# ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมรา *Phytophthora parasitica* [1]

**อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์**
**กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

**บทคัดย่อ**

ได้ศึกษารา *Phytophthora* spp. ที่ได้จากการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า จากพืชชนิดต่างๆ ในแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2550-2551 และเชื้อที่มีอยู่ใน culture collection รวม 14 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ปราจีนบุรี ระยอง จันทบุรี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กระบี่ ภูเก็ต กำแพงเพชร ลำปาง และเชียงใหม่ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ รา *Phytophthora*. spp. 33 ไอโซเลท ที่เป็นสาเหตุโรคพืช 12 ชนิด คือ หมากผู้ หมากเมีย เดหลี ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือม่วงผลเล็ก และมะเขือม่วงผลใหญ่ มะเขือยาว) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ หน้าวัว และแพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์และศึกษาแบบคู่ผสมของรา *Phytophthora*. spp. จำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบ รา *P. parasitica* จำนวน 29 ไอโซเลท เป็นสาเหตุโรคเน่าของพืชที่ศึกษา และพบ รา *P. heveae* เป็น สาเหตุโรคกล้าเน่าของกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ รา *P. palmivora* เป็น สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่าจากปราจีนบุรี คือ รา *P. parasitica* แต่สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่า จากจันทบุรี คือ รา *P. botryosa* และรา *Pythium* sp. แยกได้จากต้นหน้าวัว

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora* spp. ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 2 ชนิด คือ SSR-PCR และ AFLP ด้วยเทคนิค SSR-PCR โดย microsattlelite ไพรเมอร์ จำนวน 9 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 220 แถบ จากพืชอาศัย 6 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (โรคหน้ายางพาราเน่า จากปราจีนบุรี) สับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ ส้ม และ *Pythium* sp. จากหน้าวัว วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSys 2.22e (Dice coefficient) Phylogenetic tree แบ่งกลุ่มรา *Phytophthora* spp. ออกจากรา *Pythium* sp. ที่ 30% similarity รา *Phytophthora* spp. จำแนกเป็น 4 กลุ่ม คือ A เป็นรา *P. parasitica* จากยางพารา กลุ่ม B ประกอบด้วยรา *P. parasitica* จากสับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และส้ม ด้วยค่า

---

รหัสโครงการ 09-01-49-02

similarity 45-80 % กลุ่ม C เป็นรา *P. haveae* สาเหตุโรคกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่ม D เป็นรา *P. palmivora* สาเหตุโรคกล้วยไม้ ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ชัดเจนกับพืชอาศัยหรือแหล่งปลูกพืช ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ไพรเมอร์ E+A/M+AAC ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 65 แถบ แบ่งราออกเป็น 7 กลุ่ม พบความสัมพันธ์ของลักษณะพันธุกรรมกับพืชอาศัยและแหล่งปลูกพืชในบางกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A เป็นไอโซเลท ของรา สาเหตุโรคกล้วยไม้ จากจังหวัดเชียงใหม่ (similarity 45-75 %) (จำแนกทางสัณฐานวิทยาได้เป็นรา *P. parasitica* และ *P. haveae*) กลุ่ม B เป็นไอโซเลทของหน้าวัว จากจังหวัดภูเก็ต ลำปาง และ ปราจีนบุรี ยกเว้นไอโซเลทจากกรุงเทพมหานคร ที่มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่น จัดอยู่ในกลุ่ม F เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง กลุ่ม C เป็นไอโซเลทจากมะเขือ สะระแหน่ และเดหลี กลุ่ม D เป็นไอโซเลทจากยางพารา และส้ม และกลุ่ม E, F เป็นไอโซเลทจากหมากผู้หมากเมียและลองกอง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแสดงให้เห็นว่ารา *Phytophthora parasitica* จากพืชอาศัยชนิดต่างกัน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

## คำนำ

*Phytophthora* spp. เป็นราศัตรูพืชที่สำคัญ ทำลายพืชผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลก (ทวี, 2545) ราสกุล *Phytophthora* บาง species สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้บนอาหารสังเคราะห์ เช่น *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าส้ม และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน แต่บาง species ก็ไม่สามารถเลี้ยงได้ เช่น *P. infestans* ราสาเหตุโรคใบไหม้มะเขือเทศและมันฝรั่ง หรือมีความยากในการเลี้ยงเชื้อ เช่น *P. milabiris* สาเหตุโรคราน้ำฝนลำไย เป็นต้น สำหรับราที่เลี้ยงให้เจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์นั้น แม้จะเป็น species เดียวกัน เป็นสาเหตุโรคพืชเดียวกัน แยกได้จากสถานที่แตกต่างกัน ยังพบความแตกต่างในการเจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์ เช่น รา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนจากแยกจากทุเรียนจังหวัดจันทบุรี เจริญเติบโตดีและเร็วกว่ารา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนบางไอโซเลทจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (อมรรัตน์ และคณะ, 2546) และพบความแตกต่างของความรุนแรงและความอ่อนแอของราใน species เดียวกัน

การวินิจฉัยราสาเหตุของโรค โดยทั่วไปดูจากลักษณะสัณฐานวิทยา แต่หากเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอ จะให้ผลการสนับสนุนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกทางหนึ่ง ตัวอย่างเช่น การรายงานการระบาดของโรคใบไหม้และผลเน่าของลำไย โดยขจรศักดิ์และคณะ (2542, 2543) รายงานว่ามีสาเหตุจาก *Phytophthora capsici* แต่ อมรรัตน์และคณะ (2549) ได้ศึกษารายละเอียดของโรคลำไยดังกล่าว ในปี พ.ศ. 2547 ยืนยันว่า *Phytophthora* sp. สาเหตุของ

โรคกิ่งไหม้และใบไหม้ของลำไย เป็น *P. mirabilis* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ของไม้ดอกชนิดหนึ่ง (*Mirabilis jalapa*)

นอกจากนี้ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ได้รวบรวมตัวอย่างรา *Phytophthora* สาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แบบคู่ผสม เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิชาการของเชื้อไว้แล้ว จึงควรทำการศึกษาลายพิมพ์ DNA ของราดังกล่าว ซึ่งเป็นข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของ รา *Phytophthora parasitica* Dastur สาเหตุโรคพืชที่มีพืชอาศัยจำนวนมาก และเพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ของข้อมูลกับปัจจัยสำคัญ เช่น แหล่งปลูก พืชอาศัยของรา *P. parasitica* แล้วจัดกลุ่มของเชื้อตามลักษณะข้อมูลพันธุกรรม

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคพืช จากแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศและการแยกเชื้อสาเหตุ

ได้สำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จากแหล่งปลูกทั่วประเทศ แล้วนำตัวอย่างโรคพืชเหล่านั้นมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในวันเดียวกัน โดยวิธี tissue transplanting ตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติ เป็นชิ้นส่วนขนาด 2x2 มม. ตัวอย่างละ 15-20 ชิ้น เลี้ยงบนอาหาร PDA + BRNAP เพาะเชื้อในอุณหภูมิห้อง (25 $\pm$ $2^{0}$ซ.) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อที่เจริญออกจากชิ้นตัวอย่าง เลี้ยงบนอาหาร PDA + BRNAP อีกครั้ง เพาะเชื้อในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อที่เจริญออกจากชิ้นเชื้อ เลี้ยงบนอาหาร CA (Carrot agar) แล้วแยกเก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวอย่างในหลอดทดลองที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

### 2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของ รา *Phytophthora* spp.

#### 2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

ได้เลี้ยงรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CA จำนวน 15 มล. เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร CA นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ศึกษาบันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

**2.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา**

ได้นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ CA จำนวน 15 มล. ตัดชิ้นเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง CA แช่ในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 24-36 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (white cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 ซม.ที่ให้แสง 200 ftc ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชม. เพื่อให้เชื้อสร้าง sporangia ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (sporangiophores) วัดความกว้าง (length) และความยาว (breadth) ของ sporangia เพื่อหา L : B ratio วัดความยาวของก้านสปอร์ (pedicel หรือ stalk) ความยาวของ papilla และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ chlamydospore ศึกษาสปอร์ทั้ง 2 ชนิด จำนวนตัวอย่างละ 50 สปอร์

