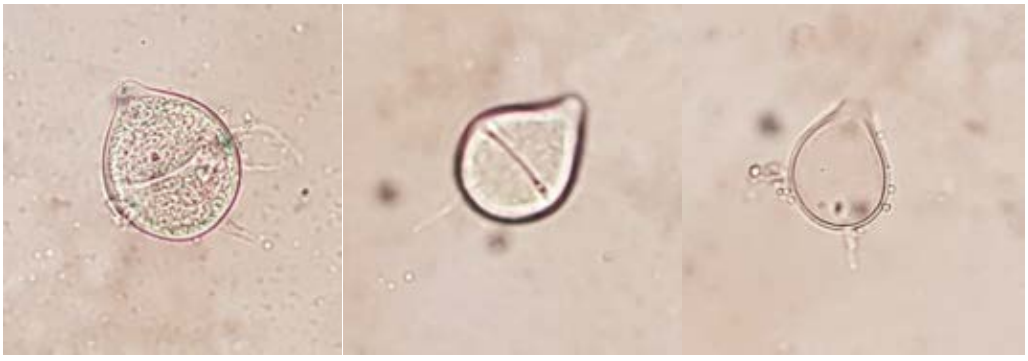
ภาพที่ 4.2 ไอโซเลต L116-1-1 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า อับสปอร์ (S)



ภาพที่ 4.3 ไอโซเลต 77-1-2-2 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า อับสปอร์ (S)



ภาพที่ 4.4 ไอโซเลต 77-1-2-4 แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า อับสปอร์ (S)

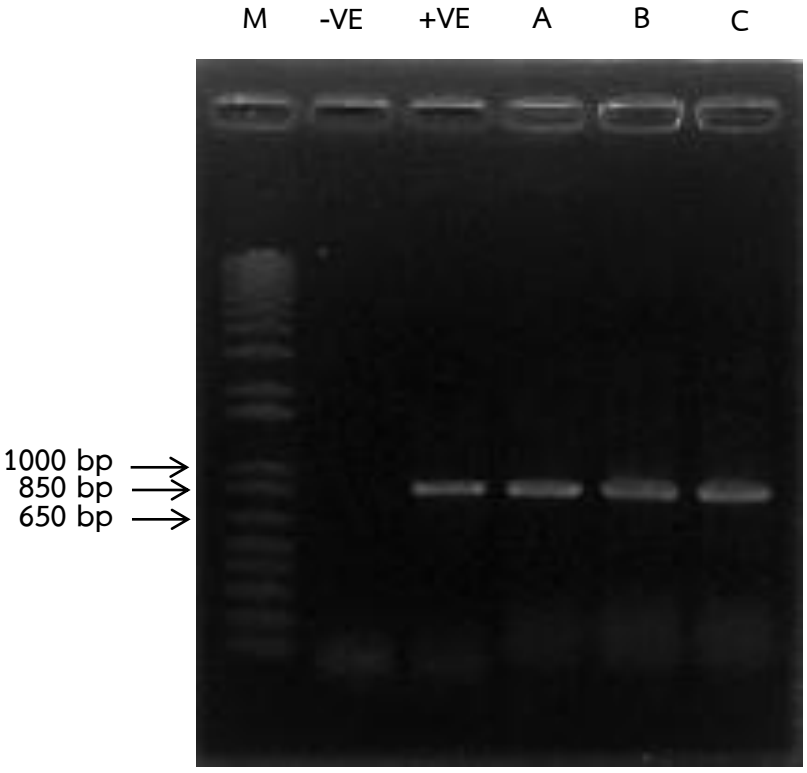


ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงก้านชูซูโอสปอร์แรงเจียม(pedicel) ไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

4.2 การระบุตัวอย่างด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

4.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

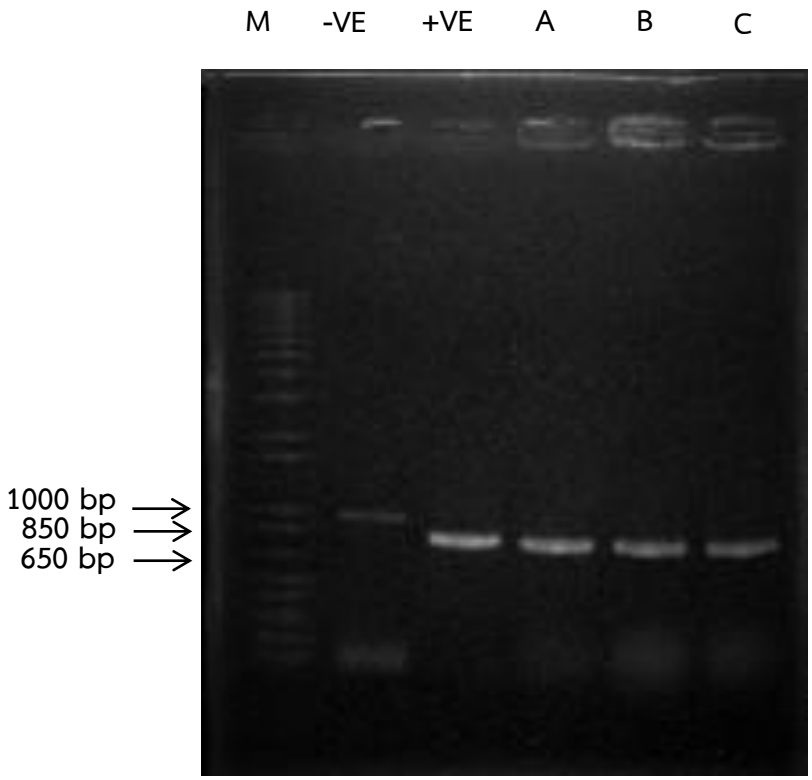
เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าตัวอย่างทั้งหมดแสดงแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 800 ถึง 1000 คู่เบสตรงกับขนาด ดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก ภาพที่ 4.5 ซึ่งใช้ *Phytophthora* sp. จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นราในกลุ่ม oomycetes



ภาพที่ 4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง L116-1-1 (A), 77-1-2-2 (B) และ 77-1-2-4 (C) ตัวแปรควบคุม *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 (+VE) และ น้ำ DI (-VE) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

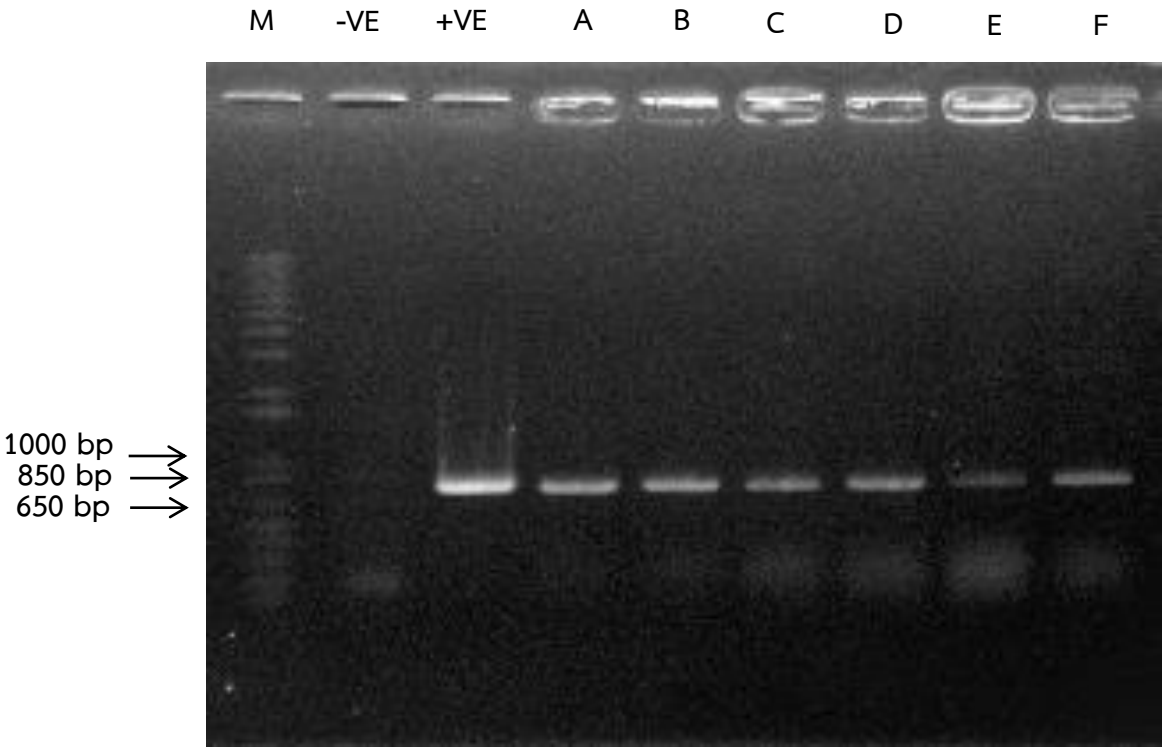
ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อรา *Phytophthora* แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าตัวอย่างทั้งหมดแสดงแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 650 ถึง 850 คู่เบสตรงกับขนาดดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก ภาพที่ 4.6 ซึ่งใช้ *Phytophthora* sp. จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นรา *Phytophthora*



