โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora citrophthora* จากต้นยางพารา

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

ชื่อนิสิต นางสาวสุวรรณทนา นุชประมูล **เลขประจำตัว** 5832354623

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 citrophthora* จากต้นยางพารา
โดย	นางสาวสุวรรณทนา นุชประมูล รหัสนิสิต 5832354623
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

การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora citrophthora* จากต้นยางพารา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาวสุวรรณทนา นุชประมูล

รหัสประจำตัวนิสิต 5832354623

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของ *Phytophthora citrophthora* จากต้นยางพารา

นิสิตผู้นำเสนอโครงการ นางสาวสุวรรณทนา นุชประมูล

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ต้องการระบุชนิดของราไฟทอฟธอราที่เกี่ยวข้องกับโรคใบร่วงและโรคเส้นดำของยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาด้วยยีนบริเวณ ITS ของไฟทอฟธอรา 4 ไอโซเลท คือ L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 พบว่าทุกไอโซเลทเป็น heterothallic และ non-caducous ซึ่งไอโซเลท L112-2, L116-1 และ L116-4 มีลักษณะสปอร์แรงเจียมแบบ obpyriform, ovoid, obturbinate และ reniform มีรูปแบบของโคโลนีแบบ stellate อีกทั้งยังมี papilla ขนาดของสปอร์แรงเจียมยาว 40.8-49.7 ไมโครเมตร กว้าง 29.9-33.7 ไมโครเมตร และอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.36-1.47 ในขณะที่ไอโซเลท L62B-1 มีลักษณะสปอร์แรงเจียมแบบ obpyriform, ovoid, obturbinate และ reniform มีโคโลนีแบบ radiation และมี papillate ขนาดของสปอร์แรงเจียมกว้างเฉลี่ย 17.3 ไมโครเมตร ยาว 26.4 ไมโครเมตร และอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง 1.53 จากลำดับของสารพันธุกรรมบริเวณ ITS พบว่า ทุกไอโซเลทอยู่ใน clade 2a โดยไอโซเลท L112-2 มีความคล้ายกับ *P. citrophthora* เช่นเดียวกับไอโซเลท L116-1 และ L116-4 ส่วนไอโซเลท L62B-1 มีความคล้ายกับ *Phytophthora botryosa* โดยงานวิจัยนี้เป็นรายงานการค้นพบ *P. citrophthora* ก่อโรคในต้นยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นครั้งแรก

TITLE	Morphological and molecular identification of *Phytophthora citrophthora* from para rubber tree
INVESTIGATOR	Miss Suwantana Nutpamoon
ADVISOR	Dr. Thanyanuch Kriangkripipat
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University

Abstract

This research identified *Phytophthora* associated with leaf fall and black stripe of para rubber tree in Eastern Thailand. On the basis of morphological characters and molecular characters using the ITS region of the rDNA, all four isolates were provisionally name as isolate L112-2, L116-1, L116-4 and L62B-1 on 5% V8 agar all isolates did not produce sexual structures. Sporangia of Isolate L112-2, L116-1 and L116-4 were non-caducous, papillate, obpyriform, obturbinate, ovoid and reniform on 5% V8. Sporangia were 40.8 to 49.7 μm long and 29.9 to 33.7 μm wide, length to width ratio was 1.36-1.47. Sporangia of Isolate L62B-1 were papillate, globose, obpyriform, obturbinate, ovoid and reniform. Dimensions were 26.4 μm long and 17.3 μm wide, length to width ratio was 1.53. Phylogenetic relationships among the isolates along with validated representative isolates of *Phytophthora* sp. from clade 2a showed that isolates L112-2, L116-1 and L116-4 were closely related to *P. citrophthora*, a species in *Phytophthora* clade 2a, while isolate L62B-1, was closely related to *Phytophthora botryosa* from the clade 2a. This is the first report of *P. citrophthora* as a pathogen of para rubber tree in Eastern Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการวิจัยและแนวทางการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างดำเนินงานวิจัย รวมถึงความรู้และวิธีทำงานวิจัยที่ถ่ายทอดให้กับผู้วิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงาน รวมไปถึงการสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนเพิ่มศักยภาพส่วนงานในด้านการวิจัยที่ให้การสนับสนุนการทำศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวิรัชนันท์ วุฒา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำแนวทางแก้ปัญหาจากการดำเนินงาน แนะนำความรู้อันเป็นประโยชน์ รวมไปถึงกำลังใจในการทำงานจนงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ จุลชีววิทยา รุ่นที่ 42 ทุกคนที่ให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ทั้งบิดา มารดา ที่คอยให้การสนับสนุน ให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันที่ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในวันนี้ได้

สุวรรณทนา นุชประมูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ-ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญกราฟ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	7
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก ก : สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	44
ภาคผนวก ข : สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย	46
ภาคผนวก ค : การตรวจสอบไฟทอฟธอราด้วยวิธี Nested-PCR	47

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 : วงจรชีวิตของ *P. infestans* 1

รูปที่ 1.2 : รูปร่างลักษณะต่าง ๆ ของสปอร์แรงเจียม 2

รูปที่ 1.3 : การเกิด papillation บนสปอร์แรงเจียม; non-papillate (A), semi-papillate (B), papillate (C) 2

รูปที่ 1.4 : ลักษณะของก้านชูสปอร์แรงเจียม; simple sympodium (A), Compound sympodia (B), umbellate sympodium (C) 3

รูปที่ 1.5 : ตำแหน่งยีนที่ใช้ตรวจสอบไฟทอฟธอรา 4

รูปที่ 1.6 : กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Nested-PCR 5

รูปที่ 3.1 : ใบยางพาราที่นำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรค 20

รูปที่ 4.1 : ไอโซเลท L112-2 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า 23

รูปที่ 4.2 : ไอโซเลท L116-1 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า และสปอร์แรงเจียมมี 2 papillates (BP) 24

รูปที่ 4.3 : ไอโซเลท L116-4 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า 25

รูปที่ 4.4 : ไอโซเลท L62B-1 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า 26

รูปที่ 4.5 : แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 27

รูปที่ 4.6 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L116-1 (B), L116-4 (C) และ L62B-1 (D) โดยมีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 30

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 4.7 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L116-1 (B), L116-4 (C) และ L62B-1 (D) โดยมีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 31

รูปที่ 4.8 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L112-2 (2A), L112-2 (3A), L116-1 (B), L116-1 (2B), L116-1 (3B), L116-4 (C), L116-4 (2C), L116-4 (3C), L62B-1 (D), L62B-1 (2D) และ L62B-1 (3D) มีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 31

รูปที่ 4.9 : แผนภาพการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไฟทอฟธอรา ไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 จากข้อมูลลำดับเบสในบริเวณ ITS ซึ่งมีตัวแทนอ้างอิงเป็นไฟทอฟธอราใน clade 2 ที่อ้างอิงโดยใช้วิธี Maximum Likelihood ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดในการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ 32

รูปที่ 4.10 : ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3 เป็นชุดควบคุม บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง 33

รูปที่ 4.11 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L112-2 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $2x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3) 34

รูปที่ 4.12 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L116-1 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $5x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม(ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3) 35

รูปที่ 4.13 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L116-4 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $1.5X10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3) 36

รูปที่ 4.14 : ชิ้นใบยางพาราจากการบ่มในน้ำ P3 (A) และชิ้นใบยางพาราจากการบ่มร่วมกับซูโอสปอร์ ไอโซเลท L112-2(B), L116-1(C) และ L116-4(D) ในน้ำ P3 นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกผลที่ระยะเวลา 30 ชั่วโมง 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 : ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 13

ตารางที่ 3.2 : ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 14

ตารางที่ 3.3 : ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 14

ตารางที่ 3.4 : ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 15

ตารางที่ 3.5 : ข้อมูลไพรเมอร์ A2 และ I2 15

ตารางที่ 3.6 : ภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 16

ตารางที่ 3.7 : ตัวแทนไฟทอฟธอราที่นำมาอ้างอิง 19

ตารางที่ 4.1 : ไอโซเลทไฟทอฟธอราจากตัวอย่างใบยางพาราจากพื้นที่เก็บตัวอย่างในภาคตะวันออก 21

ตารางที่ 4.2 : ลักษณะของไอโซเลทที่คาดว่าจะเป็น *P. citrophthora* 22

สารบัญกราฟ

หน้า

กราฟที่ 4.1 : การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 28

กราฟที่ 4.2 : การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 28

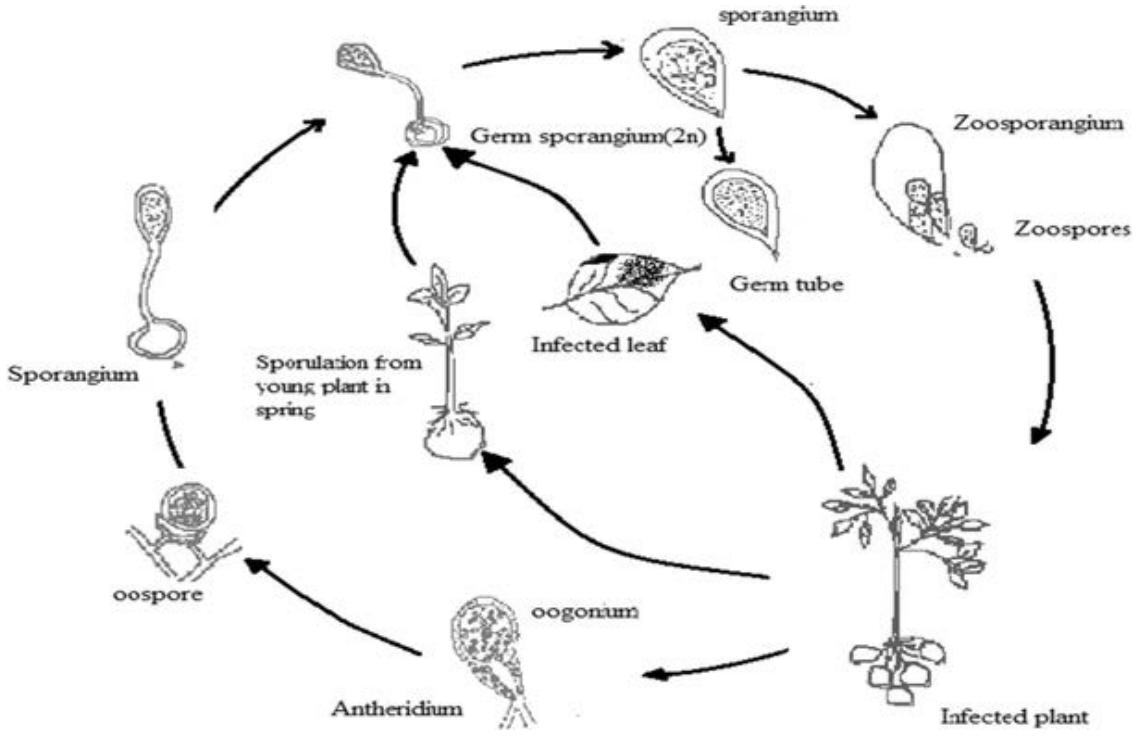
กราฟที่ 4.3 : อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส 29

บทที่ 1

บทนำ

ไฟทอฟธอรา (*Phytophthora*) เป็นราน้ำในอาณาจักร Stramenopila อยู่ในไฟลัม Oomycota เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะรูปร่างและการเจริญคล้ายรา ผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเบตากลูแคน วงจรชีวิตมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเป็นอับสปอร์ที่เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) ภายในอับสปอร์เดี่ยวมีหลายนิวเคลียสจากการแบ่งตัวของไซโทพลาสซึมในสปอร์แรงเจียม โดยจะปล่อยสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียมเป็นซูโอสปอร์ (zoospore) ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ซึ่งสามารถเคลื่อนที่และแพร่กระจายโดยอาศัยน้ำเป็นตัวพา เมื่อซูโอสปอร์เจอกับพืชอาศัยจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชนั้นโดยตรง (Ristaino และ Gumpertz, 2000) โดยการเข้าเกาะและสร้างผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส พร้อมจะเจริญเส้นใยทำลายเนื้อเยื่อของพืชอาศัยและแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของพืช (Judelson และ Blanco, 2005)

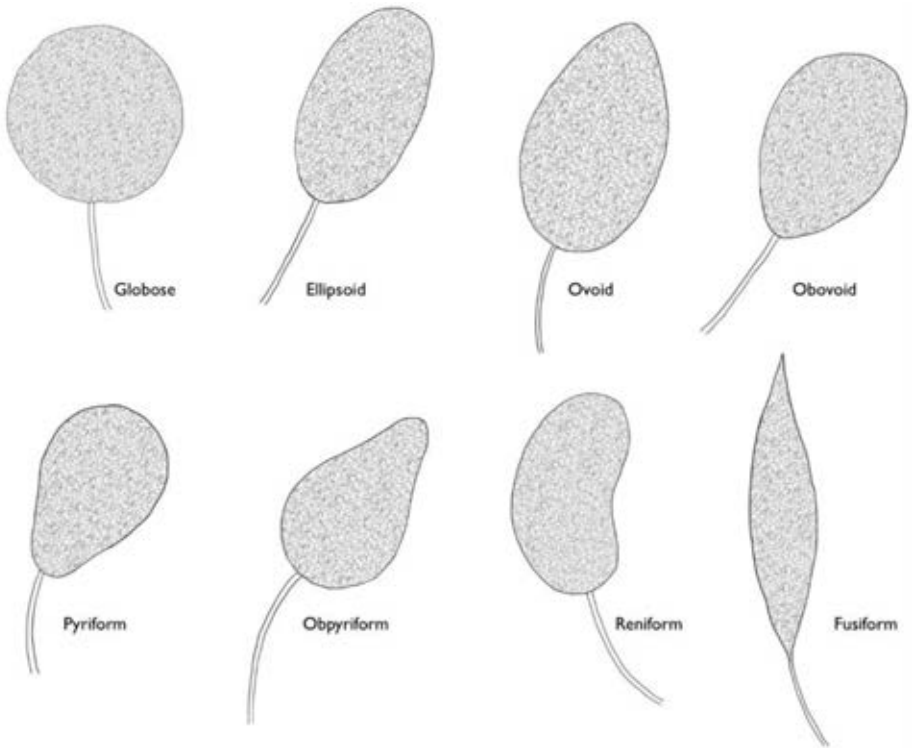
นอกจากนี้ ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอาจมีการสร้างคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) ทำให้อยู่รอดได้เป็นเวลานาน เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะกลับมาเจริญเป็นเส้นใย ในขณะที่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างโอโอสปอร์ (oospore) สายใยพบแบบ heterothallic และ homothallic ประกอบไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) ซึ่งสามารถเกิดการผสมกันแล้วขยายพันธุ์ต่อไป



(Sanju และคณะ, 2013)