**2.3 การศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา**

ได้เลี้ยงรา *Phytophthora* แต่ละไอโซเลท บนอาหาร CA วิธีการเดียวกับ ข้อ 2.1 จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ เชื้อดังกล่าว (unknown) เลี้ยงบนอาหาร CA ในจานเลี้ยงเชื้อด้านตรงข้ามกับรา *P. palmivora* มาตรฐานที่ทราบ mating type แล้ว คือ mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) แล้วทำวิธีการเดียวกันกับรา *P. palmivora* มาตรฐาน mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) เพื่อหา mating type ของราทุกไอโซเลท นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดนาน 7-10 วัน ศึกษาและบันทึกการสร้าง sexual structure ของเชื้อ unknown กับ A1 หรือ A2 มาตรฐาน วัดขนาด (ความกว้างและความยาว) ของ oogonia, oospores และ antheridia จำนวนไอโซเลทละ 50 สปอร์ ศึกษาตำแหน่งของ antheridia บนผิวของ oogonium และลักษณะของ oospore ที่อยู่ภายในแต่ละ oogonium

**3. การจำแนกชนิดรา *Phytophthora* spp.**

ได้เปรียบเทียบผลการศึกษา ลักษณะการเจริญเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่างๆ คือ sporangia, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores ของราที่นำมาศึกษา กับ คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Waterhouse (1970), Stamps *et al* (1990) และเอกสาร ของ Erwin and Ribeiro (1996)

**การจำแนกชนิดรา *Pythium* spp.**

ได้เปรียบเทียบผลการศึกษาลักษณะการเจริญเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่างๆ (sporangium, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores) ของราที่นำมาศึกษา กับคู่มือการจำแนกชนิด *Pythium* ของ PLAATS-NITERINK (1981) และ เอกสารวิชาการของ Robertson (1980)

**4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora***

**4.1 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora parasitica* ด้วยเทคนิค SSR- PCR ไพรเมอร์ microsatellite**

**การเตรียมเส้นใย และสกัดดีเอ็นเอ**

เตรียมเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทบนอาหาร carrot agar (CA) จากนั้นเขี่ยเส้นใยบนอาหารใส่ในขวดอาหารเหลว นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ได้จาการเขย่าจนขุ่น ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล. ตกตะกอนเส้นใยโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 14000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้เส้นใยมากขึ้น บดเส้นใยด้วย เม็ดสเตนเลส ขนาด 3.9 มม เติม lysis buffer 700 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วยเครื่องเขย่าข ที่ 25 Hz นาน 1 นาที แช่หลอดใน water bath ที่ 65°C นาน 10 นาที เติม precipatation buffer 224 µl (32µ/ 100 µl lysis buffer) และเติม $CH_2Cl_2$ 100 µl กลับหลอด 10 ครั้ง นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 5 นาที 14,000 rpm ดูดน้ำใส 700 µl ใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม isopropanol 700 µl กลับหลอด 10 ครั้ง ตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยวที่ 14,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol Pulse spin 10 นาที ดูด ethanol ที่เหลือทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่เติม RNase (10 µg/ml) ประมาณ 10 µl

สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างรา 14 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ ดังนี้

| No. | Name | 5'----------->3' | length |
|---|---|---|---|
| 1 | MB2F | TGCTGTGTATGGATGGATGG | 20 |
| | MB2R | CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG | 22 |
| 2 | MB5F | ACTTGGAGGAAATGGGCTTC | 20 |
| | MB5R | GGATGGCGTTTAATAAATCTGG | 22 |
| 3 | MB9F | TGGCTGGGATACTGTGTAATTG | 22 |
| | MB9R | TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG | 20 |
| 4 | MB10F | TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC | 22 |
| | MB10R | TTGCAATTACCTCCGATACCAC | 22 |
| 5 | MB11F | GTGGACGAACACCTGCATC | 19 |
| | MB11R | AGATCCTCCACCTCCACCTC | 20 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6 | MB13F | GGAGGATGAGCTCGATGAAG | 20 |
| | MB13R | CTAAGCCTGCTACACCCTCG | 20 |
| 7 | MB14F | CGTCTCTGAACCACCTTCATC | 21 |
| | MB14R | TTCCTCCGTCCATCCTGAC | 19 |
| 8 | MB17F | ACTGATTCACCGATCCTTGG | 20 |
| | MB17R | GCTGGCCTGACTTGTTATCG | 20 |
| 9 | MB18F | GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC | 22 |
| | MB18R | TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC | 22 |

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ประกอบด้วย dd$H_2O$ 7.5 µl, 10X PCR (add 20 mM $MgCl_2$) 2.5 µl, dNTPs (2.5 mM) 10 µl, Forward primer (10µM) 1 µl, Reverse primer (10 µM) 1 µl , DNA template 100 ng 2 µl รวม 25 µl นำหลอดทดลอง เข้าเครื่อง PCR ตามโปรแกมต่อไปนี้ 94°C 2 นาที 1 รอบ แล้วสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 25 รอบ อุณหภูมิ 94°C 1 นาที

55-60 °C 1 นาที 72°C 1 นาที และfinal extension 72°C 5 นาที

ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega, Madison, WI) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วย 5% polyacrylamide gel โดยใช้ sequencing apparatus ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE) แล้วตรวจดูแถบและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย silver staining

การบันทึกข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS 2.22e (Rohlf, 1994) ค่า coefficient ใช้ Dice วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ และวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่าง ไอโซเลท พืชอาศัย และ แหล่งที่มาของเชื้อ

## 4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ รา *Phytophthora parasitica*โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

**การเตรียมเส้นใยและสกัดดีเอ็นเอ**

เตรียมเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทบนอาหาร carrot agar (CA) จากนั้นเขี่ยเส้นใยบนอาหารใส่ในขวดอาหารเหลว CA วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเขี่ยเส้นใยขึ้นมา ล้างด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อซับน้ำให้แห้ง (สามารถเก็บเส้นใยไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสได้นานก่อนสกัด)

การสกัดดีเอ็นเอ นำเส้นใยที่แห้งมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.05 กรัม เติม extraction buffer ( 50 mM Tris HCL, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SPS) ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม phenol และ chloroforml ในปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดเอาเศษเซลล์และโปรตีนอื่นๆออก ดูด supernatant (ส่วนใส่ด้านบน) ใส่หลอดใหม่แล้วเติมchloroform/isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูด supernatant( ส่วนใส) ใส่หลอดใหม่ เติม Ethanol ในปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอน DNA เท supernatant (ส่วนใส) ด้านบนทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 200 มิลลิลิตร แล้วหมุนเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง (เพื่อล้าง DNA) เท supernatant (ส่วนใส) ทิ้ง ตากตะกอน DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย TE ( 10 mM Tris- HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) 50 µl แล้วเก็บไว้ที่ - 20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP (Vos *et al.,* 1995) โดยปรับ reaction และ condition บางส่วน ดังนี้ นำดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปรับให้มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ในน้ำ 5.5 ไมโครลิตร เติม restriction buffer ประกอบด้วย เอ็นไซม์ EcoRI (NEB) 5 units, MseI (NEB)1 units , 10X Ligase buffer with ATP 1.1 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 1.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.55 ไมโคลิตร และน้ำ ปริมาตรรวม 9 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการต่อ adaptor โดยเติม ligation buffer ประกอบด้วย 10X Ligase buffer 0.1 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 0.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.05 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ T4DNA ligase (regular conc.) 0.165 ไมโครลิตร 5 µM EcoRI adapter pair 1 ไมโครลิตร 50 µM MseI adapter pair 1 ไมโครลิตร และ

ปรับปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 12 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ลำดับเบสของ Adapter

EcoRI adapter 5' –CTCGTAGACTGCGTACC

CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter 5' –GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT -5'