ภาพที่ 4.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง L116-1-1 (A), 77-1-2-2 (B) และ 77-1-2-4 (C) ตัวแปรควบคุม *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 (+VE) และ น้ำ DI (-VE) โดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2

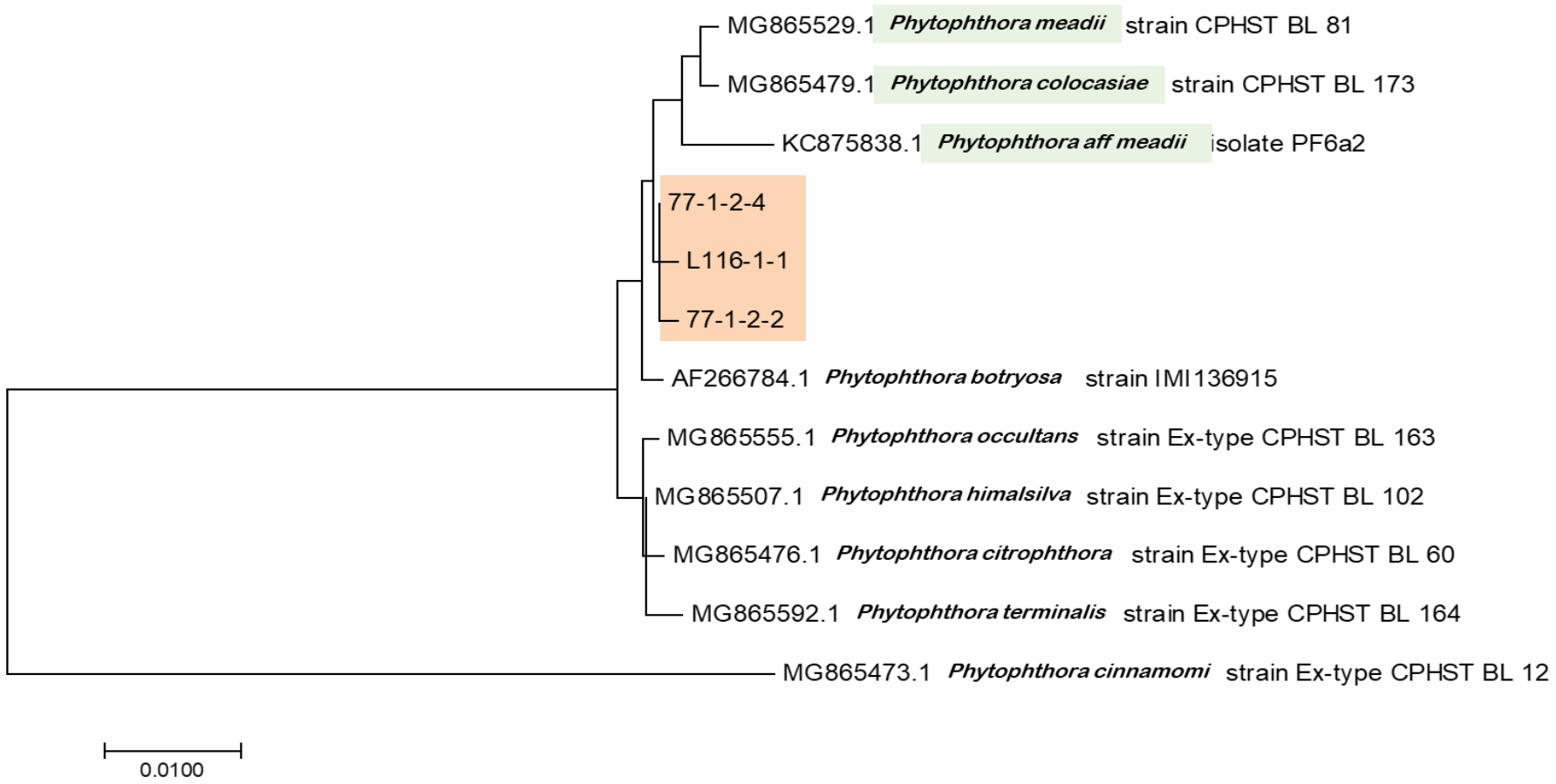
4.4.3 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วโคลนเข้าพลาสมิด หลังจากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งก่อนทำการสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับสารพันธุกรรม ได้ทำการตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์หรือไม่โดยการนำโคลนต่าง ๆ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อรา *Phytophthora* แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าตัวอย่างทั้งหมดแสดงแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 650 ถึง 850 คู่เบสตรงกับขนาดดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก ภาพที่ 4.8 ซึ่งใช้ *Phytophthora* sp. จึงสรุปได้ว่าโคลนทั้งหมดมีชิ้นส่วนของรา *Phytophthora*



ภาพที่ 4.8 การตรวจสอบการโคลนโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง L116-1-1 (A), L116-1-1 (B), 77-1-2-2 (C), 77-1-2-2 (D) , 77-1-2-4 (E) 77-1-2-4 (F) ตัวแปรควบคุม *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 (+VE) และ น้ำ DI (-VE) โดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2

เมื่อได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST พบว่าทุกไอโซเลตมีความคล้ายกับ *Phytophthora citrophthora* CBS 581.69 (accession number MH401211) มากที่สุดแต่ strain ดังกล่าวไม่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากไม่ได้ตีพิมพ์ จึงได้สร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ neighbor joining tree โดยใช้ *Phytophthora* ใน clade 2a ซึ่งเป็นเชื้ออ้างอิง ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่าไอโซเลตทั้ง 3 มีความใกล้ชิดกับ *P. meadii* และ *Phytophthora colocasiae*



ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ neighbor joining tree ความยาวของกิ่ง 0.12885389 ต้นไม้ถูกสร้างให้มีขนาดความยาวกิ่งในหน่วยเดียวกับระยะทางวิวัฒนาการที่ใช้ในการอนุมานสายวิวัฒนาการ ระยะทางวิวัฒนาการถูกคำนวณโดยใช้วิธี p-distance และอยู่ในหน่วยของความแตกต่างการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลรวมทั้งหมด 746 ตำแหน่งในชุดข้อมูล การวิเคราะห์วิวัฒนาการดำเนินการในโปรแกรม MEGA7

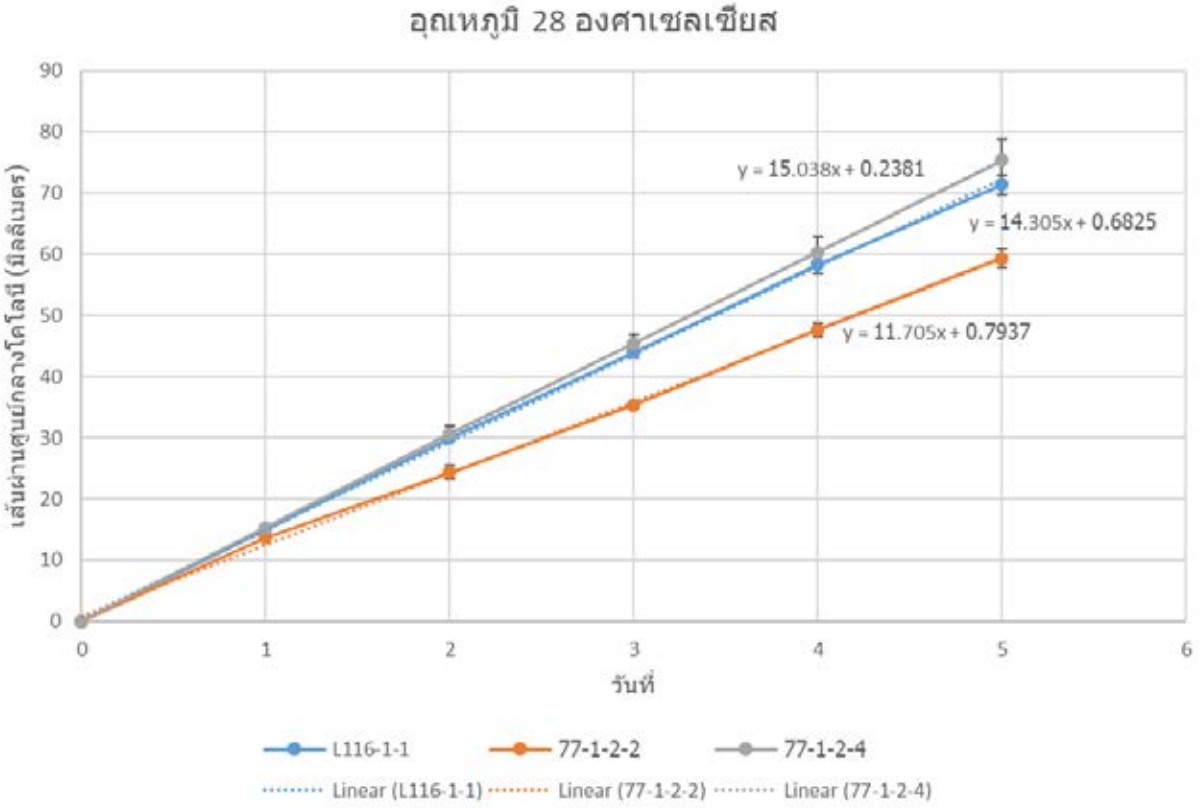
4.3 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วันที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน ทำการทดลองสามซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยได้ผลดัง ตารางที่ 4.2