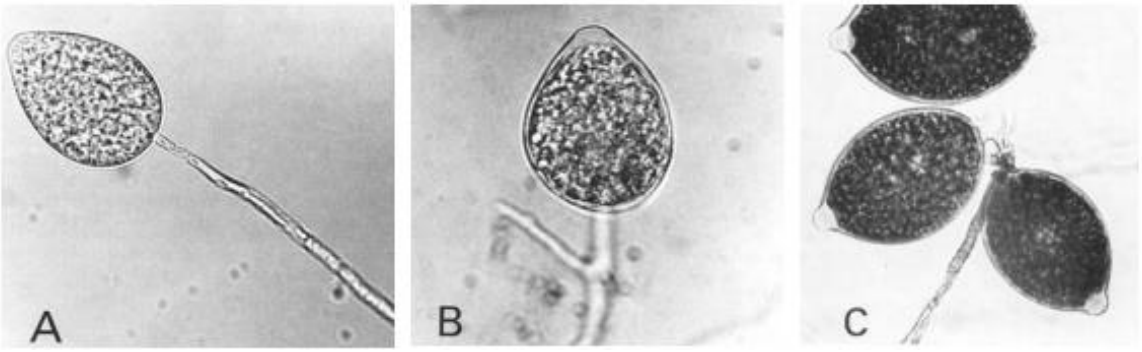
รูปที่ 1.1 : วงจรชีวิตของ *P. infestans*

การจัดจำแนกราไฟทอฟธอราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ เช่น รูปร่างของสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.2), ขนาดของสปอร์แรงเจียม, การหลุดร่วงจากสปอร์แรงจิโอฟอร์ (caducity), การสร้าง papillum บนสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.3), ลักษณะของเส้นใย, ลักษณะการเรียงตัวของก้านชูสปอร์แรงเจียม (รูปที่ 1.4) รวมถึงการสร้างคลาไมโดสปอร์ (Drenth และ Sendall, 2001)



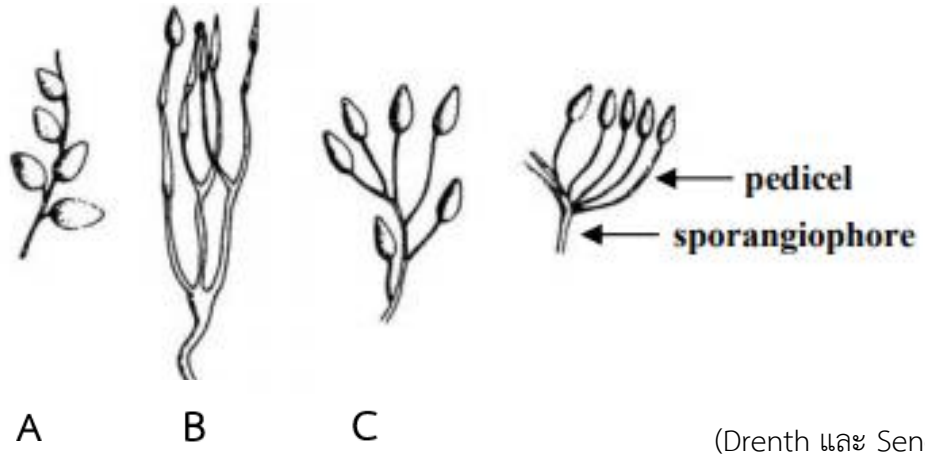
(Drenth และ Sendall, 2001)

รูปที่ 1.2 : รูปร่างลักษณะต่าง ๆ ของสปอร์แรงเจียม



(Drenth และ Sendall, 2001)

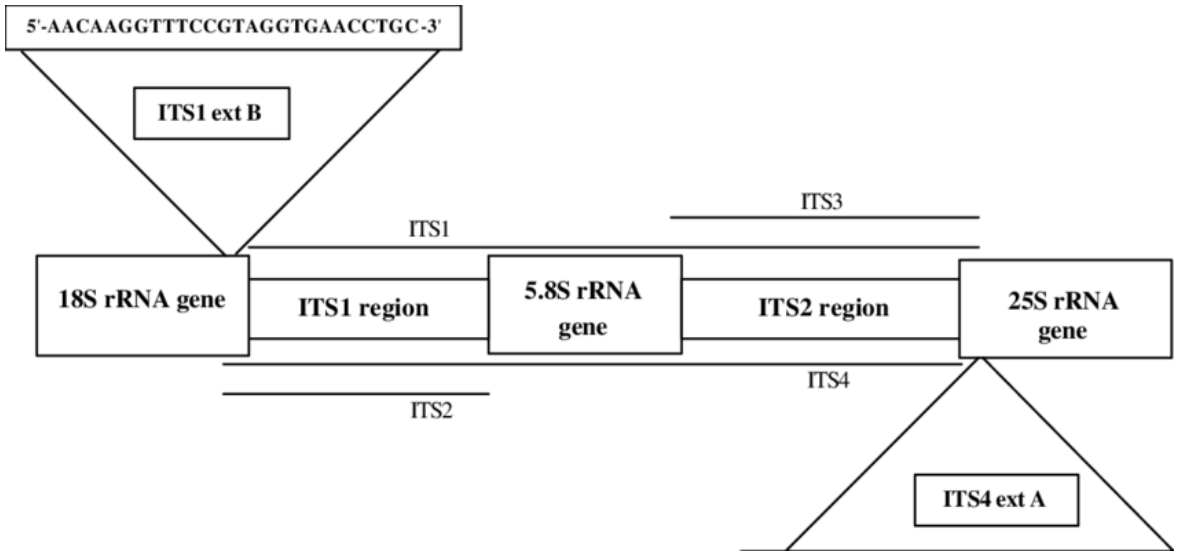
รูปที่ 1.3 : การเกิด papillation บนสปอร์แรงเจียม; non-papillate (A), semi-papillate (B), papillate (C)



(Drenth และ Sendall, 2001)

รูปที่ 1.4 : ลักษณะของก้านชูสปอร์แรงเจียม; simple sympodium (A), Compound sympodia (B), umbellate sympodium (C)

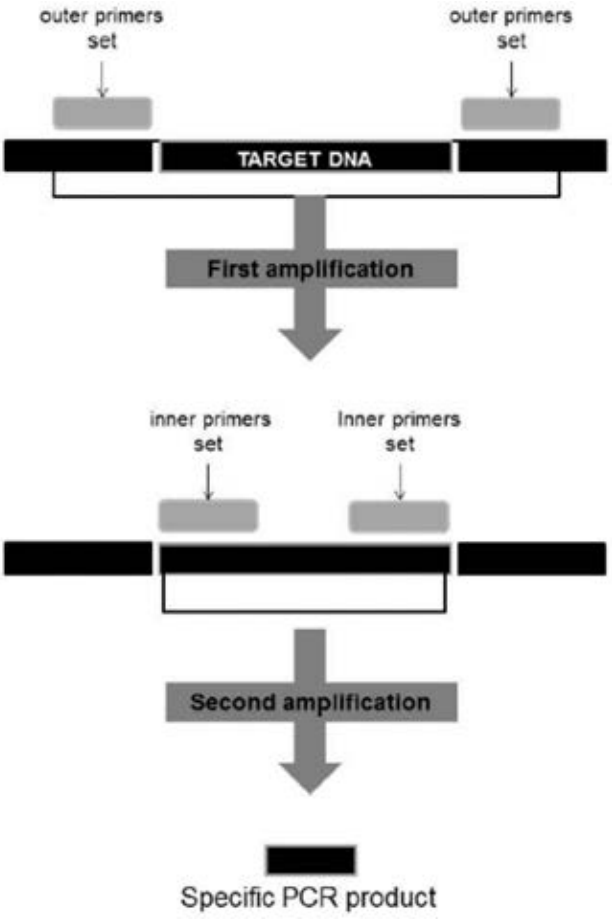
นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางอณูวิทยาเข้ามาช่วยในการจัดจำแนก ทำให้สามารถระบุชนิดของราได้ถูกต้องและรวดเร็วมากขึ้น ซึ่งเป็นที่นิยมและแพร่หลายในการจัดจำแนกไฟทอฟธอรา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งยีนที่สนใจของราแต่สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อสังเคราะห์บริเวณของยีนที่ต้องการตรวจสอบให้มากขึ้น จากนั้นตรวจหาผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยมีตำแหน่งของยีนที่จำเพาะซึ่งนิยมนำมาใช้ตรวจสอบราไฟทอฟธอราคือ ribosomal internal transcribed spacer (ITS) (รูปที่ 1.5) เป็นบริเวณ 870-900 คู่เบส ซึ่งอยู่ระหว่าง 18s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (18s rRNA) และ 25s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (25s rRNA) โดยมียีน 5.8s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (5.8s rRNA) อยู่กลางระหว่าง ITS1 และ ITS2 ซึ่งยีนนี้ถือว่าเป็นยีนส่วนที่สิ่งมีชีวิตอนุรักษ์ไว้ (conserved gene) การทราบลำดับเบสของยีนบริเวณนี้จะช่วยให้สามารถหาความสัมพันธ์และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มยูคาริโอตได้ (White และคณะ, 1990) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ยีนที่มีความจำเพาะเพียงยีนเดียวในการตรวจสอบสายพันธุ์ของไฟทอฟธอรา จะทำให้ไม่มีความชัดเจนหรือความน่าเชื่อถือมากพอที่จะระบุว่าเป็นไฟทอฟธอราสายพันธุ์ใด จึงนิยมนำยีนหลายยีนมาใช้ในการตรวจสอบร่วมกัน ซึ่งการใช้ยีนคนละบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องกันจะทำให้การตรวจสอบเพื่อยืนยันหรือระบุสายพันธุ์ชัดเจนมากขึ้น เช่น beta-tubulin (*β-tub),* 60S ribosomal protein L10 (Yang และ Hong, 2018) หรือใช้ตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome-c oxidase 1 (*cox1*) (Martin และคณะ, 2014) เป็นต้น



(Yadav, 2008)

รูปที่ 1.5 : ตำแหน่งยีนที่ใช้ตรวจสอบไฟทอฟธอรา

การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการจำแนกจีนัสไฟทอฟธอรา เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการทำ Nested-PCR (รูปที่ 1.6) ซึ่งเทคนิค Nested-PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ขั้นตอน โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ สำหรับไพรเมอร์คู่แรกจะใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งแรก ซึ่งไพรเมอร์จะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งแรกไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองซึ่งออกแบบให้มีการเพิ่มได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ถัดไปจากไพรเมอร์คู่แรก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งที่สองนั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมากตามที่ต้องการ ซึ่งเทคนิคนี้มีความว่องไวและมีความจำเพาะสูง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความจำเพาะสูงขึ้นด้วย (Tsai และคณะ, 2006)



(Ziembińska-Buczyńska และคณะ, 2014)

รูปที่ 1.6 : กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Nested-PCR

การทำ Nested-PCR ไพรเมอร์คู่แรกที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะอยู่ในช่วง 870-900 คู่เบส (White และคณะ, 1990) และไพร์เมอร์คู่ที่สองที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ ไพรเมอร์ A2 และ I2 ซึ่งมีความจำเพาะในการจำแนกราไฟทอฟธอรา โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะอยู่ในช่วง 752-852 คู่เบส (Drenth และคณะ, 2006) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ 1 kb plus DNA ladder เป็น marker ใช้ตัวแปรควบคุมบวกเป็นไฟทอฟธอรา ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 900 คู่เบส และตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น เพื่อที่จะใช้เทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลทว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอหรือไม่ และมีแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วงกี่คู่เบส ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลจากการทำ Nested-PCR และยืนยันได้ว่าแต่ละไอโซเลทที่ศึกษานั้นเป็นไฟทอฟธอรา

ในประเทศไทยมีการรายงานถึงการแพร่ระบาดของไฟทอฟธอราหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งส่งผลกระทบเป็นอย่างมากเมื่อไฟทอฟธอราเข้าทำลายพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยการเกิดโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากราไฟทอฟธอรา สำหรับไฟทอฟธอราสายพันธุ์หนึ่ง ๆ อาจก่อโรคกับพืชได้หลากหลายชนิด โดยลักษณะอาการของโรคพืชที่เกิดขึ้นนั้น มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์และความสามารถในการก่อโรคของไฟทอฟธอราสายพันธุ์นั้น ๆ (Puglisi และคณะ, 2017)

สภาพแวดล้อมที่พบว่ามีการแพร่กระจายของราไฟทอฟธอราในพื้นที่ประเทศไทย ได้มีการรายงานถึงโรคใบร่วงของยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ที่มีสาเหตุมาจาก *P. citrophthora* (Laohasakul และคณะ, 2017) โดยพื้นที่ภาคใต้ตามภูมิศาสตร์ของประเทศไทย มีสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงหรือเป็นบริเวณพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนมาก จึงเอื้อต่อการแพร่กระจายของไฟทอฟธอรา ส่งผลกระทบต่อผลผลิตยางพาราให้เกิดความเสียหาย อีกทั้ง *P. citrophthora* ยังเป็นราก่อโรคพืชซึ่งเคยมีการรายงานว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของพืชตระกูลส้มเป็นอย่างมาก (Ruano-Rosa และคณะ, 2018) นอกจากพืชตระกูลส้มที่ได้รับความเสียหาย ยังมีพืชอีกหลากหลายสายพันธุ์ในหลายพื้นที่ทั่วโลกที่มีการรายงานว่าพบการเข้าทำลายของ *P. citrophthora* เช่น โกโก้และกุหลาบ ประเทศอาร์เจนตินา (Frezzi, 1950), ผลกีวี่ ประเทศชิลี (Latorre และคณะ, 1991), ยูคาลิปตัส ประเทศสหรัฐอเมริกา (Smith, 1937), คาเนชั่น ประเทศกรีซ (Wolcan และคณะ, 2018), มะละกอ ประเทศจีน (Ho และคณะ, 1983), อะโวคาโด (Horne และคณะ, 1941) และแอปเปิ้ล (Smith และ Smith, 1925) ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

ลักษณะอาการของโรคพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของ *P. citrophthora* มีความแตกต่างกันเมื่อก่อโรคกับพืชอาศัยต่างสายพันธุ์ เช่น การก่อโรคกับพืชตระกูลส้ม จะทำให้ผลของพืชเกิดอาการเน่าเป็นบริเวณสีน้ำตาล (Eckert และ Brown, 1986) ทำให้เกิดอาการรากเน่าทั้งในพืชตระกูลส้มและมะละกอ (Whiteside, 1973) และยังพบว่ามีการทำลายเนื้อเยื่อของต้นพืชทำให้เกิดการไหลของน้ำยางที่บริเวณต้นของพืชตระกูลส้มด้วย (Knorr และ Summaries, 1973)

จากการรายงานการก่อโรคของ *P. citrophthora* ทำให้ทราบว่าไฟทอฟธอราสายพันธุ์นี้ สามารถเข้าทำลายในพืชอาศัยได้หลากหลายสายพันธุ์ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเป็นการระบุสายพันธุ์ของไฟทอฟธอราที่แยกได้จากใบยางพารา ซึ่งเป็นราก่อโรคพืชที่สำคัญ และศึกษาความสามารถในการก่อโรคกับใบยางพารา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการแก้ไขปัญหาการระบาดของราไฟทอฟธอราได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยก *P. citrophthora* ให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาลักษณะของ *P. citrophthora* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และอณูวิทยา
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อโรคในยางพาราของ *P. citrophthora*

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

22) ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis system) รุ่น Minis-150 ของบริษัท Major science ประเทศไต้หวัน

23) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

24) ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO ประเทศญี่ปุ่น

25) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

26) ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท BossTech จากสหราชอาณาจักร

27) ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น Cleanmodel V.6 ของบริษัท Lab service Ltd., Part. ประเทศสหรัฐอเมริกา

28) ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

29) ตู้อบแห้ง (dryer) ขอบริษัท Contherm ประเทศนิวซีแลนด์

30) ถุงพลาสติกใสหรือถุงร้อน

31) ถุงมือยาง

32) ถุงมือไนไตร (nitrile gloves)