จากนั้นใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เป็นต้นแบบ เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยสุ่มในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X PcR buffer with 15 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 1.25 mM dNTPs 1.6 ไมโครลิตร 5 u/ul Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Eco (+selective base) (5 uM) 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Ms (+selective base) (5 uM) 1 ไมโครลิตร และน้ำ ให้มีปริมาตรสุดท้าย ผสมสารประกอบในปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ PE 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอดังนี้

| **ปฏิกิริยา** | **อุณหภูมิ** (°C) | **เวลา** | |
|---|---|---|---|
| 1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation) | 95 | 2 นาที | |
| 2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) | 94 | 20 วินาที | ⎫ |
| 3.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) | 66(-1) | 30 วินาที | ⎭ 10รอบ |
| 4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension) | 72 | 2 นาที | |
| 5.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) | 94 | 20 วินาที | ⎫ |
| 6.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) | 56 | 30 วินาที | ⎭ 20รอบ |
| 7.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension) | 72 | 2 นาที | |
| 8.สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) | 72 | 15 นาที | |

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ โดยปรับลดอุณหภูมิ annealing 1 องศาเซลเซียส ในทุก ๆ รอบ จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วสังเคราะห์ต่ออีก 20 รอบ สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย นาน 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20

ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega, Madison, WI) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วย 5% polyacrylamide gel โดยใช้ sequencing apparatus ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE)ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 65 วัตต์ นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วตรวจดูแถบและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย silver staining

จากนั้นจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora parasitica* จำนวน 19 ไอโซเลท จากพืชอาศัย 9 ชนิด คือ กล้วยไม้ หน้าวัว เดหลี สะระแหน่ มะเขือ ส้ม ยางพารา หมากผู้หมากเมีย และลองกอง โดยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ Eco-AC/ Ms-AG, Eco-AG/MsAC และ Eco-A/ Ms-AAC

การบันทึกข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS 2.22e (Rohlf, 1994) coefficient ใช้ Dice วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ และวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่าง ไอโซเลท พืชอาศัย และ แหล่งที่มาของเชื้อ

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. สำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคพืช จากแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศและการแยกเชื้อสาเหตุ

ผลการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า ต้นเน่าของพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจแล้วแยกเชื้อสาเหตุ จากแหล่งปลูกทั่วประเทศ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ รา *Phytophthora*. spp. 33 ไอโซเลท จาก 14 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ปราจีนบุรี ระยอง จันทบุรี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กระบี่ ภูเก็ต กำแพงเพชร ลำปาง และเชียงใหม่ บนพืช 12 ชนิด คือ หมากผู้หมากเมีย เดหลี ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือม่วงผลเล็ก และมะเขือม่วงผลใหญ่ มะเขือยาว) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ หน้าวัว และแพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก) (ตารางที่ 1)

ผลการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า ที่มีสาเหตุจาก รา *Phytophthora* spp. จากแหล่งปลูกพืช ในปี พ.ศ.2550-2552 พบ โรคใบไหม้ของเดหลี (51 Pl Pb R 1 L) โรคต้นเน่าของกล้วยไม้ (51 Or Pb R 1 S Mokara และ 51 Or PB 1 L Vanda) โรคใบไหม้ต้นเน่าของหน้าวัว (51 An PB 1 L) ซึ่งตรงกับการรายงานของนิยมรัฐ (2544) รายงานการเกิดโรคเน่าดำ หรือโรคใบแห้งหน้าวัว เกิดจาก *P. parasitica* (นิยมรัฐ, 2544) และโรคโคนเน่าของแพงพวย (51 MP BK 1 S) นอกจากนี้ได้ศึกษา รา *Phytophthora* spp. ที่มีอยู่ใน culture collection บนพืช 9 (10) ชนิด คือ หมากผู้หมากเมีย ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือยาว มะเขือม่วงผลเล็ก

และมะเขือม่วงผลใหญ่) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ และหน้าวัว ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ยังไม่พบการเข้าทำลายของรานี้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ตรงกับการรายงานของ Brasier และ Hansen (1992) ที่รายงานว่ารา *Phytophthora* ส่วนมากทำให้เกิดโรคก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับพืชใบเลี้ยงคู่ (Brasier and Hansen, 1992) การแยกรา *Phytophthora* จากส่วนต่างๆ ของพืชที่เป็นโรคโดยวิธี tissue transplanting นั้น ความยุ่งยากคือต้องแยกเชื้อบริสุทธิ์ในวันเดียวกัน มิฉะนั้นจะเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย (อมรรัตน์และคณะ, 2544) และต้องนำมาแยก รา *Phytophthora* บนอาหารสังเคราะห์พิเศษ PDA + BRNAP 2 ครั้ง ครั้งแรกเพื่อแยกเชื้อสาเหตุโรคจากชิ้นส่วนพืช ครั้งที่สองเพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารแข็ง CA (Carrot agar) การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากโรคโคนเน่า ใบเน่าของกล้วยไม้และหน้าวัว ไม่สามารถแยกได้โดยง่าย เนื่องจากเกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคอย่างมาก

ในรายงานดรรชนีรายชื่อโรคพืชในประเทศไทยของพัฒนาและคณะ (2537) มีการพบและรายงานโรคพืชในประเทศไทยที่เกิดจาก รา *P. parasitica* กว่า 30 ชนิด ได้แก่ พืชไร่ เช่น โรคสมอดำ (Phytophthora boll rot ) ของฝ้าย, โรคเน่าคอดิน (Damping-off) ของปอคิวบา, โรคข้อต่อเน่า (Collar rot) ต้นเน่า (Stem rot) และเน่าคอดิน (Damping-off) ของปอแก้ว, โรคแข้งดำ (Black shank) ของยาสูบ, โรคใบไหม้และลำต้นเน่า (Phytophthora blight) ของงา, โรครากเน่า (Root rot) ของหม่อนและโรครากเน่า (Root rot) ของละหุ่ง พืชสวน เช่น โรคยอดเน่า (Heart rot) รากเน่า (root rot) ของสับปะรด, โรครากเน่า (root rot) ใบไหม้ (Leaf blight) ของส้มจุก ส้มจีน, โรครากเน่าของส้มโชกุน ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ส้ม Rough lemon, โรคใบร่วง Leaf fall (Leaf blight) ของยางพารา, โรครากเน่า (ระยะกล้า) Root rot (Seedling) ของมะม่วงหิมพานต์, โรคโคนเน่า (Foot rot) ของมะนาว มะนาวไทย, โรคใบไหม้ ผลเน่า ดอกเน่า (Brown rot, Leaf blight) ของมะนาวตาฮิติ, โรครากเน่าโคนเน่าของส้มเกลี้ยง ส้มตรา ส้มเขียวหวาน, โรคลำต้นเน่า (Stem rot) ของสตรอเบอรี่, โรครากเน่าโคนเน่า (Stem rot, Collar rot) ของแพสชั่นฟรุต, โรคผลเน่าและใบไหม้ (Fruit rot, Leaf blight) ของพุทรา, พืชสวนสมุนไพร โรคโคนและรากเน่า (Foot and root rot) ของพริกไทยและพลู พืชผัก เช่นโรคใบไหม้ (Leaf blight) ของสะระแหน่, โรคโคนต้นเน่า (Foot rot) ของกระเจี๊ยบแดง, โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) ของผักกาดหัว, โรคผลเน่า (Fruit rot) ของมะเขือยาว, โรคโคนเน่าและรากเน่าของกล้า (Seedling root rot) ของมะกรูด ไม้ดอกและไม้ประดับ เช่น โรคลำต้นเน่า (stem rot) ของว่านหางจระเข้, โรคเน่าดำ (Black rot) ของกล้วยไม้ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันไม่มีการปลูกพืชไร่หลายชนิด หรือมีการปลูกน้อย ไม่พบการเข้าทำลายของ รา *P. parasitica* บนพืชเหล่านั้น เช่น ฝ้าย ปอคิวบา และปอแก้ว ส่วนพืชหลายชนิด เช่น สับปะรด พืชตระกูลส้ม พริกไทย สะระแหน่ และมะเขือยาว รา *P. parasitica* ยังคงแพร่ระบาดทำความเสียหายตลอดมาจนถึงปัจจุบัน