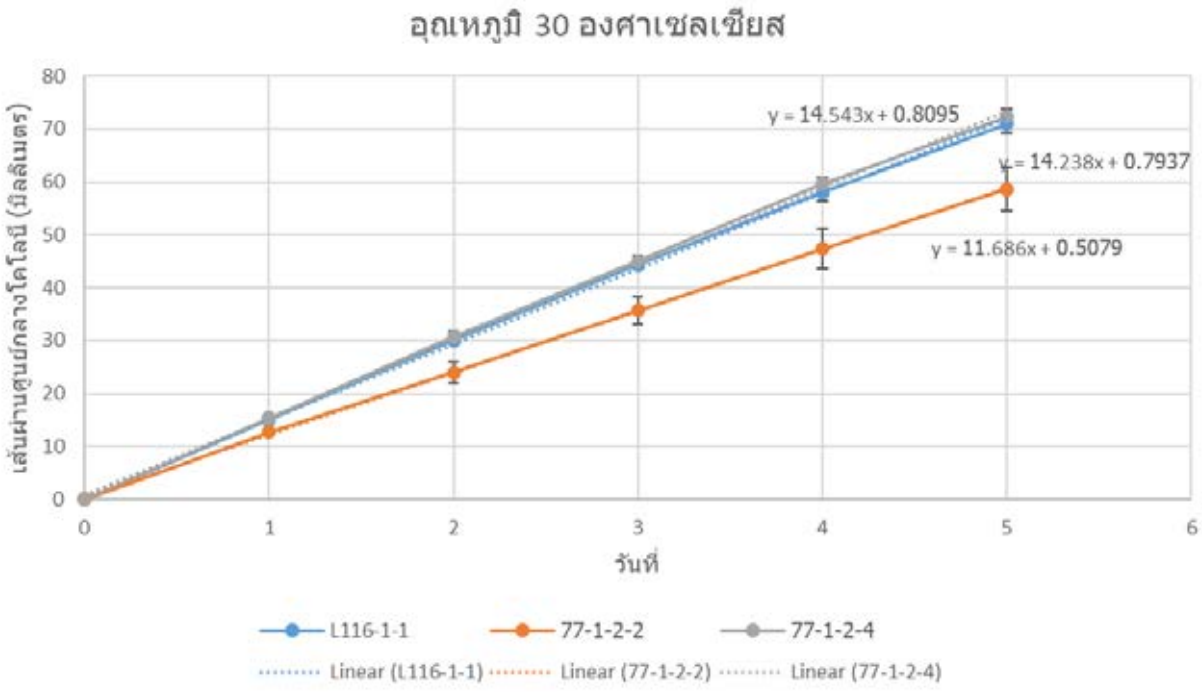
ตารางที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของวันที่ 1-5

รหัสตัวอย่าง	วันที่/ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
		7	28	30	37
L116-1-1	1	5	15	15	5
	2	5	30	30	5
	3	5	44	44.3	5
	4	5	58.3	58	5
	5	5	71.3	71	5
77-1-2-2	1	5	13.7	12.7	5
	2	5	24.3	24	5
	3	5	35.3	35.7	5
	4	5	47.7	47.3	5
	5	5	59.3	58.7	5
77-1-2-4	1	5	15.3	15.3	5
	2	5	30.7	30.7	5
	3	5	45.3	45	5
	4	5	60.3	59.7	5
	5	5	75.3	72.33	5

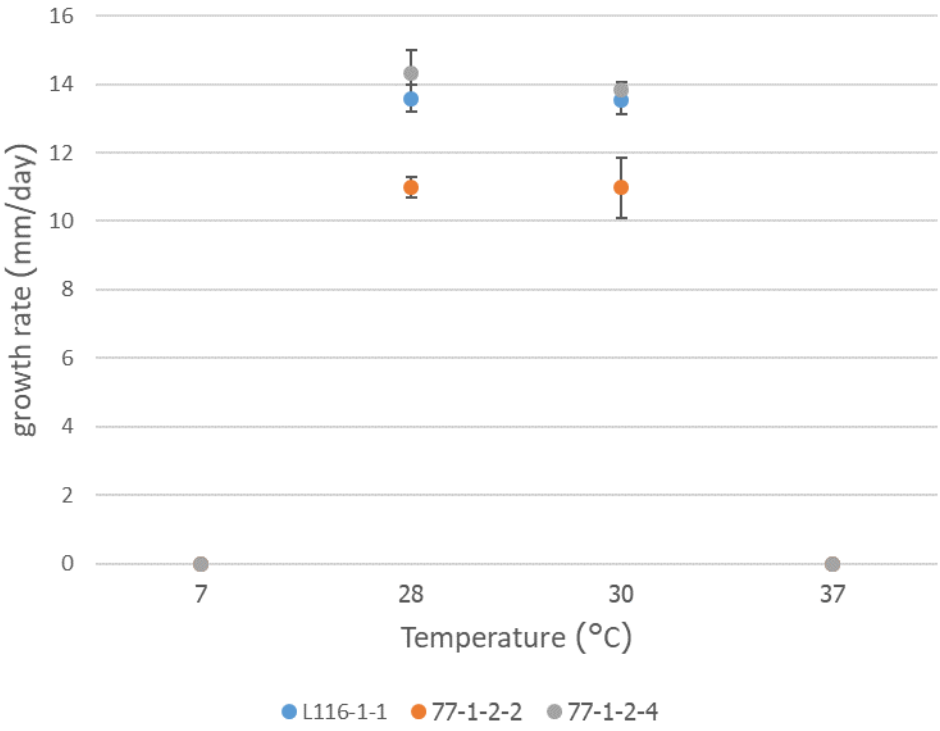
จากค่าเฉลี่ยที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 นำค่าเฉลี่ยจากอุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ที่มีการเจริญมาสร้างเป็นกราฟแสดงการเจริญของราได้ตามกราฟที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าราที่คาดว่าเป็น *P. meadii* เมื่อสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามกราฟที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 พบว่า L116-1-1 และ 77-1-2-4 มีการเจริญใกล้เคียงกันส่วนตัวอย่างที่ 77-1-2-2 ที่มีอัตราการเจริญน้อยกว่าไอโซเลตอื่นเล็กน้อย



กราฟที่ 4.1 แสดงการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน



กราฟที่ 4.2 แสดงการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน



กราฟที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของราไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

4.3 ความรุนแรงในการก่อโรคของราบนใบยางพารา (Detached Leaf Assay)