33) ทิป (tips) ขนาด 2.5 ไมโครลิตร

34) ทิป (tips) ขนาด 20 ไมโครลิตร ของบริษัท Trefflab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

35) ทิป (tips) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Trefflab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

36) ทิป (tips) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Bioline

37) ทิป(tips) ขนาด 10 มิลลิลิตร

38) ที่ตั้งหลอดพลาสติก

39) แท่งแก้วหยดสาร (dropper)

40) แท่งแก้วกระจายเชื้อ (glass spreader)

41) บีกเกอร์ (beakers) ของบริษัท Pyrex ประเทศเยอรมัน

42) แผ่นปิดสไลด์ (coverslip) ขนาด 22x22 มิลลิเมตร ของบริษัท Menzel-Glaser

43) พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)

44) อะลูมิเนียมฟอยล์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

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

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

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

49) หลอดเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR tubes) ของบริษัท QSP ประเทศสหรัฐอเมริกา

50) หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen ประเทศสหรัฐอเมริกา

51) Gel Documentation ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1) วุ้นผง (agar) ผลิตโดยบริษัท Productora de agar S.A. ประเทศชิลี
2) ชุดสกัดพลาสมิด BioFACT™ Plasmid Mini Prep Kit (Ver.2.0) ของบริษัท Biofactory
3) น้ำกลั่น (distilled water)
4) น้ำผักพร้อมดื่มยี่ห้อ V8 สูตร Original ผลิตโดยบริษัท Campbell soup ประเทศสหรัฐอเมริกา
5) น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ
6) อะกาโรส (agarose) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
7) เอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ผลิตโดยบริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา
8) Absolute ethanol
9) Ampicillin ของบริษัท M & H manufacturing co., ltd.
10) Lactophenol cotton blue
11) LB broth (Luria-Bertani) ของบริษัท Difco
12) DNA polymerase ของบริษัท Apsalagen
13) DNA marker ของบริษัท Invitrogen
14) PureLink™ Quick Gel Extraction Kit ของบริษัท Invitrogen ประเทศเยอรมัน
15) T&A™ Cloning Kit ของบริษัท Yeastern biotech co., Ltd.
16) S.O.C medium (super optimal broth with catabolic repressor)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 คัดเลือกไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *P. citrophthora*

เตรียมไอโซเลทของราไฟทอฟธอราที่คาดว่าเป็น *P. citrophthora* โดยใช้ไอโซเลทที่แยกได้จากใบยางพาราที่ร่วงหล่นและมีอาการของโรคในพื้นที่ภาคตะวันออกที่มาจากการศึกษาโครงการวิจัยในหัวข้อ “การคัดแยก *Phytophthora* sp. จากต้นยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทย” ของนายอัชวัฒน์ วงษ์เกษมศิริ และการศึกษาโครงการวิจัยในหัวข้อ “การจำแนก *Phytophthora* sp. จากสวนยางในตำบลกองดิน และตำบลพังราด อำเภอแกลง จังหวัดระยอง และตำบลวังใหม่ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี” ของนางสาวอภิชญา นพเลิศ ซึ่งมีการศึกษาและบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไฟทอฟธอราไว้เบื้องต้น โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะเบื้องต้นที่มีการรายงานจากโครงการวิจัยดังกล่าว และข้อมูลลักษณะของ *P. citrophthora* ที่มีการตีพิมพ์เป็นบทความวิจัยมาเปรียบเทียบกัน ในการคัดเลือกไอโซเลทที่พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งคาดว่าเป็น *P. citrophthora* หรือมี *P. citrophthora* ปนอยู่ เพื่อนำมาแยกให้เป็น *P. citrophthora* ที่บริสุทธิ์

3.2 แยกไฟทอฟธอราให้บริสุทธิ์

นำเข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug ของไอโซเลทไฟทอฟธอราที่คัดเลือกไว้แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อได้โคโลนีของไฟทอฟธอราจึงทำเป็น agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่ผ่านการฆ่าเชื้อกดลงบนผิวหน้าของอาหาร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug 2 ชิ้น ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำ P3 ใส่เมล็ดงา 3 เมล็ด บ่มในที่มีแสงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังบ่มครบกำหนดจึงเกี่ยวเส้นใยที่เจริญรอบเมล็ดงาใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยน น้ำใหม่ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำ P3 ไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกระตุ้นให้มีการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากซูโอสปอร์แรงเจียม สังเกตการปล่อยซูโอสปอร์โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วปิเปตน้ำบริเวณที่พบว่ามีการปล่อยซูโอสปอร์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 จากนั้นใช้แท่งแก้วกระจายเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากการแยกโดยใช้ซูโอสปอร์เดี่ยว

สังเกตการเจริญของโคโลนีไฟทอฟธอราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หากพบว่ามีโคโลนีของไฟทอฟธอราขึ้นจึงทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อกดลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug ไปเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 จานใหม่ทันที หากพบการปนเปื้อนของจุลชีพชนิดอื่นให้ทำวิธีดังกล่าวข้างต้นซ้ำจนกว่าจะได้ราไฟทอฟธอราที่บริสุทธิ์

3.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป

ศึกษาลักษณะของซูโอสปอร์แรงเจียมที่ราไฟทอฟธอราสร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 โดยนำไฟทอฟธอราที่ได้คัดเลือกไว้ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หากพบว่ามีการสร้างซูโอสปอร์แรงเจียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จึงใช้ปิเปตดูดน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไฟทอฟธอราเจริญอยู่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของซูโอสปอร์แรงเจียมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหลังจากที่ใส่น้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วบันทึกลักษณะตรวจการหลุดร่วงของสปอร์แรงเจียม โดยการเอียงจานอาหารสลับไปมาในแนวระนาบอย่างช้า ๆ เพื่อชะซูโอสปอร์แรงเจียมที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ให้หลุดออก

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์แรงเจียมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นย้อมสารแขวนลอยสปอร์แรงเจียมด้วย lacto phenol cotton blue แล้วจึงปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์แรงเจียมและความยาวของก้านชูซูโอสปอร์แรงเจียมที่ติดมากับซูโอสปอร์เมื่อหลุดออก รวมทั้งสังเกตรูปร่างของซูโอสปอร์แรงเจียมจำนวน 50 สปอร์ต่อ 1 ไอโซเลท พร้อมทั้งบันทึกข้อมูล

ศึกษารูปแบบของโคโลนีไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลท โดยทำเป็น agar plug จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตรูปแบบการเจริญของโคโลนี

3.4 ศึกษาอุณหภูมิในการเจริญ

นำ agar plug ของไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 จากนั้นนำแต่ละไอโซเลทของไฟทอฟธอราไปบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อหาอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) และอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) ที่ไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญได้ โดยทำการทดลองเป็น 3 ซ้ำต่อตัวอย่างไฟทอฟธอรที่บ่มในแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในแต่ละวัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง

3.5 ตรวจสอบสกุลราโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.5.1 เลี้ยงราเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่ผ่านการฆ่าเชื้อกดลงบนผิวหน้าของอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.5.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ใช้เส้นใยของไฟทอฟธอราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แต่ละไอโซเลท โดยเกี่ยวเส้นใยจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยตรง มาผสมกับสารทั้งหมดในปริมาณตามตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ตัวแปรควบคุมที่ใช้ในการทดลอง จะใช้ตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และใช้ตัวแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* specie

ตารางที่ 3.1 : ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ส่วนประกอบ		ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น		17.63
10X PCR buffer		2.5
50 mM $MgCl_2$		0.75
50 mM dNTPs mix		0.5
ไพรเมอร์	10 µM ITS1 (forward)	1.25
	10 µM ITS4 (reward)	1.25
Taq Polymerase		0.125
เส้นใยจากไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลท		1
ปริมาตรรวม		25

ตารางที่ 3.2 : ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

Name	Function	Position	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected size of PCR product (bp)	T_m (^oC)
ITS1	Forward	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	870-900	65
ITS4	Reverse	ITS2	TCCTCCGCTTATTGATATGC		58

(White และคณะ, 1990)

สำหรับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตารางที่ 3.3 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

3.5.3 ตรวจสอบไฟทอฟธอราด้วยวิธี Nested-PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับจีนัสไฟทอฟธอรา โดยใช้เส้นใยของไฟทอฟธอราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แต่ละไอโซเลท เกี่ยวเส้นใยจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยตรง มาผสมกับสารทั้งหมดในปริมาณตามตารางที่ 3.4 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ตัวแปรควบคุมที่ใช้ในการทดลอง จะใช้ตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และใช้ตัวแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species

ตารางที่ 3.4 : ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ส่วนประกอบ		ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น		17.63
10X PCR buffer		2.5
50 mM $MgCl_2$		0.75
50 mM dNTPs mix		0.5
ไพรเมอร์	10 µM A2 (forward)	1.25
	10 µM I2 (reward)	1.25
Taq Polymerase		0.125
เส้นใยจากไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลท		1
ปริมาตรรวม		25

ตารางที่ 3.5 : ข้อมูลไพรเมอร์ A2 และ I2

Name	Function	Position	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected size of PCR product (bp)	T_m (°C)
A2	Forward	ITS1	ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA	752-832	64
I2	Reverse	ITS2	GATATCAGGTCCAATTGAGATGC		58

(Drenth และคณะ, 2006)

สำหรับภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตารางที่ 3.6 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	55.0	0.30
extension	72.0	1.00
Final extention	72.0	5.00

3.5.4 วิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% โดยชั่งอะกาโรส 0.5 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1X TAE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อน จากนั้นเทเจลที่ละลายลงแม่พิมพ์ โดยวางหวีให้ได้ขนาดที่เหมาะสมกับการใช้งาน เมื่อเจลแข็งตัวจึงนำไปใส่ในเครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเติม 50X TAE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยผสม 6X loading dye 1 ไมโครลิตร เข้ากับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของราไฟทอฟธอราจากแต่ละไอโซเลทให้เข้ากัน และใส่ลงในช่องเจลแต่ละช่อง โดยมี 1 kb plus DNA Ladder เป็นตัวระบุขนาดผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอ กำหนดให้เครื่องมีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วนำเจลที่ได้มาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำเจลไปวิเคราะห์ผลด้วยการตรวจแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และถ่ายรูปด้วยเครื่อง gel documentation

3.6 ระบุสายพันธุ์ของไฟทอฟธอราจากลำดับสารพันธุกรรม

3.6.1 เตรียม competent cell

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

3.6.2 เตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 โดยใช้เส้นใยของไฟทอฟธอราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 แต่ละไอโซเลท เกี่ยวเส้นใยของราโดยตรงผสมกับสารทั้งหมดในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาณตามตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.6.3 ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit ทำการทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ

3.6.4 โคลนชิ้นดีเอ็นเอลงในพลาสมิด

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาโคลนลงในพลาสมิด ใช้ชุดทดสอบสำเร็จ T&A™ Cloning Kit โดยทำการทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ

3.6.5 นำพลาสมิดเข้าเซลล์ *E. coli*

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

3.6.6 คัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีหลังจากนำเข้าพลาสมิด

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลินมาแยกด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลินเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวจึงนำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลินตามช่องกริด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เจริญมา 3 โคโลนีต่อตัวอย่างไฟทอฟธอรา 1 ไอโซเลท โดยแบ่งแต่ละโคโลนีเป็นครึ่งหนึ่ง นำไปแยกด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลินเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวไว้สำหรับสกัดพลาสมิด และนำอีกครึ่งหนึ่งของโคโลนีนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ซึ่งถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับจีนัสไฟทอฟธอรา วิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เป็นการตรวจสอบก่อนที่จะสกัดพลาสมิดเพื่อยืนยันว่าโคโลนีที่เลือกมามีชิ้นส่วนพลาสมิดของตัวอย่างไฟทอธอรา

3.6.7 สกัดพลาสมิด

นำโคโลนีเดี่ยวอีกครึ่งหนึ่งที่เหลือไปลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี streak plate แล้วนำมาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ BioFACT™ Plasmid Mini Prep Kit ทำการทดลองตามคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จ จากนั้นวัดความเข้มข้นที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ให้ได้ความเข้มข้นอย่างน้อย 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วจึงแบ่งพลาสมิดที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่งไปหาลำดับสารพันธุกรรมที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

3.6.8 วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย BLASTn จากนั้นนำมาเรียงโดยใช้ ClustalW ในโปรแกรม MEGA 7 สร้างเป็นแผนรูปวิวัฒนาการของลำดับเบสที่ได้จากยีนบริเวณ ITS โดยมีตัวแทนที่ใช้อ้างอิงเป็นไฟทอฟธอราที่อยู่ใน clade 2 จากฐานข้อมูลใน GenBank ซึ่งตัวแทนที่นำมาอ้างอิงมีดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 : ตัวแทนไฟทอฟธอราที่นำมาอ้างอิง

Phytophthora species	Representative isolate	Clade	ITS
P. terminalis	Strain Ex-type CPHST BL 164	2a	MG865592
P. meadii	Strain CPHST BL 81	2a	MG865529
P. citrophthora	Strain Ex-type CPHST B 60	2a	MG865476
P. citrophthora	Voucher ABD:303	2a	MF115522
P. citrophthora	Isolate GL-Pci-2	2a	GU133066
P. citrophthora	Strain CBS 581.69	2a	MH401211
P. colocasiae	Strain CPHST BL 173	2a	MG865479
P. occultans	Strain Ex-type CPHST BL 163	2a	MG865555
P. himalsilva	Strain Ex-type CPHST BL 102	2a	MG865507
P. botryosa	Strain IMI136915	2a	AF266784
P. capsici	Strain Ex-type CPHST BL 33G	2b	MG865467

3.7 ศึกษาการก่อโรคบนใบยางพาราด้วยวิธี Detached Leaf Assay

เตรียมซูโอสปอร์แขวนลอยสำหรับทดสอบความสามารถในการก่อโรค โดยนำไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 มาทำ agar plug โดยใช้แท่งแก้วกลวงที่ผ่านการฆ่าเชื้อกดลงบนผิวหน้าอาหารบริเวณปลายเส้นใยของรา จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอเกี่ยว agar plug ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุน้ำ P3 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการกระตุ้นให้มีการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียม สังเกตซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ปิเปตซูโอสปอร์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุน้ำ P3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วจึงวางใบยางพาราอ่อนหลังจากล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลองเป็นสามซ้ำในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจะต้องเลือกขนาดของใบยางพาราในการทดสอบให้มีขนาดใกล้เคียงกัน อีกทั้งใบยางต้องไม่มีร่องรอยของโรคใด ๆ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบยางพาราในแต่ละวัน

ความเข้มข้นของซูโอสปอร์แขวนลอยคำนวณจากการทดลอง โดยการปิเปตซูโอสปอร์แขวนลอยจากแต่ละไอโซเลทปริมาตร 50 และ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ใช้แท่งแก้วกระจายเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 คำนวณหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ใบยางพาราที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นตัวอย่างใบยางพาราที่เก็บจากสวนในตำบลหมอนนาง อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี 20140 ประเทศไทย (พิกัด 13.388614, 101.21883200000001)

รูปที่ 3.1 : ใบยางพาราที่นำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรค

เมื่อครบระยะเวลาที่ทดสอบความสามารถในการก่อโรค นำใบยางพาราที่บ่มทดสอบมา 1 ตัวอย่างจากแต่ละชุดการทดลองของตัวอย่างไอโซเลท ใช้คีมคีบที่ปราศจากเชื้อฉีกใบยางพาราเป็นชิ้นเล็กวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะของเชื้อที่เจริญจากใบยางพารา

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ไอโซเลทของไฟทอฟธอราที่คัดเลือก

เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างไฟทอฟธอราที่ได้มีการรายงานไว้ในเล่มโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์เกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. citrophthora* ซึ่งมีการรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดต่างๆ พบว่าได้ตัวอย่างไอโซเลทของไฟทอฟธอราทั้งหมด 4 ไอโซเลท โดยเป็นไอโซเลทที่แยกจากใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงในพื้นที่ภาคตะวันออก ในจังหวัดระยองและจังหวัดตราด โดยนายอัชวัฒน์ วงษ์เกษมศิริ และนางสาวอภิชญา นพเลิศ มีพื้นที่เก็บตัวอย่างตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 : ไอโซเลทไฟทอฟธอราจากตัวอย่างใบยางพาราจากพื้นที่เก็บตัวอย่างในภาคตะวันออก

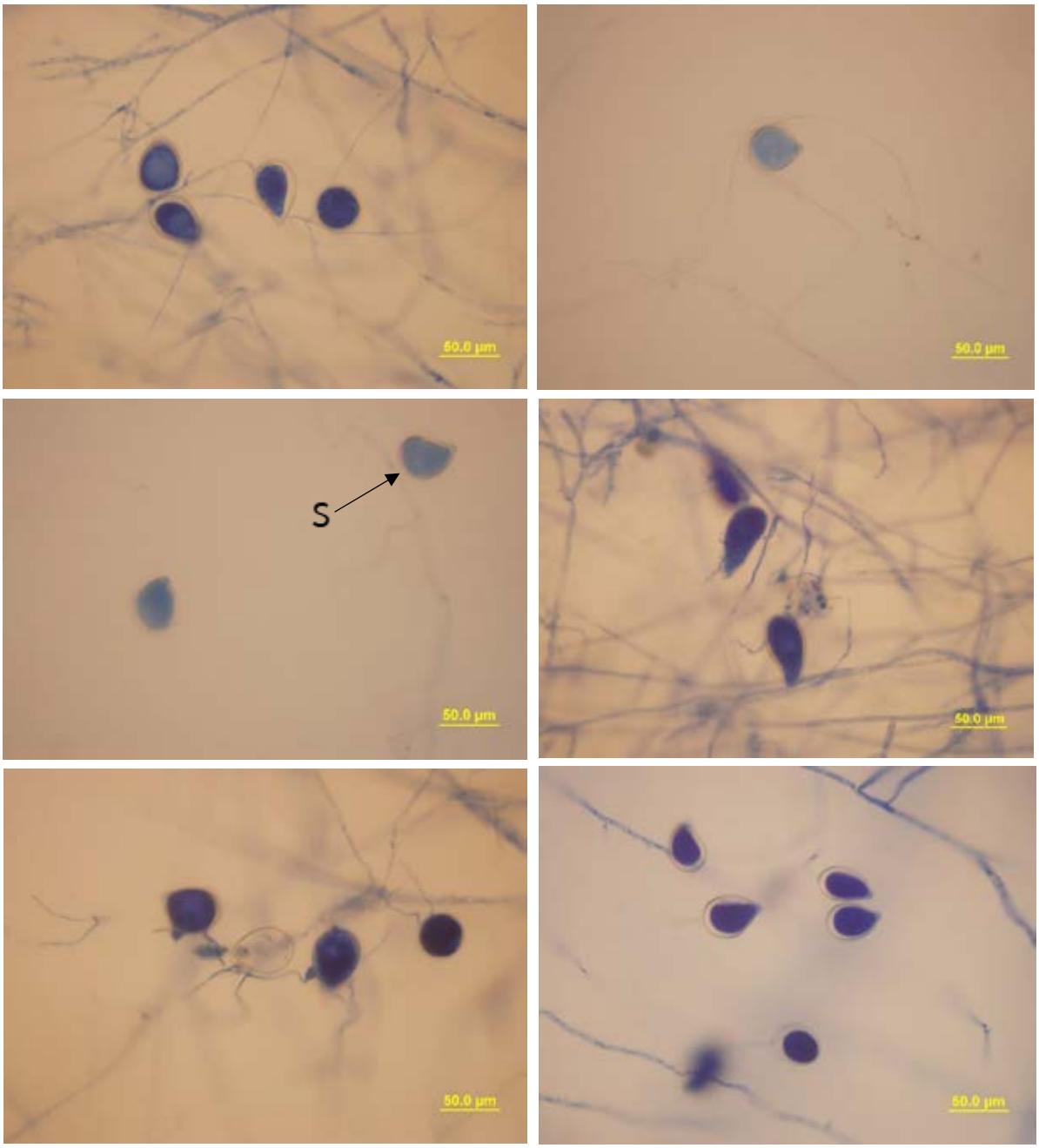
พิกัด	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	รหัสสวน	รหัสตัวอย่าง
12.418433, 102.397114	1 กม.จากปากทางเข้าวัดมุมสงบ ต.แสนตุ้ง อ.เขาสมิง จ.ตราด	L112	L112-2
12.438111, 102.618854	ซอยคลองลื้อ3 ต.ด่านชุมพล อ.บ่อไร่ จ.ตราด	L116	L116-4, L116-1
12.786174, 101.782344	ตรงข้ามสวนนายโอภาส ซ.โรงขนมจีน ถ.ชากขุนวิเศษ ต.กองดิน อ.แกลง จ.ระยอง	L62	L62B-1

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป

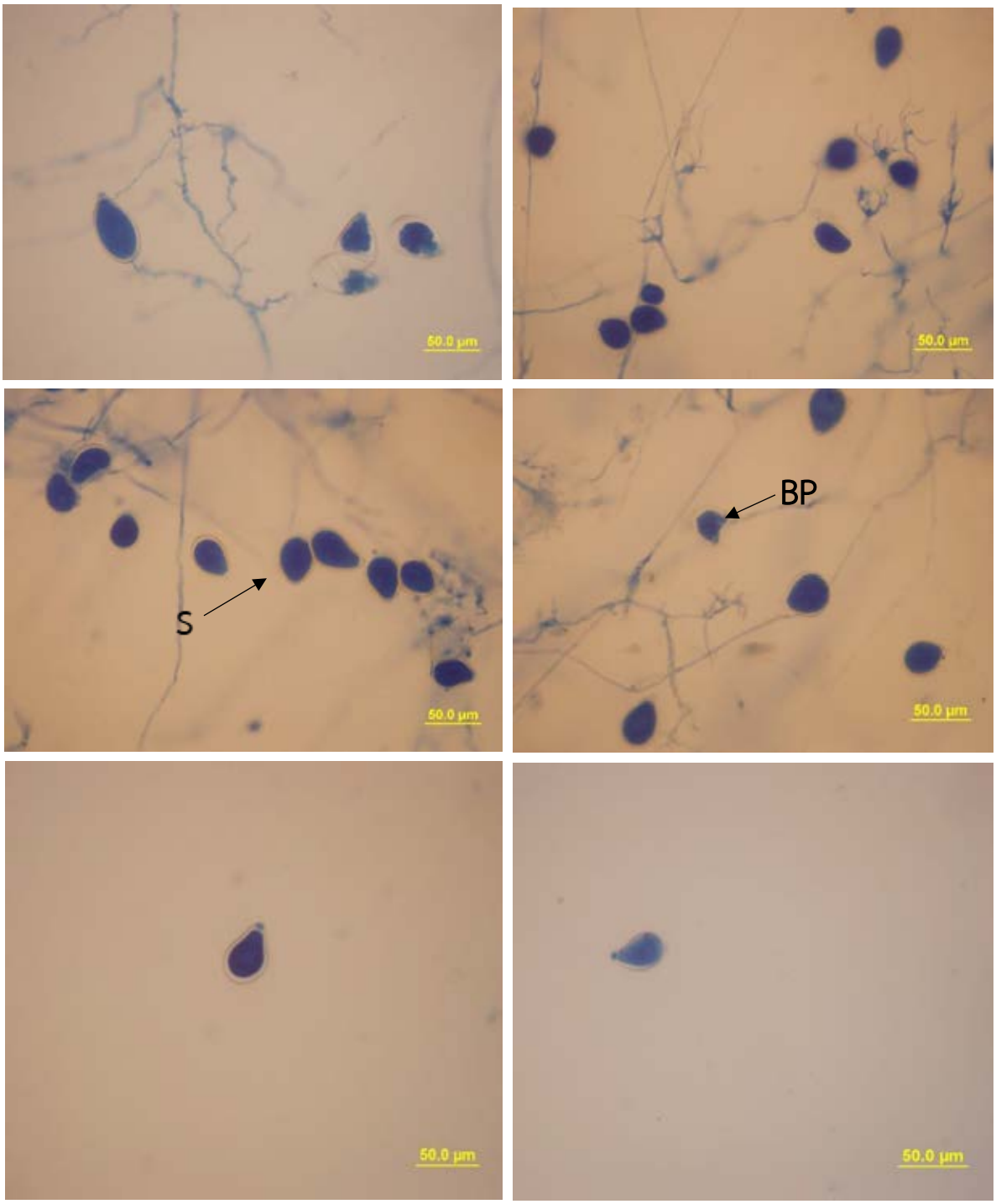
เมื่อคัดแยกไฟทอฟธอราจากตัวอย่างแต่ละไอโซเลทจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำไอโซเลทที่คาดหมายว่าเป็น *P. citrophthora* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นบันทึกข้อมูลสปอร์แรงเจียม 50 สปอร์

ตารางที่ 4.2 : ลักษณะของไอโซเลทที่คาดว่าจะเป็น *P. citrophthora*

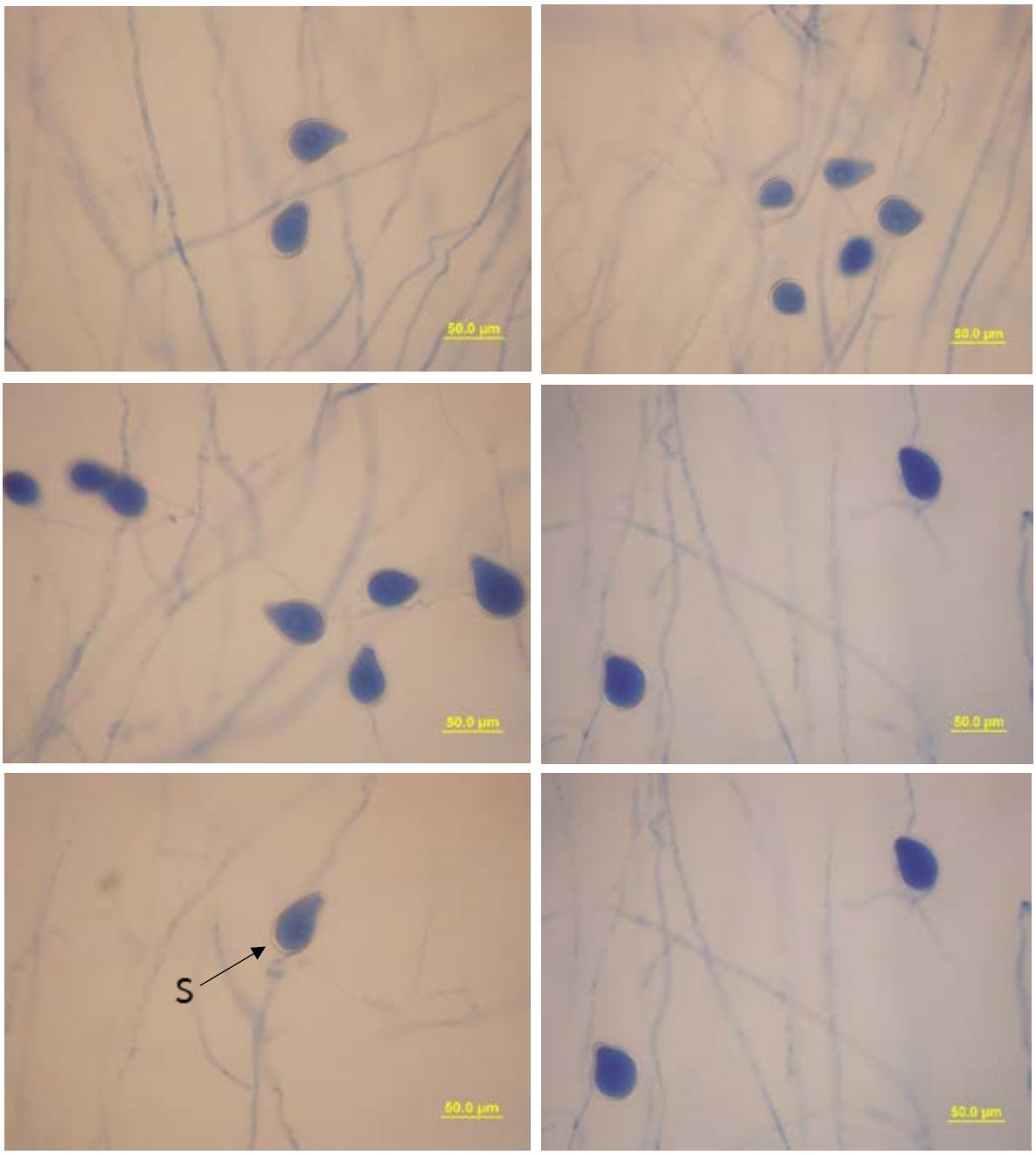
isolate	sporangia morphology									
	Sporangium size (µm)						Caducity	Papillation	shape	Length:Width ratio
	Length			Width						
	Maximum	Minimum	Average	Maximum	Minimum	Average				
L112-2	74.3	32.8	49.7	40.6	24.5	33.7	non-caducous	papillate	ellipsoid, globose, obpyriform, ovoid, obturbinate	1.47
L116-1	64.7	29.4	40.8	35.8	20.3	29.9	non-caducous	papillate	globose, obpyriform, reniform, obturbinate	1.36
L116-4	61.1	32.9	45.4	42.7	24.0	32.3	non-caducous	papillate	globose, obpyriform, reniform, obturbinate	1.41
L62B-1	34.2	17.2	26.4	20.6	15.0	17.3	non-caducous	papillate	obpyriform, obturbinate, ovoid, reniform	1.53