อมรรัตน์ (2546) รายงานพบการเป็นโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโชกุน อายุ 13 ปี ที่สวนส้มตำบลหน้าเขา อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ แสดงอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้งและร่วง มีลักษณะโคนเน่าแห้ง เมื่อเปิดเปลือกบริเวณโคนต้นและราก พบว่าเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตัดกับส่วนปกติที่มีสีขาว บางต้นมีเส้นใยสีขาวของราบางชนิดขึ้นคลุม บางต้นพบเห็ดขึ้นแล้วยืนต้นตาย และยังได้รายงานการพบการเกิดโรคโคนเน่ารากเน่าของลองกองต้นใหญ่ในสวนเกษตรกร ที่ตำบลเขาใหญ่ อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ แสดงอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้งและร่วง กำลังยืนต้นตาย เมื่อเปิดเปลือกบริเวณโคนต้นและราก พบว่าเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตัดกับส่วนปกติที่มีสีขาวเช่นเดียวกัน รากแขนงและรากฝอยที่เป็นโรคมีสีน้ำตาล รายงานว่าเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าสองกองและส้มโชกุน คือ รา *P.parasitica* และอมรรัตน์ (2548) รายงานการเกิดโรคผลเน่าในมะเขือม่วง พบว่ามีอาการฉ่ำน้ำ หรือเน่าเล็กน้อยบริเวณขั้วผล อาการเน่านี้ขยายออกไปอย่างรวดเร็ว จนทำให้เน่าเกือบทั้งผล มีสาเหตุจากรา *P.parasitica*

**2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของ รา *Phytophthora* spp.**

**2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ**

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ การเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CA ในตู้บ่มมืดอุณหภูมิ 25$^{0}$ซ. พบว่าการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง มีกิ่งก้านแยกออกไปไม่สม่ำเสมอ เส้นใยลักษณะใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (smooth) ไอโซเลทที่แยกได้จาก โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนมีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA คล้ายดอกรักเร่ ไอโซเลทอื่นมีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA คล้ายเส้นใยแมงมุม (arachnoid) ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกได้จาก หน้ายางพาราเน่า มีเส้นใยฟูมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ เชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร CA เมื่ออายุ 5 วัน แต่บนอาหาร PDA เชื้อเจริญเติบโตได้ช้ากว่า เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 7 วัน เชื้อสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA หนาแน่นกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L สร้างเส้นใยบางที่สุด และเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร CA เมื่ออายุ 2 วัน (ตารางที่ 2)

**2.2. การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของเชื้อ**

ผลการศึกษาลักษณะ รูปร่างและขนาดของ sporangium ของ รา *Phytophthora* spp. พบว่า ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกได้จาก หน้ายางพาราเน่า เชื้อสร้าง sporangia จำนวนมากบนผิวอาหารแข็ง CA เป็นรูปไข่ มีปุ่มนูน (papilla) ชัดเจนบนสปอร์ L : B ratio = 1.5 : 1 สปอร์หลุดจากก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ได้ง่ายเมื่ออายุมาก ด้านล่างมี ก้านสปอร์ (pedicel หรือ stalk) ความยาว 5-20 μm ติดอยู่ เช่นเดียวกับ ไอโซเลท แยกได้จาก โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ที่สปอร์มีปุ่มนูนที่ปลาย เมื่อสปอร์แก่จะหลุดจากก้านชูสปอร์ พร้อมมีก้าน สั้นๆ ความยาว 2.5 μm ติดอยู่

สปอร์มีรูปร่าง รีๆ L : B ratio = 1.8 : 1 แต่ไอโซเลทอื่น เชื้อสร้าง sporangia น้อย หรือไม่สร้าง sporangia บนผิวอาหารแข็ง CA ต้องตัดชิ้นเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง CA แล้วแช่ในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 24-36 ชั่วโมง เชื้อสร้าง sporangia จำนวนมากในน้ำ มี รูปค่อนข้างกลม รูปแพร์หรือกลม มีปุ่มนูนชัดเจนบนสปอร์ L : B ratio = 1.1-1.2 : 1 สปอร์ติดแน่นกับเส้นใย สปอร์ผนังหนา ยกเว้น ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L สร้างสปอร์รูปร่างแตกต่างจากทุกไอโซเลท (ตารางที่ 2)

**2.3 การศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา *Phytophthora* spp.**

ผลการศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา *Phytophthora* spp. โดยการวางเชื้อ unknown และ รา *Phytophthora* spp. มาตรฐานที่ทราบ mating type แล้ว คือ mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) และ mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) โดยวางชิ้นเชื้อคนละด้านในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อหา mating type ของราทุกไอโซเลท ในครั้งนี้ พบ รา *Phytophthora* spp. จำนวน 8 (9) ไอโซเลท คือ 45 LK Kr B 1 R, 48-Eg-BK-1-F, 47 Pi-Pr K 1 L, 49 Ct Kp 1 R, 48-An- PhK 2 L, 49 An Lpa 1 L, 51 An PB 1 L, 51 MP BK 1 S และไอโซเลทจากทุเรียน เป็น matting type A1 รา *Phytophthora* spp. จำนวน 9 (11) ไอโซเลท คือ 47-Dr-Ph B 1 L, 51 Pl Pb R 1 L, 49-Eg-CM 2 S, 48-Km-BaK 1 S, 49 Km Pb R 1 S, 49 Pi Pb R 1 L, 49-Or Na p 1 L, 47-Or-Pa T 2 L, 46-An-Ba K 1 L, 46-An- NaP 1 L และ 49 An Lpa 2 L เป็น matting type A2 สปอร์ผนังหนาเกิดจากการผสมทางเพศ (oospore) เป็นราที่จะต้องผสมต่างเพศต่างเส้นใย (heterothallic fungus) เพศเมีย (oogonium) เพศผู้ (antheridium) เพศผู้จะอยู่ใต้เพศเมีย (amphigynous antheridium) ส่วนไอโซเลท 49-Or CM 2 L จากกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ และ48-An- PhK 1 L, เป็น homothallic fungus คือ เกิด oospore โดยไม่ต้องผสม ส่วนไอโซเลทที่ไม่พบ mating typeจำนวน 11 ไอโซเลท คือ 49-PR CB 1 S, 49 –PR PB 1 S, 49-Eg-CM 1 F, 49-Eg-CM 3 F, 48-Pi-RY 2 S, 48-Or-Ra Y 1 L, 49-Or CM 3 L, 49-Or CM 4 L, 51 Or Pb R 1 S, 51 Or PB 1 L และ 48-An-Ch B 1 L (ตารางที่ 2)

mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) และรา *P. palmivora* มาตรฐาน mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) จึงใช้รา *P. palmivora* มาตรฐาน 2 ไอโซเลทดังกล่าวในการศึกษา mating type ของ รา *Phytophthora* ในครั้งนี้

ในการศึกษา mating type ผลที่ได้คือ เซลล์สืบพันธุ์ oogonia, antheridia, oospores ซึ่งบางครั้งอาจใช้ประโยชน์จากลักษณะและรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์ เป็นลักษณะอีกลักษณะหนึ่งที่ใช้จำแนกชนิดของ *Phytophthora* ได้ (Waterhouse, 1970) ตำแหน่งของ antheridia อยู่ตรงส่วนไหนของ oogonia ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผิวของ oogonia เรียบ antheridia อยู่ด้านใต้ หรือ ฐานของ oogonia เป็นแบบ amphigynous antheridium ซึ่งเป็นลักษณะประจำของ รา *P. parasitica* (ทวี, 2545) ในการทดสอบครั้งนี้ยังพบ *Phytophthora* ไอโซเลทที่ไม่ผสมกับทั้ง A1 และ A2 อาจ

เนื่องจากเป็น *Phytophthora* ต่างชนิดกันทำให้ไม่สามารถเข้ากันได้ แต่เนื่องจากการทดสอบครั้งนี้ พบ รา *P. parasitica* ทั้ง mating type A1 และ mating type A2 จึงสมควรนำราทั้งสอง mating type มาทดสอบอีกครั้ง เพื่อใช้เป็น mating type มาตรฐานของรา *P. parasitica* ได้

3. **การจำแนกชนิดรา** *Phytophthora* spp.