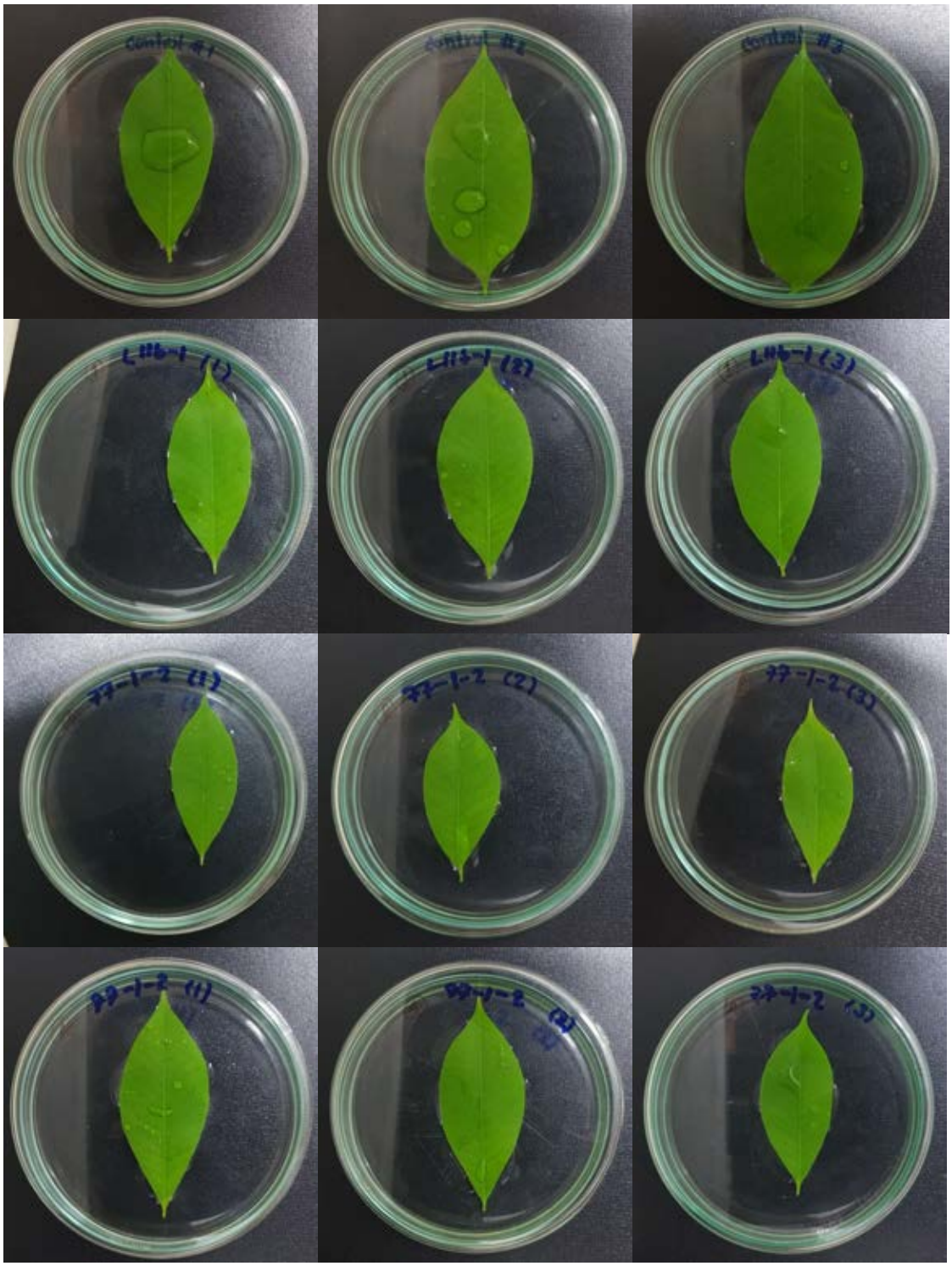
สังเกตความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension โดยไอโซเลต L116-1-1 ความเข้มข้น 1.9x 10^2 spore/ml ไอโซเลต 77-1-2-2 ความเข้มข้น 2x 10^2 spore/ml และ ไอโซเลต 77-1-2-4 ความเข้มข้น 5x 10^2 spore/ml พบว่าใบยางในชุดควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการทดลอง 110 ชั่วโมง ส่วนใบยางพาราที่ปลูกซูโอสปอร์ของ *P. meadii* ทุกไอโซเลต มีจุดดำเกิดขึ้น โดยไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2 และ 77-1-2-4 มีจุดเกิดขึ้นภายใน 16 ชั่วโมง และต่อมาใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดเป็นลำดับดังแสดงในภาพที่ 4.9-4.15