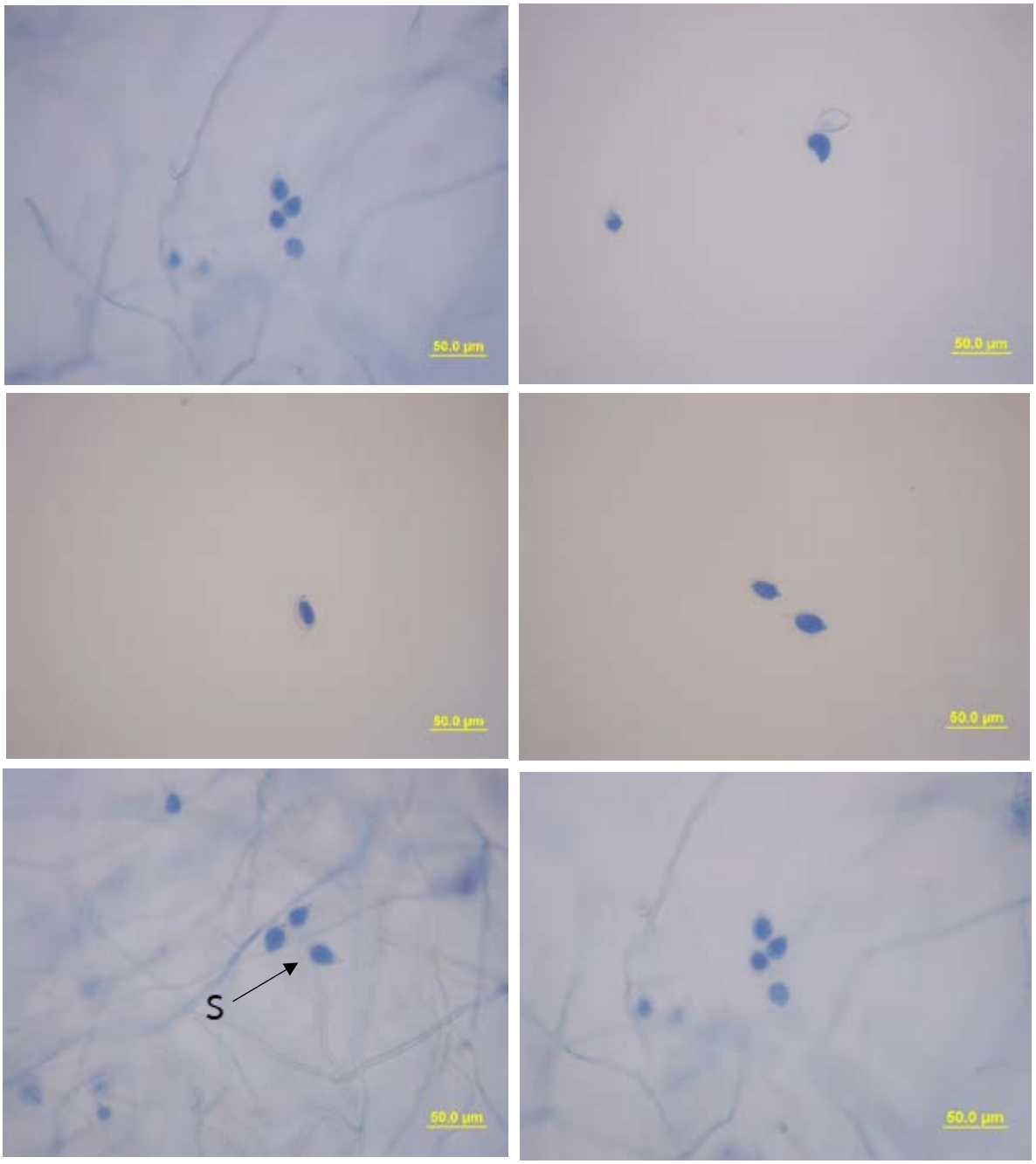
รูปที่ 4.1 : ไอโซเลท L112-2 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4.2 : ไอโซเลท L116-1 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400 เท่า และสปอร์แรงเจียมมี 2 papillates (BP)



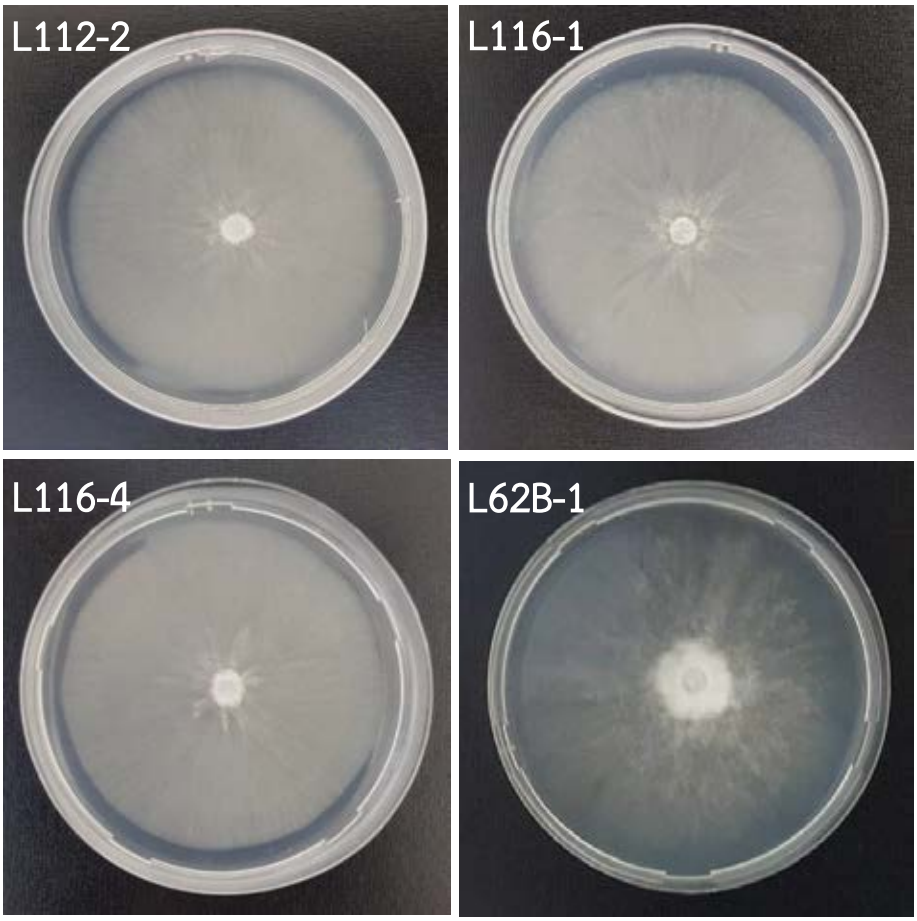
รูปที่ 4.3 : ไอโซเลท L116-4 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4.4 : ไอโซเลท L62B-1 แสดงรูปลักษณะสปอร์แรงเจียม (S) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 หลังจากที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทสร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ซึ่งมีขนาดและรูปร่างของสปอร์แรงเจียมที่หลากหลาย อีกทั้งยังพบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ สปอร์แรงเจียมที่เจริญจนสมบูรณ์ไม่หลุดออกจากก้านชูสปอร์ เรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่า non-caducous จึงไม่สามารถวัดความยาวของ pedicel ซึ่งเป็นส่วนของสปอร์แรงจิโอฟอร์ที่หลุดติดมากับสปอร์แรงเจียมได้

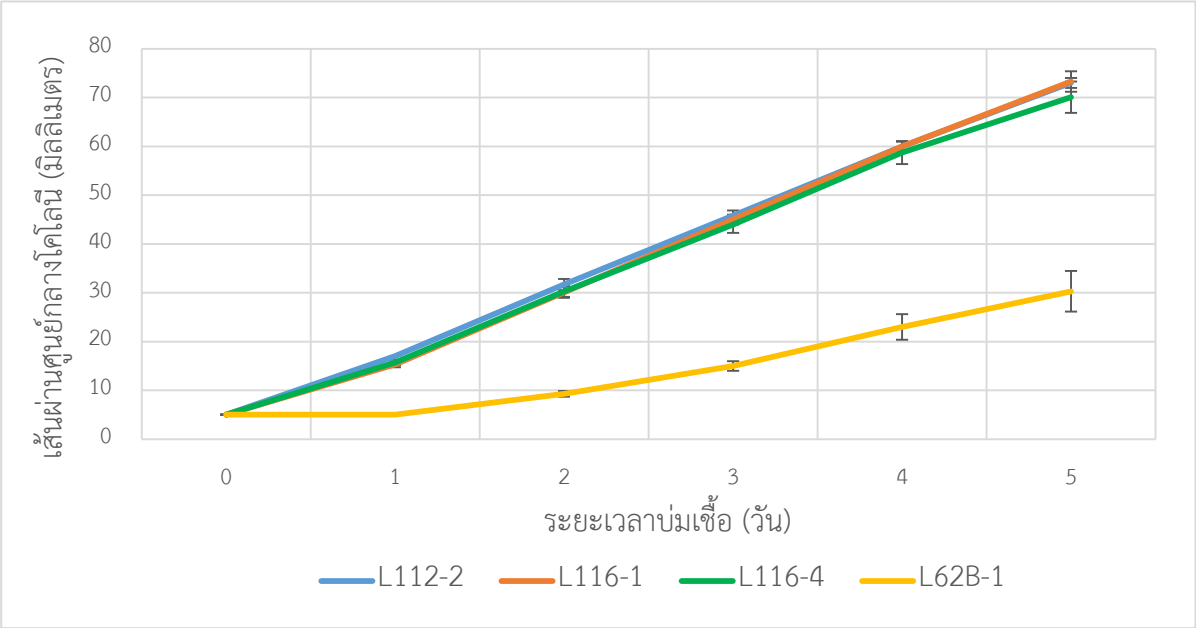
ลักษณะของโคโลนีเมื่อนำตัวอย่างไฟทอฟทอราทั้ง 4 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท L112-1, L116-1 และ L116-4 มีลักษณะโคโลนีเป็นแบบ stellate และไอโซเลท L62B-1 มีลักษณะโคโลนีเป็นแบบ radiation



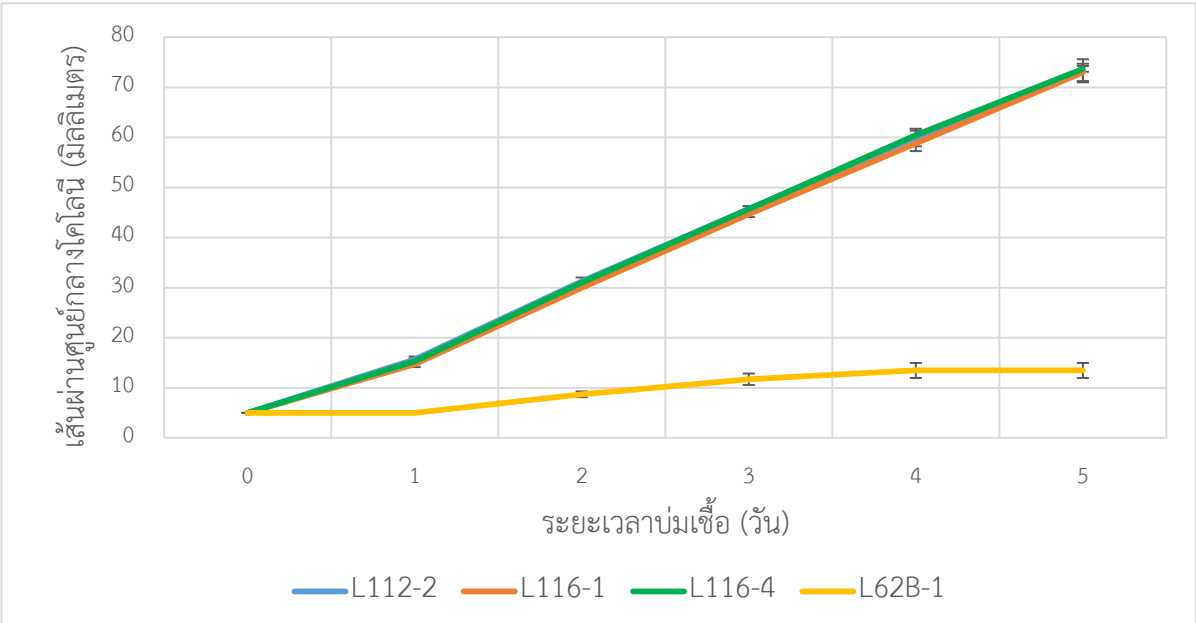
ภาพที่ 4.5 : แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.3 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

เพื่อให้ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของไอโซเลททั้งหมด โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 7 และ 37 องศาเซลเซียส ไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่ามีการเจริญ จึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี โดยเลือกช่วงการเจริญที่เป็น exponential phase ของแต่ละไอโซเลท แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญ โดยทำการทดลองสามซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย



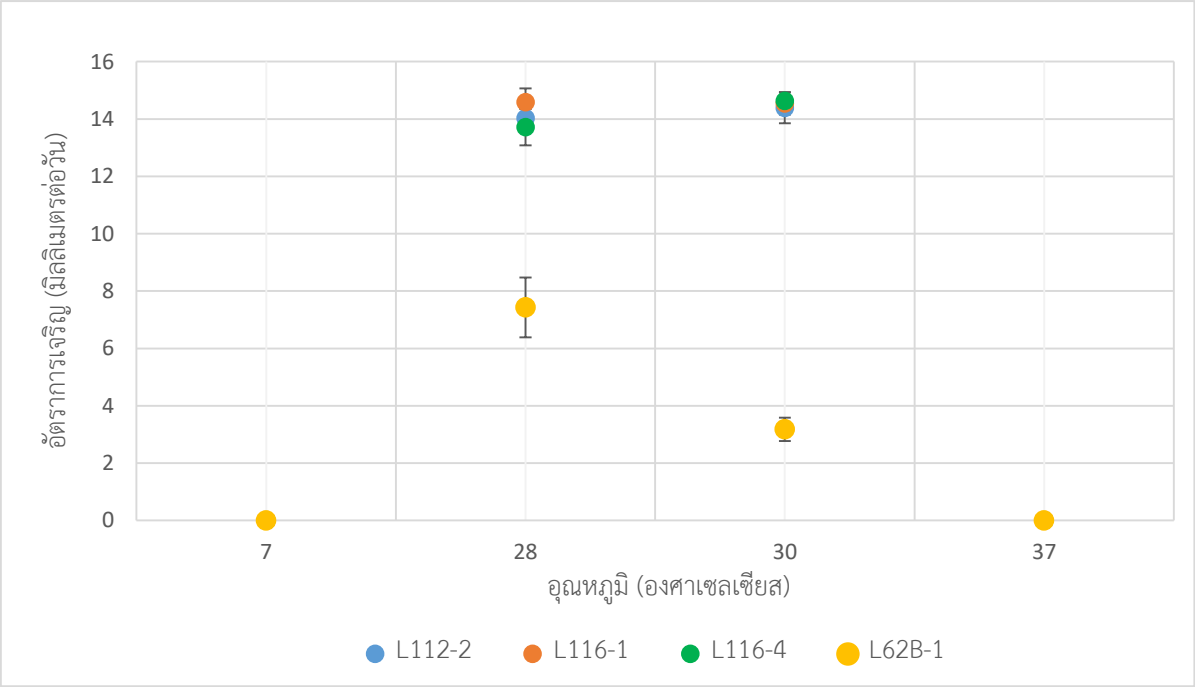
กราฟที่ 4.1 : การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส



กราฟที่ 4.2 : การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.4 อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

นำไอโซเลทที่คาดหมายว่าเป็น *P. citrophthora* มาเลี้ยงบนอาหาร 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน โดยทำการทดลองสามซ้ำเพื่อหาอัตราการเจริญ ได้ผลดังกราฟที่ 4.3