ผลการจำแนกชนิดราที่นำมาศึกษา โดยเปรียบเทียบ ลักษณะการเจริญของเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่าง ๆ (sporangium, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores) ของรา *Phytophthora* กับคู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996) และ จำแนกชนิดรา *Pythium* spp. กับคู่มือการจำแนกชนิด *Pythium* ของ PLAATS-NITERINK (1981) และ เอกสารวิชาการ ของ Robertson (1980) พบว่า ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกจากหน้ายางพารา (จากจังหวัดจันทบุรี) คือรา *P.botryosa* ไอโซเลท 49-Or CM 2 L ที่แยกได้จาก กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ คือ รา *P. heveae* ไอโซเลทที่แยกได้จากรากเน่าโคนเน่าทุเรียน คือ *P. palmivora* และ ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L ที่แยกได้จากหน้าวัว คือ รา *Pythium* sp. ส่วนราไอโซเลทอื่น ๆ คือรา *P. parasitica*

รา *P. botryosa* เป็นสาเหตุโรคใบร่วง (leaf fall) และฝักเน่า (pod rot) ของยางพารา ในประเทศมาเลเซีย และไทย ซึ่งเชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคฝักเน่าของโกโก้ด้วย (Erwin and Ribeiro, 1996) สำหรับในประเทศไทยพบการเข้าทำลายบนต้นยางพารา ทำให้เกิดโรคใบร่วง และโรคฝักเน่า และโรคเส้นดำ หรือ เสี้ยนดำ (Black stripe) ที่ทำลายหน้ายางเสมอ ๆ ในแปลงปลูก (อมรรัตน์ , 2551)

รา *P. heveae* มีการรายงานครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1929 เป็นสาเหตุโรคเส้นดำ (black stripe) ของยางพารา (*Heveae* rubber) ในประเทศมาเลเซีย ต่อมาพบรายงานการระบาดของรานี้กับพืชหลายชนิดในหลายประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกา นอกจากนี้มีรายงานการเกิดโรคยอดเน่ายอดด้วนของมะพร้าวในประเทศไอเวอรี่โคสท์ (Erwin and Ribeiro, 1996) อมรรัตน์และคณะ (2550) รายงานครั้งแรกที่พบ รา *P. heveae* บนกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ในประเทศไทย

รา *P. palmivora* เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (root rot) โคนเน่า (stem rot) แคงเกอร์ (canker) ใบไหม้ (leaf blight) ยอดเน่า (shoot rot) เหี่ยว (wilt) ผลเน่า (fruit rot) กล้าเน่า (seedling rot) ใบจุด (leaf spot) มีพืชมากกว่า 138 ชนิด ที่เป็นพืชอาศัยของราตัวนี้ พืชที่สำคัญๆ เช่น โกโก้ มะพร้าว ยางพารา พริกไทย สาเก สับปะรด ปาล์มน้ำมัน มะละกอ ทุเรียน มะม่วงหิมพานต์ กล้วยไม้ (อมรรัตน์, 2552)

รา *P. parasitica* เป็นสาเหตุโรคพืชในแหล่งปลูกประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อนและกึ่งร้อน สหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น ไต้หวัน อาร์เจนตินา เวนิซูเอลา อิหร่าน อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เม็กซิโก เมียนม่า ทาสมาเนีย เยอรมันนี บราซิล เปอร์โตริโก เปอร์ตุเกส จาไมก้า และประเทศไทย (ทวี, 2549)

## 4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora*

### 4.1 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora parasitica* ด้วยเทคนิค SSR- PCR ไพรเมอร์ microsatellite

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora* spp. จากพืชอาศัย 6 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (จากจังหวัดปราจีนบุรี) สับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และ ส้ม และ *Pythium* sp. จากหน้าวัว ด้วยเทคนิค SSR-PCR โดย microsattlelite ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกรา *Fusarium oxysporum* complex Steenkamp *et al.,* (2005) ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 220 แถบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSys 2.22e และวิเคราะห์ค่า bootstrap จำนวนสุ่ม 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม winboot ค่า bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่า bootstrap 85-100% แสดงถึงความเชื่อมั่นสูง ค่า bootstrap 71-84% แสดงถึงความเชื่อมั่นปานกลาง และค่า bootstrap 50-70% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Richardson et al. 2000) Phylogenetic tree แบ่งกลุ่มรา *Phytophthora* spp. ออกจากรา *Pythium* sp. ที่ 30% similarity รา *Phytophthora* spp. จำแนกเป็น 4 กลุ่ม คือ A เป็นรา *P. parasitica* จากยางพารา กลุ่ม B ประกอบด้วยรา *P. parasitica* จากสับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และส้ม ด้วยค่า similarity 45-80 % กลุ่ม C เป็นรา *P. haveae* สาเหตุโรคกล้วยไม้รองเท้านารี มีค่า bootstrap เป็น 100% สำหรับรา *P. haveae* เป็นไอโซเลทที่เป็นสาเหตุโรคในพืชยางพารา แต่สามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้ และมีลักษณะของสปอร์คล้ายกับรา *P. parasitica* ซึ่งจะต้องมีการศึกษาจำแนกโดยใช้คุณสมบัติต่าง ๆ มากขึ้น กลุ่ม D เป็นรา *P. palmivora* สาเหตุโรคกล้วยไม้ และรา *P. parasitica* ไอโซเลทจากกล้วยไม้ จ.ปทุมธานี ซึ่งมีค่า bootstrap สูง 96-97% ดังนั้นมีความเป็นไปได้ในการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่า ไอโซเลท Or-PaT1L อาจเป็นรา *P. palmivora* ได้ (ภาพที่ 1) ทั้งนี้ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ชัดเจนกับพืชอาศัยหรือแหล่งปลูกพืช

### 4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ รา *Phytophthora parasitica*โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *Phytophthora* จากพืชอาศัย 9 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (ยางพารา ฉะเชิงเทรา คือจากจังหวัดปราจีนบุรี) กล้วยไม้ หน้าวัว เดหลี หมากผู้หมากเมีย สะระแหน่ ส้ม มะเขือ และลองกอง พบว่าไพรเมอร์ EAC+MAG และ EAG+MAC ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน ได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และแถบดีเอ็นเอที่จาง แต่คู่ไพรเมอร์ EA+MAAC สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถจำแนกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) รวม 65 แถบ (ภาพที่ 2) วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม NTsys 2.22e แบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่ม (ภาพที่ 3) ดังนี้ กลุ่ม A มีราไอโซเลทสาเหตุโรคเน่าดำหรือเน่าเข้าไส้กล้วยไม้ 4 ไอโซเลท กลุ่ม B ประกอบด้วยรา สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว 5 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลทจากกรุงเทพฯ ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับไอโซเลทอื่น โดยมีข้อมูลเพิ่มเติมว่าเป็นไอโซเลทที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้รุนแรง กลุ่ม C เป็นไอโซเลทจากมะเขือ สะระแหน่ และเดหลี กลุ่ม D เป็นไอโซเลทจากยางพาราและส้ม กลุ่ม E, F และ G เป็นไอโซเลทจากหมากผู้หมากเมีย ลองกอง และหน้าวัว ตามลำดับ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง มีค่า similarity ตั้งแต่ 12-95% แต่สามารถจำแนกราที่เข้าทำลายพืชอาศัยชนิดเดียวกันอยู่ด้วยกันได้ ตัวอย่างคือ กลุ่ม A และ B ที่จัดกลุ่มเชื้อที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชอาศัยของกล้วยไม้และหน้าวัว ตามลำดับ แต่ไอโซเลทของกล้วยไม้จัดกลุ่มอยู่ด้วยกันที่ค่า similarity ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะแยกเก็บจากแหล่งปลูกในจังหวัดเชียงใหม่เช่นเดียวกัน มีการจัดกลุ่มรา *P. parasitica* ในกลุ่มเดียวกับ *P. havaea* ที่ค่า similarity สูงถึง 75% และมีค่า bootstrap สูงถึง 98% โดยมีข้อมูลการจำแนกทางสัณฐานวิทยาว่าเป็นรา *P. haveae* (เป็นไอโซเลทที่เป็นสาเหตุโรคในยางพารา) ทั้งนี้ควรจะต้องมีการจำแนกโดยคุณสมบัติอื่นเพิ่มเติมเพื่อความชัดเจนในการจำแนก species ไอโซเลทของหน้าวัวจากลำปางมีความคล้ายกันสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ similarity แต่ไอโซเลทจากภูเก็ตแตกต่างกัน และไอโซเลทจากกรุงเทพฯ มีความแตกต่างจากไอโซเลทจากแหล่งอื่นๆ ที่ค่า similarity 12 เปอร์เซ็นต์