C

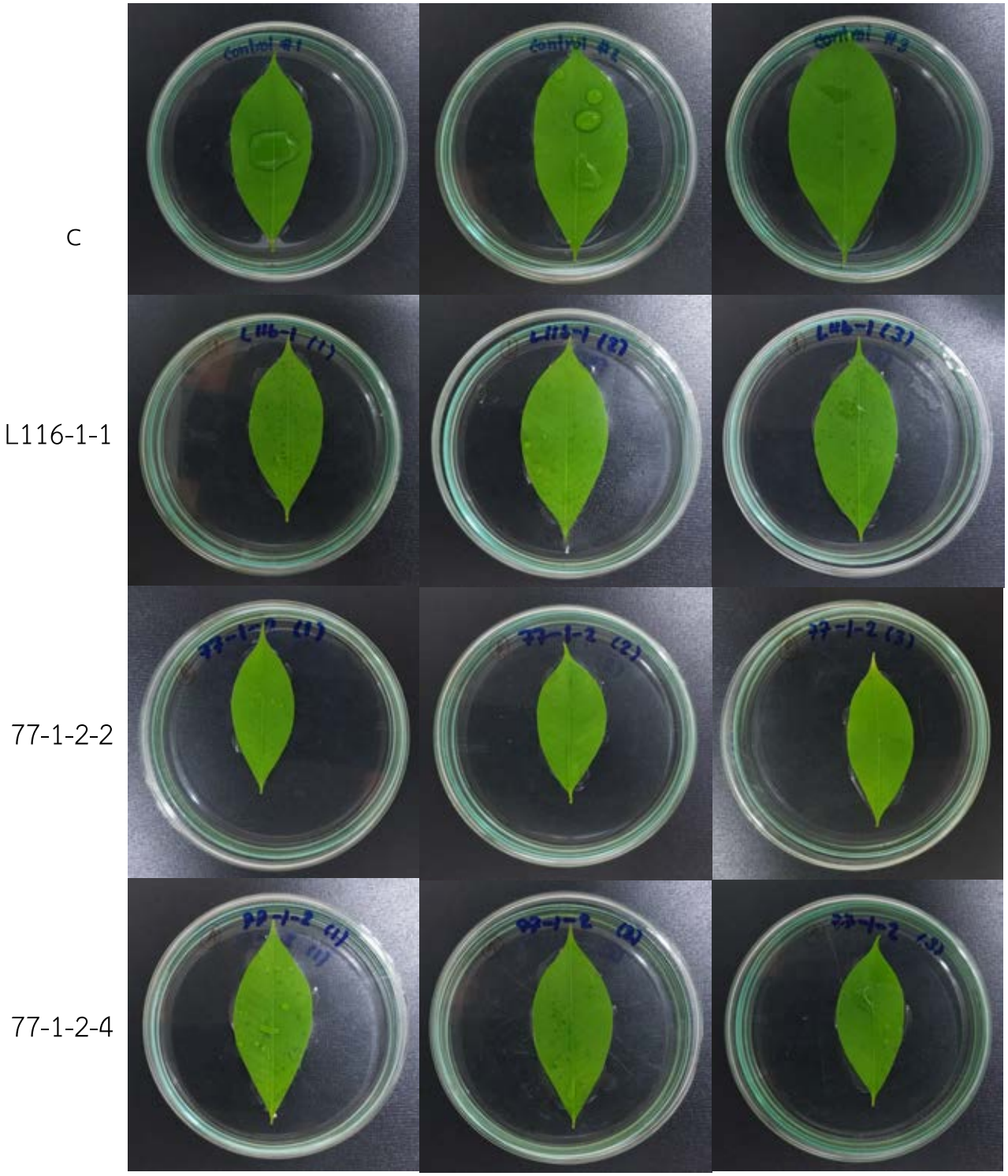
L116-1-1

77-1-2-2

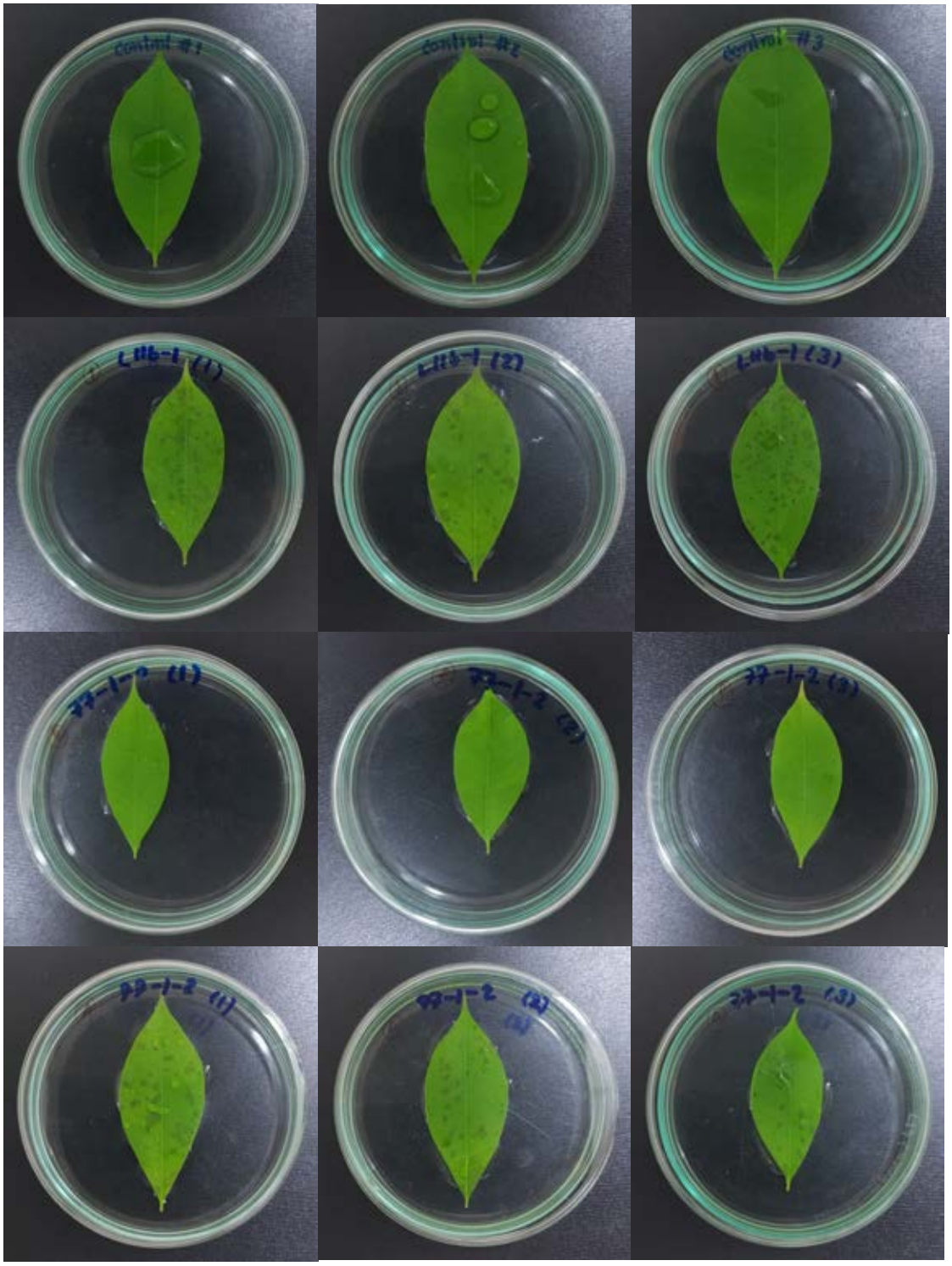
77-1-2-4



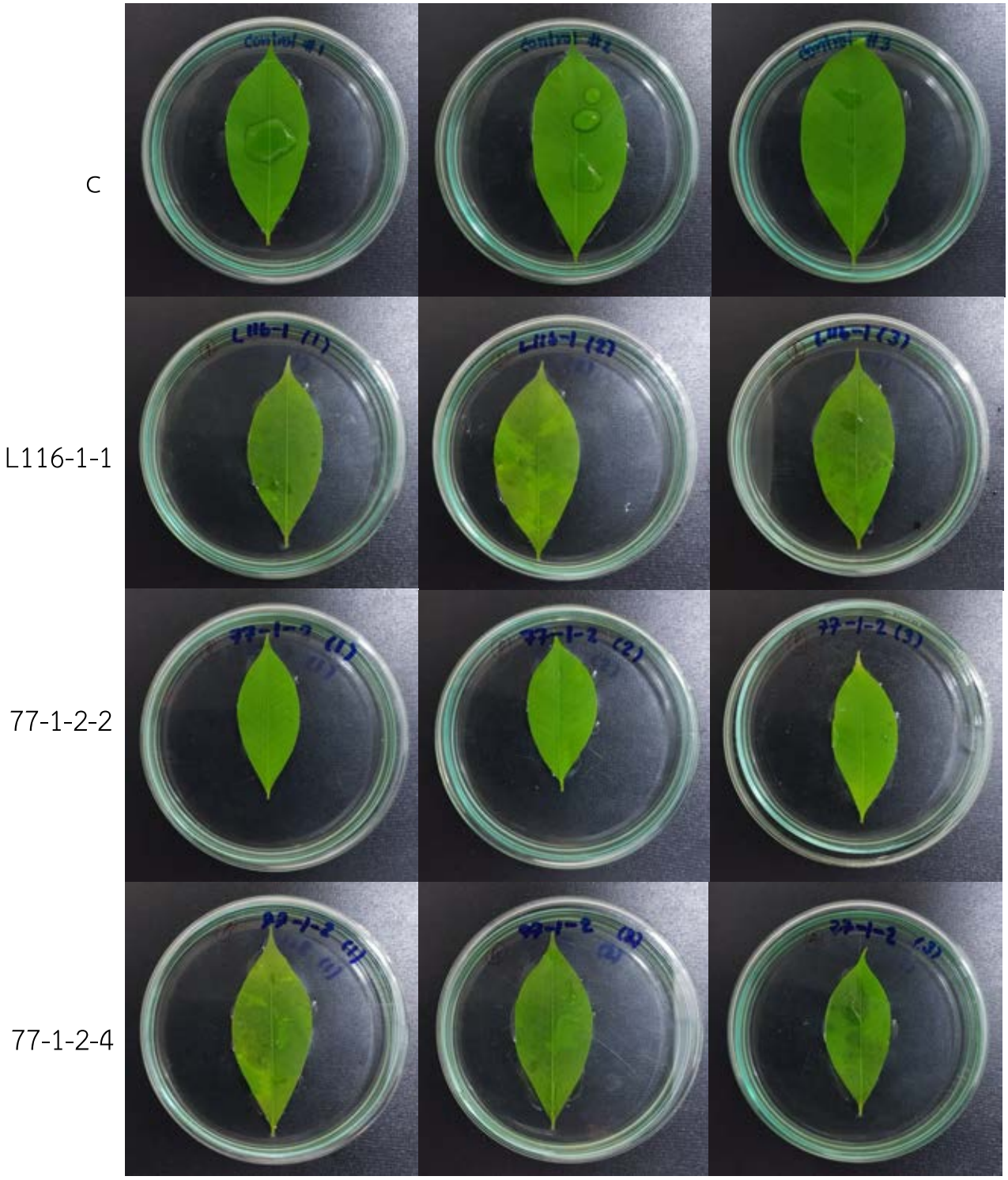
ภาพที่ 4.10 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 0 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



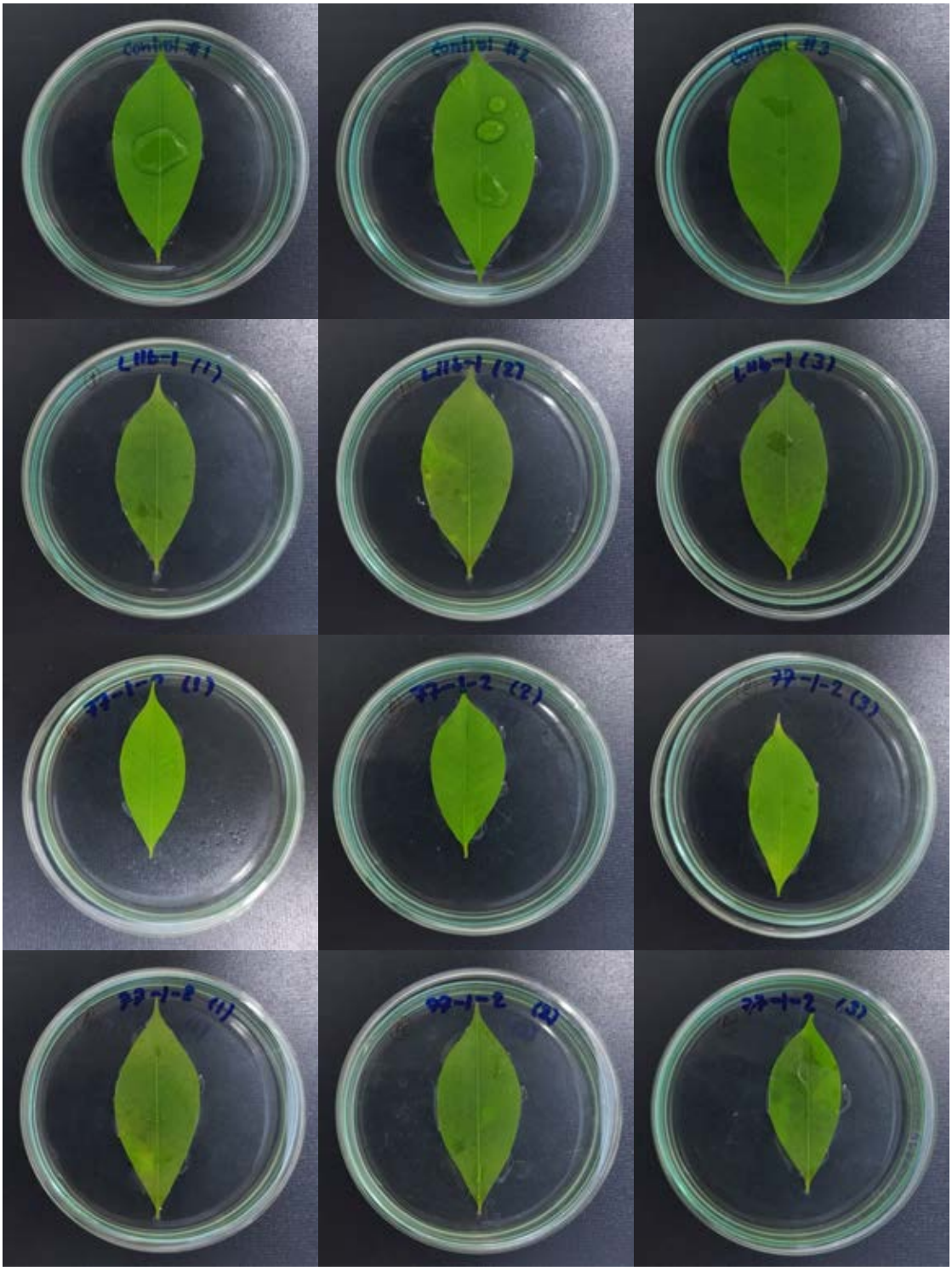
ภาพที่ 4.11 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 16 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