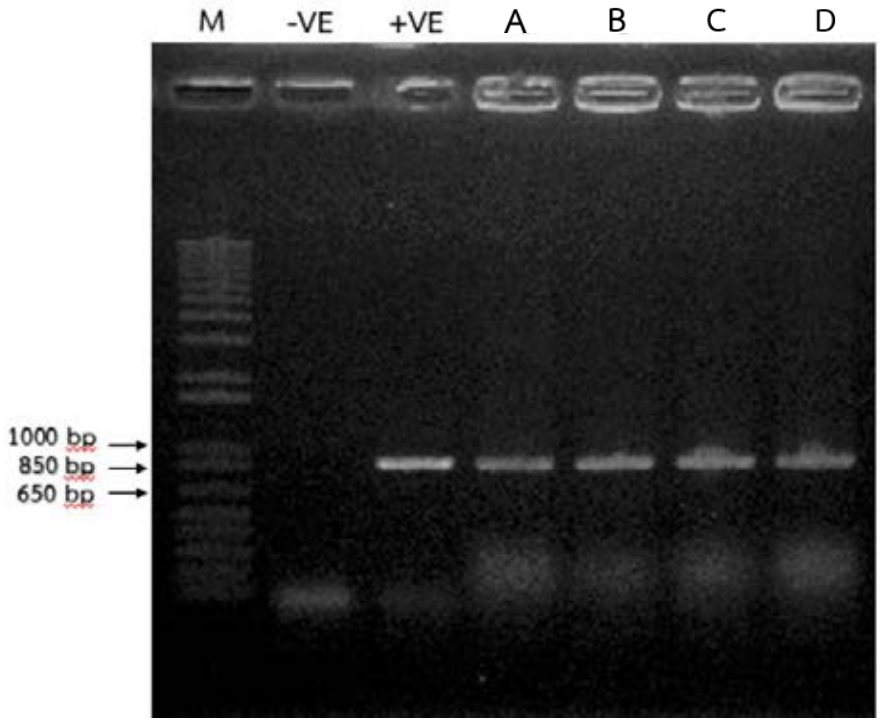


กราฟที่ 4.3 : อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ของไฟทอฟธอราไอโซเลท L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-1 ที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส

4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

4.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS

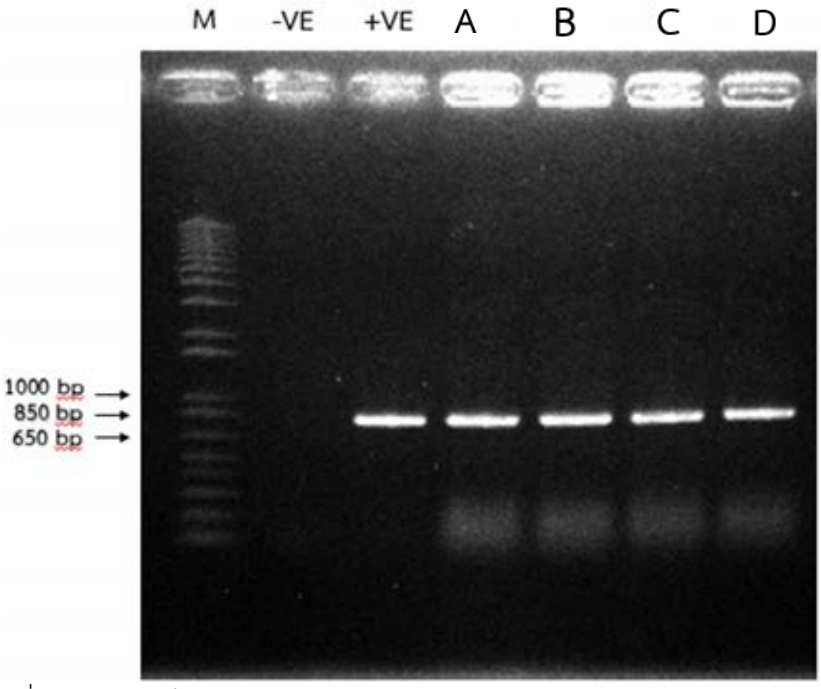
เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท แสดงแถบดีเอ็นเอตรงกับขนาดดีเอ็นเอของตัวควบคุมบวก (รูปที่ 4.6) ซึ่งใช้ *Phytophthora* species เทียบกับตัวแปรควบคุมลบที่ใช้น้ำกลั่น จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นราหรือสิ่งมีชีวิตคล้ายรา



รูปที่ 4.6 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L116-1 (B), L116-4 (C) และ L62B-1 (D) โดยมีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

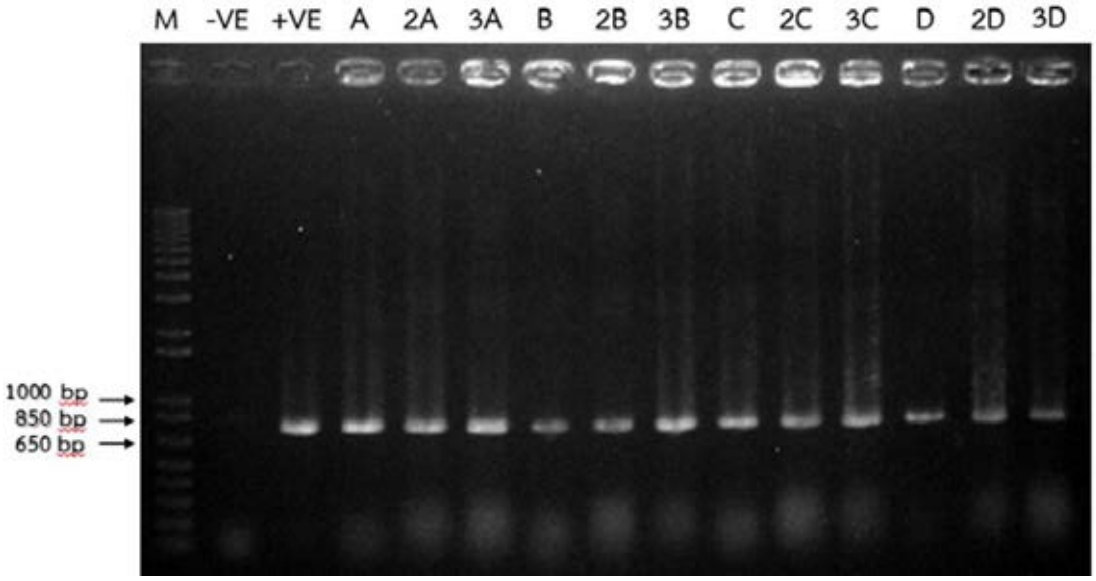
4.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อราไฟทอฟธอรา จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าจากตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท แสดงแถบดีเอ็นเอตรงกับตัวควบคุมบวก (รูปที่ 4.7) ซึ่งใช้ *Phytophthora* species เทียบกับตัวแปรควบคุมลบที่ใช้น้ำกลั่น ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นจีนัสไฟทอฟธอรา



รูปที่ 4.7 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L116-1 (B), L116-4 (C) และ L62B-1 (D) โดยมีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

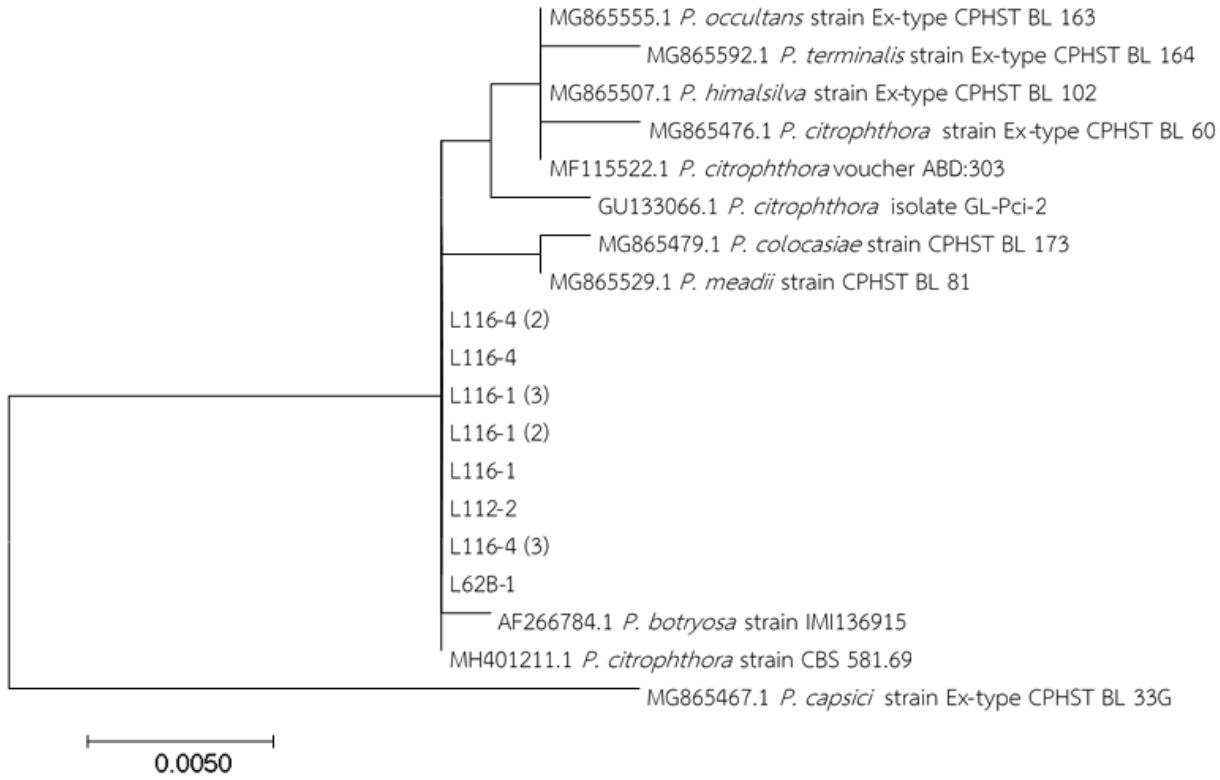
หลังจากโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้าพลาสมิด ใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าไปในพลาสมิด โดยใช้ไอโซเลทละ 3 โคลน



รูปที่ 4.8 : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลท L112-2 (A), L112-2 (2A), L112-2 (3A), L116-1 (B), L116-1 (2B), L116-1 (3B), L116-4 (C), L116-4 (2C), L116-4 (3C), L62B-1 (D), L62B-1 (2D) และ L62B-1 (3D) มีตัวแปรควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น และแปรควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* species ด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

4.6 การระบุสายพันธุ์ไฟทอฟธอราจากลำดับสารพันธุกรรม

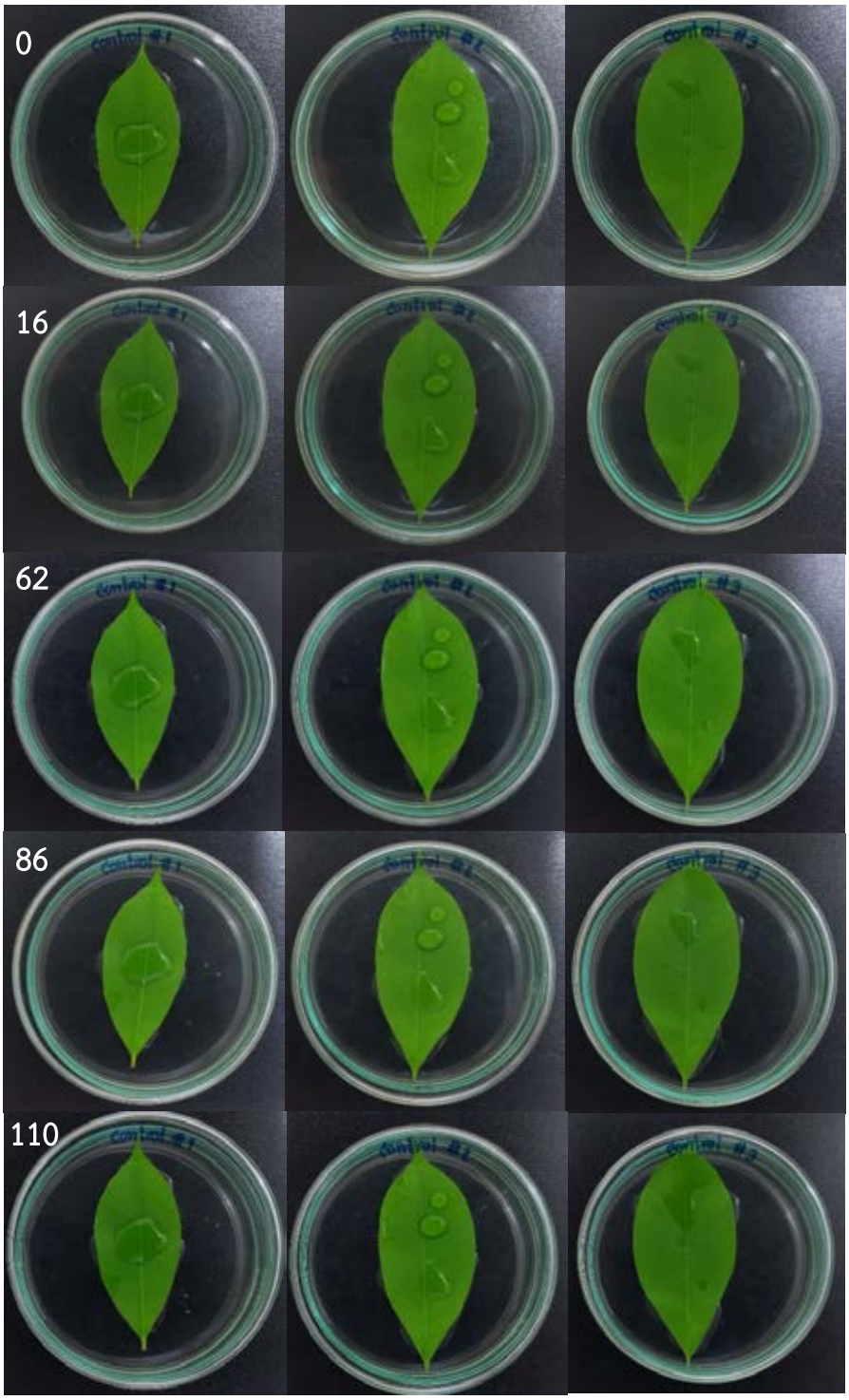
นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย BLASTn พบว่า ทุกไอโซเลทเหมือน *P. citrophthora* CBS 581.69 แต่ไอโซเลทรหัสนี้ culture collection ระบุว่าเป็น *P. botryosa* นอกจากนี้ เมื่อนำมาเทียบกับไฟทอฟธอราใน clade 2a พบว่า มีลำดับเบสในบริเวณ ITS คล้ายกันมาก ซึ่งดูได้จากแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (รูปที่ 4.9) ที่ต่างสายพันธุ์มาอยู่ปะปนกัน โดยโครงงานวิจัยนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์แรงเจียมที่เหมือนกับ *P. citrophthora* ทั่วโลก แม้จะไม่มียีนจากบริเวณอื่นมาร่วมในการวิเคราะห์เพื่อระบุสายพันธุ์ด้วย แต่ก็คาดว่าตัวอย่างไอโซเลทน่าจะเป็น *P. citrophthora* มากกว่า *P. botryosa*