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มเชื้อตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSR-PCR ไพรเมอร์ microsatellite ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจน ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP สามารถแสดงความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมกับพืชอาศัย คือพืชอาศัยชนิดเดียวกันจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ ศรีสุข และคณะ (2544) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการจัดกลุ่มรา *Phytophthora* โดยสามารถจำแนกราจากทุเรียน 3 ไอโซเลท ที่ความเหมือนกัน 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ไอโซเลทจากกล้วยไม้จัดรวมในกลุ่มเดียวกับส้มและพริกไทย ที่ความเหมือนกันเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เทคนิค AFLP นับว่าเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ สามารถใช้ในการศึกษาลักษณะทาง

พันธุกรรม ให้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งในการศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อรา แบคทีเรีย และพืช

## สรุปผลการทดลอง

ผลการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า จาก 14 จังหวัดทั่วประเทศ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบ รา *P. parasitica* จำนวน 29 ไอโซเลท เป็นสาเหตุโรคเน่าของพืชที่ศึกษา และพบ รา *P. heveae* เป็น สาเหตุโรคกล้าเน่าของกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ รา *P. palmivora* เป็น สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน รา *P. botryosa* เป็น สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่า และรา *Pythium* sp. แยกได้จากต้นหน้าวัว

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของราที่แยกได้จากต่างพืชอาศัยและแหล่งปลูกพืช วิเคราะห์จัดกลุ่มเชื้อตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSR-PCR ไพรเมอร์ microsatellite ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างพืชอาศัยหรือแหล่งปลูก แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP บางกลุ่มสามารถแสดงความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมกับพืชอาศัย และแหล่งปลูกพืช ไม่พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

## เอกสารอ้างอิง

ขจรศักดิ์ ภวกุล วิจัย รักวิทยาศาสตร์ มาโนช ทศพล สิริ สุวรรณเขตนิคม. 2542-2543. โรคใบไหม้ของลำไย : ลักษณะอาการ สาเหตุของโรคและการป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี. วารสารโรคพืช 14-15 (1-2) : 46-58.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. โรคของหน้าวัว. ใน คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 72.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กทม. 284 หน้า.

ทวี เก่าศิริ. 2545. อนุกรมวิธานรา *Phytophthora* (Taxonomy of Phytophthora). เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาอนุกรมวิธานรา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 หน้า.

ทวี เก่าศิริ. 2549. หน่วยที่ 9 สาเหตุโรคพืช ตอนที่ 9.1 รา และหน่วยที่ 10 ชนิดของโรคพืช ตอนที่ 10.1 โรคพืชที่เกิดจากรา หน้า 9-4 – 9-26และหน้า 10-1-10-34. ใน เอกสารการสอนชุดวิชาศัตรูพืชเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์.

ศรีสุข พูนผลกุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2544. การใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เปรียบเทียบวิวัฒนาการของเชื้อรา Phytophthora spp. ไอโซเลทต่าง ๆ และการจัดกลุ่มด้วยการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. ในรายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2546. เตือนภัย...ไฟทอปเธอร่า ลองกอง. กสิกร 76 (4) : 87-93.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2548. โรคผลเน่าในมะเขือม่วง. ข่าวอารักขาพืช 1 (6) : 3.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2551. โรคพืชและการจัดการโรคพืช. หน้า 19-33 *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรม กลยุทธ์การให้บริการวิชาการเกษตรด้านการผลิตพืช วันที่ 2-4 กรกฎาคม 2551 ณ ห้องประชุมศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตร้อยเอ็ด จ.ร้อยเอ็ด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4 อุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 72 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2544. โรครากเน่า-โคนเน่าในสวนทุเรียนภาคตะวันออก. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. ปีที่ 11 เล่มที่ 3. หน้า 39-45.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์และทวี เก่าศิริ. 2546. ความผันแปรใน *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. ทุเรียน : ลักษณะรูปร่างและแบบคู่ผสม. วารสารวิชาการเกษตร 21 (1) : 72-89.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ทวี เก่าศิริ และพัชราภรณ์ ลีลาภิรมย์กุล (2549) โรคราน้ำฝนลำไย. เคหการเกษตร 30 (10) : 90-95.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ทวี เก่าศิริ และพัชราภรณ์ ลีลาภิรมย์กุล. 2550. การจำแนกชนิดรา *Phytophthora* สาเหตุโรคเน่ากล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) จากเชียงใหม่. หน้า 1-17. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี. วันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550. ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ.เมือง จ. พิษณุโลก

Brasier, C. M. and E. M. Hansen, 1992. Evolution Biology of *Phytophthora* Part II : Phylogeny, Speciation and Population Structure. Annu. Rev. Phytopathol. 30 : 137-200.

Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul., MN., USA. 562 p.

Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytopthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.

Steenkamp. 2005. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex, Molecular Ecology Notes 5: 622–624

Suzui, T., U. Kueprakone and T. Kamhangridthirong. 1976. *Phytophthora* disease on some economic plants in Thailand. Plant Pathol. Div., of Agr., Thailand. 112 pp.

Waterhouse, G. M. 1970. The genus *Phytopthora* de Bary Commonwealth Mycol. Inst. Kew, Surrey, England. 59 p.

**ตารางที่ 1** ไอโซเลทของรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคพืช จากพื้นที่เพาะปลูกของประเทศไทย (ปี พ.ศ. 2545-2551)

| ที่ | พืช | ไอโซเลท | อาการ | สถานที่ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | หมากผู้หมากเมีย (Dr=Dracaena Palm) | 47[1]-Dr[2]-Ph B[3] 1[4] L[5] | ใบไหม้ | เพชรบูรณ์ |
| 2 | เดหลี (Pl = Peace lily) | 51 Pl Pb R 1 L | ใบไหม้ | อ.เมือง เพชรบุรี |
| 3 | ยางพารา (PR = Para Rubber) | 49-PR CB 1 S | หน้ายางเน่า | จันทบุรี (*P.botryosa*) |
| 4 | ยางพารา | 49 –PR PB 1 S | หน้ายางเน่า | ศูนย์วิจัยยาง ปราจีนบุรี |
| 5 | ลองกอง ลูกู LK=Long Kong | 45 LK Kr B 1 R | รากเน่า | บ้านนายยวนไทย ต.เขาใหญ่ อ.อ่าวลึก กระบี่ |
| 6 | ทุเรียน Du = Durian | 46-Du-CB 4 S | รากเน่าโคนเน่า | 79 ม.2 ต.อ่างคีรี อ.มะขาม จ.จันทบุรี |
| 7 | มะเขือ Eg = Egg-plant | 48-Eg-Ba K-1-F มะเขือม่วงผลเล็ก | ผลเน่า | ด่านพืชส่งออก ดอนเมือง กรุงเทพ ฯ |
| 8 | มะเขือ | 49-Eg-CM 1 F มะเขือม่วงผลใหญ่ | ผลเน่า | นางอำนวย ใจคำ 43 หมู่ 3 ต. ทุ่งข้าวพวง อ.เชียงดาว เชียงใหม่ |
| 9 | มะเขือ | 49-Eg-CM 2 S มะเขือม่วงผลเล็ก | รากเน่า โคนเน่า | บริษัท ยูเนี่ยนเพลส ต.ทุ่งข้าวพวง อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ |
| 10 | มะเขือ | 49-Eg-CM 3 F มะเขือยาว | ผล | บ้านปางดะ อ.สะเมิง จ. เชียงใหม่ |