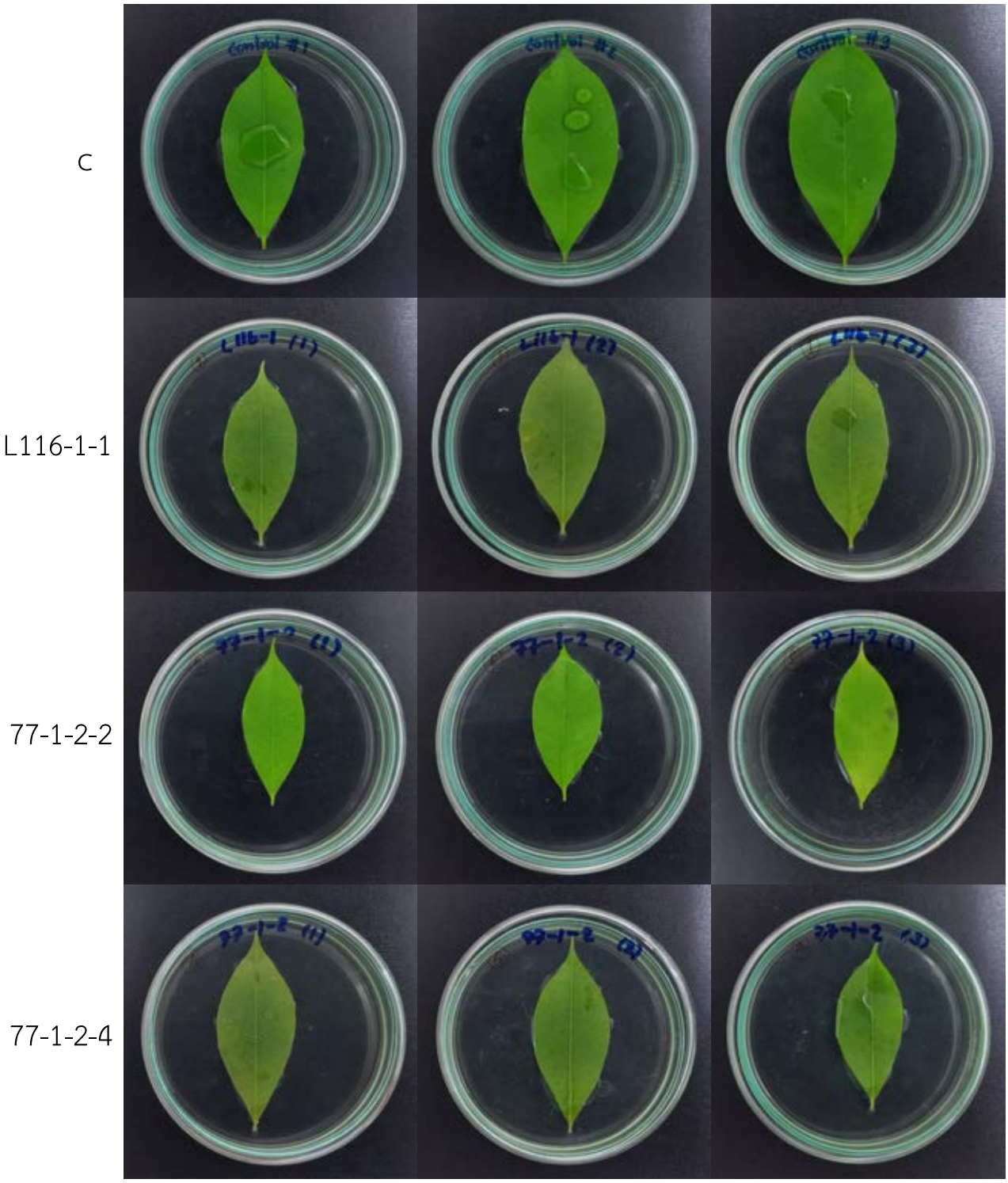
ภาพที่ 4.12 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 24 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



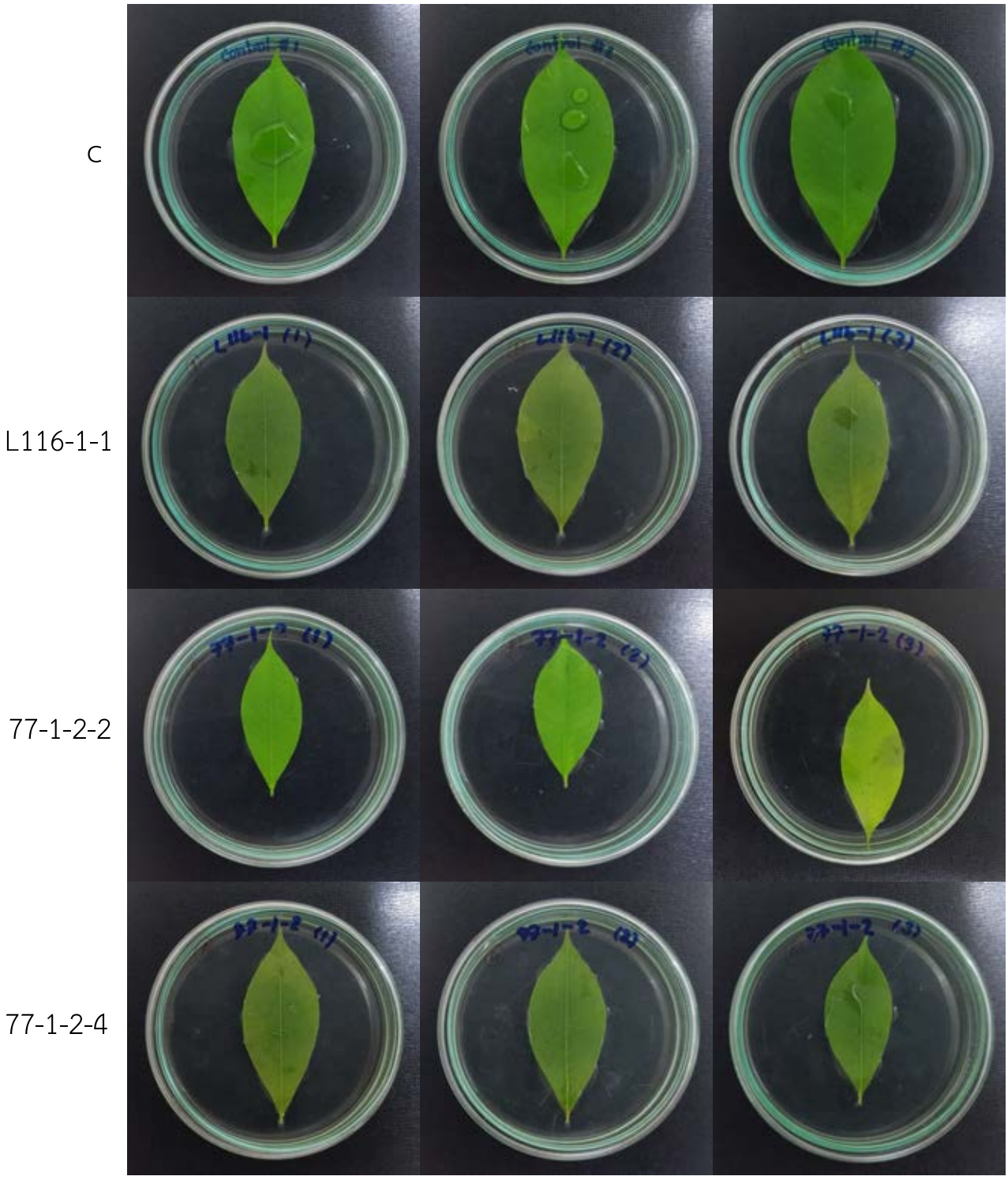
ภาพที่ 4.13 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 40 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



ภาพที่ 4.14 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 46 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



ภาพที่ 4.15 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 62 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