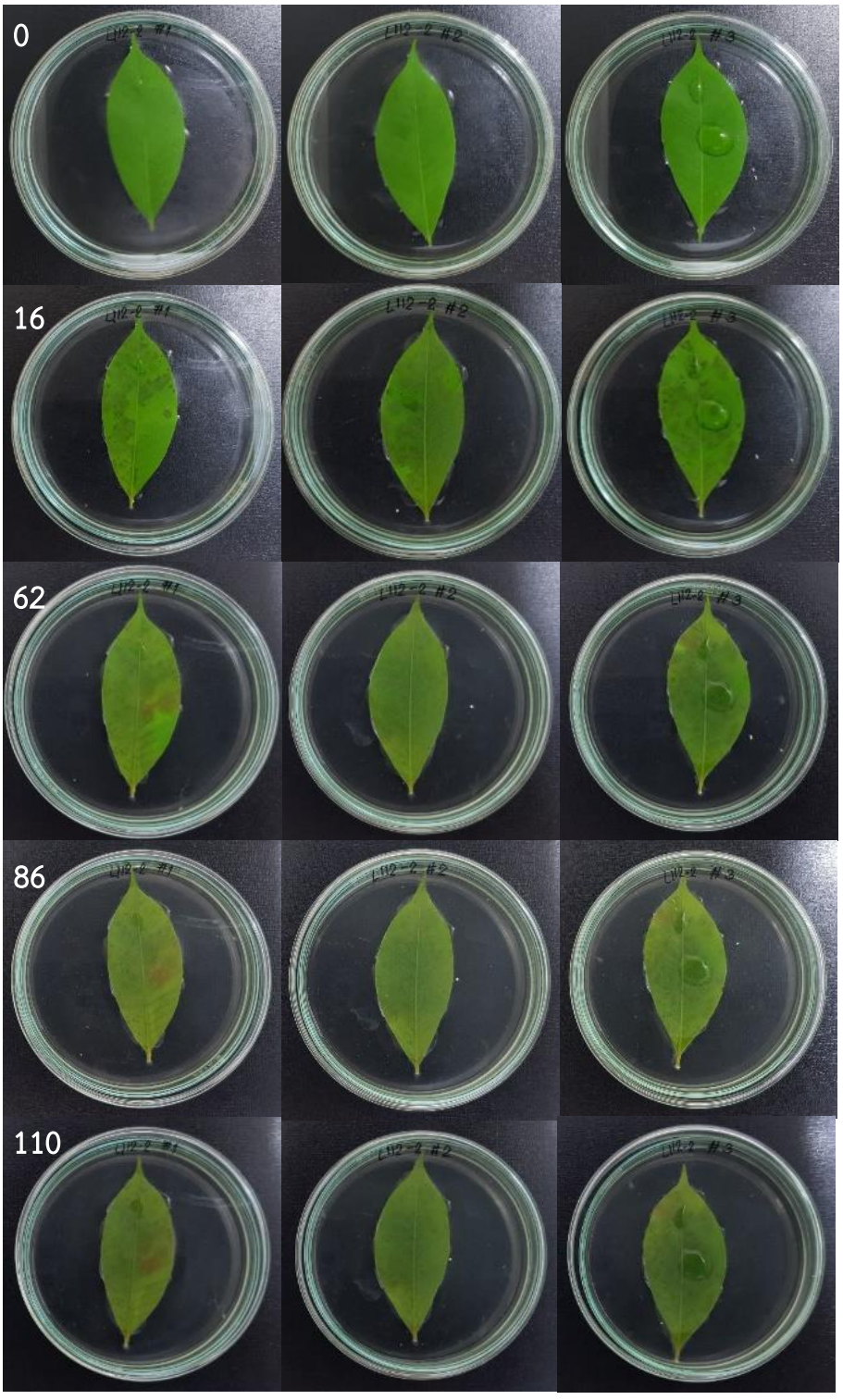
รูปที่ 4.9 : แผนภาพการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไฟทอฟธอราไอโซเลท L116-1, L112-2, L116-4 และ L62B-1 จากข้อมูลลำดับเบสในบริเวณ ITS ซึ่งมีตัวแทนอ้างอิงเป็นไฟทอฟธอราใน clade 2 ที่อ้างอิงโดยใช้วิธี Maximum Likelihood ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดในการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์

4.7 ความสามารถในการก่อโรคบนใบยางพารา

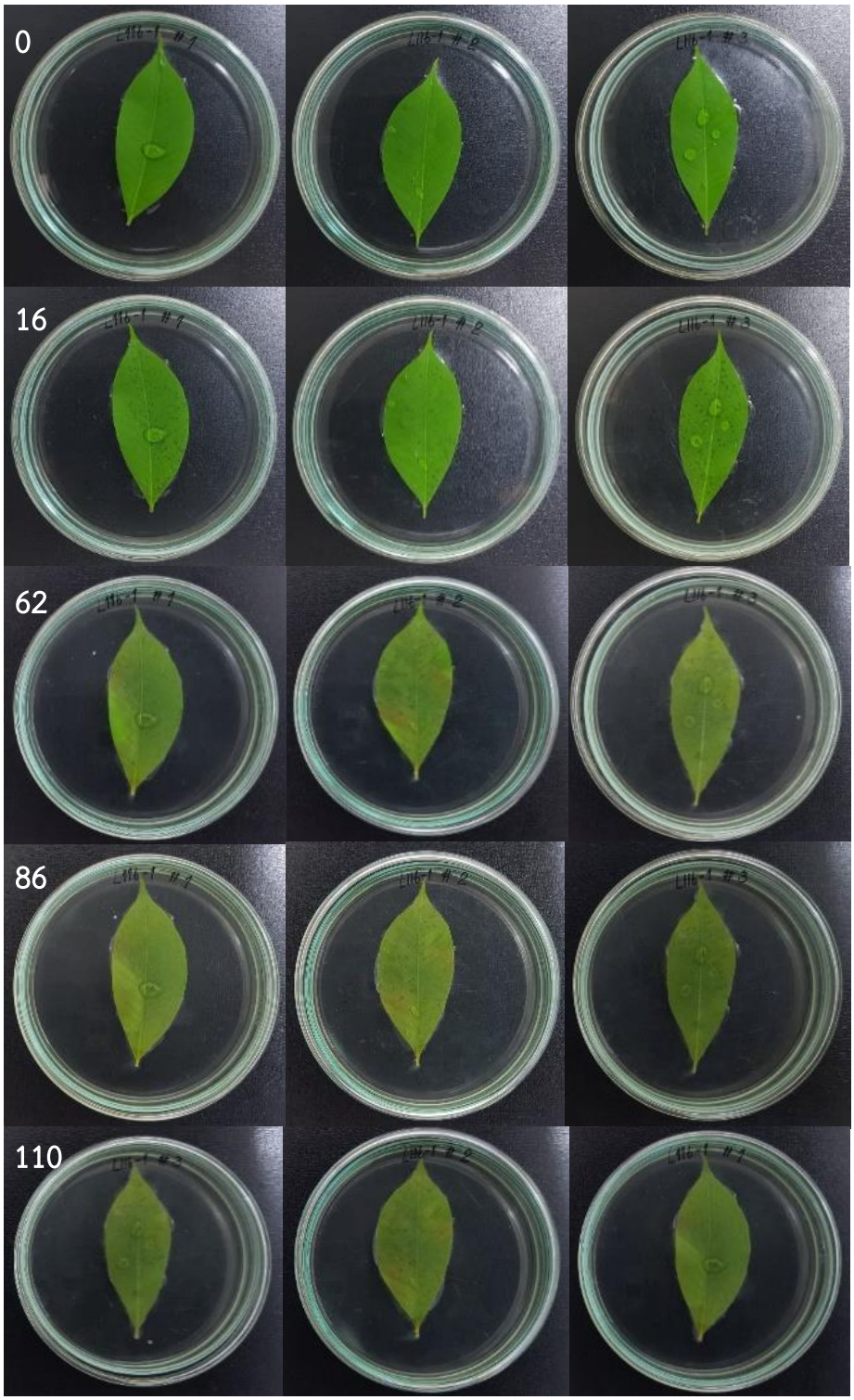
เตรียมซูโอสปอร์แขวนลอยจากไฟทอฟธอราที่คาดว่าเป็น *P. citrophthora* คือ ไอโซเลท L112-2, L116-1 และ L116-4 จากนั้นปิเปตซูโอสปอร์แขวนลอยใส่ลงในน้ำ P3 บ่มร่วมกับใบยางพารา เป็นเวลา 5 วัน แต่ละตัวอย่างทำเป็นสามซ้ำ โดยคัดเลือกใบยางให้มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน มีชุดควบคุมเป็นใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3 ได้ผลดังรูป 4.10-4.13



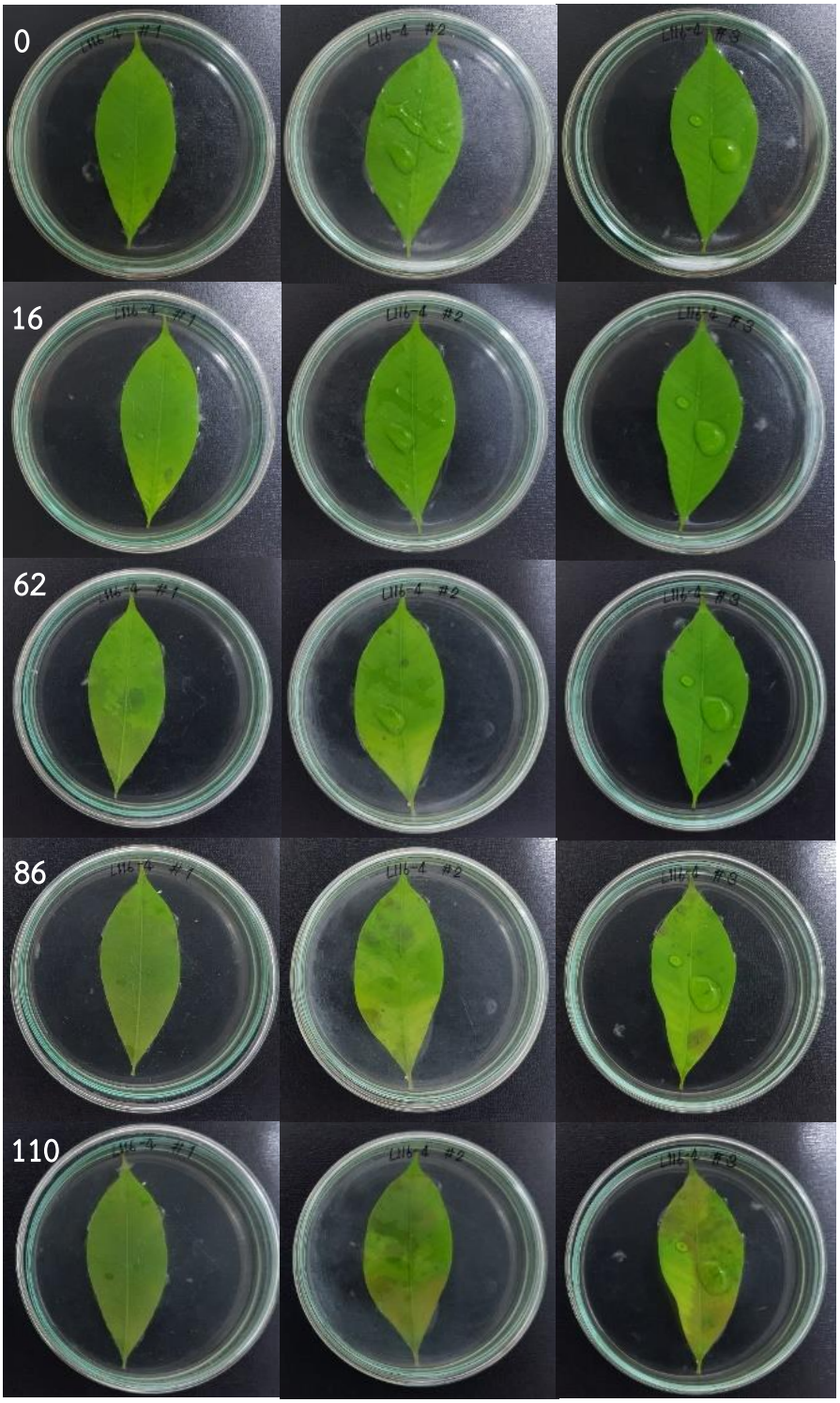
รูปที่ 4.10 : ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3 เป็นชุดควบคุม บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L112-2 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $2x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



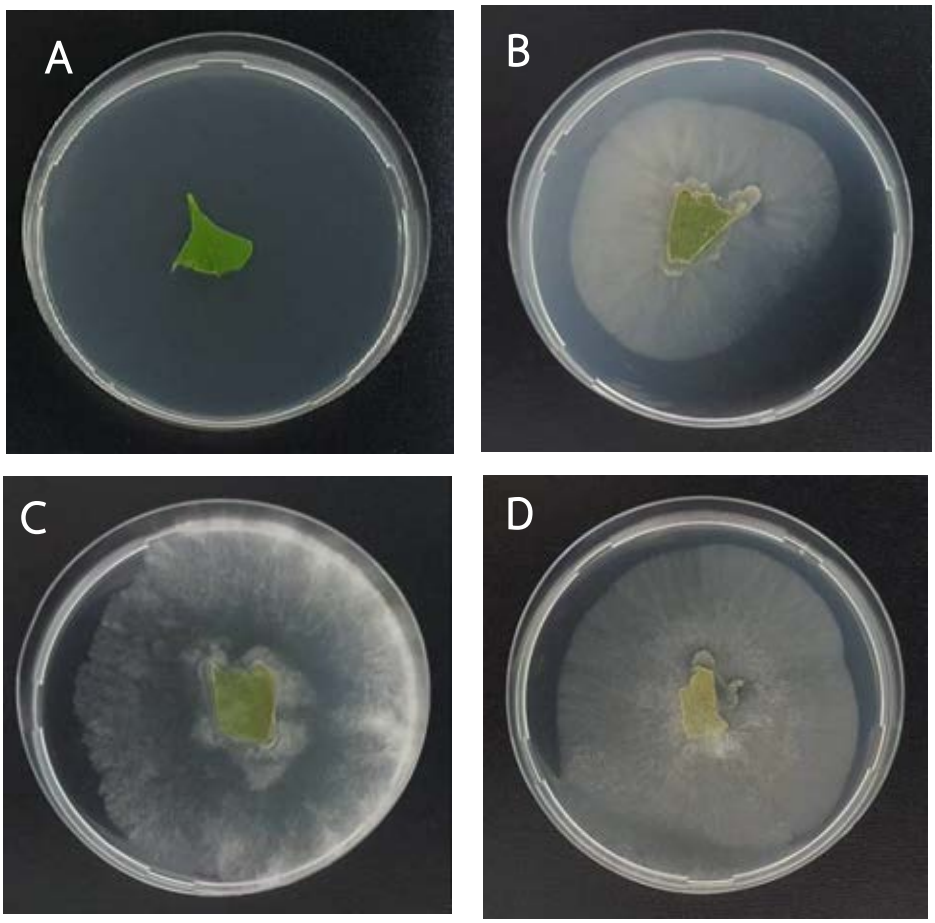
รูปที่ 4.12 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L116-1 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $5x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)



รูปที่ 4.13 : แสดงความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท L116-4 หลังบ่มใบยางพาราร่วมกับซูโอสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น $1.5X10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 16, 62, 86 และ 110 ชั่วโมง; C = ชุดควบคุม (ใบยางพาราบ่มกับน้ำ P3)

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบยางพาราพบว่า เมื่อเวลาบ่มผ่านไป 110 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชุดควบคุม ในขณะที่ชุดไอโซเลท L112-2 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงภายในระยะเวลา 16 ชั่วโมง โดยพบรอยช้ำสีน้ำตาลและจุดดำบนใบยาง เช่นเดียวกับชุดไอโซเลท L116-1 ที่พบจุดดำบนใบยางภายในระยะเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเริ่มปรากฏเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลเมื่อระยะเวลาผ่านไป สำหรับชุดไอโซเลท L116-4 พบว่าใบยางเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงภายในระยะเวลา 16 ชั่วโมงเช่นกัน โดยพบจุดดำและรอยช้ำสีน้ำตาลบนใบยาง อีกทั้งยังพบว่าใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อระยะเวลาผ่านไปได้กลายเป็นสีน้ำตาล

หลังจากบ่มใบยางพาราและบันทึกผล นำชิ้นใบยางพาราที่ใช้ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของราไฟทอฟธอราแต่ละไอโซเลทมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกผลที่ระยะเวลา 30 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 : ชิ้นใบยางพาราจากการบ่มในน้ำ P3 (A) และชิ้นใบยางพาราจากการบ่มร่วมกับซูโอสปอร์ไอโซเลท L112-2(B), L116-1(C) และ L116-4(D) ในน้ำ P3 นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกผลที่ระยะเวลา 30 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบข้อมูลของราไฟทอฟธอราที่ถูกคัดแยกและบันทึกไว้จากโครงงานวิจัยที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ “การคัดแยก *Phytophthora* sp. จากต้นยางพาราในภาคตะวันออกของประเทศไทย” ของนายอัชวัฒน์ วงษ์เกษมศิริ ในปีการศึกษา 2559 และการศึกษาโครงการวิจัยในหัวข้อ “การจำแนก *Phytophthora* sp. จากสวนยางในตำบลกองดิน และตำบลพังราด อำเภอแกลง จังหวัดระยอง และตำบลวังใหม่ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี” ของนางสาวอภิชญา นพเลิศ ในปีการศึกษา 2558 ซึ่งมีการศึกษาและบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไฟทอฟธอราไว้เบื้องต้น กับงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. citrophthora* เพื่อคัดเลือกตัวอย่างไฟทอฟธอราที่คาดหมายว่าเป็น *P. citrophthora* มาศึกษา พบว่ามีตัวอย่างราไฟทอฟธอราทั้งหมด 4 ไอโซเลท ที่มีข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *P. citrophthora* ได้แก่ L112-2, L116-1, L116-4 และ L62B-2

เมื่อนำไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่า ตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท สร้างเส้นใยสีขาว และสร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ซึ่งสปอร์แรงเจียมของไอโซเลท L112-2, L116-1, และ L116-4 มีรูปร่างที่เหมือนกันเป็นแบบ ellipsoid, globose, obpyriform, ovoid และ obturbinate มี papillate และมีขนาดโดยเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันทั้งความกว้างและความยาว คือ กว้างเฉลี่ย 29.9-33.7 ไมโครเมตร ยาว 40.8-49.7 ไมโครเมตร และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.36-1.47 ซึ่งอยู่ในช่วง กว้าง 27.4-64.3 ไมโครเมตร และยาว 18.9-40.4 ไมโครเมตร อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.50 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดของสปอร์แรงเจียมของ *P. citrophthora* (*Phytophthora* DATABASE, 2019) แต่อย่างไรก็ตาม จะต้องมีการศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้ชัดเจน ในขณะที่ไอโซเลท L62B-1 มีรูปร่างแบบ obpyriform, obturbinate, ovoid และ reniform มี papillate และมีขนาดของสปอร์แรงเจียมกว้างเฉลี่ย 17.3 ไมโครเมตร ยาว 26.4 ไมโครเมตร มีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.53 โดยมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับขนาดสปอร์แรงเจียมของ *P. botryosa* (*Phytophthora* DATABASE, 2019) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยกว้าง 15 ไมโครเมตร ยาว 28 ไมโครเมตร และเมื่อนำน้ำกรองปลอดเชื้อชะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 หลังจากที่เลี้ยงเชื้อไป 1 สัปดาห์ เพื่อทดสอบการหลุดร่วงของสปอร์แรงเจียมจากสปอร์แรงจิโอฟอร์ พบว่าสปอร์แรงเจียมของทุกไอโซเลทไม่หลุดออกจากสปอร์แรงจิโอฟอร์ได้โดยง่าย (non-cadcous)

หาอัตราการเจริญของไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 7, 28, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในวันที่ 1-5 พบว่า ที่อุณหภูมิ 7 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท ในขณะที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ราสามารถเจริญได้ทุกไอโซเลท โดยพบว่า ไอโซเลท L112-2, L116-1 และ L116-4 มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *P. citrophthora* (*Phytophthora* DATABASE, 2019) แต่สำหรับไอโซเลท L62B-1 พบว่า มีอัตราการเจริญช้ากว่าเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น ทั้งที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นการยืนยันเพิ่มเติมจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ว่า ไอโซเลท L62B-1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *P. botryosa* เนื่องจากไฟทอฟธอราสายพันธุ์นี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 26 องศาเซลเซียส (*Phytophthora* DATABASE, 2019)

ทดสอบทางชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันว่าทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นราไฟทอฟธอรา จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้วิธี Nested-PCR มีไพรเมอร์คู่แรกคือ ITS1 และ ITS4 ไพรเมอร์คู่ที่สองคือ A2 และ I2 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์คู่แรกแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมี *Phytophthora* species เป็นตัวแปรควบคุมบวก และน้ำกลั่นเป็นตัวแปรควบคุมลบ สังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอของทุกไอโซเลทตรงกับของตัวแปรควบคุมบวก แสดงว่าทุกไอโซเลทเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกราหรือสิ่งมีชีวิตคล้ายรา เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์คู่ที่สอง โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมี *Phytophthora* species เป็นตัวแปรควบคุมบวก และน้ำกลั่นเป็นตัวแปรควบคุมลบ สังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอของทุกไอโซเลทตรงกับของตัวแปรควบคุมบวก แสดงว่าทุกไอโซเลทเป็นราในจีนัสไฟทอฟธอรา ส่วนตัวแปรควบคุมลบจะไม่ขึ้นแถบดีเอ็นเอ

เมื่อยืนยันได้ว่าทุกไอโซเลทเป็นไฟทอฟธอรา จึงนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้โคลนเข้าพลาสมิด แล้วนำเข้าเซลล์ของ *E. coli* เป็นการเพิ่มจำนวน เพื่อให้ได้พลาสมิดตามที่ต้องการ สำหรับส่งไปหาลำดับสารพันธุกรรมเพื่อที่จะระบุสายพันธุ์ของไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย BLASTn พบว่า ทุกไอโซเลทเหมือน *P. citrophthora* CBS 581.69 แต่ไอโซเลทรหัสนี้ culture collection ระบุว่าเป็น *P. botryosa* (Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types, 2019) นอกจากนี้เมื่อนำมาเทียบกับไฟทอฟธอราใน clade 2a พบว่า มีลำดับเบสในบริเวณ ITS คล้ายกันมาก ซึ่งดูได้จากแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่ต่างสายพันธุ์มาอยู่ปะปนกัน โดยโครงงานวิจัยนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์แรงเจียมที่เหมือนกับ *P. citrophthora* ทั่วโลก จึงคาดว่าไอโซเลท L112-2, L116-1 และ L116-4 น่าจะเป็น *P. citrophthora* และไอโซเลท L62B-1 น่าจะเป็น *P. botryosa*

อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นไฟทอฟธอราสายพันธุ์ใด เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ยีนเพียงบริเวณเดียวคือ ITS ในการตรวจสอบเพื่อระบุสายพันธุ์ จึงไม่ชัดเจนเพียงพอที่จะระบุได้ ซึ่งสังเกตได้จากแผนภาพ

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า ทุกไอโซเลทแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไฟทอฟธอราใน clade 2a ตัวอื่น ๆ ค่อนข้างชัดเจน ทำให้สามารถระบุได้เพียงจีนัสและกลุ่มที่อยู่ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ยีนในบริเวณอื่น ๆ ด้วยในการระบุสายพันธุ์ เช่น beta-tubulin *(β-tub),* 60S ribosomal protein L10 (Yang และ Hong, 2018) หรือใช้ตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome-c oxidase 1 (*cox1*) (Martin และคณะ, 2014) เป็นต้น

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนูวิทยาจึงสามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลท L116-1 และ L116-4 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *P. citrophthora* เนื่องจากมีรูปร่างและขนาดของสปอร์แรงเจียมใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิง อีกทั้งยังเป็น heterothallic และ non-caducous เหมือนกับสายพันธุ์อ้างอิง (*Phytophthora* DATABASE, 2019) แต่สำหรับไอโซเลท L62B-1 จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนูวิทยาพบว่า มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *P. botryosa* เนื่องจากมีรูปร่างและขนาดของสปอร์แรงเจียมใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิง อีกทั้งยังเป็น heterothallic เหมือนกับสายพันธุ์อ้างอิง (*Phytophthora* DATABASE, 2019)

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยเลี้ยงไฟทอฟธอราทั้ง 4 ไอโซเลท ในขั้นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเพื่อเตรียมซูโอสปอร์ในน้ำ P3 ที่ลอยเมล็ดงา พบว่า ไอโซเลท L62B-1 ไม่มีการสร้างเส้นใยที่เมล็ดงา จึงไม่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมในน้ำ P3 ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่เลี้ยงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญของไฟทอฟธอราไอโซเลทนี้ และอาจเกี่ยวข้องกับแหล่งที่มาของราด้วยเช่นกัน จึงใช้อีก 3 ไอโซเลท ที่คาดว่าเป็น *P. citrophthora* โดยการทดสอบความสามารถในการก่อโรคได้นำไปบ่มกับใบยางพารา พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท ทำให้ใบยางพาราแสดงอาการของโรคภายใน 16 ชั่วโมง หลังจากที่ได้ปลูกเชื้อเข้าไป ในขณะที่ระยะเวลา 110 ชั่วโมง ไม่พบความผิดปกติของชุดควบคุม โดยอาการของโรคที่พบคือ ใบเน่าและเกิดจุดบนใบ ซึ่งเป็นลักษณะของโรคที่เกิดขึ้นจากราไฟทอฟธอรา

เอกสารอ้างอิง

Drenth A and Sendall B. “Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*”. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia. 2001:1-41.

Drenth A, Wagels G, Smith B, Sendall B, O’Dwyer C, Irvine G and Irwin JA. “Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species”. Australasian Plant Pathology. 2006 Mar 1;35(2):147-59.

Eckert JW and Brown GE. “Evaluation of postharvest fungicide treatments for citrus fruits”. 1986.

Frezzi MJ. “The species of *Phytophthora* in Argentina”. Revista de Investigaciones Agricoles. 1950;4(1).

Ho HH, Yu YN, Zhuang WY and Liang Z. “Mating types of heterothallic species of *Phytophthora* in China”. Acta Mycologica Sinica. 1983;2:187-91.

Horne WT, Klotz LJ and Rounds MB. “Avocado trunk cankers”. California Avocado Society Yearbook. 1941;22:46-7.

Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. Resource: http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7920 searched on May 1st, 2019

Judelson HS and Blanco FA. “The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer”. Nature Reviews Microbiology. 2005 Jan;3(1):47.

Knorr LC. “Citrus diseases—a bibliography”. PANS Pest Articles & News Summaries. 1973 Sep 1;19(3):441-77.

Laohasakul B, Boonyapipat P and Plodpai P. “First Report of *Phytophthora citrophthora* Causing Leaf Fall of Para Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) in Thailand”. Plant Disease. 2017 Jun 12;101(6):1057-.

Latorre BA, Alvarez C and Ribeiro OK. “*Phytophthora* root rot of kiwifruit in Chile”. Plant Disease. 1991;75(9):949-52.

Martin FN, Blair JE and Coffey MD. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. Fungal Genetics and Biology. 2014 May 1;66:19-32.

Phytophthora DATABASE. Resource: http://www.phytophthoradb.org/species.php searched on Apil 21st, 2019

Puglisi I, De Patrizio A, Schena L, Jung T, Evoli M, Pane A, Van Hoa N, Van Tri M, Wright S, Ramstedt M and Olsson C. Two previously unknown *Phytophthora* species associated with brown rot of Pomelo (*Citrus grandis*) fruits in Vietnam. PloS one. 2017 Feb 16;12(2):e0172085.

Ristaino JB and Gumpertz ML. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology. 2000 Sep;38(1):541-76.

Ruano-Rosa D, Schena L, Agosteo GE, Magnano di San Lio G and Cacciola SO. "*Phytophthora oleae* sp. nov. causing fruit rot of olive in southern Italy". Plant pathology. 2018 Aug;67(6):1362-73.

Sanju S, Thakur A, Siddappa S, Sreevathsa R, Srivastava N, Shukla P, Singh BP. RETRACTED ARTICLE: Pathogen virulence of Phytophthora infestans: from gene to functional genomics. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2013 Apr 1;19(2):165-77.

Smith CO. "Inoculation of some economic plants with *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora*". Phytopathology. 1937;27(11).

Smith RE and Smith EH. "Further studies on Pythiaceous infection of deciduous fruit trees in California". Phytopathology. 1925;15(7).

Tsai H-L, Huang L-C, Ann P-J and Liou R-FJBS. "Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR". Botanical Studies. 2006;47

White TJ, Bruns T, Lee SJ and Taylor JL. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics". PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990 Jan 1;18(1):315-22.

Whiteside JO., Jackson LK., Krezdron AH. and Soule J. "*Phytophthora* studies on citrus rootstocks". Proceedings of the First International Tropical Citrus short course. 1973:15-21.

Wolcan SM, Malbrán I, Mourelos CA, Sisterna MN, González MD, Alippi AM, Nico A and Lori GA. "Diseases of Carnation". Handbook of Florists' Crops Diseases. 2018:317-78.

Yadav DM. "DNA Markers in Crop Improvement". Recent Advances in Agricultural Sciences 2008:66-80

Yang X and Hong C. "Differential usefulness of nine commonly used genetic markers for identifying *Phytophthora* species". Frontiers in microbiology. 2018;9:2334.

Ziembiń ska-Buczyń ska A, Wiszniowski J and Ciesielski S. “Comparison of PCR-DGGE and Nested-PCR-DGGE Approach for Ammonia Oxidizers Monitoring in Membrane Bioreactors’ Activated Sludge”. Archives of Environmental Protection. 2014 Dec 23;40(4):31-8.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Clarified V8

น้ำผักพร้อมดื่มยี่ห้อ V8 สูตร Original	340	มิลลิลิตร
$CaCo_3$	3.4	กรัม

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

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8

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

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

3. Luria Bertani (LB) broth

แบคโตเปปโทน	10.0	กรัม
ผงสกัดยีตส์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

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

4. Luria Bertani (LB) agar

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

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

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

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

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

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย

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

ทริสอะซิเตต	242.28	กรัม
กรดอะซิติก	57.88	มิลลิลิตร
0.5 M กรดเอทิลีนไดอามีนเตตระอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

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

50X TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำ	980	มิลลิลิตร

3. สารละลายสำหรับการเตรียม competent cell

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	5.5495	กรัม
โพแทสเซียมอะซิเตต	0.9815	กรัม

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

4. สารละลายสำหรับเก็บรักษา competent cell

สารละลายจากข้อ 3	764.71	มิลลิลิตร
85% กลีเซอรอล	235.29	มิลลิลิตร

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

ภาคผนวก ค

การตรวจสอบไฟทอฟธอราด้วยวิธี Nested-PCR

DNA Ladder ที่ใช้ในการทดลอง