**ตารางที่ 1** (ต่อ)

| ที่ | พืช | ไอโซเลท | อาการ | สถานที่ |
|---|---|---|---|---|
| 11 | สะระแหน่<br>Km = Kitchen Mint | 48-Km-BaK 1 S | ก้าน เน่าดำ<br>ใบไหม้ | ร้านแหนมเนือง<br>ดอนเมือง กรุงเทพ ฯ |
| 12 | สะระแหน่ | 49 Km Pb R 1 S | ก้าน เน่าดำ<br>ใบไหม้ | แปลงผัก ร้านอาหารแซบอีหลี<br>อ.ชะอำ เพชรบุรี |
| 13 | สับปะรด<br>Pi = Pineapple | 47 Pi-Pr K 1 L<br>พันธุ์ปัตตาเวีย | โคนใบ (เน่าแห้ง) | กม.5 ปากน้ำปราณ<br>อ.ปราณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ |
| 14 | สับปะรด<br>พันธุ์ปัตตาเวีย | 49 Pi Pb R 1 L | โคนใบ (เน่าเละ) | บ้านห้วยทรายใต้<br>อ.ชะอำ เพชรบุรี |
| 15 | สับปะรด<br>พันธุ์ปัตตาเวีย | 48-Pi-RY 2 S | แกนก้าน<br>โคนต้นเน่า | แปลงผู้ใหญ่บ้าน ต.มาบยางพร<br>อ.ปลวกแดง จ.ระยอง |
| 16 | ส้ม Ct = citrus<br>พันธุ์เขียวหวาน | 49 Ct Kp 1 R | รากเน่า | กำแพงเพชร |
| 17 | กล้วยไม้หวาย<br>Or = Orchid | 48-Or-R Y 1 L | โคนใบเน่า | อ.เมือง จ. ระยอง |
| 18 | กล้วยไม้ Mokara | 49-Or Na p 1 L | ต้นเน่า<br>ใบเน่า | สุวิทย์ ลิ้มโปเจริญสุข 77/6 ม.1<br>ต.บางแก้วฟ้า อ.นครชัยศรี<br>นครปฐม |
| 19 | กล้วยไม้<br>รองเท้านารีอินทนนท์<br>(กล้าเพาะจาก<br>เนื้อเยื่อ) | 49-Or CM 2 L | ต้นกล้า<br>ใบ โคนใบเน่า | ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่<br>ต.หนองควาย อ.หางดง<br>จ.เชียงใหม่ (*P. heveae*) |
| 20 | กล้วยไม้รองเท้านารี<br>เหลืองกาญจน์ | 49-Or CM 3 L | ต้นโต<br>ใบ โคนใบเน่า | ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ |
| 21 | กล้วยไม้เอื้องกุหลาบ<br>กระเป๋าเปิด | 49-Or CM 4 L | ต้นเน่า<br>ใบเน่า | ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ |
| 22 | กล้วยไม้ | 47-Or-Pa T 2 L | ใบจุด | อ.เมือง ปทุมธานี |
| 23 | กล้วยไม้Mokara | 51 Or Pb R 1 S | ต้นเน่า | รังกล้วยไม้วิทยาลัยเกษตรกรรม<br>เพชรบุรี อ.เมือง เพชรบุรี (A1) |

**ตารางที่ 1** (ต่อ)

| ที่ | พืช | ไอโซเลท | อาการ | สถานที่ |
|---|---|---|---|---|
| 24 | กล้วยไม้Vanda | 51 Or PB 1 L | ต้นเน่า | รังกล้วยไม้บริษัท PSP อ.เมือง ปราจีนบุรี (นิยมรัฐ) (A2) |
| 25 | หน้าวัว An = Anthurium | 46-An-Ba K 1 L | ใบไหม้ | อ.มีนบุรี กรุงเทพฯ |
| 26 | หน้าวัว | 46-An- NaP 1 L | ใบไหม้ | อ.พุทธมณฑล นครปฐม |
| 27 | หน้าวัว | 48-An- PhK 1 L | ก้านหน้าวัว | ภูเก็ต 1 |
| 28 | หน้าวัว | 48-An- PhK 2 L | ก้านหน้าวัว | ภูเก็ต 2 |
| 29 | หน้าวัว | 49 An Lpa 1 L | ใบไหม้ | ต้นทดสอบพันธุ์ สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จ.ลำปาง |
| 30 | หน้าวัว | 49 An Lpa 2 L | ใบไหม้ | ต้นทดสอบพันธุ์ สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จ. ลำปาง |
| 31 | หน้าวัว | 51 An PB 1 L | ใบไหม้ เน่า | รังกล้วยไม้บริษัท PSP อ.เมือง ปราจีนบุรี |
| 32 | หน้าวัว | 48-An-Ch B 1 L | ใบ | อ.เมือง ชลบุรี |
| 33 | แพงพวยฝรั่ง Mp = Madagascar periwinkle | 51 MP BK 1 S | โคนเน่า | แปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ ฯ |

**หมายเหตุ** [1]- ปี พ.ศ. ที่เก็บตัวอย่าง

[2]- ชนิดพืชที่เป็นโรค

| | | | |
|---|---|---|---|
| หมากผู้หมากเมีย | Dr=Dracaena Palm | เดหลี | Pl = Peace lily |
| ยางพารา | PR = Para Rubber | ลองกอง ลูกู | LK=Long Kong |
| ทุเรียน | Du = Durian | มะเขือ | Eg = Egg-plant |
| สะระแหน่ | Km = Kitchen Mint | สับปะรด | Pi = Pineapple |
| ส้ม | Ct = citrus | กล้วยไม้ | Or = Orchid |
| หน้าวัว | An = Anthurium | แพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก) | Mp = Madagascar periwinkle |

[3]- จังหวัดที่เก็บตัวอย่างโรค

| | | | |
|---|---|---|---|
| กรุงเทพฯ | BK = Bangkok | ปทุมธานี | Pa T = Pathumthani |
| นครปฐม | NaP = Nakhonpathom | ปราจีนบุรี | PB = Prachinburi |
| ระยอง | Ra Y = Rayong | จันทบุรี | CB = Chanthaburi |
| เพชรบูรณ์ | Ph B = Petchbun | เพชรบุรี | Pb R = Petchburi |
| ประจวบคีรีขันธ์ | Pr K = Prachuapkhirikhan | กระบี่ | Kr B = Krabi |
| ภูเก็ต | PhK = Phuket | กำแพงเพชร | Kp = Kamphaengphet |
| ลำปาง | Lpa = Lampang | เชียงใหม่ | CM = Chiangmai |

[4] – ลำดับไอโซเลทที่แยกได้ในจังหวัดนั้น

[5] – ส่วนของพืชที่เป็นโรค

| | | | |
|---|---|---|---|
| ใบ | L = Leaf | ราก | R = Root |
| ลำต้น | S = Stem | ผล | F = Fruit |

เช่น

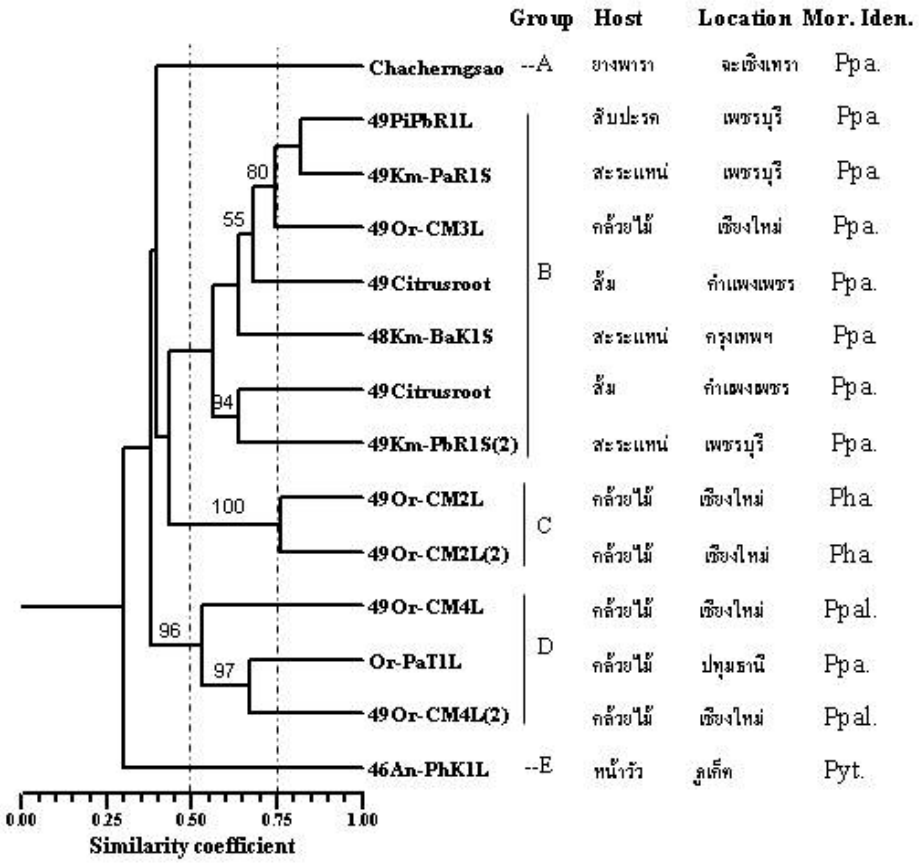
47[1]-Dr[2]-Ph B[3] 1[4] L[5] คือ ไอโซเลท รา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคใบไหม้หมากผู้หมากเมีย เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ ไอโซเลทที่ 1 แยกได้จากใบ เป็นต้น