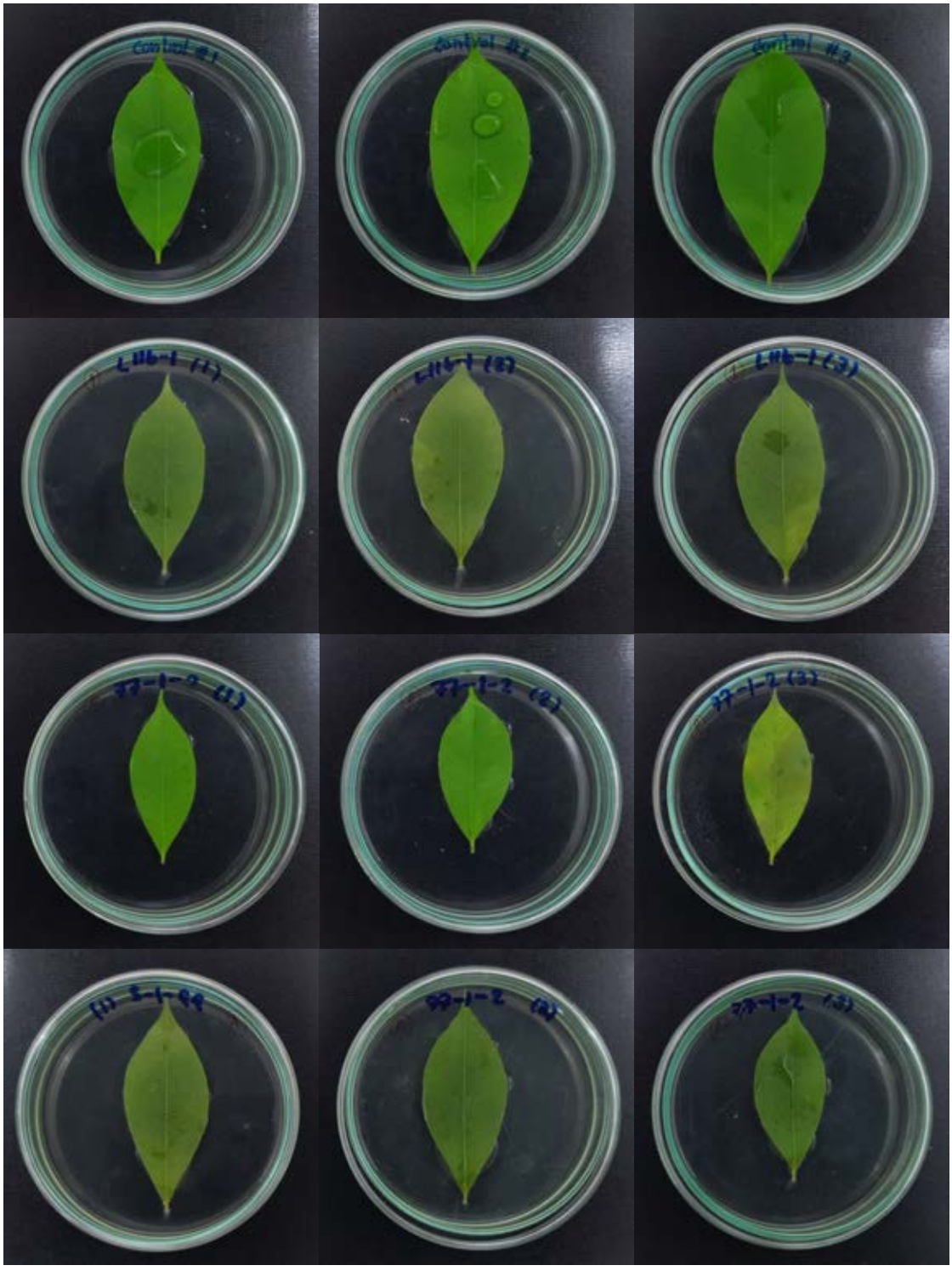
ภาพที่ 4.16 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 86 ชั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)

C

L116-1-1

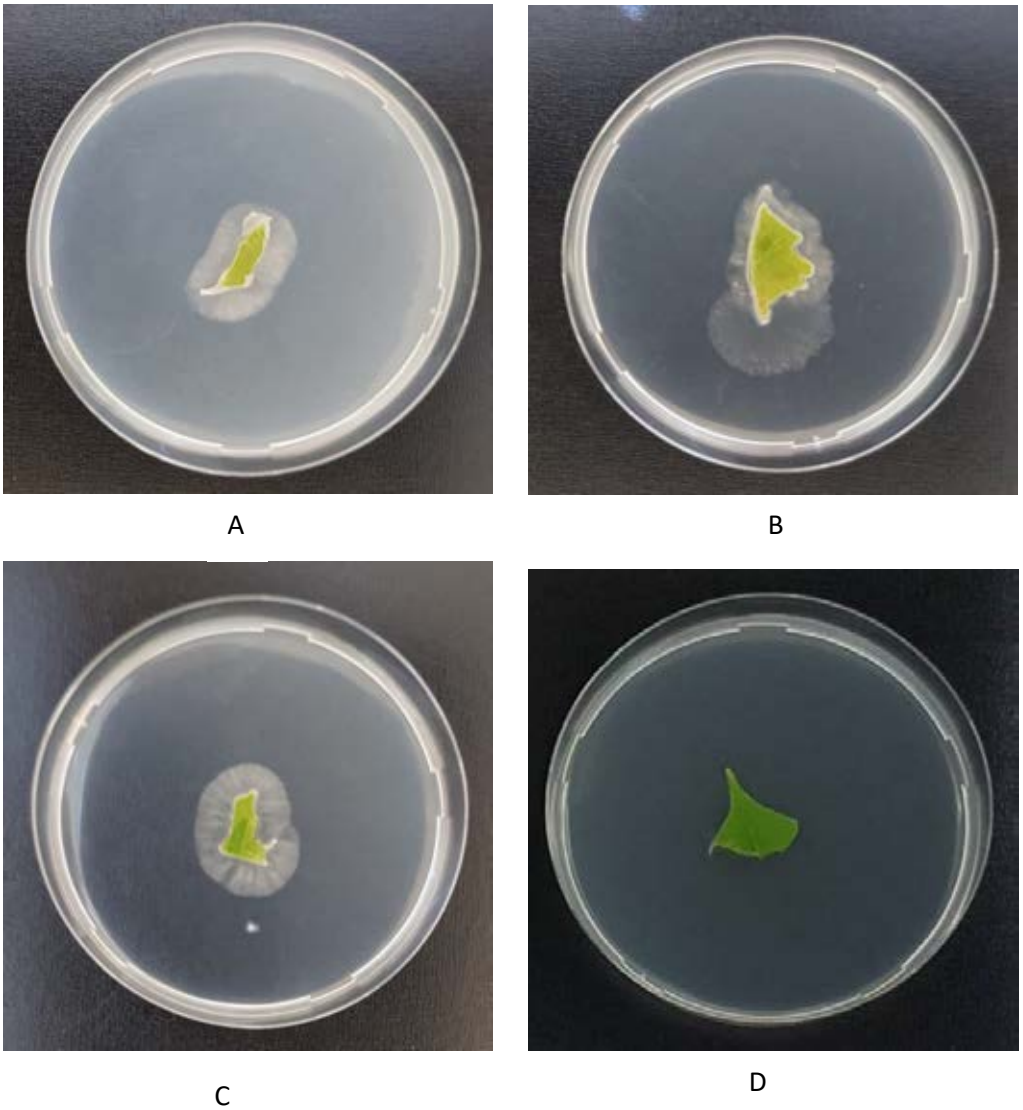
77-1-2-2

77-1-2-4



ภาพที่ 4.17 แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-2, 77-1-2-4 หลังจากบ่มใบยางพาราร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 110 ซั่วโมง ; C = control (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)

เมื่อตรวจสอบด้วยการทำ Koch's postulate โดยนำชิ้นส่วนใบยางพาราที่ผ่านการบ่มร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 110 ชั่วโมง มาวางบนอาหาร 5% V8 แล้วบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วันพบว่ามีเส้นใยเจริญออกมารอบใบยางในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการเจิญของเส้นใย ดังภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 แสดงการทดสอบ Koch's postulate จากใบยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับ Zoospore suspension ที่ 110 ชั่วโมง ของไอโซเลต L116-1-1 (A), 77-1-2-2 (B), 77-1-2-4 (C) และ ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3 เป็นตัวแปรควบคุม (D)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองแยกรา *P. meadii* จากไอโซเลตที่มีการผสมระหว่าง *Phytophthora* หลายชนิด คาดว่าจะเป็นรา *P. meadii* 3 ไอโซเลต จากจังหวัดระยอง 1 ไอโซเลตและจังหวัดตราด 2 ไอโซเลต ซึ่งการมีรา *Phytophthora* มากกว่าหนึ่งชนิดผสมอยู่ด้วยกัน ทำให้ต้องต้องใช้วิธี Baiting Technique แล้วชักนำให้ปล่อยซูโอสปอร์โดยการเปลี่ยนน้ำ P3 หลังจากนั้นดูดซูโอสปอร์ที่ถูกปล่อยมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แล้วบ่มจนเห็นโคลีนีเดี่ยว ซึ่งโคโลนีเดี่ยวนี้มาจากซูโอสปอร์เดียวทำให้มั่นใจได้ว่าโคโลนีนี้เป็น *Phytophthora* บริสุทธิ์ ย้ายโคโลนีเดี่ยวลงอาหารใหม่

ในการแยกว่าไอโซเลตใดเป็น *P. meadii* ต้องนำไปเลี้ยงในน้ำ P3 แล้วสังเกตลักษณะของอับสปอร์ โดยมีรายงานว่าอับสปอร์ของ *P. meadii* ในน้ำมีขนาดความยาว 20-44 ไมโครเมตร ความกว้าง 16-29 ไมโครเมตร ลักษณะเห็น papillate ชัดเจนมีรูปร่างเป็นแบบ obpyriform และมี Length-width ratio 1.3-2.0 และมีลักษณะโคโลนีแบบ stellate patterns (Erwin และ Ribeiro 1996) ซึ่งไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-1 และ 77-1-2-4 มีลักษณะตรงตามรายงาน ทำให้คาดว่าเป็นรา *P. meadii* จึงนำไปศึกษาต่อโดยการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS เพื่อระบุสปีชีส์ที่ชัดเจนต่อไป

ในขั้นตอนการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมเมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยใช้วิธี Nested-PCR โดยมีไพรเมอร์คู่แรกคือ ITS1 และ ITS4 ไพรเมอร์คู่ที่สองคือ A2 และ I2 พบว่าเมื่อเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์คู่แรก แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยมี *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 เป็นตัวแปรควบคุมบวก และมีน้ำ DI เป็นตัวแปรควบคุมลบจะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอของทุกอโซเลตอยู่ระหว่าง 800 ถึง 1000 คู่เบส ตรงกับของตัวแปรควบคุมบวกแสดงว่าทุกไอโซเลตเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกรา หรือสิ่งมีชีวิตคล้ายราและเมื่อเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์คู่ที่สองโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยมี *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 เป็นตัวแปรควบคุมบวก และมีน้ำ DI เป็นตัวแปรควบคุมลบจะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอของทุกไอโซเลตอยู่ระหว่าง 650 ถึง 850 คู่เบส ตรงกับของตัวแปรควบคุมบวกแสดงว่าทุกไอโซเลตเป็นราในจีนัส *Phytophthora* ส่วนตัวแปรควบคุมลบจะไม่ขึ้นแถบดีเอ็นบริเวณนั้นเนื่องจากไม่ใช่จีนัส *Phytophthora* และเพื่อระบุถึงสปีชีส์ที่ชัดเจนว่าไอโซเลตที่ทั้งหมดเป็นรา *P. meadii* หรือไม่จึงทำการส่งพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนบริเวณ ITS หาลำดับสารพันธุกรรม โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วโคลนเข้าพลาสมิด หลังจากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งก่อนทำการสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับสารพันธุกรรม ได้ทำการตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วน

ของผลิตภัณฑ์หรือไม่โดยการนำโคลนต่าง ๆ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อรา *Phytophthora* พบว่าตัวอย่างทั้งหมดแสดงแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 650 ถึง 850 คู่เบส ตรงกับขนาดดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก ซึ่งใช้ *Phytophthora* sp. ไอโซเลต L111-1 จึงสรุปได้ว่าโคลนทั้งหมดมีชิ้นส่วนของรา *Phytophthora* จึงส่งหาลำดับสารพันธุกรรม

การส่งหาลำดับสารพันธุกรรมเมื่อได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST พบว่าทุกไอโซเลตมีความคล้ายกับ *P. citrophthora* แต่ strain ที่แสดงไม่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากไม่ได้ตีพิมพ์ จึงได้สร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ neighbor joining tree โดยใช้ *Phytophthora* ใน clade 2a อ้างอิง พบว่าทั้ง L116-1-1, 77-1-2-1 และ 77-1-2-4 มีความคล้ายกับ *P. meadii* และ *P. colocasiae* เนื่องจาก *Phytophthora* ใน clade เดียวกันมีความใกล้ชิดกันมาก แต่เมื่อศึกษารวมกับลักษณะของอับสปอร์ของ *P. colocasiae* พบว่ามีขนาดความยาว 40-70 ไมโครเมตร ความกว้าง 17-28 ไมโครเมตร ลักษณะ semipapillate มีรูปร่างเป็นแบบ ovoid และมี Length-width ratio 1.6-2.6 (Erwin และ Ribeiro 1996) ซึ่งไอโซเลต L116-1-1, 77-1-2-1 และ 77-1-2-4 ที่แยกได้ไม่ได้มีลักษณะที่เหมือน *P. colocasiae* จึงคาดว่าไอโซเลตทั้ง 3 เป็นรา *P. meadii* แต่เพื่อทำการระบุสปีชีส์ที่ชัดเจนเนื่องจาก *P. meadii* อยู่ใน clade 2 (Yang และ Hong 2018) จึงควรศึกษายีน coxI ต่อไป

ในขั้นการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่ารา *P. meadii* ทั้ง 3 ไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 7 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่า 30 องศาเซลเซียส เล็กน้อย

และการศึกษาการก่อโรคของรา *P. meadii* บนใบยางพารา (Detached Leaf Assay)ทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในใบยางพาราได้โดยลักษณะอาการเริ่มจากเกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นบริเวณผิวใบยางพาราภายใน 16 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปใบเริ่มเหลืองซีดลง ส่วนใบที่เป็นตัวแปรควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังจาก 110 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

อโนทัย งามทวีและเวท ไทยกูล. (2538). **การประเมินต้นทุนการผลิตยางของประเทศไทย ปี 2538.** กรุงเทพมหานคร: สมาคมยางพาราไทย

Amornrat Poopaibool(2003) Variation in Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. isolates from durian: Morphology and mating type.

Chee, K. H. (1969) Variability of Phytophthora species from Hevea brasiliensis. *Transactions of the British Mycological Society,* 52**,** 425-IN9.

Drenth, A. & B. J. C. f. T. P. P. Sendall, Brisbane, Australia (2001) Practical guide to detection and identification of Phytophthora. 1-41.

Drenth, A., G. Wagels, B. Smith, B. Sendall, C. O'Dwyer, G. Irvine & J. J. A. P. P. Irwin (2006) Development of a DNA-based method for detection and identification of Phytophthora species. 35**,** 147-159.

Erwin, D. C. & O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society (APS Press).

Martin, F. N., J. E. Blair & M. D. Coffey (2014) A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus Phytophthora. *Fungal Genetics and Biology,* 66**,** 19-32.

Mohamed, M.-S. (2017). *Phytophthora palmivora, the causal agent of bud rot disease of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): Biology, detection and control.* University of Nottingham,

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. J. P. p. a. g. t. m. Taylor & applications (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 18**,** 315-322.

Yang, X. & C. Hong (2018) Differential Usefulness of Nine Commonly Used Genetic Markers for Identifying Phytophthora Species. *Front Microbiol,* 9**,** 2334.

Ziembiǹska-Buczyǹska, A., J. Wiszniowski & S. Ciesielski (2014) Comparison of PCR-DGGE and Nested-PCR-DGGE Approach for Ammonia Oxidizers Monitoring in Membrane Bioreactors' Activated Sludge. *Archives of Environmental Protection,* 40.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารและสารเคมี

1. V8 selective medium (Jeffers and Martin, 1986)

Ingredient	Amount per 1 L	Final concentration
Basal medium		
5% V8		
Clarified V8	50 ml	
Deionized water	950 ml	
Agar	15 g	
Amendment		
Sodium ampicillin (0.1 g/ml)	1 ml	100 µg/l

ผสม Basal medium ดังสูตรข้างต้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารอุ่นแล้วจึงเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นตามปริมาณที่ระบุไว้แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

Clarified V8

V8 1 กระป๋อง	340	มิลลิลิตร
Calcium carbonate ($CaCo_3$)	3.4	กรัม

นำ V8 ที่ผลิตโดย บริษัท แคมเบลล์ ซุปคัมปานี จำกัด ปริมาตร 340 มิลลิลิตรผสมกับ $CaCo_3$ 3.4 กรัม จากนั้นนำมาใส่ในขวดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที จากนั้นจึงเก็บส่วนน้ำใสไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Sodium ampicillin (0.1g/ml)

Sodium ampicillin (T.P. Drug Laboratories, Thailand)	1	กรัม
Sterile deionized water	10	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium ampicillin โดยใช้น้ำปราศจากไอออนแล้วใส่ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. Luria Bertani (LB) broth ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

แบคโตเปปโทน	10.0	กรัม
ผงสกัดยีตส์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

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

3. Luria Bertani (LB) agar ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

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

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

4. S.O.C medium (super optimal broth with catabolic repressor) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

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

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

7. P3 water (1L)

Pond water	1	ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. TE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.1 M Tris-HCL ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (pH 8.0)

Tris	3.152	กรัม
H2O	16	มิลลิลิตร

3.2 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (pH 8.0)

EDTA	3.72	กรัม
H2O	16	มิลลิลิตร

จากนั้นนำ Tris-HCl ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและ EDTA 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 49.40 มิลลิลิตร

9. 10X TBE buffer Stock solution ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris (Research organic, USA)	48.4	กรัม
Boric acid (Bio Basic, Canada)	11.4	กรัม
EDTA (Bio Basic, Canada)	3.7	กรัม
Deionized water	1	ลิตร

ผสมและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

10. 0.8X TBE ปริมาตร 1 ลิตร

10X TBE buffer	80	มิลลิลิตร
Sterile deionized water	920	มิลลิลิตร

11. 0.5X TBE running buffer ปริมาตร 1 ลิตร

10X TBE buffer	50	มิลลิลิตร
Sterile deionized water	950	มิลลิลิตร

12. 1% agarose gel 50 มิลลิลิตร

Agarose (AMRESCO, USA)	0.5	กรัม
0.8X TBE	50	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดและนำเข้าไมโครเวฟโดยใช้ความร้อน 800 วัตต์ 1 นาที รอสักพักให้เจลเย็นลงแล้วจึงเทใส่แม่พิมพ์

13. Ethidium bromide solution (0.5 ug/ml สำหรับใช้ย้อมเจล) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

10 mg/ml Ethidium bromide (AMRESCO, USA)	10	ไมโครลิตร
Sterile deionized water	190	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดและเก็บในภาชนะปิด เก็บไว้ในที่มืด

ภาคผนวก ข

DNA marker

1. DNA marker