**ตารางที่** 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลทรา *Phytophthora* spp. ที่แยกจากพืชต่างชนิด

| ที่ | ไอโซเลท | ลักษณะโคโลนี | L:B ratio ของสปอร์ | mating type |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 47-Dr-Ph B 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 2 | 51 Pl Pb R 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | A2 |
| 3 | 49-PR CB 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม ฟูมากที่สุด | 1.5 : 1 (*P.botryosa*) | - |
| 4 | 49 –PR PB 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | - |
| 5 | 45 LK Kr B 1 R | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A1 |
| 6 | 46-Du-CB 4 S | คล้ายดอกรักเร่ | 1.8 : 1 *P. palmivora* | A1 |
| 7 | 48-Eg-Ba K-1-F | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | A1 |
| 8 | 49-Eg-CM 1 F | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | - |
| 9 | 49-Eg-CM 2 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 10 | 49-Eg-CM 3 F | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.11 : 1 | - |
| 11 | 48-Km-BaK 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 12 | 49 Km Pb R 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.15 : 1 | A2 |
| 13 | 47 Pi-Pr K 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A1 |
| 14 | 49 Pi Pb R 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.17 : 1 | A2 |
| 15 | 48-Pi-RY 2 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | - |
| 16 | 49 Ct Kp 1 R | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A1 |
| 17 | 48-Or-Ra Y 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | - |
| 18 | 49-Or Na p 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |

**ตารางที่** 2 (ต่อ)

| ที่ | ไอโซเลท | ลักษณะโคโลนี | L:B ratio ของสปอร์ | mating type |
|---|---|---|---|---|
| 19 | 49-Or CM 2 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.29 : 1 (*P. heveae*) | homogynous |
| 20 | 49-Or CM 3 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.12 : 1 | - |
| 21 | 49-Or CM 4 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | - |
| 22 | 47-Or-Pa T 2 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 23 | 51 Or Pb R 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.13 : 1 | - |
| 24 | 51 Or PB 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | - |
| 25 | 46-An-Ba K 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 26 | 46-An- NaP 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A2 |
| 27 | 48-An- PhK 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | *Pythium* sp. | homogynous |
| 28 | 48-An- PhK 2 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | A1 |
| 29 | 49 An Lpa 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.16 : 1 | A1 |
| 30 | 49 An Lpa 2 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.17 : 1 | A2 |
| 31 | 51 An PB 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.2 : 1 | A1 |
| 32 | 48-An-Ch B 1 L | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.14 : 1 | - |
| 33 | 51 MP BK 1 S | คล้ายเส้นใยแมงมุม | 1.1 : 1 | A1 |

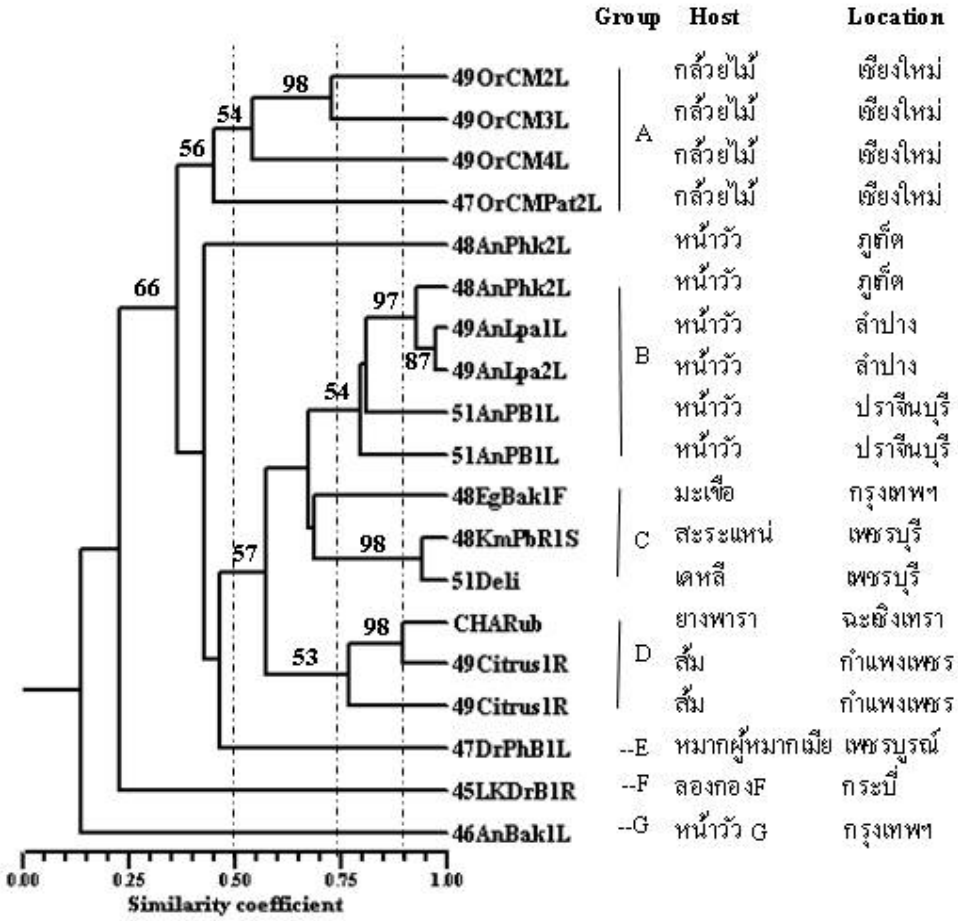



**ภาพที่ 1** Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมรา *Phytophthora* และ *Pythium* จากพืชอาศัย 6 ชนิด ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สังเคราะห์ด้วย ไพรเมอร์ microsatellite primers (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง) วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc. version 2.22e ตัวเลขบนแกนของ tree เป็นค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

**ภาพที่ 2** รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รา *Phytophthora* spp. โดยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ E+A/M+AAC ตรวจแถบดีเอ็นเอบน 6% Acrylamide gel ย้อมด้วย Silver nitrate

1. 49 Or-Cm 2 L 2. 49 Or-Cm 3 L 3. 49 Or-Cm 4 L 4. 47 Or PaT 2 L 5. 48 An-PhK 2L
6. 48 An-PhK 2L 7.49 An-Lpa 1 L 8. 49 An-Lpa 2 L 9. 51 An-PB 1 L 10. 51 An-PB 1 L
11. 46 An-BaK 1 L 12. 47Dr-Ph B 1 L 13. 45 LK-Kr B 1 R 14. 48 Eg-BaK 1 F
15. 48 Km-PbR 1 S 16. 51 Deli 17. CHARub 18. 49 Citrus 1 R 19. 49 Citrus 1 R




**ภาพที่** 3 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมรา *Phytophthora* จากพืชอาศัย 9 ชนิด ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP โดยไพรเมอร์ E+A/M+AAC วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc. version 2.22e ตัวเลขบนแกนของ tree เป็นค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง)