

ความหลากหลายทางชีวภาพและศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของ
Pythium spp. และ Oomycetes ที่แยกได้จากบางพื้นที่ในภาคตะวันออกของ
ประเทศไทย

**BIODIVERSITY AND POTENTIAL AS BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF
PYTHIUM SPP. AND RELATED OOMYCETES ISOLATED FROM SOME
AREAS OF EASTERN THAILAND**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL--2021-AG-M-065-348

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**BIODIVERSITY AND POTENTIAL AS BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF
PYTHIUM SPP. AND RELATED OOMYCETES ISOLATED FROM SOME
AREAS OF EASTERN THAILAND**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2021

KMITL-2021-AG-M-065-348

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2021

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายทางชีวภาพและศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของ <i>Pythium</i> spp. และ Oomycetes ที่แยกได้จากบางพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
นักศึกษา	นายรัฐสิทธิ์ แซ่ลี
รหัสประจำตัว	61604015
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. พรหมมาศ กุฬากาญจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. คณิงนิจ บุศราคัม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการแยก *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในคลาส Oomycetes จากแหล่งอาศัยต่างๆ ได้แก่ ดินป่าเสื่อมโทรม ดินป่าชายเลน ดินสวนเกษตร แหล่งน้ำจืดและน้ำกร่อย ในบางพื้นที่ของจังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด โดยใช้อาหารจำเพาะ จากการทดลองสามารถแยก *Pythium* และสกุลใกล้เคียงได้ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท จากการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางอนุวิทยา สามารถระบุได้เป็น *Globisporangium splendens*, *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum*, *Phytophythium cucurbitacearum*, *Phytophythium delicense*, *Phytophythium diclinum*, *Phytophythium longipapillum*, *Phytophythium myriotylum*, *Phytophythium torulosum*, *Phytophythium helicoides* และ *Phytophythium vexans* การวิเคราะห์ทางสายวิวัฒนาการที่แบ่งกลุ่ม *Pythium* และสกุลใกล้เคียงออกเป็นคลด A-K ตามการจัดจำแนกในปัจจุบัน พบว่าไอโซเลทที่แยกได้อยู่ในคลด A, B, D, I และ K เป็นจำนวน 1, 12, 7, 11 และ 21 ไอโซเลทตามลำดับซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในรายงานฉบับนี้ ในจำนวนนี้พบว่า *G. splendens* ส่วนใหญ่จะแยกได้จากดินสวนเกษตรทั้งในจังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด และผลการทดสอบโรคพบว่ามีความสามารถในการทำให้เกิดโรคสูง ประกอบกับมีรายงานว่าสามารถก่อโรคในทุเรียนได้ จึงมีแนวโน้มสูงว่าสายพันธุ์นี้จะเป็น dominant species ในแถบนี้ เมื่อศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ค่าการนำไฟฟ้า ความชื้น และปริมาณไนโตรเจนในดิน พบว่าความเป็นกรด-ด่างและความชื้นในดินมีอิทธิพลต่อปริมาณเชื้อ *Pythium* ในระดับหนึ่ง ส่วนปัจจัยอื่นยังเห็นความสัมพันธ์ไม่เด่นชัดเนื่องจากการเก็บข้อมูลตามธรรมชาติ ซึ่งค่าตัวแปรไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่อย่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการคัดเลือก *Pythium* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic *Pythium*: NpP) หรือสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ (hypo virulent *Pythium*: HvP) ไปทดสอบศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีต่อโรครากเน่าจาก *Pythium* spp. พบว่าได้ NpP 1 ไอโซเลท คือ *P. catenulatum* CHS-10 และ HvP 4 ไอโซเลท คือ *P. acanthicum* RYS-7, *P. torulosum* RYS-10, *P. diclinum* RYS-16 และ *P. cucurbitacearum* RYS-20 เมื่อทดสอบการสร้างความต้านทานให้แก่พืชที่ทำการกระตุ้นด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วย *P. catenulatum* CHS-10 และ *P. diclinum* RYS-16 นั้นมีความรุนแรงของโรคโคนเน่ารากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าทำให้การเกิดโรคอยู่ที่ 10-20% ในขณะที่ชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อนั้นมีอาการโรคสูงที่สุด คือ 75% รวมถึงยังสามารถแพร่ขยายลูกกลมไปทั่วทั้งโคนต้นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมราสาเหตุโรคพืชจาก *Fusarium* พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 18% จากการทดสอบความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรคด้วยชิ้นส่วนเซลล์ พบว่าทริตเมนต์ที่กระตุ้นด้วยเซลล์ของ *P. catenulatum* ไอโซเลท RYS-10 นั้นมีความรุนแรงของโรคโคนเน่ารากเน่าที่น้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. acanthicum* ไอโซเลท RYS-7 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 30% โดยมีกลไกการยับยั้งแบบสถานะการปรสิตในเชื้อรา (mycoparasite) นอกจากนี้พบว่า *P. diclinum* RYS-16 และ *P. catenulatum* CHS-10 อาจมีศักยภาพในการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานได้เล็กน้อย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลของเชื้อ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงที่พบในบางพื้นที่ของประเทศไทยมีความทันสมัยและชัดเจนขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัย และนำไปใช้ทางด้านการเกษตรต่อไป

Thesis	Biodiversity and potential as biological control agent of <i>pythium</i> spp. and related oomycetes isolated from some areas of Eastern Thailand
Student	MR. Rattasit Saelee
Student ID.	61604015
Degree	Master of Science
Program	Agriculture
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Prommart Koohakan
Thesis Co-Advisor	Dr. Kanungnid Busarakam

ABSTRACT

This research aimed to study *Pythium* and related genera in class Oomycetes for their distribution, biodiversity, and benefit aspects as a biological control agent. The microorganisms were isolated from any habitable locations (cultivated soil, degraded forest soil, mangrove soil, mangrove, and stream water) in Rayong, Chanthaburi, and Trad provinces, Thailand. Fifty-two isolates were obtained and identified using morphological and molecular techniques, revealing that they belong to *Globisporangium splendens*, *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum*, *Phytophythium cucurbitacearum*, *Phytophythium delicense*, *Phytophythium diclinum*, *Phytophythium longipapilum*, *Phytophythium myriotylum*, *Phytophythium torulosum*, *Phytophythium helicoides* and *Phytophythium vexans*. According to phylogeny data, *Pythium* and related genera are classified into 11 clades (A-K), and this study discovered that 1, 12, 7, 11, and 21 isolates belong to clades A, B, D, I, and K, respectively. This report describes the phylogenetic analysis of the isolates in each clade. Notably, all *Globisporangium splendens* (*P. splendens*) isolates were mostly isolated from orchard soil in Chanthaburi, Rayong and Trad provinces. *G. splendens* has been classified as a durian pathogen, and the result in this study revealed a high level of pathogenicity. In fact, it has the potential to become a dominant species in this region, as well as a major plant pathogen in the future. Environmental factors influencing the population of *Pythium* and related genera are being studied. Soil pH and moisture were the only variables found to be moderately correlated.

Due to the samples were collected naturally, other soil parameters, such as organic matter, electrical conductivity, and nitrogen content, do not appear to be related.

Non-pathogenic *Pythium* (NpP) and hypo-virulent *Pythium* (HvP) were selected for potential usage as a biocontrol agent against to *Pythium* root rot and *Fusarium* wilt diseases, including, one-isolate of NpP, *P. catenulatum* CHS-10, and four-isolate of HvP, *P. acanthicum* RYS-7, *P. torulosum* RYS-10, *P. diclinum* RYS-16 and *P. cucurbitacearum* RYS-20. In the induction of *Pythium* root rot resistance, using cell culture of NpP, *P. catenulatum* CHS-10, and HvP, *P. diclinum* RYS-16, were compared to other isolates. The results indicated that both isolates presented lowest root rot severity (10-20%), while the rest inoculated control had the highest disease severity (75%), which were developed symptom rapidly. Furthermore, induce resistance of the isolates to *Pythium* root rot disease was investigated. It was discovered that the treatment treated with *P. catenulatum* CHS-10 cell culture presented the lowest disease severity (18%). The ability of cell fragments of *P. catenulatum* RYS-10 to induce plant resistance was investigated and also found that the isolate presented the lowest disease severity, but slightly less than the inoculated control.

In terms of the ability of cell fragments to induce plant resistance to *Fusarium* wilt, the treatment tested with *P. acanthicum* isolate RYS-7 demonstrated the lowest disease severity (approximately 30%). Furthermore, the total plant weight is comparable to the inoculated control. According to the results, *P. acanthicum* RYS-7 can inhibit the growth of plant pathogens via mycoparasitism and may stimulate plant resistance to some extent. In addition, *P. diclinum* RYS-16 and *P. catenulatum* CHS-10 were discovered to have the capacity to stimulate plant resistance at a limited level. All of the *Pythium* information in this report would help clarify and update prospect knowledge while also providing an advantage in agricultural applications.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนจาก โครงการภาคีบัณฑิต ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย รวมถึงทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรหมมาศ กุหากาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยรับฟังปัญหา ให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษาทั้งเรื่องของวิทยานิพนธ์และการใช้ชีวิตตลอดมา รวมถึง ดร. คณินิจ บุศราคัม (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม สำหรับคำแนะนำในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณเพ็ญภา จันทน์นวล โดยตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท ที่ได้ให้คำแนะนำเรื่องความรู้ในห้องปฏิบัติการ วิธีการใช้งานอุปกรณ์เครื่องมือ และบทเรียนต่างๆ ขอขอบคุณ คุณสรานี สุวรรณดี และ คุณหนึ่งฤทัย ไหมพรม สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมารดาเป็นอย่างมาก ที่ได้อุปการะเลี้ยงดู และมอบความรัก รวมถึงกำลังใจมาตลอดช่วงเวลาที่เข้ารับการศึกษาจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบคุณ คุณคุณภัทร ทองคำ และคุณมงกุฎกานต์ อุดมพงษ์สุข สำหรับคำแนะนำและประสบการณ์ในการใช้ชีวิต คุณจักรกฤษณ์ ผลงาม ที่คอยช่วยเหลือข้าพเจ้าเมื่อเกิดปัญหา และขอขอบคุณ คุณดวงเดือน อินปันบุตร สำหรับความช่วยเหลือ ความรัก และข้อคิดในการดำเนินชีวิต

ท้ายที่สุด ข้าพเจ้าขอขอบคุณ และยินดี กับตัวข้าพเจ้าเอง ที่สามารถปฏิบัติงานได้จนสำเร็จ รวมถึงอดทนต่อความลำบาก ความเครียดต่างๆ จนประสบความสำเร็จในสิ่งที่ทำอยู่ได้ ข้าพเจ้าหวังว่าเนื้อหาในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะเกิดประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ รวมถึงเกิดประโยชน์ต่อสังคมโลก อย่างที่ข้าพเจ้าคาดหวังให้เป็น

รัฐสิทธิ์ แซ่ลี

2564

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 จุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes.....	4
2.2 วิวัฒนาการและการจัดกลุ่ม (phylogeny and classification)	5
2.3 สิ่งมีชีวิตคล้ายราในสกุล <i>Pythium</i> sp.....	7
2.3.1 การจัดหมวดหมู่ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	7
2.3.2 การจัดหมวดหมู่ Oomycetes ทางอณูชีววิทยา โดยอ้างอิงจากตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ระหว่างยีน small-subunit ribosomal RNA และ large-subunit ribosomal RNA.....	10
2.4 ความหลากหลายของ <i>Pythium</i> sp.....	14
2.4.1 ความสามารถในการก่อโรคในสิ่งมีชีวิตของเชื้อ <i>Pythium</i> spp. และ จุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes.....	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 ความสามารถในการเป็นปรสิตของเชื้อ <i>Pythium</i> sp. และความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ.....	17
2.4.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรคนิโรคในระดับโมเลกุล และความสามารถของ elicitin และ elicitin-like protein ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน.....	21
2.4.4 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายผนังเซลล์พืชของเชื้อในคลาส Oomycetes.....	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
ตอนที่ 1 ศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน.....	31
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	31
3.2 การแยกเชื้อ.....	33
3.2.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน.....	33
3.2.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำ.....	34
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเบื้องต้น.....	34
3.4 การจัดจำแนกโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ.....	35
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	35
3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพภาพดีเอ็นเอด้วยการทำ gel-electrophoresis.....	36
3.4.3 การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	36
3.4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับปัจจัยทางแวดล้อม.....	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ตอนที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช.....	37
3.5 การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) หรือก่อโรคได้น้อย (hypo-virulence strain)	37
3.6 การทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ สาเหตุโรคพืช.....	38
3.6.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรค.....	38
3.6.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการงอก ของชิ้นส่วนขยายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค.....	39
3.7 ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทาน และการส่งเสริมการ เจริญเติบโตในพืช.....	39
3.7.1 การกระตุ้นความต้านทานด้วยเซลล์ที่มีชีวิต.....	39
3.7.2 การกระตุ้นความต้านทานด้วยชิ้นส่วนเซลล์ (cell fragments)	40
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	42
4.1 การศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในดินอาศัยที่แตกต่างกัน.....	42
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงในคลาส Oomycetes ที่แยกได้.....	42
4.1.2 การจัดจำแนก <i>Pythium</i> โดยเทคนิคทางอนุวิทยา.....	67
4.1.2.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด จันทบุรี.....	67
4.1.2.2 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด ระยอง.....	68
4.1.2.3 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด ตรัง.....	69
4.1.3 ความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ.....	76
4.1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>Pythium</i> และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม.....	83

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช.....	89
4.2.1 ความสามารถในการก่อโรคและ host range.....	89
4.2.2 การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค หรือก่อโรคไม่รุนแรง.....	99
4.2.3 การทดสอบความเป็นปฏิกิริยาของสายพันธุ์ NpP กับ HpP กับเชื้อสาเหตุโรค.....	101
4.2.4 ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทาน และการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของสายพันธุ์ NpP หรือ HpP แยกได้.....	109
4.2.4.1 การกระตุ้นความต้านทานด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture)	109
4.2.4.2 การกระตุ้นความต้านทานด้วยชิ้นส่วนเซลล์ (cell fragments)	114
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง.....	118
5.1 การศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน.....	118
5.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการจัดจำแนก.....	118
5.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่แยกได้กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม.....	119
5.2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช.....	120
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	123
เอกสารอ้างอิง.....	125
ภาคผนวก.....	135
ประวัติผู้เขียน.....	159

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สภาพแวดล้อมที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้.....	32
4.1	การเจริญเติบโตและโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงในคลาส Oomycetes ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด....	43
4.2	ผลการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ITS เทียบกับฐานข้อมูล.....	70
4.3	ความสามารถในการก่อโรคในผักสลัดกรีนโอ๊กของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด.....	90
4.4	ความสามารถในการก่อโรคในข้าวโพดของ <i>Pythium</i> และใกล้เคียงแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด.....	93
4.5	ความสามารถในการก่อโรคในต้นแตงกวาของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด.....	96
4.6	สรุปความรุนแรงในการก่อโรคของสายพันธุ์ที่แยกได้เพื่อคัดเลือก NpP หรือ HvP.....	99
4.7	ประสิทธิภาพของ non-pathogenic <i>Pythium</i> (NpP) หรือ hypo-virulence <i>Pythium</i> (HvP) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม...	101
4.8	ผลของ culture filtrate จาก non-pathogenic <i>Pythium</i> (NpP) หรือ hypo-virulence <i>Pythium</i> (HvP) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Pythium</i> สาเหตุโรคพืช.....	107
4.9	ผลของ culture filtrate จาก non-pathogenic <i>Pythium</i> (NpP) หรือ hypo-virulence <i>Pythium</i> (HvP) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Fusarium</i> สาเหตุโรคพืช.....	108
4.10	การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเน่าจากเชื้อ <i>Pythium</i> sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture) ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP.....	109

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ X อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.11 ผลการทดสอบความสามารถของเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture) ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP ในควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ <i>Fusarium</i> sp. ในต้นมะเขือเทศอายุ 2 สัปดาห์.....	112
4.12 การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP.....	114
4.13 การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ <i>Fusarium</i> sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP.....	116

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2.1	สายวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ใน superkingdom chromalveolate.....	5
2.2	วิวัฒนาการและการจัดกลุ่มของ Oomycetes.....	7
2.3	zoospore ใน filamentous sporangia.....	8
2.4	ลักษณะของ sporangia และเส้นใยของ <i>Pythium</i> sp.....	9
2.5	ลักษณะของ oogonia และ oospores ของ <i>Pythium</i> sp.....	9
2.6	primer ที่ได้จากตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ที่มักนิยมใช้ในการศึกษาในเชื้อราหลายชนิด.....	10
2.7	แผนภูมิสายวิวัฒนาการของ <i>Pythium</i> spp. ที่สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง ITS และตำแหน่ง 5.8S ของยีน rDNA.....	12
2.8	แผนภูมิสายวิวัฒนาการของ <i>Pythium</i> spp. ที่สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง D1 และตำแหน่ง D3 ของยีน Large subunit ribosomal ribonucleic acid (LSU rRNA)	13
2.9	ความคล้ายคลึงของลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตในคลาส Oomycetes กับ stramenopiles รวมถึงรูปแบบการดำรงชีพและแหล่งอาศัย.....	14
2.10	แสดงวงจรชีวิตของ <i>P. insidiosum</i> ในธรรมชาติ.....	15
2.11	zigzag model ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุและพืชอาศัย.....	22
2.12	แสดงความแตกต่างระหว่าง zigzag model (a) และ invasion model (b).....	23
2.13	แผนภูมิสายวิวัฒนาการของ elicitin และ elicitin-like protein.....	24
2.14	มันฝรั่งสายพันธุ์ Désirée ที่ทำการถ่ายยีนสร้าง ELR และปลูกเชื้อด้วย <i>Phytophthora sojae</i>	25
2.15	แสดงการเกิดความต้านทานในพืชโดย elicitin ของสิ่งมีชีวิตคล้ายราในกลุ่ม Oomycetes.....	26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.1	แสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ทำการเกษตร..... 31
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4 และ CHS-5 (<i>G. splendens</i>) 49
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-6, CHS-7 และ CHS-8 (<i>P. vexans</i>) 50
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-9 และ CHS-10 (<i>P. catenulatum</i>) 51
4.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-11 (<i>P. myriotylum</i>) 52
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-12 และ CHS-13 (<i>P. helicoides</i>) 53
4.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17 (<i>P. longipapillum</i>) 54
4.7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-1 และ RYS-3 (<i>G. splendens</i>) 55
4.8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-2 (<i>P. vexans</i>) 56
4.9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-4, RYS-5, RYS-6, RYS-7, RYS-18 และ RYS-19 (<i>P. acanthicum</i>) 57
4.10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-8 และ RYS-20 (<i>P. cucurbitacearum</i>) 58
4.11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-11 (<i>P. deliense</i>) 59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-14 และ RYS-16 (<i>P. diclinum</i>)	60
4.13	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-10 (<i>P. torulosum</i>)	60
4.14	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-9, RYS-12, RYS-13, RYS-15 และ RYS-17 (<i>P. helicoides</i>)	61
4.15	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9 (<i>G. splendens</i>)	62
4.16	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-2, TS-3, TS-10 และ TS-11 (<i>P. cucurbitacearum</i>)	63
4.17	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-4 (<i>P. acanthicum</i>).....	64
4.18	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-7 และ TS-8 (<i>P. vexans</i>)	65
4.19	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-12 และ TS-14 (<i>P. helicoides</i>)	66
4.20	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-13 และ TS-15 (<i>P. diclinum</i>)	67
4.21	แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดจันทบุรี.....	80
4.22	แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดระยอง.....	81
4.23	แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดตราด.....	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>G. splendens</i> RYS-1 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E).....	84
4.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>G. splendens</i> RYS-3 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	85
4.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>G. splendens</i> TS-1 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	85
4.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>P. acanthicum</i> RYS-7 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	86
4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>P. acanthicum</i> TS-4 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	86
4.29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>P. cucurbitacearum</i> TS-10 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	87
4.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>P. vexans</i> TS-8 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)..	87
4.31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>P. acanthicum</i> RYS-19 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E)	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.32 การกระจายตัวของเชื้อ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียงในจังหวัด จันทบุรี ระยอง และตราด.....	88
4.33 แสดงระดับการเป็นโรคของผักสลัด.....	92
4.34 การทดสอบโรคในต้นสลัดกรีนโอ๊ค (อายุ 3 วัน) ที่ได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน.....	92
4.35 การทดสอบโรคในต้นข้าวโพด (อายุ 7 วัน) หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน.....	95
4.36 การทดสอบโรคในต้นแตงกวา (อายุ 10 วัน) หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน.....	98
4.37 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ <i>Pythium</i> sp. (P) และ <i>Fusarium</i> sp. (F) สาเหตุโรคพืช (ซ้าย) กับสายพันธุ์ NpP หรือ HvP (ขวา).....	102
4.38 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อรวมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ <i>Pythium</i> sp. (P) และ <i>Fusarium</i> sp. (F) สาเหตุโรคพืช กับ NpP หรือ HvP สายพันธุ์ที่แยกได้.....	103
4.39 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อรวมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ <i>Pythium</i> สาเหตุโรคกับ <i>P. acanthicum</i> RYS-7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	104
4.40 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อรวมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ <i>Fusarium</i> สาเหตุโรคกับ <i>P. acanthicum</i> RYS-7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	105
4.41 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate จาก NpP หรือ HvP ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Pythium</i> สาเหตุโรคพืช.....	107
4.42 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate จาก NpP หรือ HvP ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อ <i>Fusarium</i> สาเหตุโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.43	การทดสอบการควบคุมโรคน้ำที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> ในต้นมะเขือเทศที่แช่ด้วย cell culture ของ NpP หรือ HvP ด้วยเทคนิค split-root	110
4.44	แสดงรากของต้นมะเขือเทศที่แช่ด้วย cell culture ของ NpP หรือ HvP เพื่อควบคุมเชื้อ <i>Pythium</i> สาเหตุโรคน้ำด้วยเทคนิค split-root	111
4.45	ตัวอย่างอาการต้นมะเขือเทศที่ทำการปลูกเชื้อ <i>Fusarium</i> sp.....	112
4.46	แสดงต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ cell culture ของ NpP หรือ HvP เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ <i>Fusarium</i> สาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค split-root	113
4.47	แสดงลำต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของ NpP หรือ HvP เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ <i>Pythium</i> สาเหตุโรค.....	115
4.48	แสดงลำต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของ NpP หรือ HvP ในการควบคุมเชื้อ <i>Fusarium</i> สาเหตุโรค.....	117

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถจัดจำแนกได้ตามหลักอนุกรมวิธาน (Taxonomy) เพื่อให้สามารถศึกษาและเข้าใจลำดับการวิวัฒนาการได้อย่างถูกต้อง โดยสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ โพรคาริโอต (Prokaryote) และยูคาริโอต (Eukaryote) ตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโพรคาริโอต ได้แก่ อาร์เคีย (Archaea) แบคทีเรีย (Bacteria) มายโคพลาสมา (Mycoplasma) ซึ่งอาร์เคียจะจัดให้อยู่ในโดเมน Archaea แบคทีเรียและมายโคพลาสมาจัดให้อยู่ในโดเมน Bacteria ที่ส่วนใหญ่จะมีความหลากหลายในการดำรงชีวิตและสามารถสร้างอาหารได้เอง (autotroph) (นงลักษณ์, 2552) ส่วนสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต ได้แก่ โปรโตซัว เชื้อรา สาหร่าย พืช และสัตว์ โดยจัดให้อยู่ในโดเมน Eukarya (Woese *et al.*, 1990) ซึ่งการศึกษาลำดับการวิวัฒนาการพบว่าโดเมน Eukarya มีวิวัฒนาการที่สูงกว่า สืบเกิดได้จากโครงสร้างและองค์ประกอบเซลล์ที่มีความซับซ้อน ตั้งแต่อดีตพบว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับโพรคาริโอตและสิ่งมีชีวิตบางกลุ่มในยูคาริโอตเป็นจำนวนมาก ทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ เช่น การเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) การเปลี่ยนสารประกอบต่าง ๆ ให้กลายเป็นแร่ธาตุ (mineralization) การเป็นตัวควบคุมสิ่งมีชีวิตอื่น (biocontrol agent) อันทำให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศ เป็นต้น ซึ่งจากความแตกต่างในระดับพันธุกรรมจึงทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นอกจากนี้สภาพแวดล้อมภายนอก ได้แก่ สภาพอากาศ แหล่งอาหาร ศัตรูตามธรรมชาติ หรือ host และความเปลี่ยนแปลงภายในสิ่งมีชีวิต เช่น ความผิดปกติของยีนและการกลายของโครโมโซมที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ มากกระตุ้น ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เช่นกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นสิ่งมีชีวิตในสกุลเดียวกัน หรือว่าสายพันธุ์เดียวกันก็ตาม

โดยทั่วไป การศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์นั้นมุ่งเป้าไปที่เชื้อแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส หรือ เชื้อรา เนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและมีความหลากหลายสูง ไม่ว่าจะเป็นวงการสาธารณสุข การศึกษาทางด้านสิ่งแวดล้อม หรือแม้กระทั่งการวิจัยอุตสาหกรรม เช่น การศึกษาราก *Trichoderma* spp. ในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งเชื่อดังกล่าวได้รับการศึกษามายาวนานตั้งแต่ก่อนปี 1930 (Howell, 2003) จนถึงปัจจุบัน และยังมีแนวโน้มที่จะถูกวิจัยเพิ่มเติมต่อไปอีก (Martinez-Medina *et al.*, 2017) หรือการศึกษาแบคทีเรียภายในรากพืชที่ส่งเสริมการเจริญของพืชและการสร้างขนราก (Verma *et al.*, 2017) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เป็นที่

น่าสนใจว่าสิ่งมีชีวิตคล้ายราในกลุ่ม Oomycetes นั้นยังมีการศึกษาไม่มากเท่าที่ควรทั้งที่มีความเป็นไปได้ว่าน่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรคและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากเช่นกัน

สิ่งมีชีวิตคล้ายราในกลุ่ม Oomycetes เป็น Eukaryote ที่ในอดีตจัดให้อยู่ในอาณาจักรรา (Fungi) แต่ในปัจจุบันการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและลำดับวิวัฒนาการ ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวถูกจัดแยกออกมาจากอาณาจักร Fungi และจัดให้อยู่ในอาณาจักร Chromista ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่วิวัฒนาการมาจากสาหร่าย และดำรงชีวิตอยู่ได้ในแทบทุกระบบนิเวศ สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั้งในดินและแหล่งน้ำ โดยมีหลายสายพันธุ์ที่อาศัยเศษซากพืชเป็นแหล่งอาหาร รวมไปถึงยังสามารถเป็นปรสิตที่ก่อโรคได้ทั้งคนและสัตว์ ตัวอย่างเช่นจุลินทรีย์บางชนิดในตระกูล Pythiaceae ที่สามารถเป็นได้ทั้ง necrotroph และ biotroph ตระกูล Peronosporaceae ที่เป็น hemibiotroph และ biotroph เป็นต้น จากความสามารถในการอยู่อาศัยในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นดินต่างชนิดหรือแหล่งน้ำในหลายรูปแบบ ทั้งทะเลสาบ น้ำกร่อย หรือแม้แต่ น้ำทะเล จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes มีความหลากหลายสูง เป็น Eukaryotes ที่สามารถแพร่กระจายในหลายๆ แหล่งอาศัยที่ประสบความสำเร็จในการดำรงชีพมากที่สุด (Thines, 2014) Oomycetes มีทั้งประโยชน์และโทษ ตัวอย่างที่สามารถก่อโรคในพืชและสัตว์ เช่น *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora infestans* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ *Pythium insidiosum* ที่ก่อให้เกิดโรคพืทิโอซิส (Pythiosis) ในสัตว์ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสายพันธุ์ที่รายงานว่า มีประโยชน์ เช่น *Pythium oligandrum* ที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์และเป็นปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Legandium* sp. ที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของแมลง *Pythium graminicola* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) (Deacon, 1979) รวมถึงการมีแนวโน้มเป็นแหล่งผลิตโมเลกุลสำคัญบางชนิดที่ใช้ในวงการแพทย์ เช่น β -glucan (Barsanti *et al.*, 2011) เป็นต้น จากคุณลักษณะดังกล่าว จึงทำให้มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาความเป็นประโยชน์ ความเป็นโทษ และความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อที่จะก่อให้เกิดแหล่งข้อมูลอ้างอิงใหม่ๆ อันจะเป็นประโยชน์ต่อวงการเกษตร สาธารณสุข และสิ่งแวดล้อมได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาความหลากหลายของ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงในกลุ่ม Oomycetes เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์หรืองานวิจัย

1.2.2 ศึกษาศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และแนวทางในการนำไปใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ได้ข้อมูลการกระจายตัวของ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงในกลุ่ม Oomycete
- 1.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและ พืชอาศัยเพื่อประโยชน์ทางการวิจัยในอนาคต
- 1.3.3 ค้นพบสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ หรือค้นพบแนวโน้มในการค้นหาเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงที่มีศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพชนิดใหม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

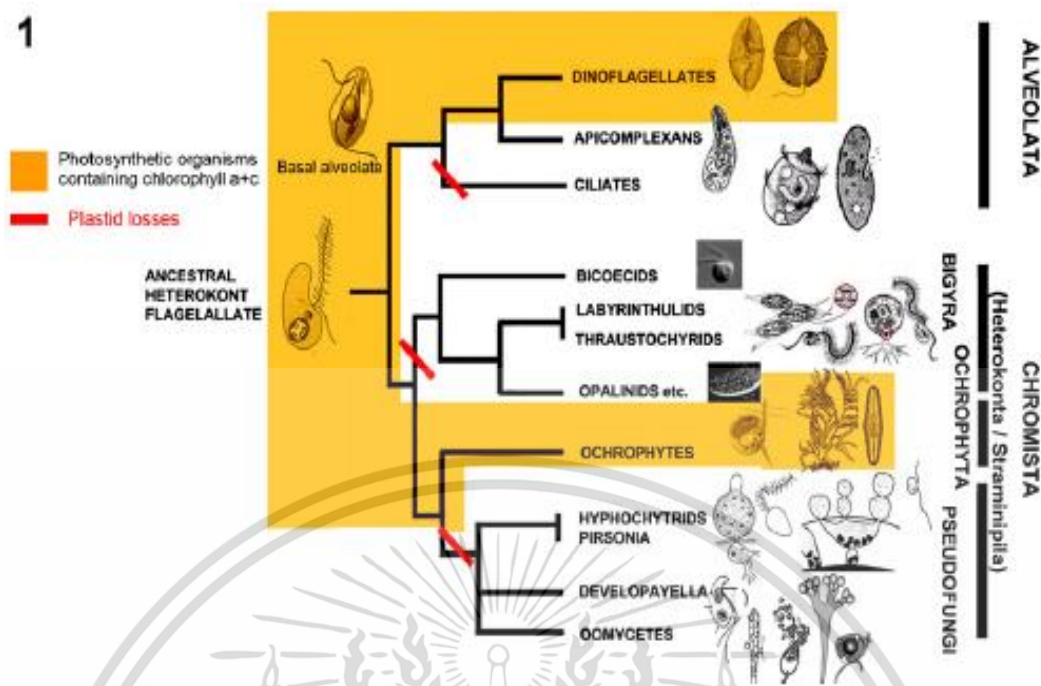
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes

จุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes นั้นเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดเป็น eukaryote โดยรายงานปัจจุบันจัดให้อยู่ในอาณาจักร Chromista แยกย่อยเป็น subphylum Oomycota และมีชื่อคลาสว่า Oomycetes (Schroeder *et al.*, 2013) ซึ่งเชื่อจุลินทรีย์ในคลาสดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราที่แท้จริง (true fungi) แต่มีความแตกต่างกันทางด้านขององค์ประกอบผนังเซลล์ โดย Oomycetes จะมีเซลลูโลสและกลูแคนเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่เชื้อราทั่วไปจะพบไคตินเป็นองค์ประกอบ (Bartnicki-Garcia, 1968; Thines, 2014) อีกทั้งยังไม่พบการมีผนังกันเส้นใย (coenocytic hyphae) Oomycetes นั้นถูกกล่าวถึงมามากกว่า 150 ปี โดยตลอดเวลาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางชีวเคมีอย่างต่อเนื่อง ทำให้สามารถทราบได้ว่าองค์ประกอบทางผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสาหร่าย นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตคล้ายราอย่าง *Achlya* และสาหร่ายสีน้ำตาล *Ochromonas* (Lévesque, 2011) โดยนอกจากองค์ประกอบทางชีวเคมีที่ใช้จัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ช่วยให้สามารถสันนิษฐานและระบุเชื้อดังกล่าวได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเฉพาะการมีแฟลกเจลลา (flagella) สองเส้นติดอยู่กับ zoospore แทนที่จะมีเพียงเส้นเดียว จึงทำให้สามารถกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes นั้นอยู่ใน subdomain Bikonta ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สร้างแฟลกเจลลามากกว่า 1 เส้น ทำให้มีส่วนคล้ายกับสิ่งมีชีวิตในอาณาจักร Straminipila (ภาพที่ 2.1) ซึ่งคล้ายกับพวกสาหร่ายทะเลมากกว่ากลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สร้างเส้นใย (filamentous microorganism) ในอาณาจักร Mycota (Thines, 2014; Beakes *et al.*, 2011)

Oomycetes สามารถเจริญได้ในแทบทุกระบบนิเวศ โดยสามารถอ้างอิงได้จากรายงานของ Thines (2014) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวโดยการรวบรวมข้อมูลจากงานวิจัยหลายชิ้น โดยสามารถพบได้ทั้งมหาสมุทร ป่าเขตร้อน พื้นที่เขตอบอุ่น พื้นที่กึ่งแห้งแล้ง หรือแม้แต่ทะเลทราย นอกจากนี้ยังสามารถที่จะทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารผ่านกระบวนการย่อยสลายและการใช้ประโยชน์จากวัตดูลินทรีย์ (Kamoun, 2003) รวมไปถึงยังสามารถที่จะอยู่ในพื้นที่ที่มีออกซิเจนต่ำ และสามารถใช้อาหารจากเศษซากของพืชโดยการเป็น saprotrophs อีกด้วย ตัวอย่างเช่นเชื้อที่อยู่ในวงศ์ Pythiaceae ที่สามารถก่อให้เกิดโรคและทำให้เกิดอาการเซลล์ตายในพืชได้ (necrotrophic pathogen)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 สายวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ใน superkingdom chromalveolate พวกที่สังเคราะห์แสงได้จะอยู่ในแถบสีส้ม ส่วนเซลล์ที่มีการวิวัฒนาการจนสูญเสีย plastid จะแสดงด้วยเส้นสีแดง

ที่มา Beakes *et al.* (2011)

2.2 วิวัฒนาการและการจัดกลุ่ม (phylogeny and classification)

Beakes *et al.* (2011) ได้รายงานไว้ว่า Oomycetes clades ที่เคยมีการศึกษามาก่อนว่ายังไม่ครอบคลุมสปีชีส์ทั้งหมด โดยสปีชีส์ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม *Peronosporomycetes* ที่มีบรรพบุรุษแบ่งได้เป็นสอง clade คือ Saprolegnialean และ Peronosporalean (Thines, 2014) (ภาพที่ 2.2) โดยอ้างอิงหลักการจำแนกได้ดังนี้ (Crous *et al.*, 2009)

2.2.1 Saprolegniomycetes

สิ่งมีชีวิตคล้ายราใน clade ใหญ่นี้ส่วนใหญ่มักจะเป็นปรสิตในสัตว์ รวมไปถึงยังสามารถดำรงชีวิตเป็น saprophyte ได้ ตัวอย่างเช่น *Saprolegnia parasitica*, *Verrucal vus*, *Pachymetra* และ *Aphanomyces* โดย *Aphanomyces* สามารถวิวัฒนาการและแบ่งไปได้อีก 3 กลุ่ม คือสามารถก่อโรคในสัตว์ ตัวอย่างเช่น *Aphanomyces astaci* ที่ทำให้เกิดโรคในล็อบสเตอร์น้ำจืด นอกจากนั้นยังสามารถเป็น saprophyte และอีกกลุ่มเป็นสาเหตุโรคพืช เช่น โรครากเน่าในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ที่เกิดจาก *Aphanomyces euteiches*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 Peronosporomycetes

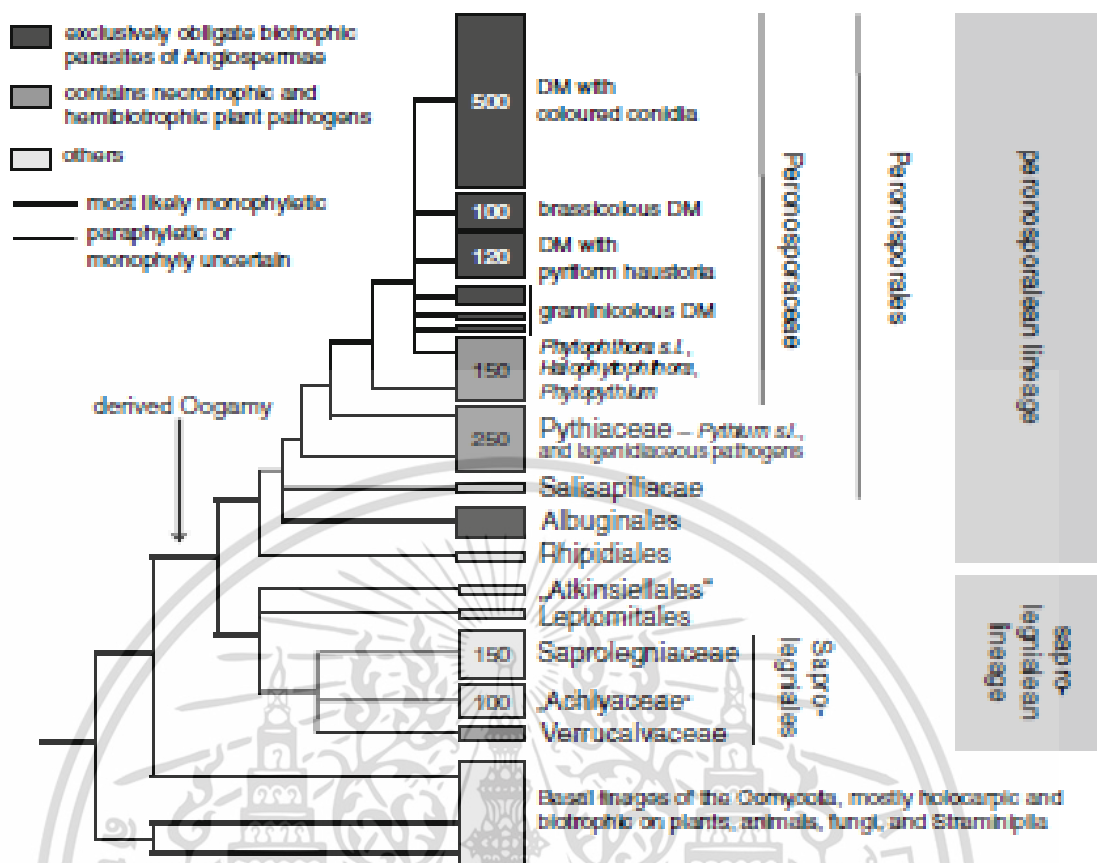
เป็น clade ที่มีจำนวนสปีชีส์ที่สามารถก่อโรคในพืชมากที่สุด ประกอบด้วย subclass Peronosporomycetidae, Albuginomyetidae และ Rhipidiomycetidae

2.2.2.1 Order Albuginales ในบางรายงานจัดให้อยู่ใน order เดียวกันกับ Peronosporales โดยเชื้อในลำดับนี้อาจจัดให้อยู่ในวงศ์ Albuginaceae ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Albugo* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคราสนิมขาว (white rust) ซึ่งจัดจำแนกโดยการสร้าง sporangiophore ที่ไม่แตกแขนง รวมไปถึงยังสร้าง sporangia ที่มีลักษณะเป็นสายโซ่ และจะมีการสร้างอวัยวะพิเศษที่เรียกว่า haustoria ที่จะช่วยให้สามารถแทงผ่านผนังเซลล์ของพืชและสร้าง sporangiophore รูปร่างคล้ายกระบองอยู่ภายใต้ชั้น epidermis ได้

2.2.2.2 Order Peronosporales จัดจำแนกโดยความสามารถในการสร้างเส้นใยที่แข็งแรงกว่าเชื้อในลำดับ Saprolaginales, Leganidales และ Leptomiales โดย sporangia ของเชื้อในลำดับนี้จะสร้างอยู่บนเส้นใย หรือสร้างบน sporangiophore

1) Pythiaceae สกุลที่สำคัญ คือ *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. (บางรายงานจัดให้ *Phytophthora* อยู่ใน peronosporaceae) ส่วนมากพบเป็นปรสิตในพืช (plant parasitic) รวมไปถึงอาศัยอยู่ในเศษซากพืช สำหรับเชื้อในสกุล *Pythium* sp. จะไม่มีการสร้าง zoospore ภายใน sporangia แต่จะสร้างภายในโครงสร้างพิเศษซึ่งเกิดจากแรงดันจากการเคลื่อนที่ของ protoplasm ภายใน sporangia ทำให้เกิดการโป่งพอง (vesicle) โดยจะมีการสร้าง zoospore อยู่ภายใน vesicle ดังกล่าว เมื่อ vesicle เกิดการแตกออก zoospore ก็จะเคลื่อนที่ออกไปภายนอก ซึ่ง sporangia จะมีทั้งแบบเจริญอยู่ระหว่างเส้นใย (intercalary sporangia) หรืออยู่ส่วนปลายของเส้นใย (terminal sporangia) ในขณะที่ *Phytophthora* sp. จะมีการสร้าง zoospore ภายใน sporangia และไม่มีการสร้าง vesicle โดย sporangia จะสร้างอยู่ที่ปลายของเส้นใยหรืออยู่บน sporangiophore ที่แตกแขนง รูปร่างของ sporangia จะเป็นแบบกลมไข่ (ovoid) หรือว่ารูปร่างคล้ายผลเลมอน (lemon-shaped) ซึ่งสามารถมีและไม่มี papillae (ช่องเปิดที่ปลาย sporangia) ก็ได้

2) Peronosporaceae สิ่งมีชีวิตคล้ายราในวงศ์นี้จะเป็นปรสิตพืชชั้นสูง เช่นเชื้อสาเหตุโรคน้ำค้าง (downy mildew) จำแนกได้โดยลักษณะของการแตกแขนงของ sporangiophore ความสามารถในการแทงผ่านเซลล์พืชอาศัย sporangia มีรูปร่างแบบทรงกลมหรือทรงรี (oval) สามารถแพร่กระจายไปตามแรงลม หรือสามารถสร้าง zoospore หรืองอก germ tube ได้โดยตรง ตัวอย่างสกุลของเชื้อในวงศ์นี้ได้แก่ *Plasmopara* sp. ในอองุ่น *Peronospora* sp. ในพืชตระกูลแตง *Bremia* sp. ในผักสลัด และ *Sclerospora* sp. ในพืชตระกูลหญ้า (Gramineae)



ภาพที่ 2.2 วิวัฒนาการและการจัดกลุ่มของ Oomycetes

ที่มา Thines *et al.*, 2014

2.3 สิ่งมีชีวิตคล้ายราในสกุล *Pythium* sp.

2.3.1 การจัดหมวดหมู่ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Pythium คือสกุลของสิ่งมีชีวิตคล้ายราที่อยู่ในคลาส Oomycetes หรือ Peronosporomycetes โดยที่สามารถเรียกได้ทั้ง 2 แบบ ขึ้นอยู่กับรูปแบบการจัดหมวดหมู่ที่ผู้วิจัยนั้นๆอ้างอิง (Schroeder, 2013) โดยสามารถจัดหมวดหมู่นุกรมวิธาน (taxonomy) ได้ดังนี้

Kingdom: Chromista

Phylum: Oomycota

Class: Oomycetes

Order: Pythiales

Family: Pythiaceae

Genus: *Pythium*

ที่มา Kirk (2008); Uzuhashi (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Pythium* sp. จะสร้าง zoospore ภายในโครงสร้างพิเศษซึ่งเกิดจากแรงดันจากการเคลื่อนที่ของ protoplasm ภายใน sporangia ทำให้เกิดการโป่งพอง (vesicle) (Schroeder *et al.*, 2012) (ภาพที่ 2.3) โดยเมื่อ vesicle เกิดการแตกออก zoospore ก็จะเคลื่อนที่ออกไปภายนอก ซึ่ง sporangia จะมีทั้งแบบเจริญอยู่ระหว่างเส้นใย (intercalary sporangia) หรืออยู่ส่วนปลายของเส้นใย (terminal sporangia) โดย Crous *et al.* (2009) ได้แบ่งชื่อดังกล่าวเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะของ sporangia ดังนี้ (ภาพที่ 2.4)

- 1.) Sporangia ที่มีรูปร่างคล้ายเส้นใยที่ไม่มีการพองบวม (non-inflated filamentous sporangia) ซึ่งเจริญมาจากเส้นใยปกติ (vegetative hypha) ตัวอย่างเช่น *Pythium dissotocum*
- 2.) Sporangia ที่มีรูปร่างคล้ายเส้นใยที่มีการพองบวม (inflated filamentous sporangia) ตัวอย่างเช่น *Pythium aphanidermatum* และ *Pythium torulosum*
- 3.) Sporangia ที่มีรูปร่างกลมแบบไม่แตกกิ่งก้าน (spherical, globose without proliferation) ตัวอย่างเช่น *Pythium ultimum* var. *sporangiiferum*
- 4.) Sporangia ที่มีรูปร่างกลมแบบแตกกิ่งก้านระหว่างเส้นใย ตัวอย่างเช่น *Pythium ostracodes*

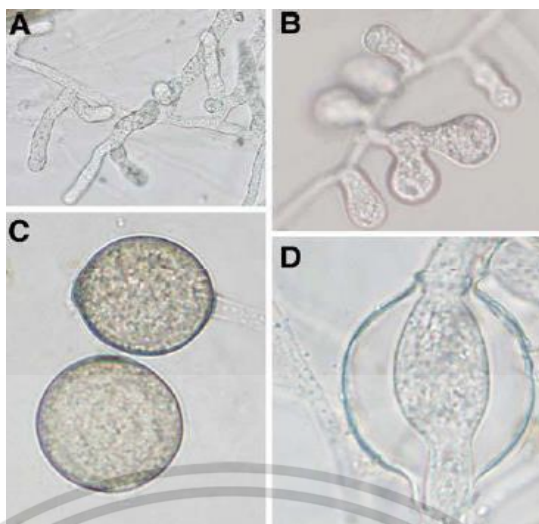


ภาพที่ 2.3 Zoospore ใน filamentous sporangia

ที่มา Schroeder *et al.* (2012)

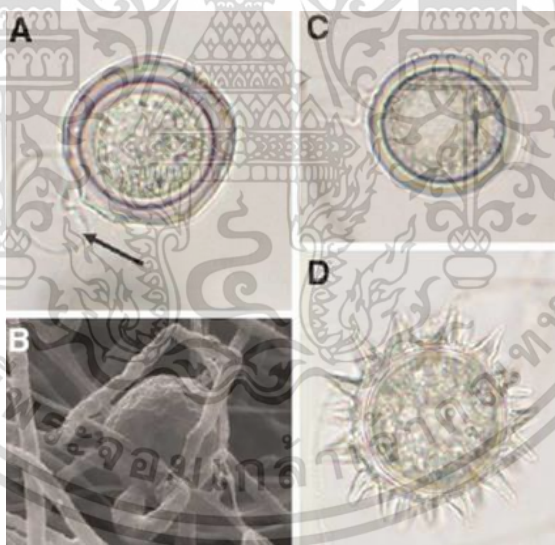
นอกจากโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ *Pythium* sp. จะสามารถสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ที่เรียกว่า oospore (Van der Plaats-Niter, 1981) ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) ผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) โดยปกติ oospore จะมี 2 ลักษณะหลัก คือ แบบผนังเรียบ (smooth-walled) และผนังแบบขรุขระ หรือมีรูปร่างเป็นหนาม (ornamented) (ภาพที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของ sporangia และเส้นใยของ *Pythium* sp. A: Filamentous sporangia; B: Inflated filamentous sporangia ของ *P. torulosum*; C: Hyphal swelling ของ *P. ultimum* and D: Internally proliferating sporangium of ของ *P. middletonii*

ที่มา Schroeder *et al.* (2012)



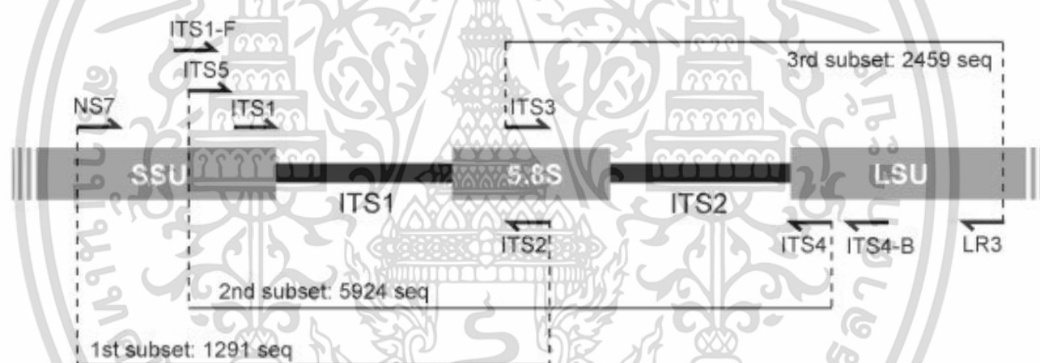
ภาพที่ 2.5 ลักษณะของ oogonia และ oospores ของ *Pythium* sp. A: aplerotic oosphere ใน oogonium ผนังเรียบ; B: oogonium และ antheridia ใต้กึ่งจุดทรานส์อเล็กตรอน; C: intercalary oogonium แบบผนังเรียบที่มี oosphere แบบ plerotic; D: oogonium แบบมีหนาม

ที่มา Schroeder *et al.* (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การจัดหมวดหมู่ Oomycetes ทางอนุชีววิทยา โดยอ้างอิงจากตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ระหว่างยีน small-subunit ribosomal RNA และ large-subunit ribosomal RNA

Internal transcribed spacer (ITS) เป็น spacer DNA หรือ DNA ส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัส ที่อยู่ระหว่างลำดับของยีน small-subunit ribosomal RNA กับ large-subunit ribosomal RNA เป็นตำแหน่งที่นิยมใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์ หรือใช้เป็น molecular marker สำหรับเชื้อราและ Oomycetes หลายชนิด (Schoch *et al.*, 2012) โดย rRNA ของยูคาริโอตนั้นประกอบไปด้วยยีน 18S, 5.8S, และ 28S rRNA ที่มักนิยมใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ ซึ่งตำแหน่งของ transcribed spacers รวมถึงตำแหน่งของยีน 5.8S จะถูกเรียกโดยรวมว่าตำแหน่ง ITS (ITS region) ตำแหน่งอื่นๆ เช่นยีน 18S nuclear ribosomal small subunit rRNA (SSU) และตำแหน่งบนยีน 28S nuclear ribosomal large subunit rRNA (LSU) เองนั้นก็มักจะถูกนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการเช่นกัน และมักจะถูกนำไปใช้ศึกษาร่วมกับตำแหน่ง ITS (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 Primer ที่ได้จาก Internal transcribed spacer (ITS) บนยีน Ribosomal RNA ที่ประกอบด้วย small-subunit ribosomal RNA (SSU) กับ large-subunit ribosomal RNA (LSU)

ที่มา: Bellemain *et al.* (2010)

ในปัจจุบัน ตำแหน่ง ITS มักจะถูกใช้เพื่อระบุสายพันธุ์ของ *Pythium* spp. ถึงแม้ว่าลำดับที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งชนิดดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันน้อย ทำให้อาจจะสามารถใช้ศึกษาสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แต่ไม่สามารถบ่งบอกความแปรผันภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific variation) ได้ แต่ก็ยังเป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีฐานข้อมูลขนาดใหญ่ที่เข้าถึงได้ง่าย (Schroeder *et al.*, 2013) โดยงานวิจัยชิ้นสำคัญ ที่เป็นรากฐานให้กับการจัดหมวดหมู่ในระดับวิวัฒนาการให้กับ *Pythium* กับสกุลใกล้เคียง ก็คืองานของ Lévesque and de Cock (2004) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของ *Pythium* หลายสปีชีส์ จนสามารถจัดแบ่งกลุ่มจนได้เป็น 11 เคลด (clade A-K) (ภาพที่ 2.7 และ 2.8) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลด A: เป็นเคลดของ *Pythium* ที่สร้าง sporangium แบบเส้นใยทั้งแบบพองและไม่พอง บวม มักพบได้ในแหล่งน้ำ เช่น *Pythium adhaerens*, *P. aphanidermatum*, *P. porphyrae* และ *Pythium deliense*

เคลด B: เป็นเคลดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด สามารถแบ่งแยกเคลดย่อย (subclade) ลงไปได้อีก คือ B1 (B1a -B1e) และ B2 ซึ่งก็คือการแบ่งเป็นกลุ่ม (cluster) บางกรณีก็เรียกว่าเป็น *Pythium vanterpoolii* กับ *Pythium appleroticum*-cluster แบ่งตามข้อมูลทางลำดับนิวคลีโอไทด์ และรูปร่างของ sporangium ที่เป็นเส้นใยแบบพอง และไม่พองบวม ตามลำดับ

เคลด C: *Pythium* ในเคลดนี้มีอยู่เพียง 2 สปีชีส์เท่านั้น คือ *Pythium grandisporangium* และ *Pythium insidiosum* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานและสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน นั่นคือมี sporangium แบบกลม (globose) กับแบบเส้นใย

เคลด D: สร้าง sporangium แบบพองบวมอยู่ชิดติดกัน (contiguous sporangium) จนคล้ายกับ hyphal swelling และลักษณะเฉพาะที่สำคัญคือการสร้าง oogonia แบบมีหนามแหลม (acute spine) ไม่ค่อยพบ antheridium หรืออาจสร้างติดแน่นไปกับ oogonium จนแทบจะเป็นชิ้นส่วนเดียวกัน (constricted) ส่วนใหญ่เป็นปรสิตในเชื้อราชนิดอื่น (mycoparasite)

เคลด E: แบ่งเป็น 2 เคลดย่อย คือ E1 (*Pythium rostratiformans*-clade) ที่มี sporangium แบบกลมที่แตกแขนง หรือมี hyphal swellings แบบกลม รวมถึง oogonium แบบผิวเรียบ และเคลดย่อย E2 (*Pythium segnitium*-clade) ที่สร้าง sporangium แบบทรงรี (ovoid) จนถึงแบบยาว (elongate) แบบไม่แตกแขนง ส่วนใหญ่แล้วจะสร้าง antheridium แบบเดี่ยวที่อยู่บนเส้นใยเดียวกันกับ oogonium (hypogynous antheridium)

เคลด F: เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *Pythium violae* (ชื่อใหม่ *Globisporangium violae*; Uzuhashi et al., 2010) และ *Pythium irregulare* เป็นต้น โดยจะสร้าง sporangium แบบกลมไม่แตกแขนง สปีชีส์ส่วนใหญ่จะไม่สร้าง zoospore ซึ่งสามารถพบได้ในบางครั้งเท่านั้น

เคลด G: สร้าง sporangium แบบรีที่แตกแขนงภายในเส้นใย และมี oogonia แบบผิวเรียบ ยกเว้น *Pythium paddicum* ที่สร้าง oospore แบบ ornamented ลักษณะอื่นจะขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์

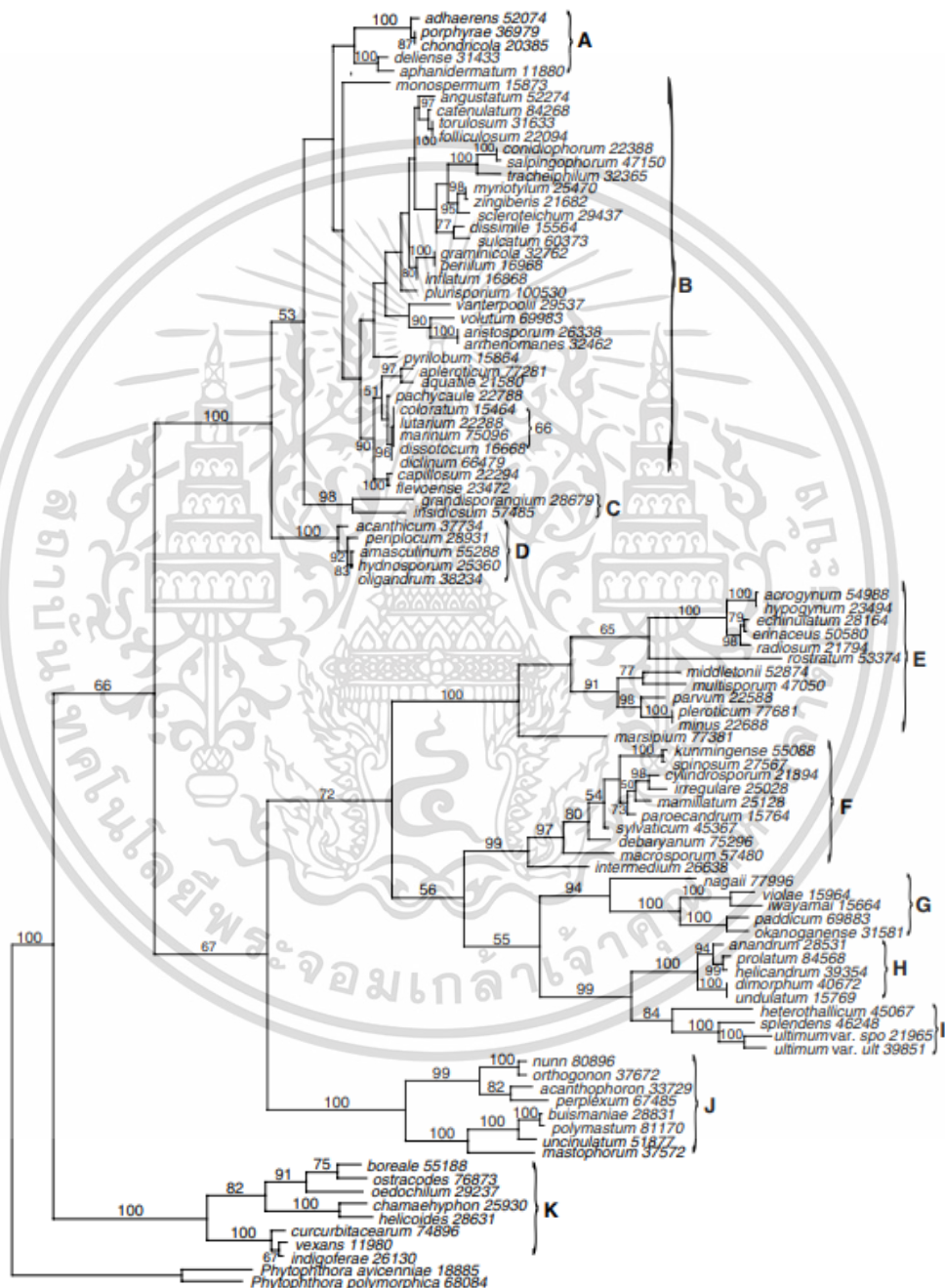
เคลด H: สร้าง sporangium ทรงรีจนถึงแบบยาวที่แตกแขนงภายในเส้นใย มีขนาดใหญ่ มาก รวมถึงยังสร้าง oogonium แบบ ornamented

เคลด I: ส่วนใหญ่ *Pythium* ในเคลดนี้จะไม่สร้าง zoospore และไม่มีลักษณะโครงสร้างที่เด่นชัด เช่น *Pythium splendens* และ *P. ultimum* (ภายหลังมีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Globisporangium*; Uzuhashi et al., 2010)

เคลด J: สร้าง sporangium ทรงกลมขนาดใหญ่ สร้าง oogonium แบบมีหนามทรงกรวย (conical spines) และมี oospore ที่มีผนังหนา แต่เคลดย่อยที่ประกอบด้วย *Pythium jasmonium*, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยระบบอัตโนมัติ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pythium unculatum และ *Pythium polymastrum* นั้นมีลักษณะที่แตกต่างจาก *Pythium* spp. สปีชีส์อื่นๆ

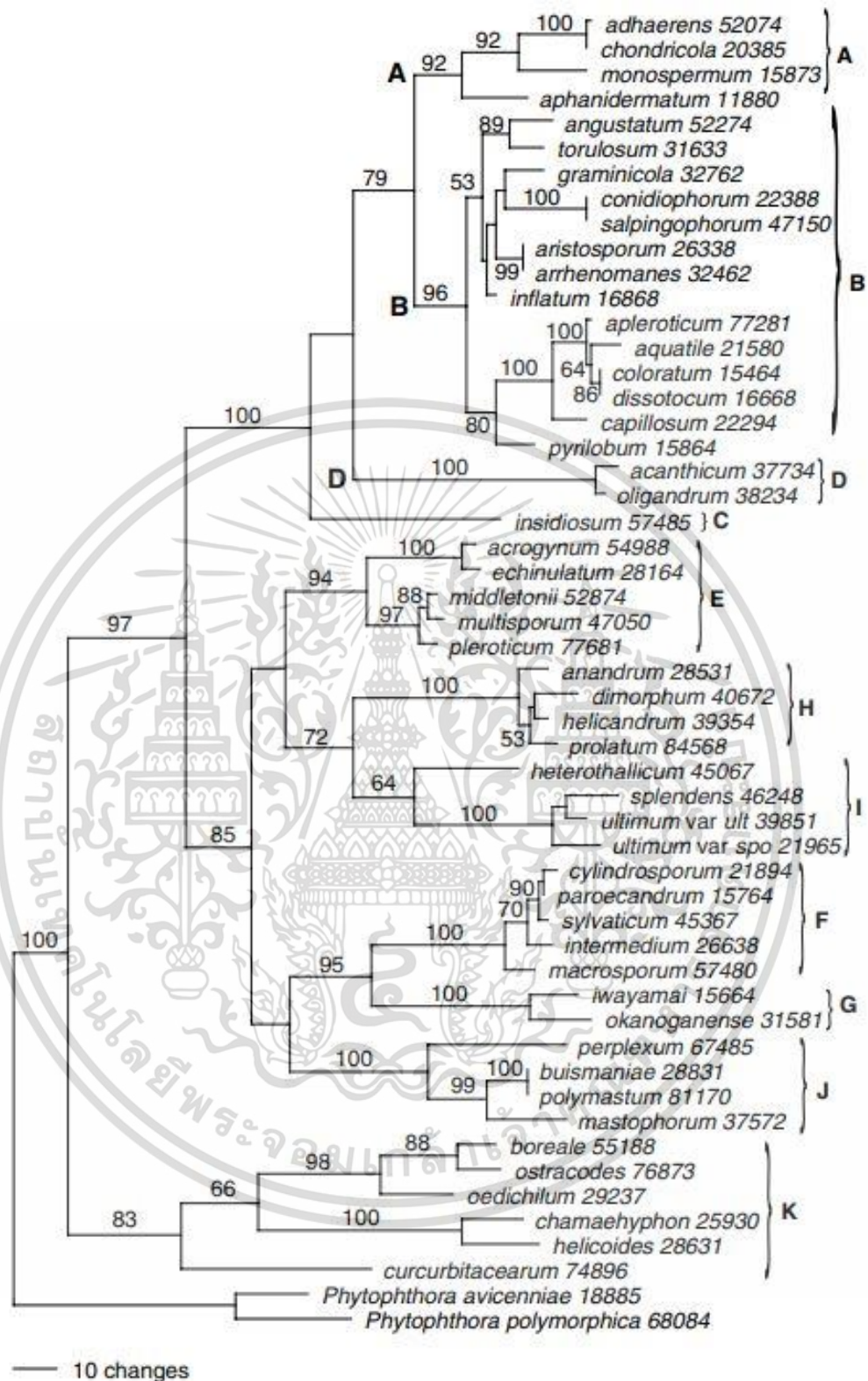
เคลด K: มีลักษณะร่วมระหว่างเชื้อ *Pythium* กับเชื้อ *Phytophthora* โดยสร้าง sporangium แบบทรงกลมจนถึงทรงรีแบบมีปากเปิด (papilla) และมักจะแตกแขนงภายในเส้นใย สร้าง oogonium ขนาดใหญ่ oospore มีผนังหนา มี antheridium รูปร่างยาวเกาะด้านข้าง oogonium



ภาพที่ 2.7 แผนภูมิสายวิวัฒนาการของ *Pythium* spp. ที่สร้างขึ้น โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง ITS และตำแหน่ง 5.8S ของยีน rDNA

ที่มา Lévesque and de Cock (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

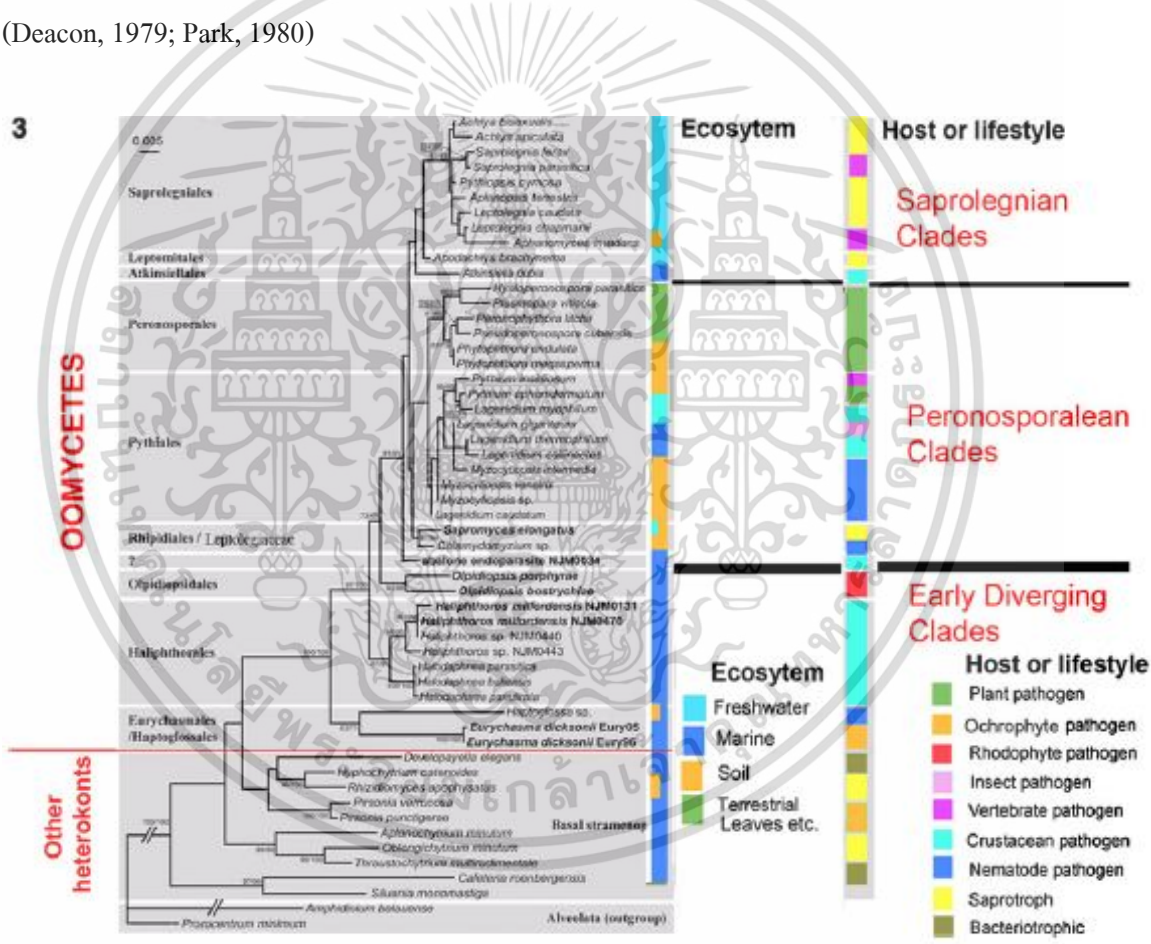


ภาพที่ 2.8 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของ *Pythium* spp. ที่สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง D1 และตำแหน่ง D3 ของยีน Large subunit ribosomal ribonucleic acid (LSU rRNA) โดยใช้หลักการ maximum parsimony

เอกสารนี้ เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ความหลากหลายทางถิ่นที่อยู่อาศัยของ *Pythium* sp.

Pythium sp. นั้นสามารถอยู่ได้ในระบบนิเวศที่หลากหลาย เช่น สามารถอาศัยอยู่ในดิน ไม่ว่าจะ เป็นดินป่า ทุ่งหญ้า หรือแม้แต่ดินที่ใช้ทำการเกษตร นอกจากนั้นยังพบว่าสามารถที่จะอาศัยอยู่ใน แหล่งน้ำจืด รวมไปถึงน้ำตกได้อีกด้วย (Beakes *et al.*, 2009) (ภาพที่ 2.9) ซึ่งจากความหลากหลาย ในแหล่งที่อยู่และความสามารถการอยู่รอดนี้เอง จึงทำให้สามารถพบได้ทั้งสายพันธุ์ที่มีความสามารถ ในการก่อโรคพืช (*P. aphanidermatum* และ *P. ultimum*) สายพันธุ์ที่ก่อโรคในสัตว์ (Phillips *et al.*, 2007) สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคในรูปแบบของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Paul *et al.*, 2003; Karaca *et al.*, 2008) และสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานในพืช (Takenaka *et al.*, 2006) รวมไปถึงยังสามารถที่จะสร้างเอนไซม์ย่อยเศษซากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม (Deacon, 1979; Park, 1980)



ภาพที่ 2.9 ความคล้ายคลึงของลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตในคลาส Oomycetes กับ stramenopiles รวมถึงรูปแบบการดำรงชีพและแหล่งอาศัย เกล็ดหลักจะเขียนอยู่ทางด้านขวาของภาพ แถบยาวที่มีหลายสีบ่งบอกถึงแหล่งกำเนิดและรูปแบบของการดำรงชีพ จะเห็นได้ว่า Oomycete วิวัฒนาการมาจากทะเล และส่วนใหญ่ก็เป็นปรสิตในสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มา Beakes *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 ความสามารถในการก่อโรคในสิ่งมีชีวิตของเชื้อ *Pythium* spp. และจุลินทรีย์ในคลาส

Oomycetes

Mendoza *et al.* (1993) รายงานว่า *P. insidiosum* สามารถก่อให้เกิดโรคพืทิโอสิสในมนุษย์และสัตว์ได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Pythium* สายพันธุ์อื่นๆ โดยผู้ป่วยจะมีอาการแผลอักเสบบนผิวหนังและก่อยขยายตัว บางครั้งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ โดยอาการโรคมักจะเกิดขึ้นในช่วงฤดูฝน สำหรับวิธีการทดลอง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อดังกล่าวโดยปลูกเชื้อใส่ใบพืชและชิ้นส่วนผิวหนังของม้าก่อนจะนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า zoospore ของเชื้อมีการตอบสนองต่อผิวหนังของม้าและเส้นผมของมนุษย์ ในขณะที่แทบจะไม่ตอบสนองต่อชิ้นส่วนพืชบางชนิด (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 แสดงวงจรชีวิตของ *P. insidiosum* ในธรรมชาติ เริ่มจากการที่อาศัยกับพืช (a) ทำการสร้าง sporangium (b-d) และปลดปล่อย zoospore (รูป e) zoospores จะเคลื่อนที่หาสิ่งเร้า ทำการค้นหาพืชอาศัยใหม่ ซึ่งถ้าหากมีมนุษย์และสัตว์เข้ามาเป็นส่วนหนึ่งในวงจร (ส่วนล่างสุดของรูปภาพ) zoospores จะถูกดึงดูดด้วยเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผล (รูป f) และจะทำการสลัดเปลือกเซลล์ทิ้งเพื่อเกาะติดกับเนื้อเยื่อโดยการสร้างสารเหนียวและพักตัว (รูป g) และทำการงอก (รูป h คือการงอกในมนุษย์ และรูป I คือการงอกในสัตว์) จนเกิดอาการพืทิโอสิส โดยในม้าจะพบการสร้างโครงสร้างบางอย่างที่เรียกว่า kunkers (รูป j)

ที่มา Mendoza *et al.* (1993)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phillips *et al.* (2007) กล่าวว่าจุลินทรีย์หลาย ๆ สายพันธุ์ในคลาส Oomycetes สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถก่อโรคได้ทั้งพืชและสัตว์ ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Aphanomyces astaci* ที่ก่อโรคในเครย์ฟิชน้ำจืด (*Astacus astacus*) หรือ *P. insidiosum* ที่ทำให้เกิดอาการแผลเน่าบนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสามารถพบได้ทั่วไปในดินและแหล่งน้ำทั่วโลก ชื่อของโรคนั้นถูกเรียกพิทิโอสิส (pythiosis) อันเป็นการแพร่เชื้อรังกบนผิวหนังของสัตว์หลายชนิดรวมไปถึงมนุษย์ โดยเมื่อสิ่งมีชีวิตติดเชื้อมักจะเกิดอาการอักเสบที่รักษาได้ยาก ถึงแม้ว่าโอกาสเกิดโรคในมนุษย์นั้นจะน้อย แต่ว่าเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อมักพบว่ามีอาการโรคที่รุนแรงมากเสมอ โดยในประเทศไทยพบผู้ป่วยเป็นโรคพิทิโอสิสมากกว่า 100 ราย

Adhikari *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักร Stramenopile และทำการเปรียบเทียบเพื่อสำรวจคุณสมบัติที่จะเชื่อมโยงไปถึงการดำรงชีวิตแบบเชื้อสาเหตุโรค เช่น การสร้าง effector และเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ใน *Phytophthora* sp. การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและการส่งสัญญาณใน *Pythium* sp. เป็นต้น โดยผู้วิจัยได้กล่าวเอาไว้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes นั้นสามารถก่อโรคได้ทั้งพืช สัตว์ แมลง สัตว์น้ำ สัตว์มีปล้อง แมลง สหราชอาณาจักรและจุลินทรีย์หลายชนิด โดยกลุ่มที่ก่อโรคในพืชนั้นสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชได้ เช่น การลดลงของผลผลิตธัญพืช โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากที่สุดคือ *Aphanomyces*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora* และ *Pythium*

Kamoun *et al.* (2016) ได้จัดทำรายงานเกี่ยวกับผลลงคะแนนของนักวิทยาศาสตร์จากสิบห้าประเทศเกี่ยวกับ Oomycetes สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชอันมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและวงการวิทยาศาสตร์จำนวนทั้งหมด 33 สายพันธุ์ พบว่ามี Oomycetes 10 สายพันธุ์ที่ได้รับคะแนนสูงสุดคือ

อันดับหนึ่ง	<i>Phytophthora infestans</i> ,
อันดับสอง	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> และ <i>Phytophthora ramorum</i>
อันดับสาม	<i>Phytophthora sojae</i>
อันดับสี่	<i>Phytophthora capsica</i>
อันดับห้า	<i>Plasmopara viticola</i>
อันดับหก	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
อันดับเจ็ด	<i>Phytophthora parasitica</i>
อันดับแปด	<i>Pythium ultimum</i> และ <i>Albugo candida</i>

โดยเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์นั้นถือว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่รุนแรงทั้งสิ้น ตัวอย่างเช่น *Ph. infestans* ที่ก่อให้เกิดโรคไหม้ในมันฝรั่ง (potato late blight) ซึ่งเคยทำให้ผู้คนในไอร์แลนด์ทวีปยุโรปกว่า 750,000 คนต้องประสบกับภาวะอดอยากและเกิดการย้ายถิ่นฐาน ถือเป็นหนึ่งใน

เหตุการณ์สำคัญที่เรียกว่าทุพภิกขภัยครั้งใหญ่ในไอร์แลนด์ (Irish Famine) (Zadoks, 2009) ซึ่ง

ไม่ทราบว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายครั้งใหญ่ในหน้าประวัติศาสตร์ที่เกิดจาก *Ph. infestans* นี้เองที่เป็นจุดกำเนิดให้เกิดการศึกษาทางโรคพืช โดยตัวอย่างเชื้ออื่นๆ ในคลาสนี้ คือ *P. ultimum* ที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่าในพืชอาศัยกว่า 300 ชนิด

2.4.2 ความสามารถในการเป็นปรสิตของเชื้อ *Pythium* sp. และความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ

การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Pythium* sp. นอกจากจะมีความสามารถในการก่อโรคแล้ว ยังมีรายงานศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมไปถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญและการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานอีกด้วย โดยรายชื่อของ *Pythium* ที่เป็นประโยชน์ที่เคยมีการศึกษามีดังนี้ *Pythium acanthicum* (Deacon *et al.*, 1978), *Pythium acanthophoron*, *Pythium bifurcatum* (Paul, 2003), *Pythium citrinum* (Paul, 2004), *Pythium lycopersicum* (Karaca *et al.*, 2008), *Pythium mycoparasiticum* (Jones and Deacon, 1994), *Pythium nunn* (Fang and Tsao, 1994), *Pythium oligandrum*, *Pythium paroecandrum* (Paul *et al.*, 2003), *Pythium periplocum* (Ali-Shtayeh, 1999) และ *Pythium radiosum* (Paul 1999) โดย *Pythium* บางชนิด จะมีศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพโดยกลไกหลายๆแบบ (Sayed *et al.*, 2021) เช่น *Pythium oligandrum* ที่มีความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคในดิน โดยมีกระบวนการหลักๆ คือ การแย่งครอบครองพื้นที่อาศัย ความสามารถทางด้าน mycoparasitism ที่จะพันธักเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรค รวมถึงหลั่งเอนไซม์ย่อยสลายเส้นใย เช่น glucanase, cellulase, chitinase และ protease การสร้างโปรตีน tryptophan คล้ายฮอร์โมน auxin และ Indole-3-acetaldehyde (auxin like tryptophan and indole acetaldehyde) ที่จะถูกปรับเปลี่ยนเป็น tryptamine (TNH2) เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช รวมถึงการหลั่งโปรตีน oligandrin และ elicitin-like protein เพื่อกระตุ้นความต้านทาน

Berry *et al.* (1993) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. oligandrum* และเชื้อราสาเหตุโรคในสกุล *Pythium* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ คือเชื้อ *P. ultimum*, *Pythium vexans*, *Pythium graminicola* และ *P. aphanidermatum* โดยการเลี้ยงด้วยเทคนิค slide culture และศึกษาปฏิสัมพันธ์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *P. oligandrum* พันธักเชื้อ *Pythium* ที่เป็น host และเจาะเข้าไปภายในเส้นใยภายในเวลา 50 นาทีหลังจากที่พันธัก โดยเชื้อที่มีความอ่อนแอต่อการถูกพันธักและได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายน้อยที่สุดคือเชื้อ *P. aphanidermatum* รองลงมาคือ *P. graminicola* ส่วนเชื้อที่อ่อนแอที่สุดคือ *P. vexans* และ *P. ultimum*

Fang and Tsao (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *P. nunn* สามารถดำรงชีพเป็นปรสิตในเส้นใย sporangia chlamydospore และ โครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *Phytophthora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cinnamomi, *Phytophthora citrophthora* และ *Ph. parasitica* รวมไปถึงยังสามารถยับยั้งการเจริญได้ โดยเมื่อทำการทดสอบเพื่อตรวจดูความหนาแน่นของเชื้อสาเหตุและเชื้อปฏิปักษ์ในกระถางทรายผสมกับพีทมอส พบว่าเมื่อทำการเติมอินทรีวัตถุ (ข้าวโอ้ตบด 1%) ลงไปในทรายผสมดังกล่าว เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมีปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของเชื้อ *Ph. parasitica* ไอโซเลต T593 จะมีความสัมพันธ์ทางจำนวนกับเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเติมอินทรีวัตถุ แต่จะลดลงเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *P. nunn* ยกเว้นในเชื้อ *Ph. parasitica* ไอโซเลต T131 ที่ไม่มีการลดปริมาณลง ทว่าเมื่อทดสอบความสามารถของ *P. nunn* ในการควบคุมโรครากเน่าในดอกกุหลาบพันปี และต้นส้ม พบว่าเชื้อ *P. nunn* ที่มีความเข้มข้นของชิ้นส่วนขยายพันธุ์ 1000 ชิ้นต่อดินหนึ่งกรัมสามารถที่จะยับยั้งอาการเน่าของต้นส้มได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพเมื่อทดสอบกับดอกกุหลาบพันปี นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญของต้นอ่อนลดลงอีกด้วย

Jones and Deacon (1994) ได้ศึกษาความสามารถของเชื้อ *P. acanthophoron* และ *P. oligandrum* โดยพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถพันรัด แทะผ่าน และย่อยสลายเส้นใยของเชื้อ *Fusarium oxysporum* ได้ โดย *P. acanthophoron* สามารถเจริญทับเส้นใยของเชื้อราอื่นที่เจริญอยู่ก่อนหน้าบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งให้ผลคล้ายกับ *P. oligandrum* และ *P. mycoparasiticum* แต่แตกต่างกันตรงที่สามารถเจริญได้ไม่เท่ากันบน slide culture ซึ่งเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลว พบว่าเชื้อทั้งสามชนิดมีความทนทานต่อโซเดียมคลอไรด์น้อยกว่า *Pythium* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค นั่นก็คือ *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* และ *P. graminicola* อย่างไรก็ตาม จากความสามารถในการเป็นปรสิตในเชื้อรา เชื้อ *P. acanthophoron* จึงเป็นอีกหนึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มว่าจะมีประโยชน์ในแง่ของการเป็นเชื้อปฏิปักษ์

Ali-Shtayeh *et al.* (1999) ศึกษาความสามารถในการเป็นปรสิตในเชื้อราของ *P. acanthicum*, *P. oligandrum* และ *P. periplocum* ซึ่งเชื่อดังกล่าวแสดงคุณลักษณะในการเป็นปฏิปักษ์เชื้อ *Pythium* อื่นหลายสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น *P. ultimum* ที่จะอ่อนแอต่อ *P. periplocum* มากที่สุด และจากการทดสอบการส่งเสริมการเจริญ รวมไปถึงการยับยั้งเชื้อสาเหตุเมื่อทำการปลูกเชื้อลงในแฉกควา พบว่า *P. oligandrum* และ *P. periplocum* สามารถเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์ และช่วยป้องกันต้นอ่อนจากอาการโคนกล้าเน่า

Benhamou *et al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. oligandrum* กับเชื้อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายราในคลาส oomycete ที่เป็นสาเหตุโรคพืชในดิน ได้แก่ เชื้อ *P. ultimum*, *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum*, *Verticillium albo-atrum*, *Rhizoctonia solani* และ *Phytophthora megasperma* ด้วยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อดูความสามารถในการเป็นปรสิตของ *P. oligandrum* กับเชื้อกลุ่มดังกล่าว โดยพบว่า *P. oligandrum* มีปฏิสัมพันธ์แบบปฏิปักษ์กับจุลินทรีย์ทุกชนิด ยกเว้น *Ph. megasperma* โดยจะเกิดการย่อยสลายของผนังเซลล์ในเชื้อ *P. ultimum* นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายของ protoplasm ในเชื้อ *F. oxysporum* ซึ่งคล้ายคลึงกับเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นต้นการวิจัย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. solani ที่ผนังเซลล์ของเชื้อที่ประกอบด้วยไคตินนั้นเกิดความเสียหาย สำหรับกรณีของ *Ph. megasperma* ถึงแม้จะไม่พบการสัมผัสกันของเส้นใย แต่พบว่าเส้นใยของเชื้อสาเหตุนั้นได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง สาเหตุอาจเป็นเพราะ hydrolytic enzyme ที่ *P. oligandrum* สร้างขึ้น

Paul (1999) ใช้เชื้อ *Pythium radiosum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราสีเทาในองุ่น โดยเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถที่จะเจริญเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อสาเหตุและทำความเสียหายต่อ protoplasm และเมื่อทำการทดสอบปลูกเชื้อบนใบองุ่น (detach leaves) พบว่าอาการโรคจากเชื้อ *B. cinerea* บนใบที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *P. radiosum* มีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในปี 2003 และ 2004 (Paul, 2003; Paul, 2004) ยังมีการค้นพบเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pythium sp.* ที่มีชื่อว่า *P. citrinum* จากสวนองุ่นในเขตเบอร์กันดีและสามารถแยก *P. paroecandrum* ไอโซเลท B-30 จากตัวอย่างดินที่ปลูกข้าวสาลีในประเทศฝรั่งเศส โดยได้ทำการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Botrytis cinerea* ด้วยเทคนิคเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ หรือ slide culture พบว่ามีความเสียหายของเส้นใยเชื้อสาเหตุเมื่อนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจากการทดสอบปลูกเชื้อบนใบพืช พบว่าอาการแผลเน่าบนใบที่ทำการปลูกเชื้อ *P. citrinum* ร่วมกับนั้นมีขนาดเล็กกว่าใบที่ปลูกเชื้อด้วย *B. cinerea* เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ เมื่อทำการตรวจสอบและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อด้วยวิธีการทางโมเลกุล พบว่า *P. citrinum* มีลำดับที่แตกต่างจากเชื้อในวงศ์ Pythiaceae สกุลอื่นๆ แต่มีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *P. montanum* ซึ่งมีการสร้าง sporangia แบบทรงกลม (spherical) กลมรี และลักษณะคล้ายผลมะนาว (lemoniform) และในการใช้เชื้อ *P. paroecandrum* ไอโซเลท B-30 ก็ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน จากผลการทดลองดังกล่าวจึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราปฏิปักษ์ในสกุล *Pythium spp.* ทั้งสามชนิดนั้นไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช ซึ่งสามารถนำมาค้นคว้าเพิ่มเติมและวิจัยร่วมกับพืชชนิดอื่นได้

Karaca *et al.* (2008) ได้แยกเชื้อ *P. lycopersicum* ซึ่งเป็นเชื้อในสกุล *Pythium* สายพันธุ์ใหม่และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมไปถึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเชื่อกันว่าได้จากตัวอย่างดินจากเขตอิสปาร์ตาของตุรกี จากการศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์จึงพบว่าเชื้อ *P. lycopersicum* มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. oligandrum* ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการเป็นปรสิตในเชื้อราสาเหตุโรค *Botrytis cinerea* พบว่าสามารถที่จะยับยั้งและสร้างความเสียหายให้กับเชื้อสาเหตุได้

Rey *et al.* (2009) ได้รายงานว่าการใช้เชื้อ *P. oligandrum* มีความสามารถในการแทงผ่านเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณรากได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ผู้วิจัยจึงใช้เชื้อ *P. oligandrum*, *F. oxysporum* และ *Trichoderma harzianum* ร่วมกันในการควบคุมโรคราสีเทาที่เกิดจาก *B. cinerea* ในต้นมะเขือเทศ โดยผู้วิจัยได้พบความแตกต่างระหว่าง

การทดลองในห้องปฏิบัติการและในแปลงทดลอง ซึ่งจากการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการเพื่อ

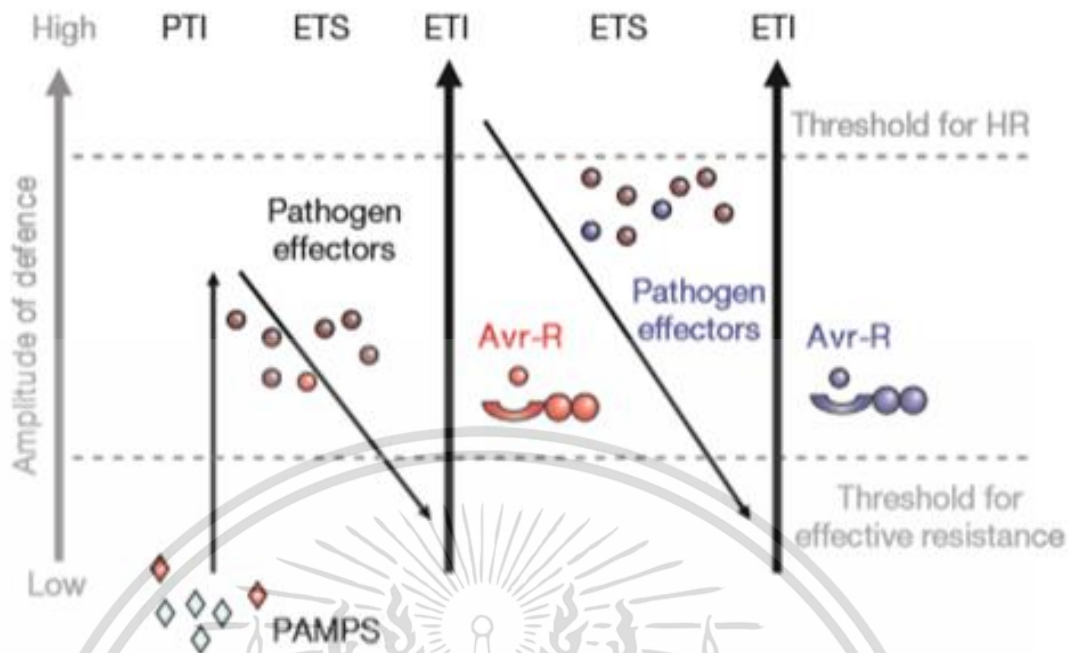
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นเป็นชอบระเบียนดำเนินการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้งสามสกุลนั้น พบว่าเชื้อ *T. harzianum* และ *F. oxysporum* ทำให้ไซโตพลาสซึมของเชื้อ *P. oligandrum* เกิดความเสียหาย ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบในแปลงทดลองเพื่อศึกษาความสามารถในการอาศัยกับรากพืช (root colonization) พบว่าเมื่อเซลล์ของ *P. oligandrum* อยู่ห่างจากเซลล์ของ *F. oxysporum* ในระยะที่เหมาะสม หรือประมาณ 4 ไมโครเมตร เชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวจะไม่เกิดความเสียหายใดๆ ในขณะที่จะได้ได้รับความเสียหายเมื่อทำการเลี้ยงร่วมกับ *T. harzianum* และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ร่วมกันในบริเวณเขตราก พบว่าเชื้อ *T. harzianum*, *F. oxysporum* และ *P. oligandrum* สามารถครอบครองพื้นที่บริเวณส่วนรากได้มากกว่า 82%, 77% และ 50% ตามลำดับโดยหลังจากทำการตรวจความรุนแรงของโรคราสีเทา พบว่าทริตเมนต์ที่ใช้เชื้อ *P. oligandrum* ร่วมกับ *T. harzianum* นั้นมีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับทุกทริตเมนต์ อย่างไรก็ตาม พบว่าผลการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทุกชนิดนั้นทำให้อาการโรคลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว และมีการแสดงออกของ pathogenesis-related proteins (PR-proteins) ที่ใกล้เคียงกันทุกทริตเมนต์ หรือกล่าวได้ว่าพืชเกิดกระบวนการต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ (systemic plant resistance) แม้ว่าจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดจะไม่ส่งเสริมความสามารถกันและกันก็ตาม

Vallance *et al.* (2009) ได้ศึกษาประชากรของเชื้อราและจุลินทรีย์ในคลาส Oomycetes หลังจากที่ทำกรใส่ *P. oligandrum* สามสายพันธุ์ลงไปบริเวณเขตรากของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์ของเชื้อ *P. oligandrum* ถูกคัดเลือกรากความสามารถในการสร้าง oospore ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นเพื่อการอยู่รอด การสร้าง tryptamine ที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมน auxin และการสร้าง oligandrin (glycoprotein elicitor) ผู้ทดลองได้ทำการใช้เทคนิคนับจำนวนโดยตรง (direct count) และ Real-time PCR ในการนับจำนวนจุลินทรีย์ รวมถึงยังได้วิเคราะห์ population dynamics ด้วยการใช้ Inter simple sequence repeats (ISSR) และการวิเคราะห์ Single-strand conformation polymorphism (SSCP) โดยพบว่าสายพันธุ์ที่มีมากที่สุดคือสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง oospores ได้น้อยที่สุด และได้สังเกตว่าประชากรเชื้อราในบริเวณนั้นมีการเพิ่มขึ้นตลอดเวลา โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างใดๆ ของนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ ยกเว้นเชื้อราในคลาส Oomycetes ที่เป็นสาเหตุโรครอง (minor pathogen) ที่มีชื่อว่า *Pythium dissotocum*

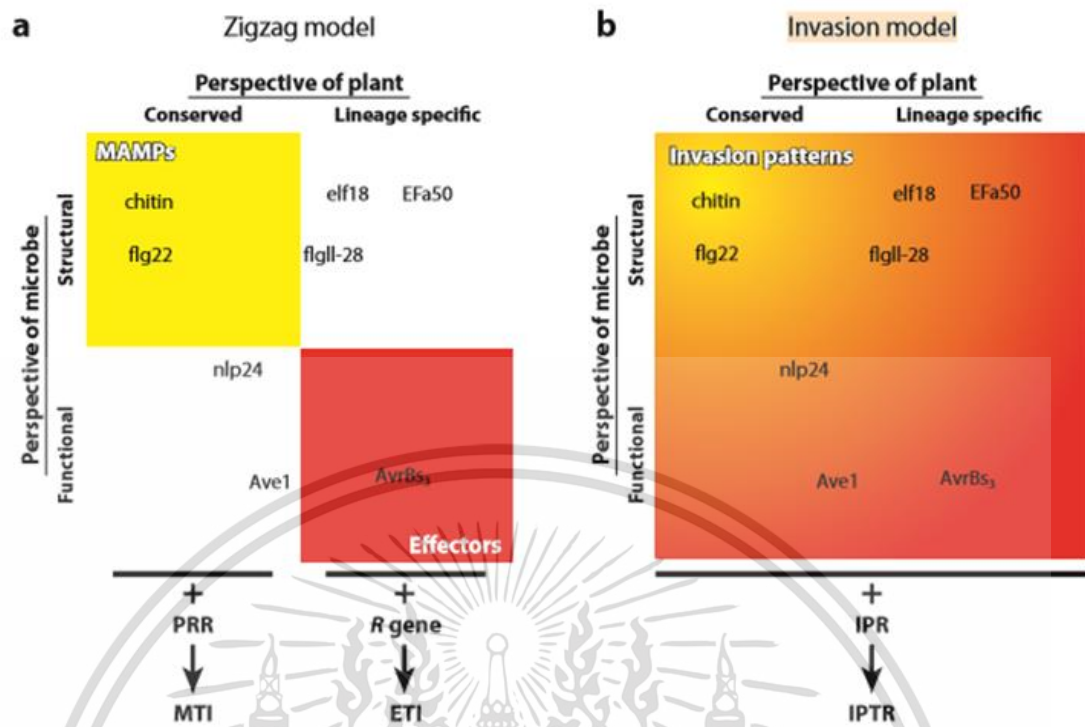
2.4.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรคในระดับโมเลกุล และความสามารถของ elicitin และ elicitin-like protein ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน

กลไกป้องกันตนเองในรูปแบบใดก็ตาม จำเป็นต้องมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของเชื้อสาเหตุและพืชอาศัยก่อนจึงจะแสดงผลการต้านทานออกมาในรูปแบบต่างๆ โดยพืชนั้นมีระบบป้องกันตัวเองแตกต่างจากสัตว์ นั่นคือไม่มี antigen-antibody interaction จึงจำเป็นต้องพึ่งพาการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ด้วยสารชีวโมเลกุล โดยพืชจะมีโปรตีนสำคัญ คือ transmembrane pattern recognition receptor (PRRs) หรือ โปรตีนตัวรับ (receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ช่วยในการจดจำโมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรคหรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ MAMPs (microbe associated molecular patterns) เป็นโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบส่วนใดส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ที่อาจเป็นทั้งสาเหตุและไม่ใช่อสาเหตุโรค) PAMPs (pathogen associated molecular patterns โมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อสาเหตุโรค) หรือ DAMPs (damage-associated molecular patterns) ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวสามารถเป็นได้ทั้งองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ไคติน เซลลูโลส หรือโปรตีนต่างๆ ที่พืชจะจดจำในฐานะโมเลกุลแปลกปลอม (non-self-molecules) (Jones and Dangl, 2006) เราสามารถเรียกปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนตัวรับกับ โมเลกุลอื่นที่มีความจำเพาะต่อกันว่า receptor-ligand interaction สำหรับในบางกรณี เชื้อสาเหตุเองก็สามารถพัฒนากลไกในการก่อโรคมมากขึ้น ด้วยการเปลี่ยนแปลงโปรตีนก่อโรค สร้าง effector หรือหลอกกล่อไม่ให้พืชสามารถจดจำ (recognize) โมเลกุลของเชื้อได้ และพืชเองก็สามารถพัฒนาตนเองเพื่อตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุได้เช่นกัน โดยปัจจุบันก็มีหลายรายงานที่พยายามจะขยายความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุและพืชอาศัยให้ชัดเจน จึงนำไปสู่การสร้างโมเดลเชิงแนวคิด (conceptual model) แบบต่างๆ ที่อ้างอิงมาจากแนวคิดที่ว่าความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุ นั้น อยู่ในรูปแบบของการวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolutionary) เช่น zig-zag model (Jones and Dangl, 2006; ภาพที่ 2.11), invasion model (Cook *et al.*, 2015; ภาพที่ 2.12) หรือ guard and decoy model (Van der Hoorn and Kamoun, 2008) เป็นต้น



ภาพที่ 2.11 zigzag model ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุและพืชอาศัย เริ่มจากที่โมเลกุลของเชื้อถูกจดจำได้โดยโปรตีน PRR ของพืช ทำให้เกิดความต้านทาน (PAMP-triggered immunity (PTI) หรือ MAMP-triggered immunity (MTI) และเชื้ออาจพัฒนาตัวเองสร้างโปรตีน effector (สีแดง) ทำให้ไม่เกิด PTI (เกิด effector-triggered susceptibility (ETS) โดยหากพืชสามารถปรับตัวและวิวัฒนาการจนสามารถจดจำโปรตีน effector พืชก็สามารถเกิดความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย effector (effector-triggered immunity (ETI) และทั้งพืชหรือเชื้อก็มีโอกาสที่จะพัฒนาตนเองเพื่อให้เกิดความต้านทาน (ETI) หรือความอ่อนแอ (ETS) ขึ้นอีกครั้ง

ที่มา Jones and Dangl, (2006)



ภาพที่ 2.12 แสดงความแตกต่างระหว่าง zigzag model (a) และ invasion model (b) จะเห็นได้ว่า zigzag model จะจำแนกโมเลกุลต่างๆ เป็นกลุ่มตามคุณสมบัติ และมี receptor คือ pattern recognition receptors (PRRs) ที่นำไปสู่การตอบสนองให้เกิดต้านทานแบบ MTI หรือ ETI ในขณะที่ invasion model จะแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลต่างๆ ไม่ได้ถูกแบ่งแยกหรือจำแนกเป็นกลุ่มประเภทเหมือน zigzag model เพื่อลดความสับสน โดยจะเรียกโมเลกุลที่มีปฏิสัมพันธ์กับ receptor ว่า invasion pattern เรียก receptor ทั้งหมดว่า IP receptors (IPRs) และนำไปสู่การตอบสนองแบบ IP-triggered response (IPTRs)

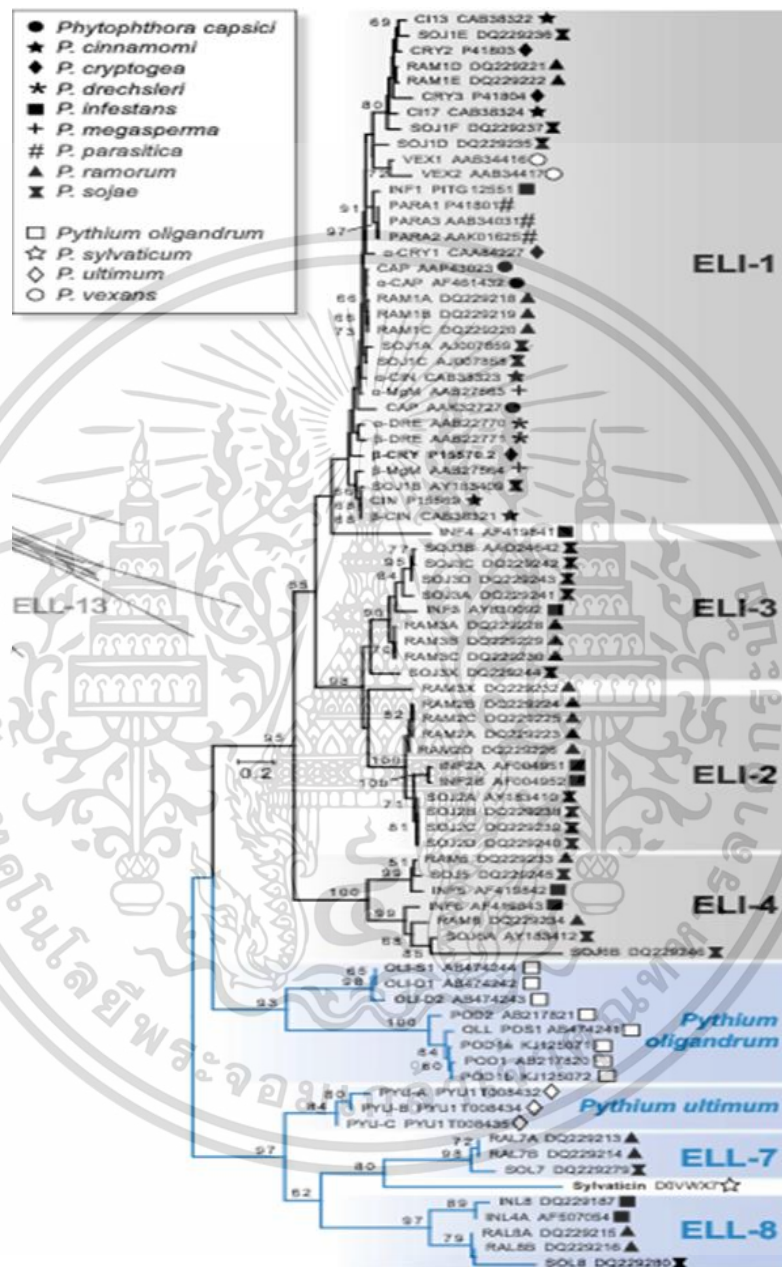
ที่มา Cook *et al.*, (2015)

สำหรับการศึกษาสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oomycetes ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านโรคพืช Derevnina *et al.* (2016) ได้รายงานไว้ว่าเส้นใยของ *P. oligandrum* สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคบางชนิดได้ เช่น *Fusarium* sp. เป็นต้น นอกจากนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวยังสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานแบบ ETI ได้ด้วยโปรตีน 2 รูปแบบ นั่นคือ elicitin (ELIs) และ elicitin-like protein (ELLs) ที่ประกอบด้วยหลายคลาสย่อย (ภาพที่ 2.13)

elicitin (ELIs) หรือ elicitin-like protein (ELLs) คือ MAMPs (Microbe-associated molecular pattern) (Derevnina *et al.*, 2016) ชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes สร้าง มีลักษณะโครงสร้างที่มีการอนุรักษ์ ไม่มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกับโปรตีนพืช ตัวพืชจดจำในฐานะโมเลกุลแปลกปลอมด้วย receptor ที่เรียกว่า pattern recognition receptor (PRR) และยื่นสังเคราะห์โมเลกุลดังกล่าวมีการแสดงออกในระหว่างที่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ โดยทั้ง ELIs และ ELLs จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ELIs ประกอบด้วยโดเมนของกรดอะมิโน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

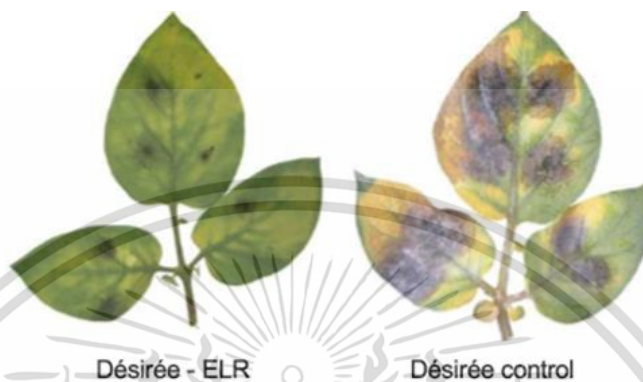
98 ชนิดที่มีตำแหน่งอนุรักษ์เป็น cysteine 6 โมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ส่วน ELLs จะมีลักษณะที่คล้ายกัน ซึ่งตัวโปรตีนนั้นมีความสามารถในการจับกับสเตอรอลและไขมันอันเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญและสร้างสปอร์



ภาพที่ 2.13 แผนภูมิตายวิวัฒนาการของ elicitin และ elicitin-like protein ที่มา Derevnina et al. (2016)

พืชแต่ละสายพันธุ์จะมีการตอบสนองต่อ elicitin แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพื้นฐานทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม มีรายงานอ้างอิงถึง receptor-like protein (RLP) ที่สำคัญชนิดหนึ่งเรียกว่า elicitin response (ELR) ที่ช่วยให้พืชจดจำ elicitin ได้ โดยเมื่อพืชจดจำโมเลกุลดังกล่าวได้ก็จะเกิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการเพื่อให้นักวิจัยได้รู้ถึงข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องนี้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความต้านทาน (elicit response) ถึงแม้ elicitor แต่ละชนิดจะมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันมาก ก็ยังสามารถถูกจดจำได้จากโคเมนอนุกรม ทำให้สันนิษฐานได้ว่าการถ่ายยีนสร้าง ELR ใส่พืชชนิดอื่นๆอาจทำให้พืชชนิดนั้นๆ ต้านทานโรคจาก Oomycetes ได้กว้าง (broad-spectrum resistance) (ภาพที่ 2.15) โดยนอกจาก ELR ก็อาจมีโปรตีนชนิดอื่นที่ทำหน้าที่เป็น co-receptor เช่น BAK1/SERK3 และ SOBIR1



ภาพที่ 2.14 มันฝรั่งสายพันธุ์ Désirée ที่ทำการถ่ายยีนสร้าง ELR และปลูกเชื้อด้วย *Phytophthora sojae* โดยพบว่าใบที่ทำการถ่ายยีนและปลูกเชื้อ (ซ้าย) แสดงอาการโรคน้อยกว่าชุดควบคุม (ขวา)

ที่มา Derevnina *et al.* (2016)

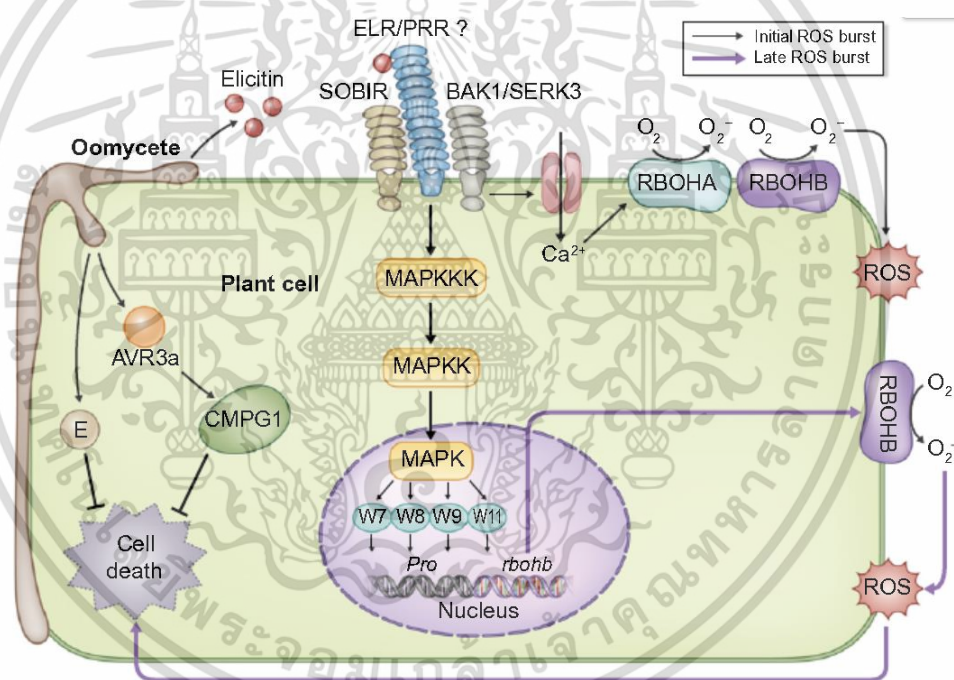
elicitor สามารถกระตุ้นพืชให้เกิดการตายของเซลล์แบบยับยั้ง (hypersensitive response หรือ HR cell death) อันเนื่องมาจากกระตุ้นให้เกิดการสะสมของโมเลกุลที่ทำให้เกิดความต้านทาน หรือ reactive oxygen species (ROS) จากกระบวนการ oxidative burst (การสร้าง NADPH oxidase, calcium influx และการกระตุ้น MAP kinase) อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อ elicitor ไม่จำเป็นต้องเกิด hypersensitive response เพียงอย่างเดียว ในบางครั้ง elicitor อาจกระตุ้นพืชให้เกิด jasmonic acid และ ethylene จนได้ความต้านทานแบบ basal defense เช่น ใน *P. oligandrum* ที่เมื่อกระตุ้นมะเขือเทศด้วยโปรตีนผนังเซลล์ก็จะสามารถต้านทานโรคเหี่ยวจาก *Ralstonia solanacearum* ได้ เป็นต้น

ตัวโปรตีน elicitor นั้นจะไปกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ reactive oxygen species (ROS) แบบ 2 ขั้นตอน เริ่มจากการที่พืชจดจำ elicitor ได้จากตัว receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ (ELR) โดยมี receptor ร่วม (co-receptor) ช่วยทำงาน 2 ชนิด ชนิดแรกคือ BAK1(SERK3) (Yang *et al.*, 2011) ที่เป็นโปรตีน receptor-like kinase ที่ประกอบไปด้วยโคเมนของกรดอะมิโน leucine (Leucine-rich repeat receptor-like kinases หรือ LRR-RLKs) ชนิดหนึ่ง โดย BAK1 มีชื่อเต็มคือ BRI1-associated kinase ซึ่งเป็น co-receptor ของ brassinosteroid (BR) insensitive 1 (BRI1) ที่จะช่วยจับ brassinosteroid ที่เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและเจริญเติบโตของเซลล์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมันอยู่ในกลุ่มของโปรตีน kinase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นอ่อน ส่วนชนิดที่ 2 คือ SOBIR1 (Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine/tyrosine-protein kinase) เป็นโปรตีน kinase ที่ทำงานกับ โมเลกุลที่มี serine/threonine หรือ tyrosine เป็นองค์ประกอบ (Liebrand *et al.*, 2014) โดยทั้ง 2 ชนิดนั้นเป็น co-receptor ที่จำเป็นต่อการทำงานของ receptor-like kinase รวมถึงโปรตีนที่ทำงานคล้าย receptor (receptor-like protein) ชนิดอื่น

เมื่อพืชสามารถจดจำ elicitor ได้แล้ว ก็จะเกิดการส่งสัญญาณให้เกิดความต้านทาน นั่นคือเกิดการไหลเข้าทางช่องของแคลเซียม (calcium influx) ทำให้เอนไซม์ NADPH oxidases 2 ชนิดทำงาน นั่นคือ RBOHA และ RBOHB จนเกิดการสร้าง ROS ระยะแรก ตามด้วยการทำงานของ MAPK ที่จะช่วยทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน WRKY 7, 8, 9 และ 11 เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *rbohB* เพื่อให้เกิดการสร้าง superoxide และผลิต ROS ออกมาเป็นครั้งที่ 2 รวมถึงเกิดการตายของเซลล์ (ภาพที่ 2.15)



ภาพที่ 2.15 แสดงการเกิดความต้านทานในพืชโดย elicitor ของสิ่งมีชีวิตคล้ายราในกลุ่ม Oomycetes ซึ่งเกิดจากการทำงานของ receptor (MAPK 2 ชนิด คือ BAK1(SERK3) และ SOBIR1) และเอนไซม์ (NADPH oxidase) หลักๆ หลายชนิด แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่เชื้อสาเหตุ จะสร้างโปรตีน effector (E) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และไม่เกิดความต้านทานได้เช่นกัน

ที่มา Derevnina *et al.* (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายผนังเซลล์พืชของ Oomycetes

Deacon (1979) ได้ทดสอบความสามารถของเชื้อในสกุล *Pythium* spp. ในการย่อยสลายเซลล์โลสโดยการวัดผลจากการสูญเสียสภาพของเยื่อเซลล์โลสและการสูญเสียน้ำหนักของกระดวยกรอง จากการทดสอบในเชื้อดังต่อไปนี้ คือ *P. acanthicum*, *P. anandrum*, *P. aphanidermatum*, *P. butleri*, *P. debaryanum*, *P. graminicola*, *P. heterothallicum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. mamillatum*, *P. scleroteichum*, *P. sylvaticum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. ultimum* และ *P. vexans* พบว่า *P. graminicola* สามารถย่อยสลายเยื่อเซลล์โลสได้ดีที่สุดในบรรดา *Pythium* หลายๆ สายพันธุ์ รวมถึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักของกระดวยกรองในระดับสูงมาก ใกล้เคียงกับ *P. acanthicum* และ *P. mamillatum*

Campion *et al.* (1997) ได้ศึกษาความรุนแรงและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของ *P. violae*, *P. sulcatum* และ *P. ultimum* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการก่อโรค อาการโรคที่เกิดขึ้น และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ โดยเชื้อสาเหตุทั้งสามชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคจุดในแครอทได้ จากการศึกษา พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายซูเบอรินในผนังชั้นนอกของพืชในระดับต่ำ สำหรับเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการย่อยสลายชีวโมเลกุลประเภทน้ำตาลใน *P. violae* มีเพียง pectate lyase และ cellulase ปริมาณน้อยเท่านั้นที่ถูกสร้างขึ้น ในขณะที่ *P. ultimum* จะมีการสร้าง polygalacturonase และ -1,4-glucanase ในปริมาณที่มากกว่า *P. violae* จึงทำให้ขนาดแผลบนแครอทใหญ่กว่า นอกจากนี้ *P. ultimum* ยังสามารถสร้างไอโซไซม์ (isoenzyme หรือ isozyme) เพื่อย่อยสลายโปรตีนและเซลล์โลสได้

Park (1980) ได้ศึกษาจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Pythium* spp. บริเวณแม่น้ำลาแกนและแม่น้ำมินโนวเบิร์นในประเทศไอร์แลนด์เหนือที่เคยมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายเซลล์โลสได้ โดยสามารถหาความหนาแน่นของเชื้อได้จากตัวอย่าง 51 ตัวอย่าง พบเชื้อ *P. fluminum* var. *fluminum*, *P. fluminum* var. *flavum* และ *P. uladhun*

Latijnhouwer *et al.* (2003) ได้รายงานว่า Oomycetes สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ได้โดยจะแสดงออกโดยการงอก germ tube และเส้นใยบริเวณส่วนที่เข้าทำลายพืช ตัวอย่างของเอนไซม์ที่สร้าง เช่น polygalacturonase, pectin-lyase, pectinase, cellulase, xylanase และ glucanase โดย *Phytophthora* และ *Pythium* นั้นเป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืชได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและห้องปฏิบัติการ

1. หัวเจาะดิน (hand auger)
2. ชุดตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง (ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
3. จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร
4. หลอดทดลอง
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. เข็มเย็บเย็บ
7. Cork borer
8. Syringe filter
9. ปีกเกอร์
10. Falcon tube (Fisher scientific)
11. Haemocytometer 0.1 มิลลิเมตร รุ่น Neubauer (Boeco, Germany)
12. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง ยี่ห้อ Nikon รุ่น Eclipse E200
13. Wifi camera eyepiece MC-500W
14. Vortex mixer รุ่น GENIE 2
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ NUVE รุ่น NF400
16. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น Accuplus i250
17. Micropipette (Capp, Denmark)
18. Centrifuge tube
19. Micro tube 1.5 มิลลิลิตร
20. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA thermocycler (Biometra, Germany)
21. เครื่อง spectrophotometer รุ่น biophotometer plus (Eppendorf, USA)
22. เครื่อง gel documentation GeneGenius (SynGene, UK)
23. เครื่อง gel electrophoresis (Biorad, USA)
24. เครื่อง water bath (Memmert, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะต้นพืช

1. หลอดไฟ LED สำหรับปลูกต้นไม้ (VÄXER LED plant light bulb PAR20)
2. พีทมอสสำหรับปลูกพืช (VAN EGMOND)
3. ฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว
4. เครื่องวัด EC ยี่ห้อ Truncheon (Bluelab, New Zealand)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง HM digital (USA)
6. กระบะเพาะกล้า

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA 1 ลิตร ประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และวุ้น 17 กรัม)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar (CMA; Himedia, India)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 agar และ V8 broth (ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม V8 CaCO₃ และใช้วุ้น 17 กรัม สำหรับอาหารแข็ง)
4. Benomyl (50% active ingredient)
5. Pentachloronitrobenzene (PCNB)
6. สารปฏิชีวนะ nystatin (T.O. Pharma Ltd)
7. สารปฏิชีวนะ rifampicin
8. สารปฏิชีวนะ ampicillin
9. Cetrimonium bromide (CTAB)
10. Tris base (Sigma-Aldrich, USA)
11. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
12. RNase A (Thermo Fisher, USA)
13. Chloroform (Merck, Germany)
14. Isoamyl alcohol (Merck, Germany)
15. Isopropanol (Merck, Germany)
16. Absolute ethanol (Merck, Germany)
17. TE buffer
18. Ethidium bromide
19. Forward primer ITS6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20. Reverse primer ITS4
21. 2X PCR Master mix Solution (i-Taq) (iNtRON Biotechnology, Korea)
22. 1 kb DNA ladder ยี่ห้อ GeneRuler (Thermo scientific, USA)
23. 6X DNA gel loading dye (Thermo scientific, USA)
24. GeneJET gel extraction kit (Thermo scientific)
25. Nitric acid
26. สารละลายธาตุอาหารพืช จากปริมาตรตั้งต้น 20 ลิตร โดยสูตร A: Calcium Nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Fe-EDTA และ สูตร B: Potassium Nitrate (KNO_3), Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4), Magnesium Sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Zinc Sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Copper Sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Manganese Sulphate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Boric acid (H_3BO_3) และ Ammonium Molybdate หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

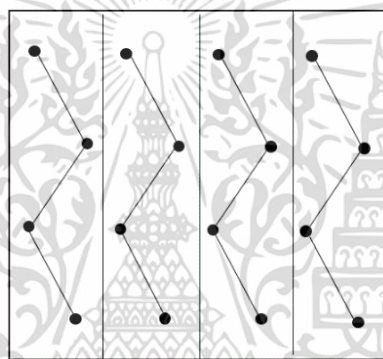
วิธีการ

ตอนที่ 1 ศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินที่ความลึก 30 เซนติเมตรในพื้นที่ทำการเกษตร พื้นที่ป่า พื้นที่ป่าชายเลน แหล่งน้ำธรรมชาติ และตัวอย่างเศษซากพืชในเขตจังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด พร้อมบันทึกจุดพิกัดบริเวณที่เก็บและชุดดินในพื้นที่เก็บตัวอย่าง

1. การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เพาะปลูก ดำเนินงาน โดยแบ่งพื้นที่เก็บตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน และแบ่งจุดเก็บตัวอย่างแบบสลับฟันปลา (Estefan *et al.*, 2013; ภาพที่ 3.1) ตัวอย่างดินทั้งหมดจะถูกนำมารวมกันเมื่อดำเนินการเก็บสำเร็จ



ภาพที่ 3.1 แสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่เพาะปลูก โดยทำการแบ่งพื้นที่เป็น 4 ส่วน และทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละส่วนให้ครบ 4 ตัวอย่าง

2. สำหรับการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่า (ป่าเสื่อมโทรมและป่าชุมชน) ใช้วิธีการแบ่งพื้นที่เป็นสี่ส่วนคล้ายกับดินเกษตร นั่นคือใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบสลับฟันปลา

3. การเก็บตัวอย่างบริเวณเขตพื้นที่ป่าชายเลน ทำการเก็บตัวอย่างเศษซากใบพืชที่สัมผัสน้ำ หรือมีความชื้น โดยนับเป็นเชื้อต่อธรรมชาติ นอกจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดินเลนในบริเวณที่มีเศษซากใบพืชอยู่ให้ได้ 16 จุด และนำมารวมกันเป็นตัวอย่างเดียว

4. การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำจืด หากเป็นน้ำตกร เก็บตัวอย่างจากระดับชั้นที่สูงที่สุดก่อน โดยให้ทำการเก็บตัวอย่างเศษซากใบพืชที่สัมผัสน้ำ หรือมีความชื้น รวมไปถึงดินตะกอนในบริเวณนั้น ชั้นละ 4 ตัวอย่าง หากเป็นตัวอย่างธารน้ำธรรมชาติ เก็บตัวอย่างดินข้างแม่น้ำให้ได้ 16 จุด และนำมารวมกันเป็นตัวอย่างเดียว

5. การเก็บข้อมูล แบ่งตัวอย่างดินที่เก็บได้เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์อินทรีย์วัตถุภายในดิน (Walkley and Black method) ในโตรเจนทั้งหมดในดิน (Kjeldahl method) ความชื้น (Gravimetric method) และค่า pH โดยนำส่งวิเคราะห์ ณ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร ดินส่วนที่เหลือนำไปบดให้ละเอียด (ในกรณีที่เป็นดินเลนไม่จำเป็นต้องบด) พร้อมทั้งประเมินปริมาณความหนาแน่นของ Oomycetes ด้วยวิธี plate count technique เพื่อนำข้อมูลไปประเมินหาอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อปริมาณของประชากร Oomycetes ด้วยวิธี linear regression analysis หากมีตัวอย่างน้ำให้นำไปวิเคราะห์หาค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) ค่า DO (Dissolved Oxygen) ค่า pH ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณอินทรีย์คาร์บอน

ตารางที่ 3.1 สภาพแวดล้อมที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

จังหวัด	สถานที่	ละติจูด, ลองจิจูด	วันที่เก็บ	ลักษณะ
จันทบุรี	พื้นที่เกษตร	12.7098950, 102.1804450	17/06/2562	ใช้เพาะปลูกทุเรียน ลำไย และลองกอง ดินเหนียว ความชื้นประมาณ 38%
	ป่าชุมชน	12.711564, 102.177968	17/06/2562	ดินเหนียว ความชื้นประมาณ 27%
	ป่าชายเลน	12.573183, 101.903589	16/06/2562	ป่าดิบชายฝั่ง มีการถมทรายในพื้นที่ ความชื้นประมาณ 66%
	แม่น้ำ	12.711763, 102.181276	17/06/2562	ดินข้างแม่น้ำเป็นดินทราย ความชื้นประมาณ 31%
ระยอง	พื้นที่เกษตร	12.85099178, 101.55733498	29/09/2562	พื้นที่ปลูกทุเรียน ก่อขุด และลองกอง ดินร่วนปนทราย (sandy loam) ความชื้นประมาณ 10-15%
	ป่าชุมชน	12.849345, 101.555479	29/09/2562	ดินร่วนเหนียวปนทราย (sandy clay loam) ความชื้นประมาณ 30-45%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ต่อ

จังหวัด	สถานที่	ละติจูด, ลองจิจูด	วันที่เก็บ	ลักษณะ
ระยอง	ป่าชายเลน	12.698767, 101.707131	29/09/2562	ดินทรายปนดินร่วน (loamy sand) ความชื้นประมาณ 20-45%
	แม่น้ำ	12.776806, 101.714779	29/09/2562	ดินร่วนปนทราย (sandy loam) ความชื้นประมาณ 10-25%
ตราด	พื้นที่เกษตร	12.3554343, 102.44117412	27/09/2562	พื้นที่ปลูกทุเรียน ดิน ร่วนเหนียวปนทราย (sandy clay loam) ความชื้นประมาณ 20-28%
	ป่าชุมชน	12.15233197, 102.53187095	28/09/2562	ดินทราย (sand) ความชื้นประมาณ 5- 15%
	ป่าชายเลน	12.139832, 102.50864408	28/09/2562	ดินเหนียว (clay) ความชื้นประมาณ 50-65%
	แม่น้ำ	12.35619623, 102.440991	27/09/2562	ดินข้างแม่น้ำเป็นดิน ร่วน (loam) ความชื้น ประมาณ 30-50%

3.2 การแยกเชื้อ

3.2.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน ใ่ววิธีดังนี้

1. วิธี soil plate (Masago *et al.*, 1977): โรยตัวอย่างดิน 0.1 กรัม ลงบนผิวหน้าอาหาร CMA + BNPRO (benomyl 10 ppm, nystatin 25 ppm, pentachloronitrobenzene 25 ppm, rifampicin 10 ppm และ ampicillin 500 ppm) + Rose bengal เมื่อมีการเจริญของเส้นใยออกมาจากตัวอย่าง ทำการตัดปลายเส้นใย ย้ายลงบนอาหาร CMA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธี soil baiting (Dhingra and Sinclair 1994): ทำการผสมดิน 1 กรัมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดแตงกวา 10 เมล็ด ให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงย้ายลงบนอาหารจำเพาะ เมื่อมีการเจริญของเส้นใยออกมาจากตัวอย่าง ทำการตัดปลายเส้นใย ย้ายลงบนอาหาร CMA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส

3. วิธี soil dilution (Stanghellini and Kronland, 1985): ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตรที่เติม 0.3 % Water agar ลงไปด้วย ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง ทำการเจือจางโดยเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) เจือจางให้ได้ถึง 10^{-4} โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารแขวนลอยจากหลอดหนึ่ง (1 มิลลิลิตร) ใส่หลอดที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร และเขย่าด้วย vortex mixture ก่อนดูดทุกครั้ง เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นดูดสารแขวนลอย 1 มิลลิลิตรของหลอดที่เจือจางได้ 10^{-4} ผสมกับอาหาร CMA + BNPR + Rose bengal หมุนจานอาหารเพื่อให้เกิดการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เมื่อมีการเจริญของเส้นใยออกมาจากตัวอย่าง ทำการตัดปลายเส้นใย ย้ายลงบนอาหาร CMA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 24 – 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

3.2.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำ

แยกเชื้อโดยใช้เหยื่อล่อธรรมชาติ: นำเศษชิ้นส่วนพืชที่เก็บได้ไปวางบนอาหาร WA เมื่อมีการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุทำการตัดไปวางบนอาหาร CMA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 24 – 28 องศาเซลเซียส

ทำการบันทึกแหล่งที่มา ทั้งสถานที่เก็บ แหล่งอาศัย ของแต่ละไอโซเลทที่แยกได้

3.3 การศึกษาลักษณะพื้นฐานและการจัดจำแนกเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาโครงสร้างและอวัยวะที่ใช้สืบพันธุ์ (Abad *et al.*, 1994) แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ด้วยการทำ water culture การใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) และเลี้ยงใน poor media ไปพร้อมกัน

3.3.1 การทำ water culture: ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และทำการเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อลงไปจนท่วม ตรวจสอบการสร้าง sporangium และ zoospore อย่างสม่ำเสมอจนครบ 2 วัน

3.3.2 การใช้เหยื่อล่อ: ต้มใบหญ้าจีนเล็กๆ ในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่ลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อและชิ้นวุ้นของเชื้อลงไป ตรวจสอบการสร้าง sporangium และ zoospore อย่างสม่ำเสมอทุกๆ 1-2 วัน

3. การเลี้ยงเชื้อใน poor media: ตรวจสอบการสร้าง sporangium โดยการนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร CMA ด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบกำลังขยายต่ำ หากพบการสร้าง sporangium ให้ทำการเขียนเส้นใยบริเวณดังกล่าวเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

สำหรับวิธีการศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร V8 juice agar เมื่อเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทำการเขียนเส้นใยไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ antheridia, oogonia และ oospore ตามหลักการจัดจำแนกของ Van der Plaats-Niter (1981) และเก็บรักษาใน CMA slant

3.4 การจัดจำแนกโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงมาจาก Ivors, 2015)

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อที่แยกได้จากการศึกษานี้ (ตารางที่ 3.2) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว V8 อายุ 3 วัน โดยสังเขป ดังนี้ โดยล้างเส้นใยด้วย 25 mM EDTA และน้ำกลั่นอย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ จากนั้นบดเส้นใยให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว นำเส้นใยบดละเอียดใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดดังกล่าว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง และในขณะที่บ่มให้ทำการพลิกหลอดไปมา ทุก 15 นาที จากนั้นนำหลอดดังกล่าวมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนเติม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พลิกกลับไปมาให้สารผสมเข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่น้ำในหลอดใหม่ เติม RNase A เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนเติม 10% CTAB 50 ไมโครลิตร เมื่อผสมให้เข้ากันเสร็จแล้วทำการเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 700 ไมโครลิตร พลิกกลับไปมาให้สารผสมเข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ก่อนเติม isopropanol ปริมาตร เท่ากับส่วนใสที่ดูดมา (equal volume) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย absolute ethanol บ่มเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ นาน 30 นาที ทำ 2 ครั้ง ทิ้ง ethanol จากหลอดและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง (air-dried) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเก็บรักษาจนกว่าจะใช้งานที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการทำ gel-electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer (Eppendorf, USA) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (Eppendorf, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค gel-electrophoresis ทำได้โดยการหลอม agarose gel ใน TAE buffer (0.5% agarose gel) เตรียมหลอดพลาสติกแม่แบบและใช้หัวเจาะรูบนเจลแข็งเพื่อเตรียมเป็นช่องใส่สารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ รวมถึง DNA ladder ที่ขนาด 1 kb กับ gel loading dye เมื่อเสร็จจุดสารละลายที่ทำการผสมแล้วลงในแต่ละช่องบนเจลแข็ง และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 v เป็นเวลาทั้งหมด 40 นาที จากนั้นทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยการแช่น้ำกลั่น 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel document (SynGene, UK)

3.4.3 การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ใช้ universal primer ITS6 (5' GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG 3') และ (ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Hung *et al.*, 2015) สำหรับใน 1 หลอด reaction mixture นั้นจะใช้ชุดสำเร็จรูป 2X PCR master mix solution (iNtRON Biotechnology, Korea) มีวิธีการดังนี้คือเติมสารละลายดังกล่าวลงในหลอด PCR 10 ไมโครลิตร Forward และ reverse primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ละลายใน TE buffer ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 6-7 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

และมีสถานะในกระบวนการ PCR ดังนี้ (Cooke *et al.*, 2000)

- 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที
- 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที
- 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 25 วินาที
- 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที และทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ
- 5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป GeneJET gel extraction kit (Thermo scientific)

3.4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับปัจจัยทางแวดล้อม

ส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.4.3 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท Bionics (Bionics Co. Ltd.) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ส่งเข้าฐานข้อมูล Genbank (NCBI database) วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับจะถูกวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ Basic Local Alignment Search Tool เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(BLAST) ของ National Center for Biotechnology (NCBI; Bethesda, USA). แผนภูมิวิวัฒนาการจะสร้างโดยใช้อัลกอริทึม neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ในโปรแกรม MEGA 7 โดยเปรียบเทียบกับแผนภูมิวิวัฒนาการที่ได้จากอัลกอริทึม Maximum-likelihood (Felsenstein, 1985) และ maximum-parsimony (Kluge and Farris, 1969) คำวนระยะห่างทางวิวัฒนาการโดยใช้โมเดลของ Jukes และ Cantor (Jukes and Cantor 1969) ประเมินความน่าเชื่อถือของโครงสร้างแผนภูมิโดยวิเคราะห์ค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ (Felsenstein, 1985) โดยมี *Aphanomyces saluginosus* (Oomycetes, Saproleginales) เป็น outgroup นอกจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและน้ำ ไม่ว่าจะเป็น ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน หรือปริมาณเชื้อสาเหตุที่นับได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้วยวิธี linear regression analysis

ตอนที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช

3.5 การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) หรือก่อโรคได้ไม่รุนแรง (hypo-virulence strain)

3.5.1 ทดสอบโรคนำระดับดินในเมล็ด (pre-emergence damping off)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ที่จำนวน 4 ซ้ำ ทดสอบกับผักสลัดกรีนโอ๊ค โดยดัดแปลงจากวิธี grass-leaf culture (Abad *et al.*, 1994) กับวิธีการของ Bouket *et al.* (2016) ทำได้โดยต้มใบหญ้าในน้ำเดือดประมาณ 10-12 ชั้นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตัดเอาชิ้นส่วนของเชื้อที่ต้องการทดลองวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อลงไปประมาณ 20 ml จากนั้นวางใบหญ้าต้มที่ทำการฆ่าเชื้อลงไป บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการแช่เมล็ดพืชที่ต้องการทดลองลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเมล็ดมาวางบนกระดาษกรองขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มภายใต้สภาวะเดิม

3.5.2 ทดสอบโรคนำระดับดินในต้นกล้า (post-emergence damping-off)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ที่จำนวน 4 ซ้ำ ทำได้โดยเพาะกล้าลงในวัสดุปลูก (peat moss) ในถาดเพาะชำ โดยมีพืชทดสอบ 2 กลุ่ม คือพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (ข้าวโพด) และพืชใบเลี้ยงคู่ (แตงกวา) เมื่อต้นกล้าอายุได้ 14 วันให้ทำการปลูกเชื้อสาเหตุด้วยการเทสารแขวนลอยเส้นใยลงบริเวณโคนต้น โดยมีชุดควบคุมเป็นต้นพืชที่รดด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว สำหรับการเตรียมเชื้อสาเหตุ ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อ *Pythium* สายพันธุ์ที่จะทดสอบในอาหารเหลว V8 (Ayers and Lumsden, 1975) และเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นให้ปั่นเส้นใยเพื่อเตรียม mycelial suspension เพื่อนำไปนับชิ้นส่วนเส้นใยด้วย hemacytometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^4 propagule ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเทสารแขวนลอยดังกล่าวลงบริเวณ โคนต้นพืช ต้นละ 10 มิลลิลิตร

เก็บผลทุกวันจนครบ 7 วัน เก็บข้อมูลจำนวนต้นที่เป็นโรคเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} \times \text{ระดับความรุนแรงที่พบ}}{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} \times \text{ระดับความรุนแรงสูงสุด}}$$

เก็บผลข้อมูลการเกิดโรคเพื่อพิจารณาว่าเชื้อสายพันธุ์ใดก่อโรค (ตารางที่ 4.6) รวมทั้งบันทึกการเจริญของพืชทดสอบด้วยได้แก่ น้ำหนักสตราก น้ำหนักสลดต้น น้ำหนักสลดทั้งหมด ความยาวราก และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

3.6 การทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช

นำ *Pythium* ไอโซเลทที่ไม่ก่อโรค (non-pathogen) หรือที่เกิดโรครดต่ำ (hypo-virulence) ที่ได้จากข้อ 3.5 มาทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

3.6.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรค

1) การเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (dual culture)

ใช้ cork borer เจาะ วัสดุส่วนปลายเส้นใยของเชื้อสาเหตุและเชื้อปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นย้ายชิ้นวัสดุลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เทอาหาร PDA ไว้แล้ว วางชิ้นวัสดุของเชื้อทั้ง 2 ชนิดให้มีระยะห่างกัน 5 เซนติเมตร มีระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร โดยมีชุดควบคุมเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางเชื้อสาเหตุหรือเชื้อปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำด้วยแผนการทดลองแบบ CRD เก็บข้อมูลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นชุดควบคุมและคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ประกอบไปด้วย *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยว *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่า

2) การเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ (slide culture) (Paul, 1999)

ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เกิดการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ ซึ่งมีหลักการคล้ายคลึงกับเทคนิคเลี้ยงเชื้อร่วมปกติ โดยการวางแท่งแก้วรูปตัววี หรือ แท่งแก้วคนสารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นฐานวางสไลด์ วางสไลด์ลงบนแท่งแก้วและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทอาหาร PDA ให้ทั่วทั้งสไลด์ โดยให้เทแบบบาง (thin layer) วางชิ้นวัสดุของเชื้อปฏิปักษ์และจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบไว้คนละฝั่งของสไลด์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส (Paul, 1999) เมื่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดเจริญสัมผัสกันให้เริ่มเก็บภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดปฏิสัมพันธ์ ไม่ว่าจะเป็นการเป็นปรสิตในเส้นใย (mycoparasitism) หรือการเกิดความผิดปกติ (abnormality) ของเส้นใย

เชื้อสาเหตุ เช่น การเกิดการย่อยสลายของเซลล์ (cell lysis) การรั่วไหลของไซโทพลาสซึม (cytoplasm leakage) เป็นต้น

3.6.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญ และการงอกของชิ้นส่วนขยายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค

ดัดแปลงจากวิธีการของ (Picard *et al.*, 2000) เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคเลี้ยงเชื้อ ร่วมให้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว V8 ในที่มืด เป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ทำการ แยกเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปกรองด้วย syringe filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน จนได้ส่วนใส (supernatant) ที่ปราศจากเชื้อ (cell-free culture filtrate; CF) ทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรคได้ด้วยเทคนิค poisoned-food ทำได้โดยการผสม CF ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ความเข้มข้น 50% จากนั้นวางกระดาษ cellophane ขนาด 9 เซนติเมตรลงบนอาหารดังกล่าว ใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตรเจาะลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บริสุทธิ์ที่มีเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรค ก่อนจะย้ายชิ้นวัฏมาวางบนกระดาษดังกล่าว เก็บผลการ ทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีร่วมกับการวัดน้ำหนักเส้นใยสด นำไป เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสม CF และชุดควบคุมที่ผสมน้ำกลั่น สำหรับการทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยว ทำได้ได้โดยการเติมส่วนใสที่ได้จากการ แยกเส้นใยเชื้อลงใน microtube 1.5 ml ร่วมกับสารแขวนลอยสปอร์หรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ สาเหตุที่ความเข้มข้น 10^4 propagule/ml จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อตรวจดูความผิดปกติ ของสปอร์ โดยมีชุดควบคุมเป็นหลอดทดลองที่เติมอาหารเหลวและสปอร์ของเชื้อสาเหตุเพียงอย่าง เดียว ส่วนชิ้นส่วนเส้นใยที่เหลือนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.7 ศึกษาการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของสายพันธุ์ NpP หรือ HvP ที่แยกได้

3.7.1 การกระตุ้นความต้านทานด้วยเซลล์ที่มีชีวิต

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เชื้อสาเหตุที่ใช้คือ *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวและ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่า สำหรับการเตรียมต้นพืชเพื่อทดสอบในสภาพ *in vivo* ทำได้ด้วยวิธี split root technique เริ่มต้นให้ทำการแบ่งรากของพืชเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกแช่ ด้วยสารแขวนลอยของเชื้อสาเหตุ (10^4 spores ต่อมิลลิลิตร หรือ 10^4 propagules ต่อมิลลิลิตร) รากส่วน ที่สองแช่ด้วยสารแขวนลอยของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือก (วิธีการทำสารแขวนลอยเชื้อแบบเดียวกับข้อ 3.6.2) โดยทดสอบกับทุกไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในข้อ 3.5 หลังจากต้นพืชแสดงอาการทำ การบันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรคและระดับความรุนแรง สำหรับระดับความรุนแรงโรคในพืชที่ปลูก เชื้อ *Pythium* sp. ตามระดับคะแนน ดังนี้ (Li *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการโรค

ระดับ 1 = รากมีอาการแผ่ต่ำกว่า 20%

ระดับ 2 = รากเกิดอาการเน่าปานกลาง

ระดับ 3 = เกิดอาการเน่าลุกลามและทำให้รากลดลงน้อยในระดับที่ต่ำกว่า 50% และ

ระดับ 4 = รากเกิดอาการเน่าทั้งระบบและทำให้จำนวนรากลดลงมากกว่า 50%

ส่วนในพืชที่ปลูกเชื้อ *Fusarium* sp. แบ่งระดับความรุนแรงได้ดังนี้ (Ahn *et al.*, 1998) คือ

ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการโรค

ระดับ 1 = เกิดอาการเหลืองและเหี่ยวเล็กน้อย

ระดับ 2 = เกิดอาการเหี่ยว และเนื้อเยื่อลำเลียงเกิดการเปลี่ยนสีเล็กน้อย

ระดับ 3 = เกิดอาการเหี่ยวอย่างหนัก รวมถึงเนื้อเยื่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับ 4 = เกิดการเหี่ยวทั้งต้น และพืชตาย

เมื่อเก็บข้อมูลสำเร็จนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรคดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} \times \text{ระดับความรุนแรงที่พบ}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับความรุนแรงสูงสุด}} \times 100$$

3.7.2 การกระตุ้นความต้านทานด้วยชิ้นส่วนเซลล์ (cell fragment) (Hase *et al.*, 2008)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ทดสอบกับเชื้อ *Pythium* และ *Fusarium* สาเหตุโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่รากส่วนที่ทำการกระตุ้นด้วยสารแขวนลอยเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเปลี่ยนเป็นการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ (cell fragment) การเตรียมชิ้นส่วนเซลล์ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว V8 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร (ผสมด้วย CaCO_3 0.015 M และ wheat germ oil 0.1%) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 อาทิตย์ หลังจากนั้นเก็บเอาชิ้นส่วนของเส้นใยมากรองด้วยตะแกรงที่มีรูตะแกรงขนาด 150 ไมโครเมตร และล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 ครั้ง ทำให้แห้งโดยการตากทิ้งไว้บนกระดาษกรอง นำเส้นใย 5 กรัม ไปปั่นให้ละเอียดรวมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของชิ้นส่วนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งให้ได้ประมาณ 5×10^8 oospores หรือ propagules ต่อ มิลลิลิตร ที่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น elicitor เมื่อจะทดสอบให้ทำการแช่รากพืชทดสอบด้วยชิ้นส่วนเซลล์ที่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร การบันทึกข้อมูลใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ

3.7.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผลการทดลองให้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยข้อมูลใช้วิธี DMRT (Duncan's Multiple Range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม R



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน

4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในคลาส Oomycetes ที่แยกได้

ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินเกษตร ดินป่า ดินแม่น้ำ ดินป่าชายเลน ตัวอย่างน้ำ และเศษซากใบพืช สามารถแยก *Pythium* sp. และสกุลใกล้เคียงได้ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท จากจันทบุรี 17 ไอโซเลท (CHS1-17) ระยอง 20 ไอโซเลท (RYS1-20) และตราด 15 ไอโซเลท (TS1-15) โดยมีลักษณะโคโลนีที่หลากหลาย เช่นแบบปุยฝ้าย (cottony) ดอกเบญจมาศ (chrysanthemum) หรือดอกกุหลาบ (rosette) การเจริญเติบโตแบ่งออกเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตเร็วซึ่งสามารถเจริญเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง และกลุ่มที่โตช้าซึ่งอาจใช้เวลาประมาณหนึ่งสัปดาห์ในการเจริญเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ละไอโซเลทมีการสร้างโครงสร้างขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเพศในลักษณะต่างกัน ตามลักษณะทางสัณฐานของเชื้อในสกุล *Pythium* และ *Phytophythium* ถ้าหากแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างแล้ว จะพบว่ามีทั้งสายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้าง sporangium กลุ่มที่สร้าง sporangium มีลักษณะทั้งแบบเส้นใย (filamentous) ที่พองและไม่พองบวม หรือแบบ globose, subglobose, limoniform, pyriform และ obpyriform ที่มี papillae นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่สร้าง oospore แบบผนังเรียบ (smooth wall) หรือแบบมีหนาม (spine) ที่มี oospore แบบเต็ม (plerotic) หรือไม่เต็ม (aplerotic) oogonium จากการทดลองครั้งนี้พบกลุ่มที่มีการสืบพันธุ์แบบ asexual reproduction จำนวน 9 สายพันธุ์ กลุ่มที่มีการสืบพันธุ์แบบ sexual reproduction จำนวน 8 สายพันธุ์ และกลุ่มที่มีการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบจำนวน 6 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตและโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงใน
 คลาส Oomycetes ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด

ไอโซเลต	ระยะเวลาในการเจริญ			Sporangia (length x wide; μm)	Oogonia (μm)	Antheridia	Oospores (μm)
	เต็มจานอาหาร (วัน)						
	CMA	PDA	V8				
CHS-1	2	2	3	-	smooth wall intracalary (15.94±0.69)	1 diclinous antheridium per oogonia	apterotic (15.94±1.08)
CHS-2	2	2	2	-	smooth wall terminal, intracalary (17.35±1.05)	1 monoclinal	apterotic (30.93±0.39)
CHS-3	2	2	3	-	smooth wall terminal, intracalary (16.02±2.02)	1 monoclinal antheridia per oogonia	apterotic (19.87±7.65)
CHS-4	3	3	3	-	smooth wall terminal, intracalary (17.01±0.89)	1 monoclinal antheridia per oogonia	apterotic (30.11±1.78)
CHS-5	2	2	3	-	smooth wall terminal (19.06±5.30)	1-3 diclinous	apterotic (23.68±4.65)
CHS-6	5	5	5	sub-globose or pyriform (18.29 x 7.59)	smooth wall Terminal, intracalary (23.79±3.27)	1-3 diclinous or hyphogynous antheridia per oogonia	apterotic (19.24±0.64)
CHS-7	4	4	4	ovoid, limoniform or pyriform (18.67 x 7.54)	smooth wall Terminal, intracalary (15.85±0.86)	1-3 diclinous antheridia per oogonia	apterotic (18.18±1.26)
CHS-8	5	5	6	globose, ovoid or pyriform (19.00 x 7.71)	smooth wall Terminal, intracalary (16.90±0.51)	1 hyphogynous or 1-2 monoclinal antheridia per oogonia	apterotic (17.47±0.93)
CHS-9	4	4	4	filamentous with vesicle (24.91)	smooth wall terminal, intracalary (19.29±2.40)	1-2 monoclinal antheridia per oogonia	plerotic (15.60)
CHS-10	3	3	5	filamentous with vesicle (11.83)	smooth wall Terminal, intracalary (18.40±2.40)	1-2 monoclinal antheridia per oogonia	plerotic (16.68)
CHS-11	2	2	2	inflated filamentous	smooth wall terminal (33.20±0.68)	1 diclinous antheridium per oogonia	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ต่อ

ไอโซเลต	ระยะเวลาในการเจริญ			Sporangia (length x wide; μm)	Oogonia (μm)	Antheridia	Oospores (μm)
	เต็มจานอาหาร (วัน)						
	CMA	PDA	V8				
CHS-12	4	4	3	limoniform, pyriform (vesicle observed) (20.58 x 9.17)	smooth wall Terminal (27.87 \pm 3.96)	1 amphigynous antheridia	plerotic (17.3)
CHS-13	3	3	2	-	smooth wall terminal or intercalary (27.49 \pm 2.62)	monoclinous or diclinous	aplerotic (28.70 \pm 1.87)
CHS-14	3	3	3	-	-	-	-
CHS-15	3	3	3	filamentous	-	-	-
CHS-16	4	4	3	filamentous	-	-	-
CHS-17	3	3	3	filamentous	-	-	-
RYS-1	2	2	2	-	smooth wall, intercalary (33.91 \pm 1.92)	3-4 monoclinous antheridia per oogonia	aplerotic (68.76)
RYS-2	2	2	2	sub-globose or pyriform proliferating (9.86)	smooth wall, terminal or intercalary (23.28 \pm 3.23)	1 monoclinous or hypogynous antheridia per oogonia	nearly plerotic (47.31)
RYS-3	2	2	2	-	smooth wall, intercalary (58.98 \pm 7.99)	1 monoclinous or hypogynous antheridia per oogonia	aplerotic (56.38 \pm 0.96)
RYS-4	5	5	4	subglobose with discharge tube (17.28)	ornamented, terminal or intercalary (44.77 \pm 1.09)	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	plerotic (44.42 \pm 2.27)
RYS-5	5	5	5	sub-globose with discharge tube (17.02)	ornamented, terminal or intercalary (35.77 \pm 4.30)	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	plerotic (42.53 \pm 1.34)
RYS-6	4	4	5	-	ornamented, terminal or intercalary (46.03 \pm 0.763)	1 monoclinous of hypogynous antheridia per oogonia	plerotic (39.65)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ต่อ

ไอโซเลต	ระยะเวลาในการเจริญ			Sporangia (length x wide; μm)	Oogonia (μm)	Antheridia	Oospores (μm)
	เต็มจานอาหาร (วัน)						
	CMA	PDA	V8				
RYS-7	7	7	6	-	ornamented, terminal or intercalary (38.17 \pm 0.45)	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	plerotic (44.64 \pm 1.13)
RYS-8	6	6	6	sub-globose or pyriform, papillate (20.36 x 7.46)	smooth wall, terminal or intercalary (33.39)	-	plerotic (32.48 \pm 1.72)
RYS-9	2	2	2	sub-globose or pyriform (18.10 x 8.71)	smooth wall, terminal or intercalary (36.97 \pm 4.46)	1 monoclinous antheridia per oogonia	-
RYS-10	5	5	5	non-inflated filamentous	-	-	-
RYS-11	2	2	2	inflated filamentous with vesicle	smooth wall, terminal and intercalary (34.70 \pm 9.28)	1 monoclinous antheridia per oogonia	-
RYS-12	2	2	2	sub-globose or pyriform (24.47 x 11.51)	smooth wall, terminal and intercalary (22.31 \pm 4.39)	1 monoclinous antheridia per oogonia	-
RYS-13	2	2	2	-	-	-	-
RYS-14	5	5	4	inflated filamentous	-	-	-
RYS-15	2	2	2	sub-globose or pyriform (27.74 x 13.77)	smooth wall, terminal and intercalary (27.04)	-	-
RYS-16	4	4	3	-	-	-	-
RYS-17	2	2	2	globose, sub- globose or pyriform (23.47)	-	-	-
RYS-18	5	5	4	sub-globose (25.16)	ornamented, terminal or intercalary (33.88 \pm 3.71)	1 monoclinous antheridia per oogonia	plerotic (28.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ต่อ

ไอโซเลต	ระยะเวลาในการเจริญ			Sporangia (length x wide; μm)	Oogonia (μm)	Antheridia	Oospores (μm)
	เต็มจานอาหาร (วัน)						
	CMA	PDA	V8				
RYS-19	3	3	3	sub-globose (27.39)	ornamented, terminal or intercalary (34.53 \pm 11.96)	1 monoclinalous antheridia per oogonia	plerotic (42.75 \pm 1.04)
RYS-20	5	5	5	pyriform (28.34 x 12.15)	smooth wall, terminal or intercalary (33.06 \pm 1.27)	1-2 monoclinalous antheridia per oogonia	plerotic (34.11 \pm 0.72)
TS-1	2	2	2	-	smooth wall terminal or intercalary (27.82 \pm 2.71)	-	-
TS-2	5	5	5	ovoid with papillae (15.19 x 9.38)	smooth wall, terminal (14.17 \pm 2.85)	1 monoclinalous per oogonia	Plerotic (21.09 \pm 3.66)
TS-3	5	5	5	sub-globose, ovoid or pyriform with papillae (11.95 x 7.34)	smooth wall, terminal (19.17 \pm 0.61)	1 monoclinalous per oogonia	Plerotic (18.38 \pm 1.21)
TS-4	3	3	4	sub-globose	ornamented (acute spines), terminal or intercalary (15.19 \pm 4.85)	1 monoclinalous or hyphogynous antheridia per oogonia	plerotic (21.89)
TS-5	2	2	2	-	smooth wall intercalary (28.87 \pm 4.34)	-	-
TS-6	2	2	2	-	smooth wall intercalary (29.54 \pm 3.25)	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ต่อ

ไอโซเลต	ระยะเวลาในการเจริญ			Sporangia (length x wide; μm)	Oogonia (μm)	Antheridia	Oospores (μm)
	เต็มจานอาหาร (วัน)						
	CMA	PDA	V8				
TS-7	5	5	5	ovoid or limoniform (13.16 x 11.52)	smooth wall intercalary (16.49 \pm 0.63)	1 hyphogynous per oogonia	apterotic, (19.77)
TS-8	5	5	5	pyriform (20.75 x 12.05)	smooth wall terminal or intercalary (25.23 \pm 5.75)	1-2 monoclinalous per oogonia	nearly plerotic (17.92 \pm 1.35)
TS-9	2	2	2	-	smooth wall terminal (24.33 \pm 3.96)	-	-
TS-10	5	5	5	ovoid (15.58 x 7.58)	-	-	plerotic (17.04 \pm 0.15)
TS-11	5	5	5	pyriform (20.08 x 15.45)	-	-	-
TS-12	2	2	2	pyriform or obpyriform with papillae (19.80 x 16.01)	-	-	-
TS-13	4	4	3	non-inflated with vesicle	-	-	-
TS-14	2	2	2	obpyriform with papillae (20.01 x 16.97)	-	-	-
TS-15	3	3	2	non-inflated	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลทประกอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถจัดจำแนกในเบื้องต้นได้ดังนี้

ไอโซเลท CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4 และ CHS-5 มีความใกล้เคียงกับ *Globisporangium splendens* (ภาพที่ 4.1)

ไอโซเลท CHS-6, CHS-7 และ CHS-8 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium vexans* (ภาพที่ 4.2)

ไอโซเลท CHS-9 และ CHS-10 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium catenulatum* (ภาพที่ 4.3)

ไอโซเลท CHS-11 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium myriotylum* (ภาพที่ 4.4)

ไอโซเลท CHS-12 และ CHS-13 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium helicoides* (ภาพที่ 4.5)

ไอโซเลท CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium longipapillum* (ภาพที่ 4.6)

ไอโซเลท RYS-1 และ RYS-3 มีความใกล้เคียงกับ *Globisporangium splendens* (ภาพที่ 4.7)

ไอโซเลท RYS-2 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium vexans* (ภาพที่ 4.8)

ไอโซเลท RYS-4, RYS-5, RYS-6, RYS-7, RYS-18 และ RYS-19 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium acanthicum* (ภาพที่ 4.9)

ไอโซเลท RYS-8 และ RYS-20 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium cucurbitacearum* (ภาพที่ 4.10)

ไอโซเลท RYS-11 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium deliense* (ภาพที่ 4.11)

ไอโซเลท RYS-14 และ RYS-16 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium diclinum* (ภาพที่ 4.12)

ไอโซเลท RYS-10 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium torulosum* (ภาพที่ 4.13)

ไอโซเลท RYS-9, RYS-12, RYS-13, RYS-15 และ RYS-17 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium helicoides* (ภาพที่ 4.14)

ไอโซเลท TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9 มีความใกล้เคียงกับ *Globisporangium splendens* (ภาพที่ 4.15)

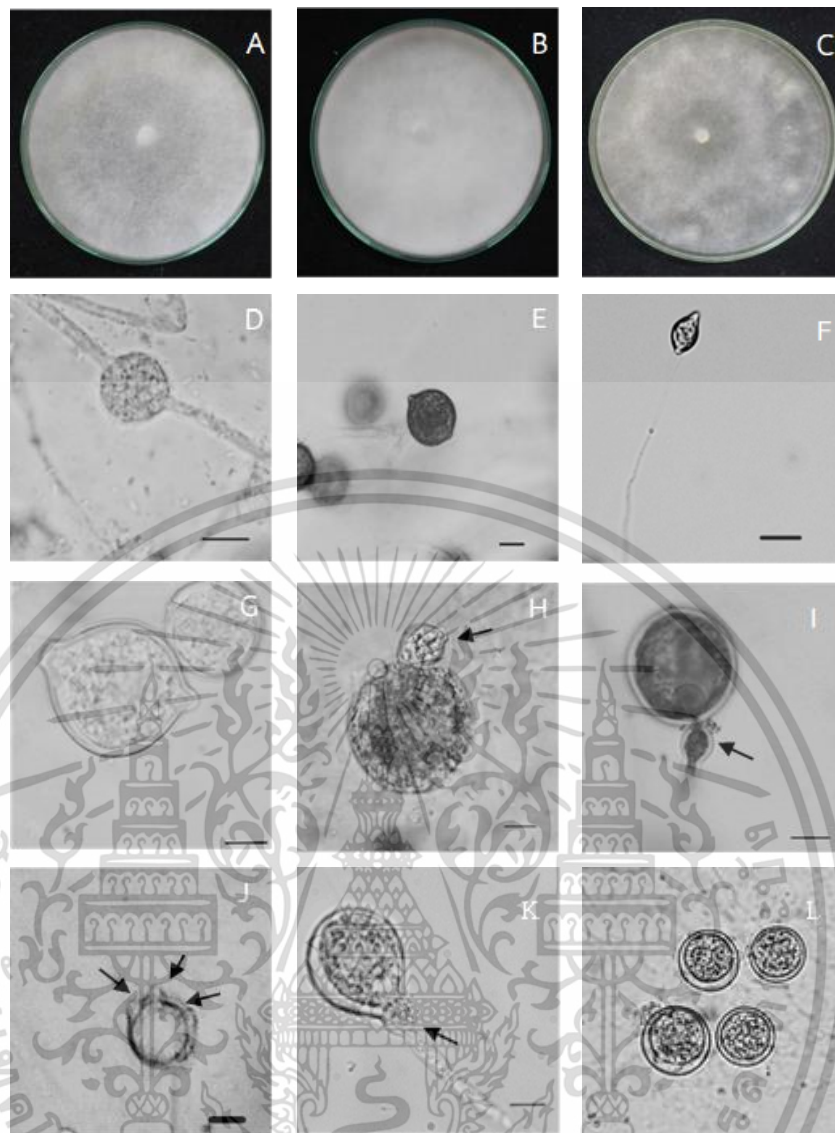
ไอโซเลท TS-2, TS-3, TS-10 และ TS-11 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium cucurbitacearum* (ภาพที่ 4.16)

ไอโซเลท TS-4 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium acanthicum* (ภาพที่ 4.17)

ไอโซเลท TS-7 และ TS-8 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium vexans* (ภาพที่ 4.18)

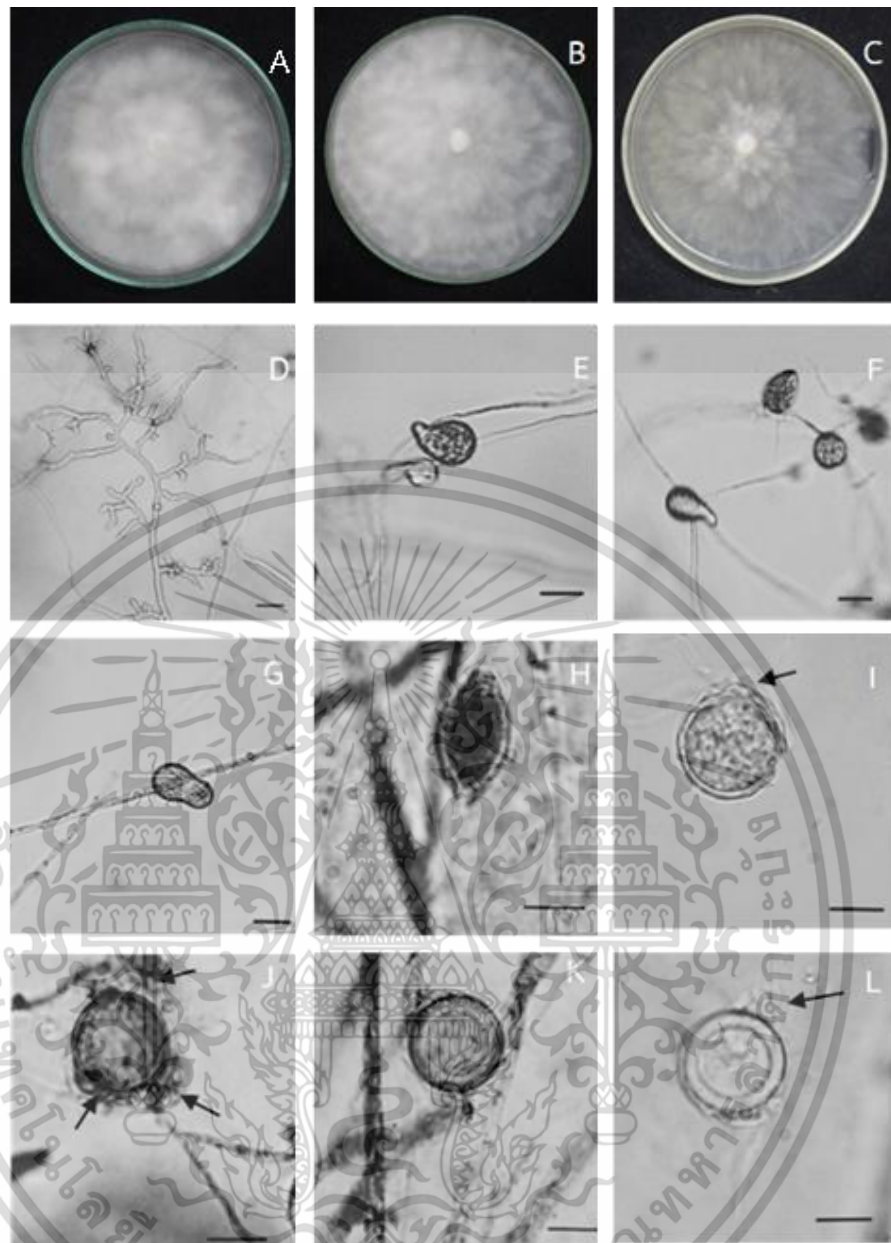
ไอโซเลท TS-12 และ TS-14 มีความใกล้เคียงกับ *Phytopythium helicoides* (ภาพที่ 4.19)

ไอโซเลท TS-13 และ TS-15 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium diclinum* (ภาพที่ 4.20)



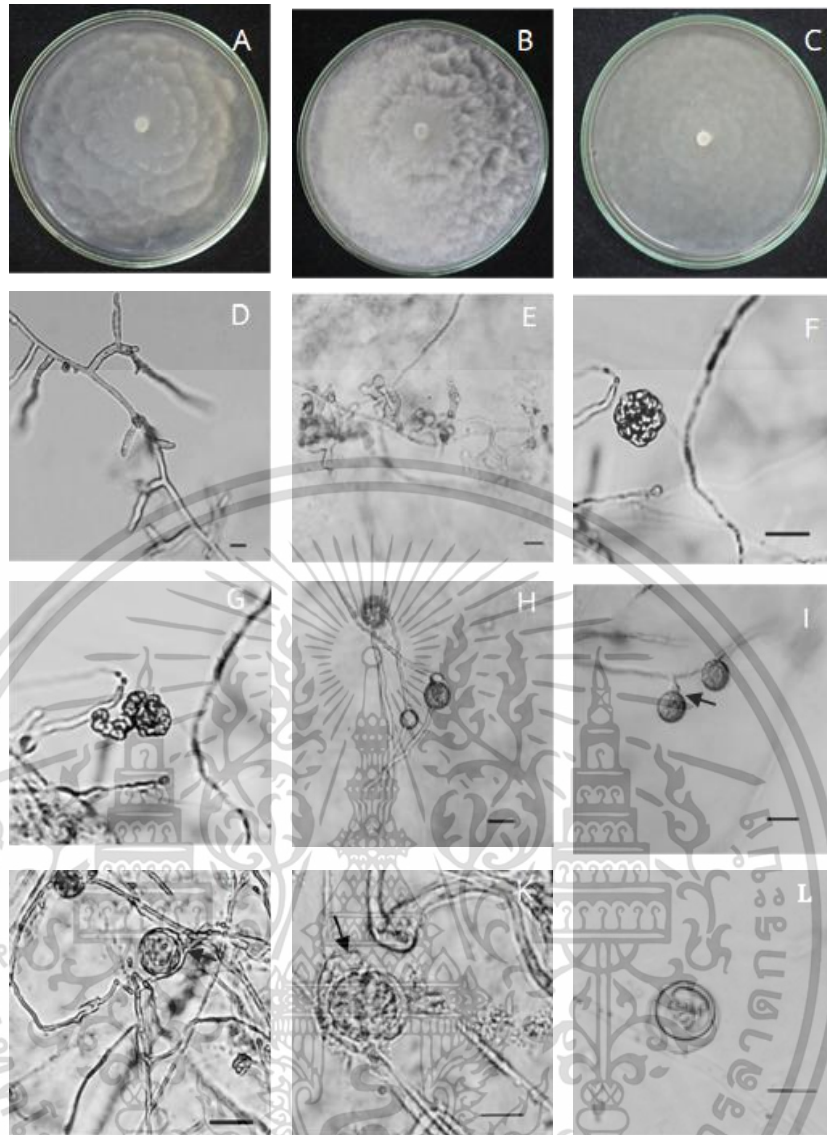
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4 และ CHS-5 (*G. splendens*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 3 วัน; D: intercalary hyphal swelling (400×); E: terminal hyphal swelling (100×); F: oogonia ที่เพิ่งสร้างใหม่ (100×); G: smooth wall oogonia (400×); H-I: การจับกันระหว่าง oogonium กับ antheridium (400×) J: การจับกันระหว่าง oogonia กับ diclinous antheridia (100×); K: oogonia; L: aplerotic oospore (scale bars ที่ 100 ×: 20 μm; 400×: 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



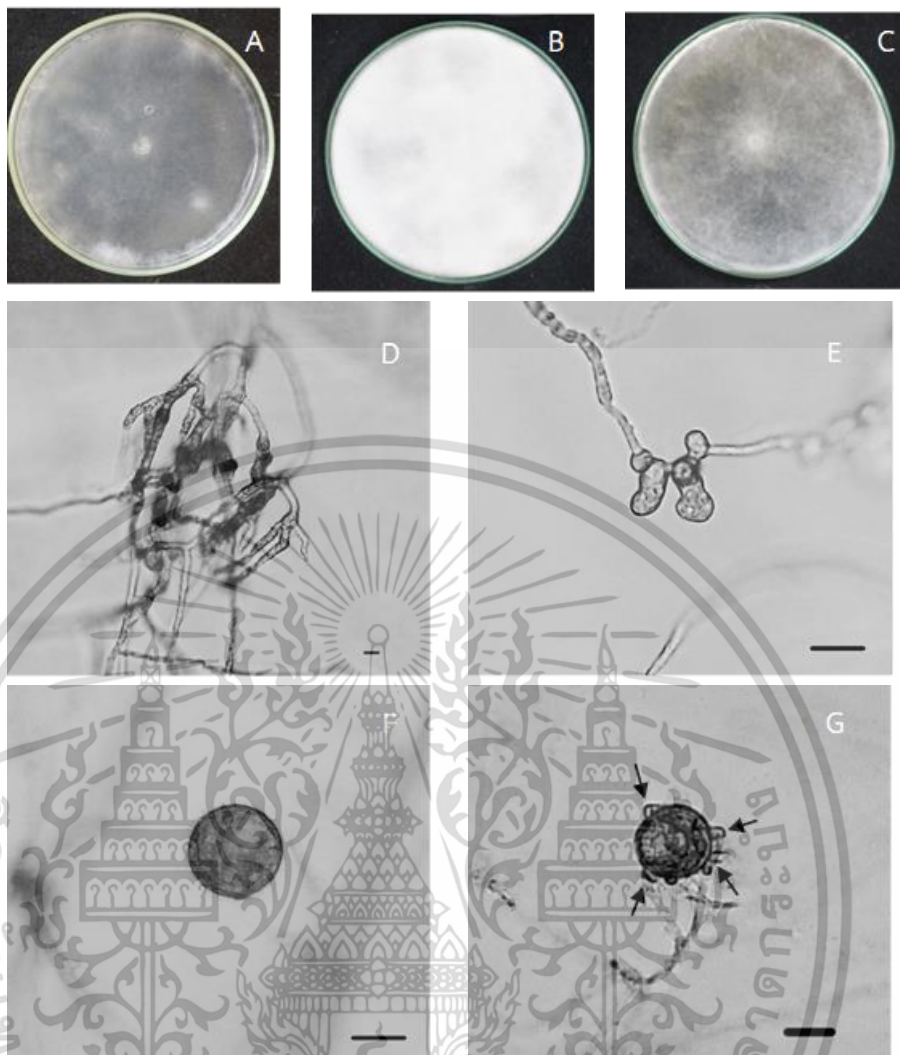
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท CHS-6, CHS-7 และ CHS-8 (*P. vexans*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 4-5 วัน; D: เส้นใยที่แตกแขนง (100×); E: pyriform sporangium (100×); F: Pyriform, sub-globose และ globose sporangium (100×); G: hyphal swelling (100×); H: limoniform sporangium (100×); I-J: การจับกันระหว่าง oogonium กับ antheridium (400×); K-L: aplerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400×: 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



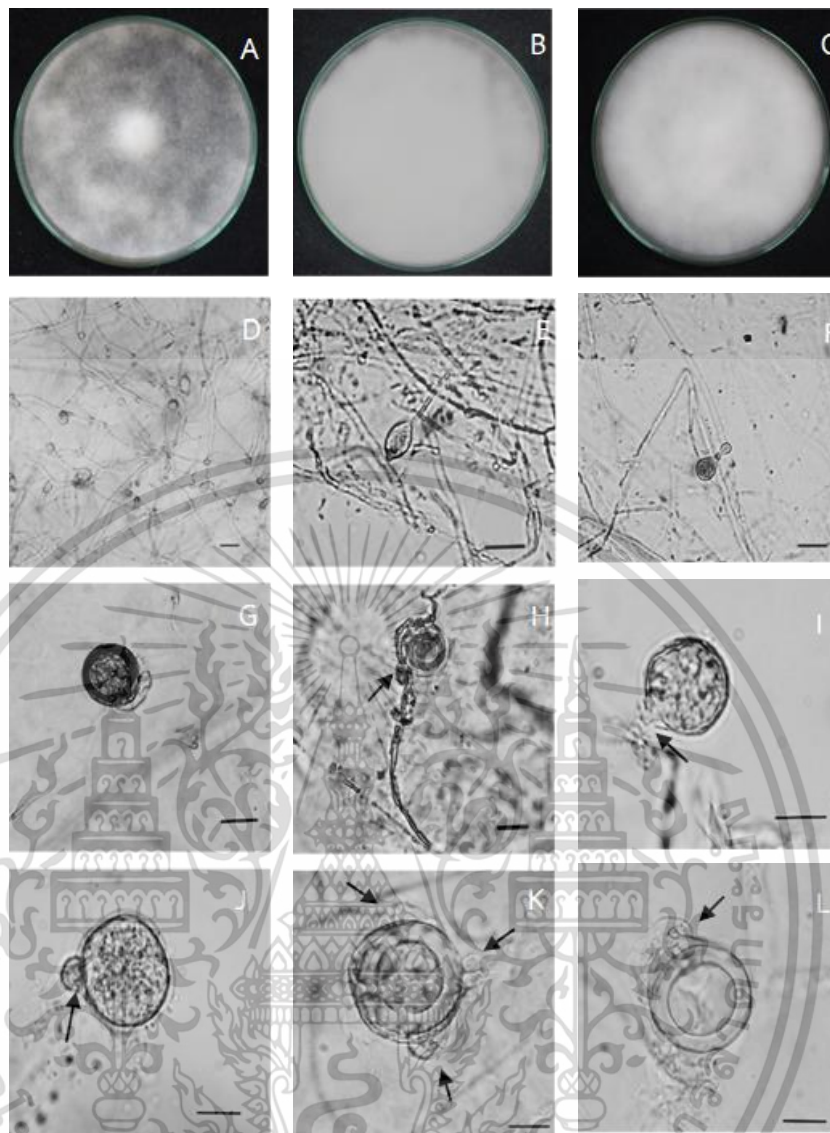
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes โอโซเลท CHS-9 และ CHS-10 (*P. catenulatum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโคเนียนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 3-4 วัน; D: filamentous sporangium (100×); E: filamentous inflated sporangium (100×); F: vesicle ที่บรรจุ zoospore ไว้ภายใน (100×); G: zoospore ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก vesicle (100×); H-I: oogonia และ antheridium (100×); J: oogonium และ antheridium (100×); K: oogonium และ antheridium; L: aplerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400×: 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



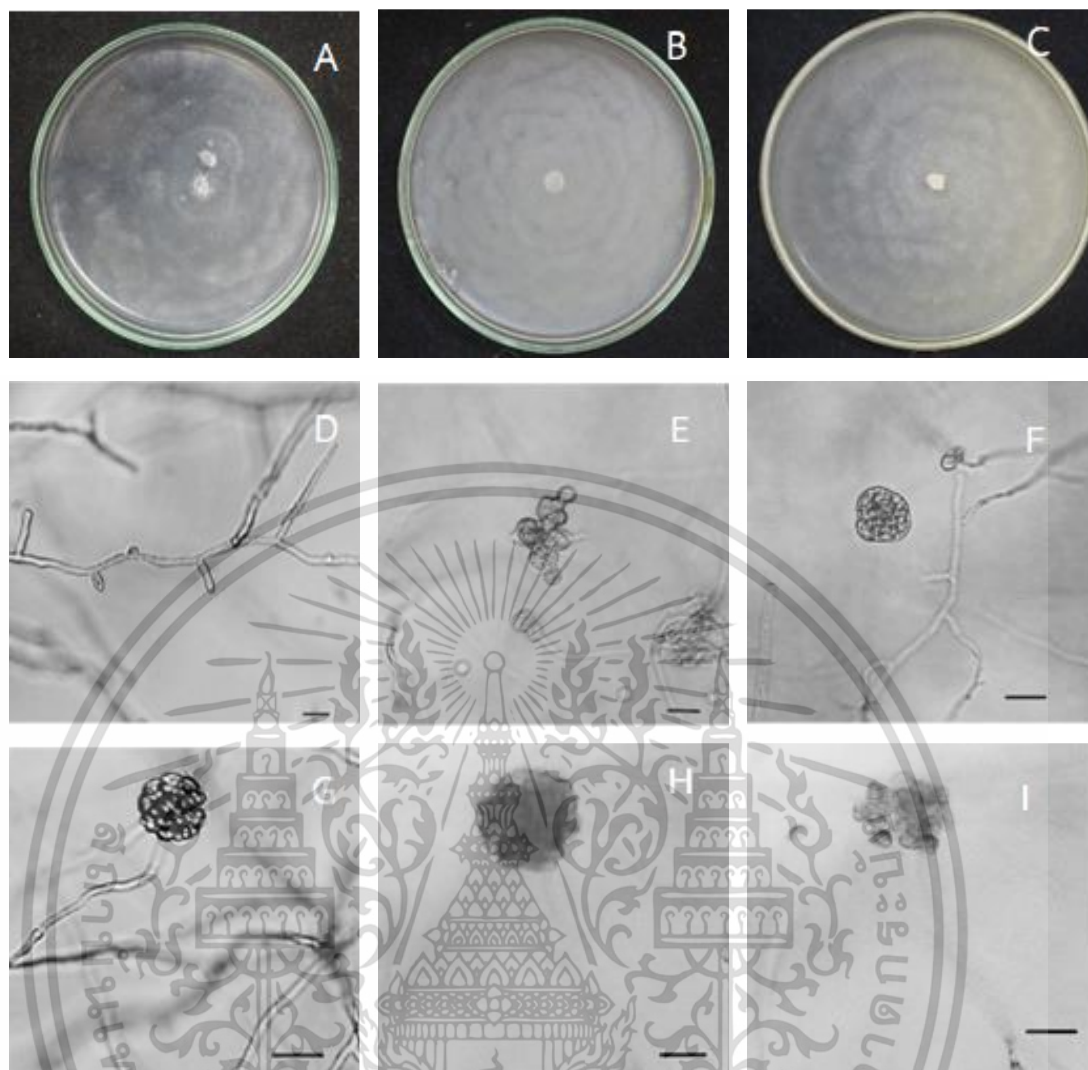
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต CHS-11 (*P. myriotylum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุ 2 วัน; D: filamentous sporangium (100×); E: filamentous inflated sporangium (100×); F: oogonia (100×); G: oogonium และ diclinous antheridium (100×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



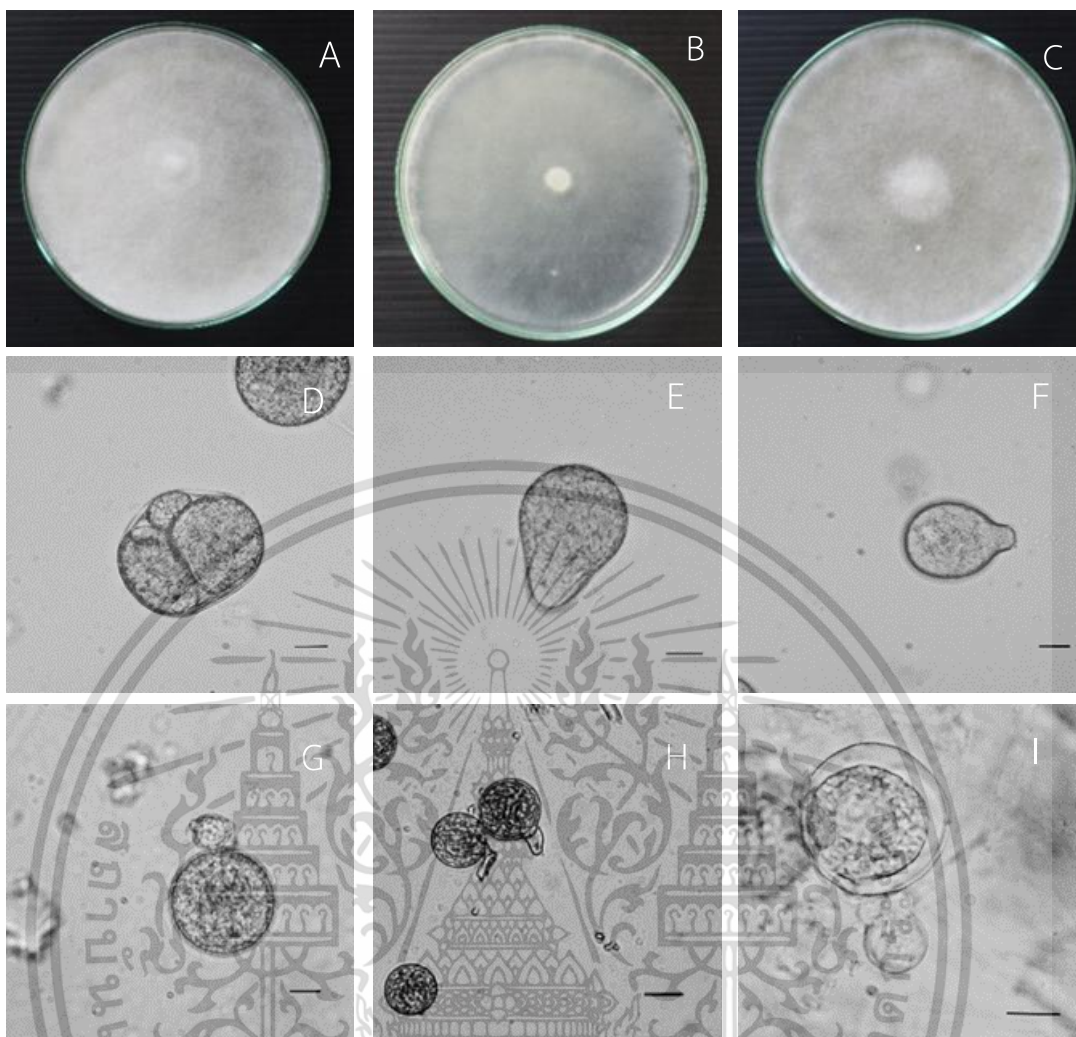
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต CHS-12 และ CHS-13 (*P. helicoides*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 3-4 วัน; D: เส้นใยที่พองบวม (10×); E: sporangium แบบ limoniform (10×); F: sporangium ที่กำลังสร้าง vesicle (100×); G: oogonium และ antheridium (100×); H-I: oogonia และ antheridium (100×; 400×); J: oogonium และ antheridium (400×); K: oospore และ antheridium; L: aplerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 10×: 20 μm; 40×: 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



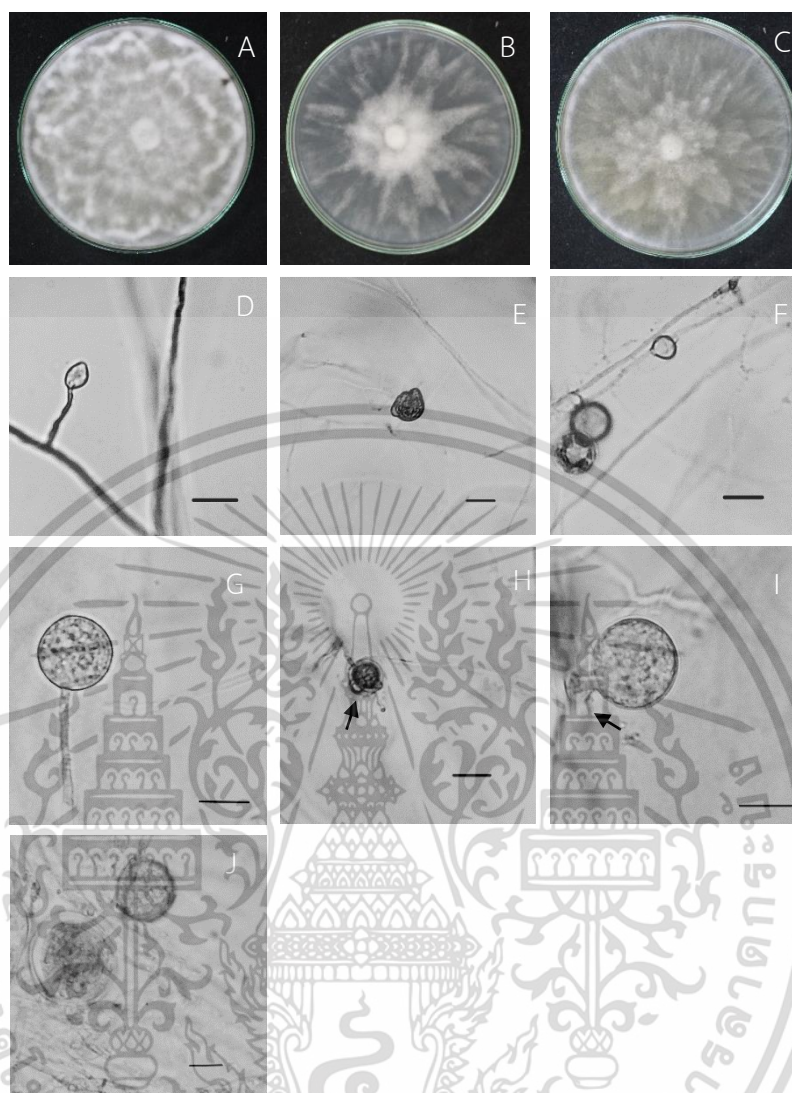
ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17 (*P. longipapillum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 3-4 วัน; D: เส้นใยของเชื้อ (100×); E: zoospores (100×); F-I: vesicle และกระบวนการปลดปล่อย zoospores (100×); (scale bars ที่ 100×: 20 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



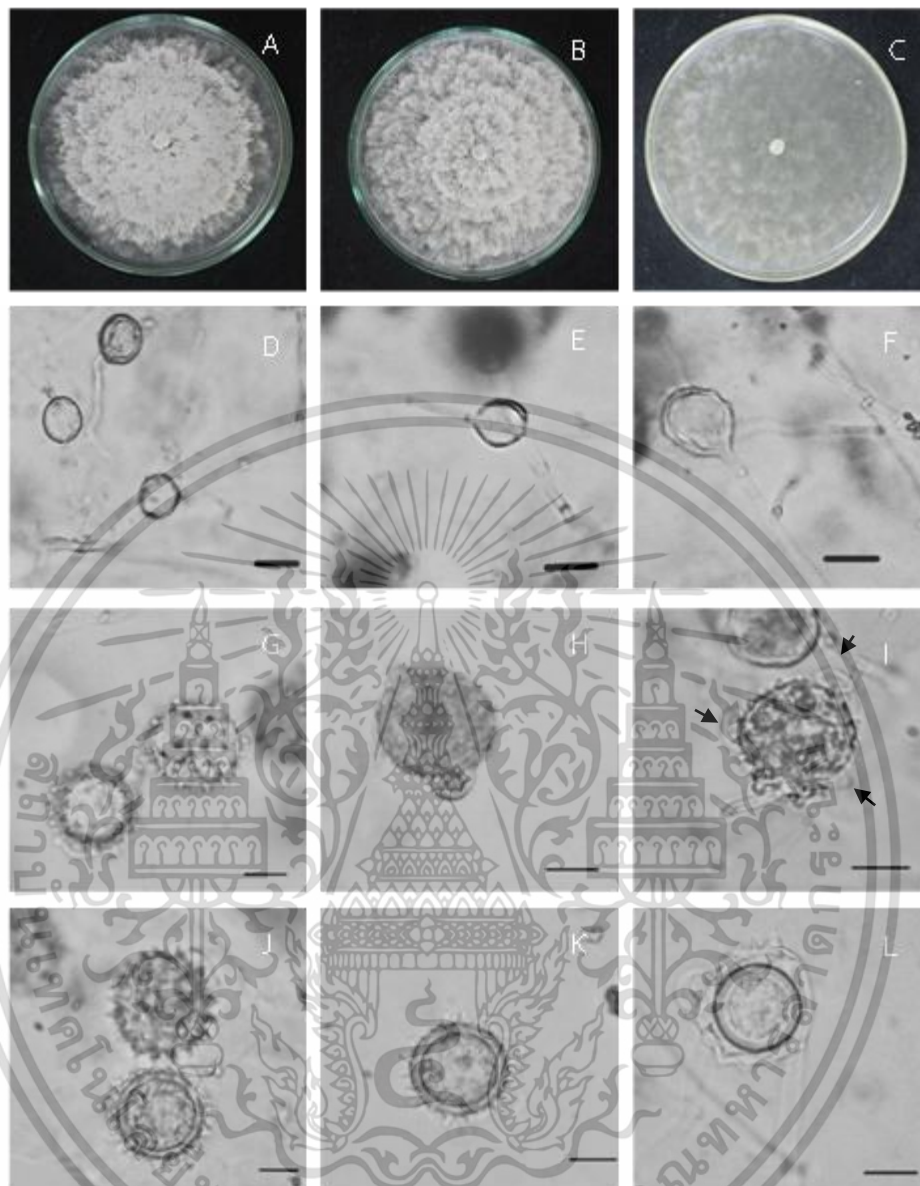
ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-1 และ RYS-3 (*G. splendens*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 2 วัน; D-F: young sporangium (100×); G-H: oogonium (100×); I: aplerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



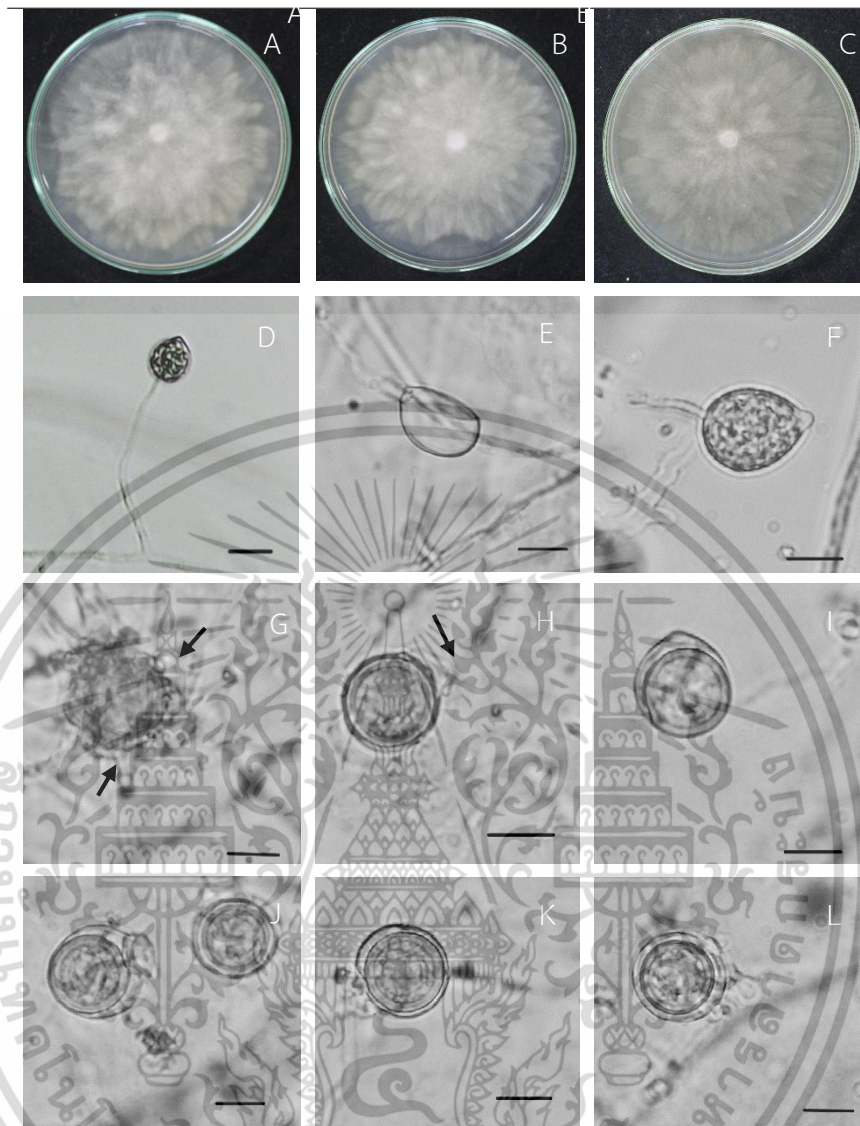
ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-2 (*P. vexans*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 2 วัน; D: sporangium (100×); E: hyphal swelling (100×); F: sporangium (100×); G: hyphal swelling (10×); H: oogonium (10×); I: oogonium และ antheridium (400×); J: oospore และ oogonium (400×) (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



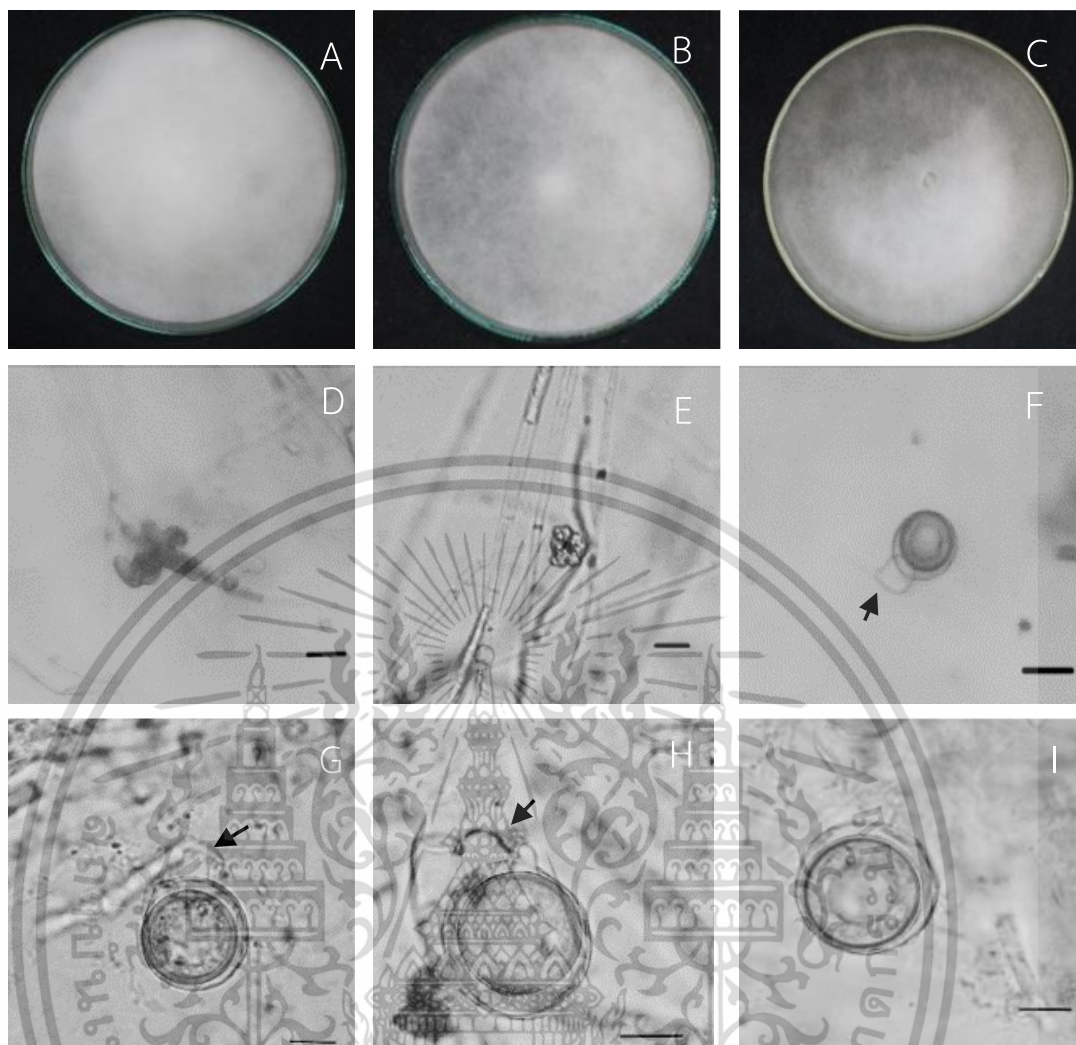
ภาพที่ 4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต RYS-4, RYS-5, RYS-6, RYS-7, RYS-18 และ RYS-19 (*P. acanthicum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 4-6 วัน; D-F: sporangium ที่วางเปล่า (100×); G-H: ornamented oogonium ที่มีหนามแหลม (400×); H: oogonium (400×); I: oogonium และ antheridium (400×); J: oospore และ oogonium; K-L plerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm ; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



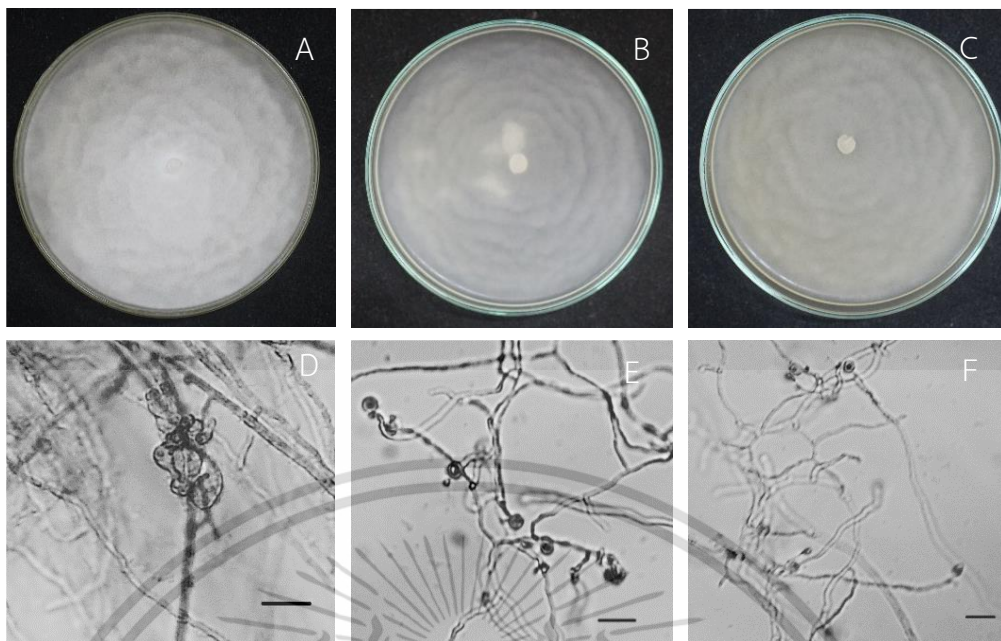
ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-8 และ RYS-20 (*P. cucurbitacearum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 5-6 วัน; D-F: pyriiform sporangium (D: 100×; E-F: 400×); G: oogonium (400×); H-L: pleurotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

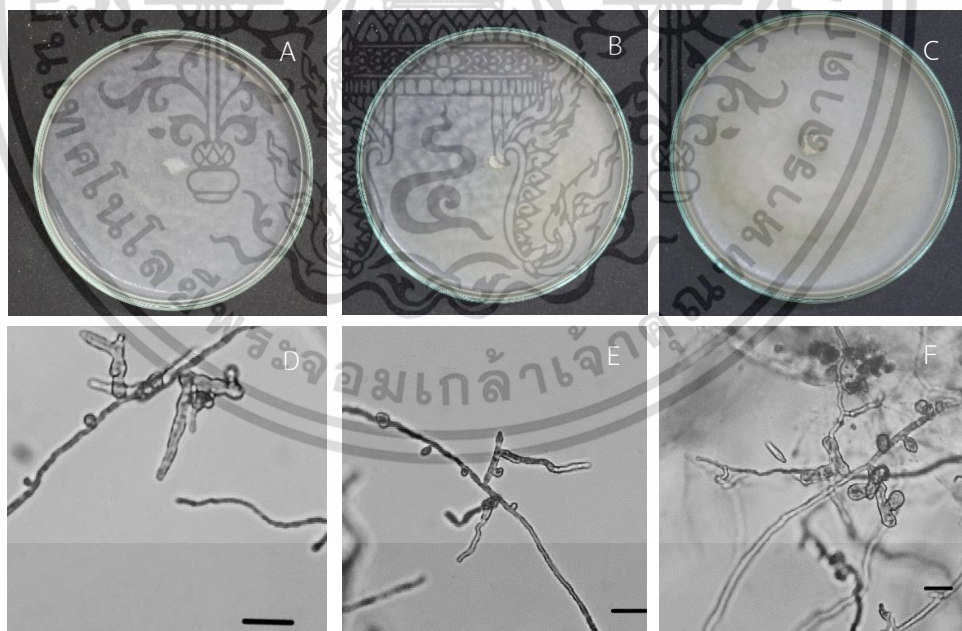


ภาพที่ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-11 (*P. deliense*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 2 วัน; D-E: zoospore และ vesicle (100×); F-G: oogonium และ antheridium (E: 100×; G: 400×); H-I: aplerotic oospore (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

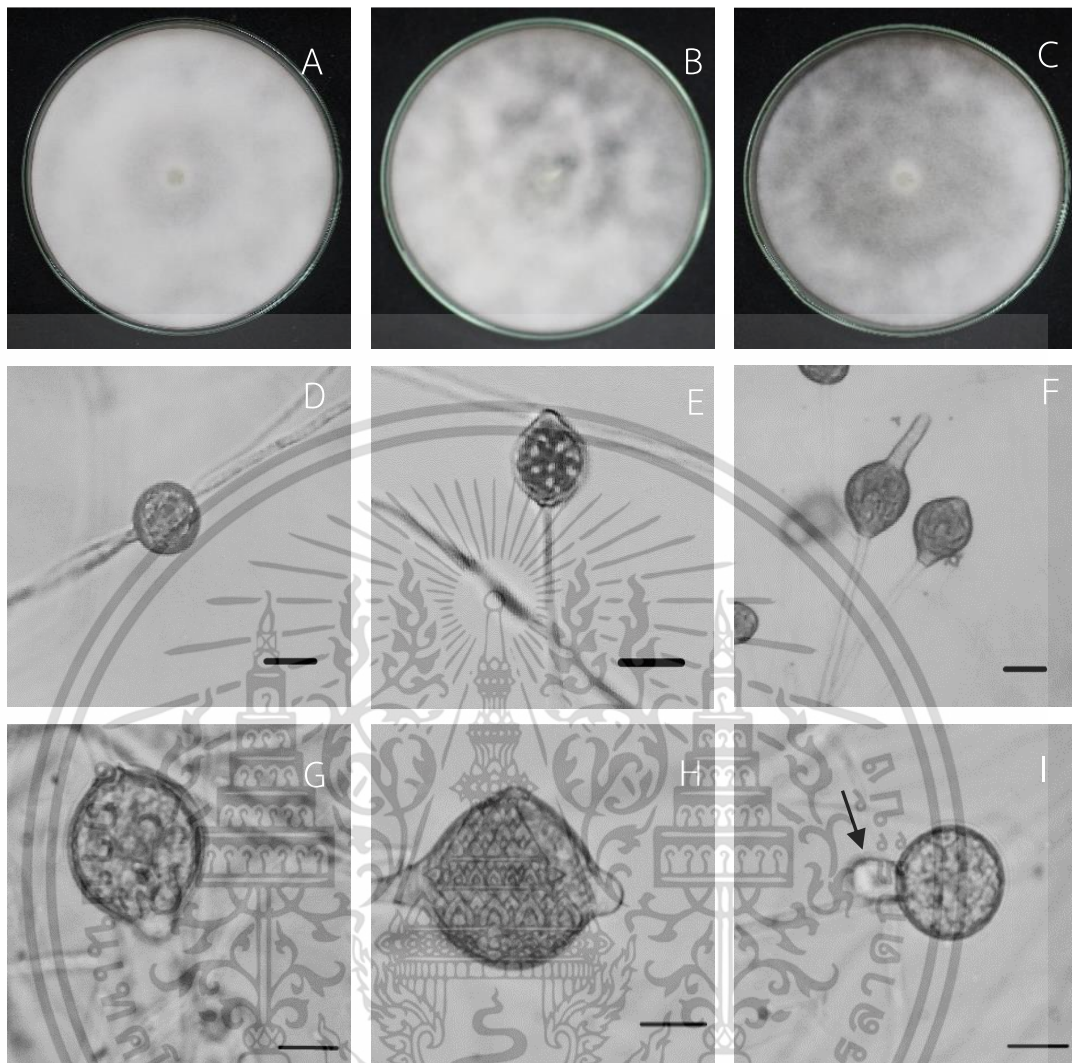


ภาพที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต RYS-14 และ RYS-16 (*P. diclinum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 4-5 วัน; D: filamentous Inflated sporangium (100×); E-F: การงอกของ zoospore (100×); (scale bars ที่ 100×: 20 μ m)



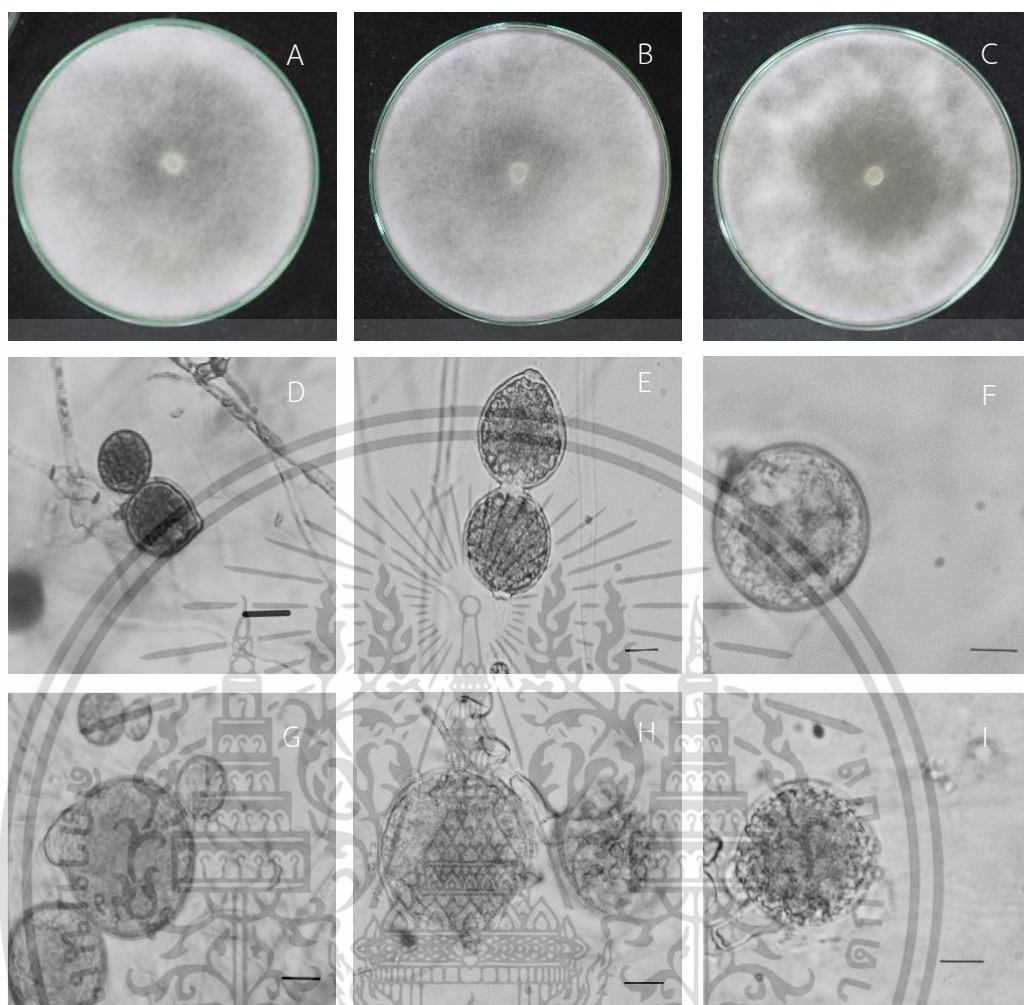
ภาพที่ 4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต RYS-10 (*P. torulosum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุ 5 วัน; D-F: filamentous inflated sporangium (100×); (scale bars ที่ 100×: 20 μ m;)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



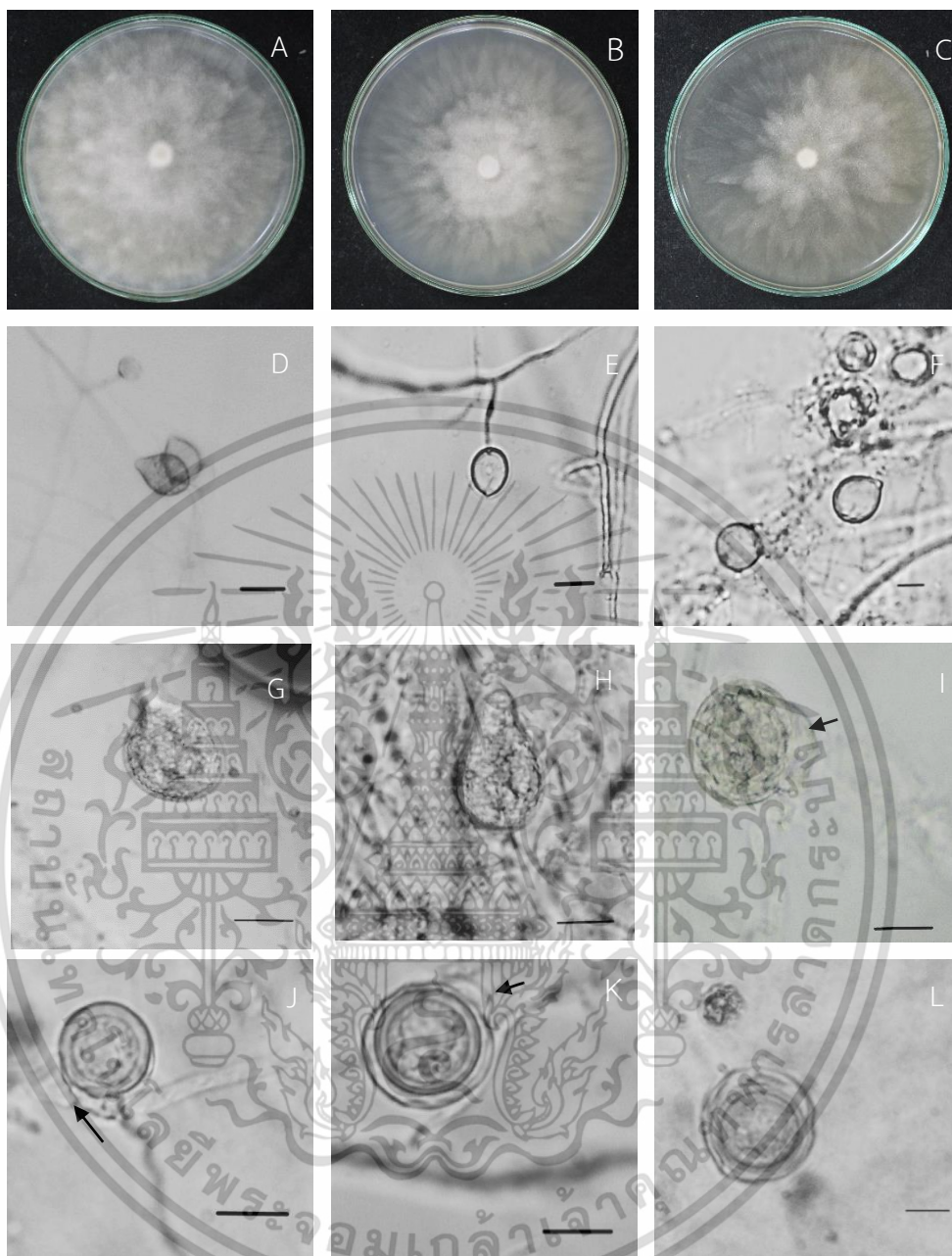
ภาพที่ 4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท RYS-9, RYS-12, RYS-13, RYS-15 และ RYS-17 (*P. helicoides*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโคเนียบอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 2 วัน; D: globose sporangium (100×); E-H: pyriform sporangium (E-F: 100×; G-H: 400×); I: oogonium และ antheridium (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9 (*G. splendens*); โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุ 2 วัน; D-E: hyphal swelling (100×); F-I: oogonium (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



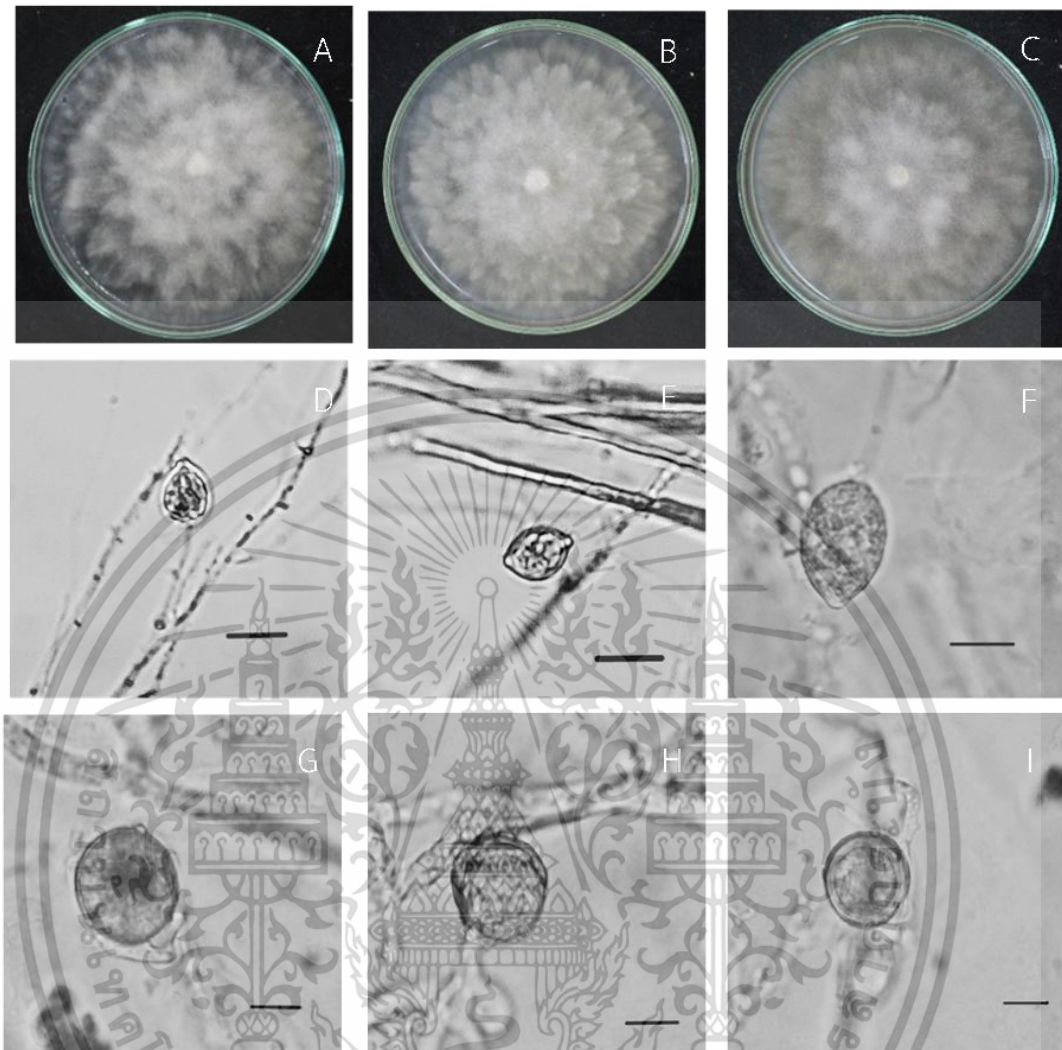
ภาพที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลต TS-2, TS-3, TS-10 และ TS-11 (*P. cucurbitacearum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุ 5 วัน ; D: pyriform sporangium (D: 100×); E-F: pyriform sporangium ที่ว่างเปล่า; G-H: obpyriform sporangium (400×); I: oogonium (400×); J-K: nearly plerotic oospore (400×); L: plerotic oospore (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm) ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



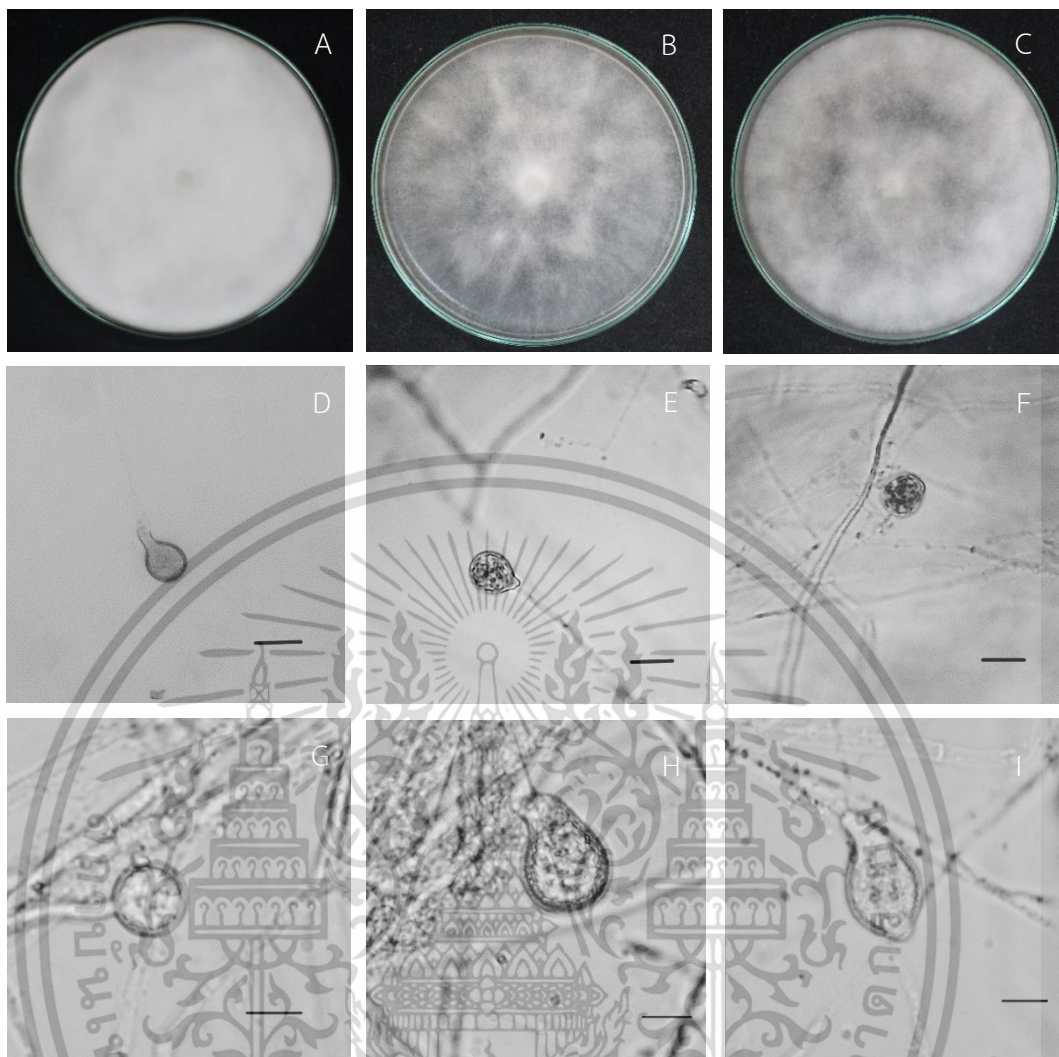
ภาพที่ 4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-4 (*P. acanthicum*); โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโคนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) อายุประมาณ 3-4 วัน; D: sporangium ที่ว่างเปล่า (40×); E-F: oogonium แบบมีหนาม (40×); G: plerotic oospore (400×); (scale bars 400× : 10 μm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



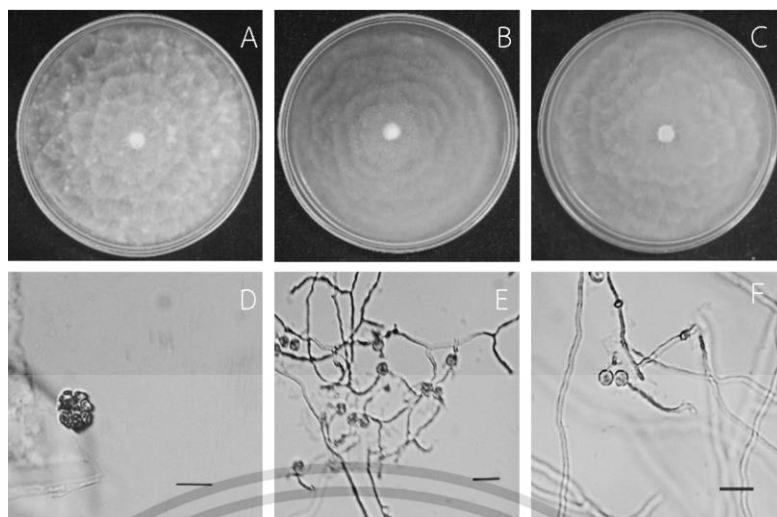
ภาพที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-7 และ TS-8 (*P. vexans*); โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) อายุ 5 วัน; D-F: pyriform sporangium (D-E: 100 \times ; F: 400 \times); G: oogonium (400 \times); H-I: aplerotic oospore (400 \times); (scale bars 100 \times : 20 μ m; 400 \times : 10 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-12 และ TS-14 (*P. helicoides*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโคนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 2-5 วัน; D-E: obpyriform sporangium (10×); F: sub-globose sporangium (100×); G: globose sporangium (400×); H-I: obpyriform sporangium (400×); (scale bars ที่ 100×: 20 μm; 400× : 10 μm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oomycetes ไอโซเลท TS-13 และ TS-15 (*P. diclinum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (A), CMA (B) และ V8 agar (C) ที่อายุประมาณ 3-4 วัน; D: vesicle (100×); E-F: encysted zoospore และ germinated zoospore (scale bars ที่ 100×: 20 μm;)

4.1.2 การจัดจำแนก *Pythium* โดยเทคนิคทางอณูวิทยา

การจัดจำแนก *Pythium* sp. โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับ ITS ด้วยการใส่ primer ITS6 และ ITS4 ของเชื้อ Oomycetes ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 52 ไอโซเลท หลังการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology; Bethesda, USA) พบว่าเชื้อที่ได้สามารถถูกจัดจำแนกได้ทั้งสิ้น 3 สกุล ได้แก่ *Globisporangium*, *Phytophythium* และ *Pythium* ซึ่งประกอบด้วย *Globisporangium splendens* (ชื่อเดิม *Pythium splendens*), *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum*, *Phytophythium cucurbitacearum* (ชื่อเดิม *Pythium cucurbitacearum*), *Pythium deliense*, *Pythium diclinum*, *Pythium longipapillum*, *Pythium myriotylum*, *Pythium torulosum*, *Phytophythium helicoides* (ชื่อเดิม *Pythium helicoides*) และ *Phytophythium vexans* (ชื่อเดิม *Pythium vexans*) (ตารางที่ 4.2)

4.1.2.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด จันทบุรี (ตารางที่ 4.2)

การเปรียบเทียบศึกษา ITS region gene tree พบว่า *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในคลาส oomycetes ที่แยกได้จำนวน 17 ไอโซเลท นั้นมีความคล้ายคลึงกับ

Globisporangium splendens โดยคล้ายคลึงประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 850-900 คู่เบส จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4 และ CHS-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phytophthium vexans โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 850-900 คู่เบส จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-6, CHS-7 และ CHS-8

Pythium catenulatum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 850-900 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-9 และ CHS-10

Pythium myriotylum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสที่ 856 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-11

Phytophthium helicoides โดยคล้ายคลึงประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 650-820 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-12 และ CHS-13

Pythium longipapillum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 750-850 คู่เบส จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17

4.1.2.2 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด ระยอง (ตารางที่ 4.2)

การเปรียบเทียบศึกษา ITS region gene tree พบว่า *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในคลาส oomycetes ที่แยกได้จำนวน 20 ไอโซเลท นั้นมีความคล้ายคลึงกับ

Globisporangium splendens โดยคล้ายคลึงประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 800-850 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-1 และ RYS-3

Phytophthium vexans โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 920 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-2

Pythium acanthicum โดยคล้ายคลึงประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 920 คู่เบส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-4, RYS-5, RYS-6, RYS-7, RYS-18 และ RYS-19

Pythium cucurbitacearum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 850 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-8 และ RYS-20

Phytophthium helicoides โดยคล้ายคลึงประมาณ 94-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 650-850 คู่เบส จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-9, RYS-12, RYS-13, RYS-15 และ RYS-17

Pythium torulosum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 870 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-10

Pythium deliense โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 823 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-11

Pythium diclinum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจาก ลำดับเบสในช่วง 780 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ RYS-14 และ RYS-16

4.1.2.3 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัด ตราด (ตารางที่ 4.2)

การเปรียบเทียบศึกษา ITS region gene tree พบว่า *Pythium* และสกุลใกล้เคียง ในคลาส oomycetes ที่แยกได้จำนวน 15 ไอโซเลท นั้นมีความคล้ายคลึงกับ

Globisporangium splendens โดยคล้ายคลึงประมาณ 95-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 800-850 คู่เบส จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9

Phytopythium cucurbitacearum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 800-900 คู่เบส จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ TS-2, TS-3, TS-10 และ TS-11

Pythium acanthicum โดยคล้ายคลึงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจาก ลำดับเบสในช่วง 859 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ TS-4

Phytopythium vexans โดยคล้ายคลึงประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบ จากลำดับเบสในช่วง 880 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ TS-7 และ TS-8

Phytopythium helicoides โดยคล้ายคลึงประมาณ 97-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับเบสในช่วง 760-790 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ TS-12 และ TS-14

Pythium diclinum โดยคล้ายคลึงประมาณ 97-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบ จากลำดับเบสในช่วง 720 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ TS-13 และ TS-15

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ITS เทียบกับฐานข้อมูล GenBank

Clade	ไอโซ เลข	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความ คล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
A	RYS-11	MT758174	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. deliense</i> MN365090.1	823	99	2/823
B	CHS-9	MW412827	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	River soil	<i>P. catenulatum</i> JX569196.1	837	99	5/836
	CHS-10	MW412828	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	River soil	<i>P. catenulatum</i> JX569196.1	769	99	2/769
	CHS-11	MW412829	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. myriotylum</i> KY019264.1	864	99	14/838
	CHS-14	MW412832	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. longipapillum</i> KX228104.1	797	99	4/762
	CHS-15	MW412833	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. longipapillum</i> KX228104.1	744	99	5/744
	CHS-16	MW412834	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. longipapillum</i> KX228104.1	856	99	4/767
	CHS-17	MW412835	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. longipapillum</i> KX228104.1	820	99	4/767

ตารางที่ 4.2 ต่อ

Clade	ไอโซเลท	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
B	RYS-10	MT758173	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Fresh water	<i>P. torulosum</i> MK015674.1	877	99	4/866
	RYS-14	MT758177	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	782	99	10/782
	RYS-16	MT758179	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	774	99	14/773
	TS-13	MW426387	Trat Province <12.35619623,102.440991>	Leaf debris (river)	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	725	98	10/716
	TS-15	MW426389	Trat Province <12.35619623,102.440991>	Leaf debris (river)	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	726	99	9/725
D	RYS-4	MT758167	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> LC332027.1	772	98	10/761
	RYS-5	MT758168	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	863	98	11/768
	RYS-6	MT758169	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	871	98	11/768
	RYS-7	MT758170	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	858	98	11/768
	RYS-18	MT758181	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	River soil	<i>P. acanthicum</i> AY598617.2	822	99	5/766

ตารางที่ 4.2 ต่อ

Clade	ไอโซเลต	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
D	RYS-19	MT758182	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	River soil	<i>P. acanthicum</i> HQ643411.1	770	98	10/753
	TS-4	MW426378	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	859	99	272/784
I	CHS-1	MW412819	Chanthaburi Province <12.7098950, 102.1804450>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> AB796308.1	806	98	14/797
	CHS-2	MW412820	Chanthaburi Province <12.7098950, 102.1804450>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> AB780629.1	803	99	17/800
	CHS-3	MW412821	Chanthaburi Province <12.7098950, 102.1804450>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> AB780646.1	791	99	2/787
	CHS-4	MW412822	Chanthaburi Province <12.7098950, 102.1804450>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> HQ237486.1	834	99	3/821
	CHS-5	MW412823	Chanthaburi Province <12.7098950, 102.1804450>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> EU781675.1	822	99	5/814
	RYS-1	MT758164	Rayong Province <12.85099178, 101.55733498>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> AY598655.2	853	99	23/825
	RYS-3	MT758166	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. splendens</i> KU724186.1	793	99	2/792
	TS-1	MW426375	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> HQ237486.1	809	99	1/806

ตารางที่ 4.2 ต่อ

Clade	ไอโซเลต	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
I	TS-5	MW426379	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> HQ237486.1	824	99	5/818
	TS-6	MW426380	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. splendens</i> AB796287.1	800	95	26/778
	TS-9	MW426383	Trat Province <12.35619623,102.440991>	River soil	<i>P. splendens</i> EU781675.1	818	99	1/815
K	CHS-6	MW412824	Chanthaburi Province <12.711564, 102.177968>	Forest soil	<i>P. vexans</i> KP183941.1	824	99	27/818
	CHS-7	MW412825	Chanthaburi Province <12.573183, 101.903589>	Mangrove soil	<i>P. vexans</i> KP183944.1	831	99	29/825
	CHS-8	MW412826	Chanthaburi Province <12.573183, 101.903589>	Mangrove soil	<i>P. vexans</i> KP183944.1	827	99	30/821
	CHS-12	MW412830	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	824	100	2/824
	CHS-13	MW412831	Chanthaburi Province <12.711763, 102.181276>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> MG597190.1	679	99	1/679
	RYS-2	MT758165	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. vexans</i> MK011121.1	922	99	17/898
	RYS-8	MT758171	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	856	99	5/855

ตารางที่ 4.2 ต่อ

Clade	ไอโซเลท	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
K	RYS-9	MT758172	Rayong Province <12.849345, 101.555479>	Forest soil	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	797	99	2/797
	RYS-12	MT758175	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT595686.1	656	97	9/641
	RYS-13	MT758176	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KY084740.1	793	95	44/775
	RYS-15	MT758178	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	819	99	3/818
	RYS-17	MT758180	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	841	99	1/841
	RYS-20	MT758183	Rayong Province <12.776806, 101.714779>	River soil	<i>P. cucurbitacearum</i> MK416211.1	868	100	4/868
	TS-2	MW426376	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	904	99	5/904
	TS-3	MW426377	Trat Province <12.3554343,102.44117412>	Orchard soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	790	99.	3/790

ตารางที่ 4.2 ต่อ

Clade	ไอโซเลต	GenBank Accession no.	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Hits	Sequence length (bp)	ความ คล้ายคลึง (%)	Variation ratio (Different/Total)
K	TS-7	MW426381	Trat Province <12.15233197,102.53187095>	Forest soil	<i>P. vexans</i> MT647272.1	882	99	12/877
	TS-8	MW426382	Trat Province <12.15233197,102.53187095>	Forest soil	<i>P. vexans</i> KP183940.1	885	99	29/878
	TS-10	MW426384	Trat Province <12.35619623,102.440991>	River soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	904	99	2/904
	TS-11	MW426385	Trat Province <12.35619623,102.440991>	River soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	821	100	0/821
	TS-12	MW426386	Trat Province <12.35619623,102.440991>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	796	98	11/781
	TS-14	MW426388	Trat Province <12.35619623,102.440991>	Leaf debris (river)	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	766	99	2/761

4.1.3 ความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ

จากการนำข้อมูลสายวิวัฒนาการของเชื้อทุกไอโซเลทมาจัดกลุ่มให้อยู่ในคลด A ถึง K โดยอ้างอิงจากรายงานของ Lévesque and de Cock (2004) ผลการวิเคราะห์พบว่าอยู่ในคลด A, B, D, I และ K เป็นจำนวน 1, 12, 7, 11 และ 21 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2; ภาพที่ 4.21-4.23) ดังนี้

Clade A

Pythium sp. ที่พบในคลด A มีเพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้น นั่นคือ RYS-11 ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจากจังหวัดระยอง (ตารางที่ 4.2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลอ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Pythium deliense* S3-Iraq (MN365090.1) มากที่สุด โดยไอโซเลทนี้จะสร้าง sporangium แบบเส้นใยพองบวม (inflated filamentous sporangium) และสร้าง oospore ผนังเรียบแบบ aplerotic (ภาพที่ 4.11, ตารางที่ 4.1) โดย *P. deliense* มีหลายรายงานที่อ้างถึงว่าสามารถก่อให้เกิดโรคได้กับพืชหลายชนิด และพบได้ในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น (Watanabe, 1981) ไทย (Intaparn *et al.*, 2019) ปากีสถาน (Lodhi *et al.*, 2004) หรืออียิปต์ (Gherbawy *et al.*, 2005) สำหรับสปีชีส์อื่น ๆ ในคลดนั้นนอกจาก *P. deliense* พบว่าส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ (water-borne species) (Choudhary *et al.*, 2016; Nam and Choi, 2019) โดยสันนิษฐานว่าคลดนี้อาจเป็นคลดแรกเริ่ม ที่วิวัฒนาการมาจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสาหร่าย (early divergence)

Clade B

ในคลดนี้ พบเชื้อจำนวน 5 สปีชีส์ คือ *P. catenulatum*, *P. myriotylum*, *P. longipapillum*, *P. torulosum* และ *P. diclinum* (ตารางที่ 4.2) จำนวนทั้งหมด 12 ไอโซเลท ได้แก่ CHS-9, CHS-10, CHS-11, CHS-14, CHS-15, CHS-16, CHS-17 (ภาพที่ 4.21), RYS-10, RYS-14, RYS-16 (ภาพที่ 4.22), TS-13 และ TS-15 (ภาพที่ 4.23) แต่ละสายพันธุ์มีลำดับ ITS ที่คล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์อ้างอิง นั่นคือ โดยไอโซเลท CHS-9 และ CHS-10 มีความคล้ายคลึงกับ *P. catenulatum* (JX569196.1) ที่ 99% โดยแตกต่างกันที่ 5 จาก 836 และ 2 จาก 796 คู่เบสตามลำดับ ไอโซเลท CHS-11 มีความคล้ายคลึงกับ *P. myriotylum* (KY019264.1) ที่ 99% มีความแตกต่างที่ 14 จาก 838 คู่เบส ไอโซเลท CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17 มีความคล้ายคลึงกับ *P. longipapillum* (KX228104.1) ประมาณ 99% มีความแตกต่างประมาณ 4-5 เบส จากประมาณ 770 คู่เบส ในขณะที่ ไอโซเลท RYS-10, RYS-14, RYS-16, TS-13 และ TS-15 นั้นมีความคล้ายคลึงกับ *P. diclinum* (MK015676.1) ที่ 98-99% โดยมีความแตกต่างทางลำดับเบสที่ 4, 10, 14, 10 และ 9 เบส จาก 866, 782, 773, 716 และ 725 คู่เบส ตามลำดับ

คลดนี้ประกอบด้วย *Pythium* ที่อาศัยอยู่ในน้ำคล้ายกับคลด A (Lévesque and de Cock 2004; Nam and Choi 2019) ซึ่งนับเป็นคลดที่ใหญ่ที่สุดเทียบกับคลดอื่นๆ โดย *Pythium* ในคลด B

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นสร้าง sporangium ลักษณะคล้ายเส้นใยแบบพองบวม อย่างไรก็ตาม Lévesque and de Cock (2004) ได้แบ่งสิ่งมีชีวิตนี้ลงไปอีกเป็น 2 เกลดย่อย (subclade B1 และ B2) และในเกลดย่อยนั้นก็จะแบ่งแยกลงไปได้อีก โดยในการศึกษานี้ มี 4 ไอโซเลทที่อยู่ในเกลดย่อย B1 นั่นคือ *P. catenulatum*, *P. torulosum* และ *P. myriotylum* สำหรับ *Pythium* ไอโซเลท CHS-9 และ CHS-10 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Pythium catenulatum* JX569196.1 ที่ 99% โดยแตกต่างกันที่ 5 และ 2 คู่เบส จากจำนวน 836 และ 769 คู่เบส ตามลำดับ โดยพบโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ (filamentous sporangium และ plerotic oospore) (ภาพที่ 4.3, ตารางที่ 4.1) ในขณะที่ *Pythium* ไอโซเลท RYS-10 มีความใกล้เคียงกับ *P. torulosum* MK015674.1 ที่ 99% โดยมีความแตกต่างอยู่ที่ 4 คู่เบส จากทั้งหมด 866 คู่เบส อย่างไรก็ตามระหว่างที่ทำการศึกษพบว่าไอโซเลทดังกล่าวทำการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น (ภาพที่ 4.13) นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าไอโซเลท CHS-9 กับ CHS-10 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่เป็น monophyletic โดยมีค่า bootstrap ที่ 100% (ภาพที่ 4.21)

มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่าสามารถแยก *P. catenulatum* ได้จากหลายพื้นที่ เช่น พื้นที่ชลประทานในประเทศสเปน (Sanchez and Gallego, 2001) ทะเลสาบในประเทศเยอรมัน (Wielgoss et al., 2009) โอมาน (Al-Balushi et al., 2018) พื้นที่เพาะปลูกในโอไฮโอ (Dorrance et al., 2004) หรือจากเขื่อนกักเก็บน้ำในประเทศไทย (Kammarnjesadakul et al., 2011) *Pythium* ไอโซเลท CHS-11 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium myriotylum* KY019264.1. มากที่สุดที่ 99% โดยมีความแตกต่าง 14 คู่เบส จากทั้งหมด 838 คู่เบส เชื้อไอโซเลทนี้สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (ภาพที่ 4.4, ตารางที่ 4.1) โดยมีหลายรายงานที่กล่าวว่า *P. myriotylum* นั้นเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญในพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น โรครากเน่าในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (Koochakan et al., 2008) แดงกวา (Al-Balushi et al., 2017) ยาสูบ (Mufunda et al., 2017) และจิง (Le et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการพบทั้ง *P. catenulatum* และ *P. myriotylum* ในแม่น้ำได้อีกด้วย (Czeczuga et al., 2003).

Pythium ในเกลดย่อย B2 ที่ทำการศึกษานี้มีอยู่ทั้งหมด 7 ไอโซเลท ได้แก่ *P. diclinum* และ *P. longipapillum* โดยสามารถแยกมาได้จากทั้งสามจังหวัด (จันทบุรี ระยอง และตราด) เกลดย่อยนี้สร้าง sporangium แบบเส้นใยลักษณะไม่พองบวม (filamentous non-inflated) หรือพองบวมเล็กน้อย (slightly inflated sporangium) และสร้าง oogonia แบบเรียบ โดย *Pythium* ไอโซเลท CHS14, CHS15, CHS-16 และ CHS-17 จะแยกได้จากจังหวัดจันทบุรี และมีชื่อสปีชีส์ว่า *P. longipapillum* KX228104.1 ซึ่งเป็นสปีชีส์ใหม่ที่ค้นพบในปี 2019 และมีเพียงรายงานเดียวที่สามารถแยกได้จากพื้นที่ปลูกข้าว (*Oryza sativa*) ของประเทศอิหร่าน (Salmaninezhad and Mostowfzadeh-Ghalamfarsa, 2019) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่านี่อาจเป็นรายงานแรกของการ

ค้นพบ *P. longipapillum* ในประเทศไทย หรืออาจจะเป็นรายงานแรกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ก็ได้ ซึ่งทุกไอโซเลทที่พบในประเทศไทยพบแต่การสร้างส่วนขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศคือสปอร์แรงเจียมคล้ายเส้นใย (filamentous sporangium) โดยยังไม่พบการสร้างส่วนขยายพันธุ์โดยใช้เพศแต่อย่างใด ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า ไอโซเลท CHS-14, CHS-15, CHS-16 และ CHS-17 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.6) และมีค่า bootstrap support ในระดับสูง (ภาพที่ 4.21) และมีข้อสังเกตอีกประการหนึ่งว่าทุกไอโซเลทของ *P. longipapillum* ที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับ *P. diclinum* ด้วย ซึ่งหมายความว่านอกจากการที่ทั้ง 2 สปีชีส์จะมีความใกล้ชิดกันมาก ก็อาจจะเป็นไปได้ว่าทั้ง *P. longipapillum* และ *P. diclinum* เป็น *Pythium* สปีชีส์เดียวกัน (conspecific) โดยงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสปีชีส์ดังกล่าวนี้ยังมีอยู่น้อย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Clade D

Pythium ในคลัดนี้มีจำนวนทั้งหมด 7 ไอโซเลท โดยสามารถแยกได้จากดินป่า แม่น้ำ และพื้นที่เพาะปลูกจากจังหวัดระยองและจังหวัดตราด (RYS-4, RYS-5, RYS-6, RYS-7, RYS-18, RTS-19 และ TS-14) โดยทุกไอโซเลทที่ได้มีความใกล้เคียงกับ *P. acanthicum* (ภาพที่ 4.21-4.23) โดยจะทำการสร้าง oospores ที่มีหนามแหลม (ornamented oospore ที่มีหนามแบบ acute spines) (Van der Plaats-Niter, 1981) นอกจากนี้ *Pythium* ในคลัดนี้ (*P. acanthicum*, *P. oligandrum*, *Pythium periplocum*, *Pythium amasculinum* และ *Pythium hydno sporum*) บางชนิดเป็นปรสิตในเชื้อรา (mycoparasites) หรือ oomycetes ชนิดอื่น ๆ (Deacon and Henry, 1978; Ali-Shtayah *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีรายงานกล่าวว่าบางไอโซเลทของ *P. acanthicum* นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (Allain-Boule *et al.*, 2004) หรือก่อโรคได้น้อย (Sewell, 1981) แต่ก็มีบางไอโซเลทสามารถเป็นเชื้อสาเหตุฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) และก่อให้เกิดโรครุนแรงในพืชบางชนิดได้ (Robertson, 1973)

Clade I

พบเชื้อในกลุ่มนี้จำนวน 11 ไอโซเลท นั่นคือ CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4, CHS-5, RYS-1, RYS-3, TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9 ทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกับ *P. splendens* (ตารางที่ 2) โดยสามารถแยกได้จากทั้ง 3 จังหวัด *P. splendens* เป็นสปีชีส์ที่ต้องการเซลล์สืบพันธุ์จากเชื้อสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (heterothallic species) และไม่พบการสร้าง sporangium มีเพียง *P. ultimum* เท่านั้นที่เป็น homothallic species ที่มีการสร้าง sporangium (Levesque and De Cock, 2004) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน *Pythium* ในคลัด I ได้ถูกเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Globisporangium* เนื่องมาจากการสร้าง sporangium แบบกลม (globose sporangia) (Uzuhashi *et al.*, 2010; Uzuhashi

et al., 2019) ทำให้หลายสปีชีส์ในคลัดนี้เช่น *P. ultimum*, *P. splendens*, *P. violae* and *P. heterothallicum* ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Globisporangium ultimum*, *Globisporangium splendens*, *Globisporangium violae* และ *Globisporangium heterothallicum* ตามลำดับ (Uzhashi et al., 2010) นอกจากนี้ บางสปีชีส์ในคลัด E ก็ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Globisporangium* ด้วยเช่นกัน (Uzhashi et al., 2019)

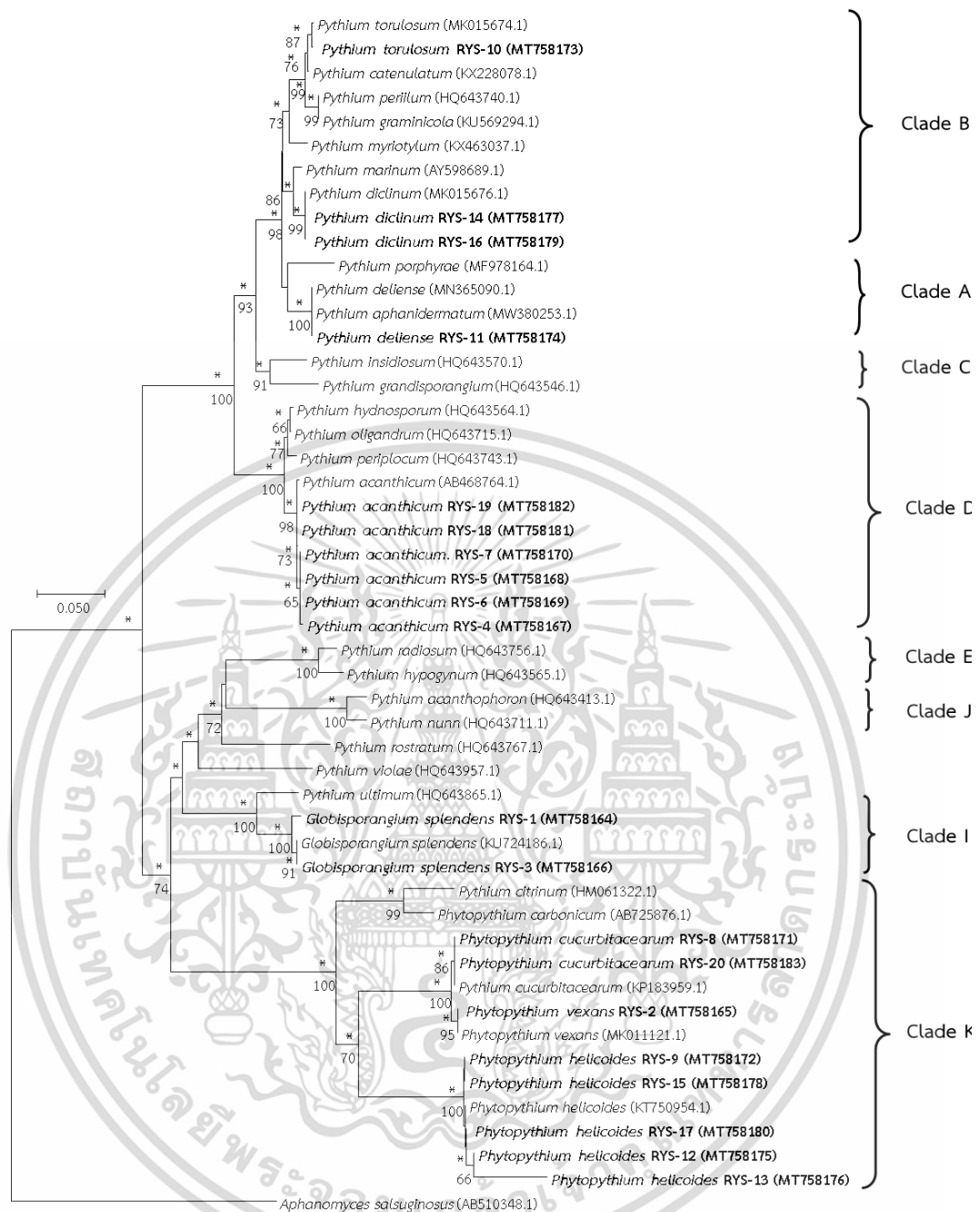
Clade K

ในการศึกษานี้สามารถแยก *Pythium* ที่อยู่ในคลัด K ได้ทั้งหมด 3 สปีชีส์ นั่นคือ *P. cucurbitacearum*, *P. helicoides* และ *P. vexans* โดยมีจำนวนทั้งหมด 6, 8 และ 5 ไอโซเลตตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) โดยสามารถแยกมาได้จากทุกจังหวัดยกเว้น *P. cucurbitacearum* สำหรับ *P. vexans* นั้นสามารถพบได้ในทุกๆ แหล่งยกเว้นดินในพื้นที่ทำการเกษตร ในขณะที่ *P. helicoides* นั้นถูกพบได้ในดินป่า ดินแม่น้ำ ยกเว้นดินป่าชายเลนและดินเกษตร ตัวอย่างสำหรับรายงานการค้นพบ *Phytophythium* เช่น รายงานของ Bennett et al. (2018) ที่กล่าวว่าได้ค้นพบ *P. helicoides* จากเศษซากพืชในป่าชายเลน ในขณะที่ในประเทศไทยนั้นมีการพบ *P. cucurbitacearum* ทั้งในดินเพาะปลูกและพืชอาศัย (Suksiri et al., 2018; Hattapanichaporn et al., 2020)



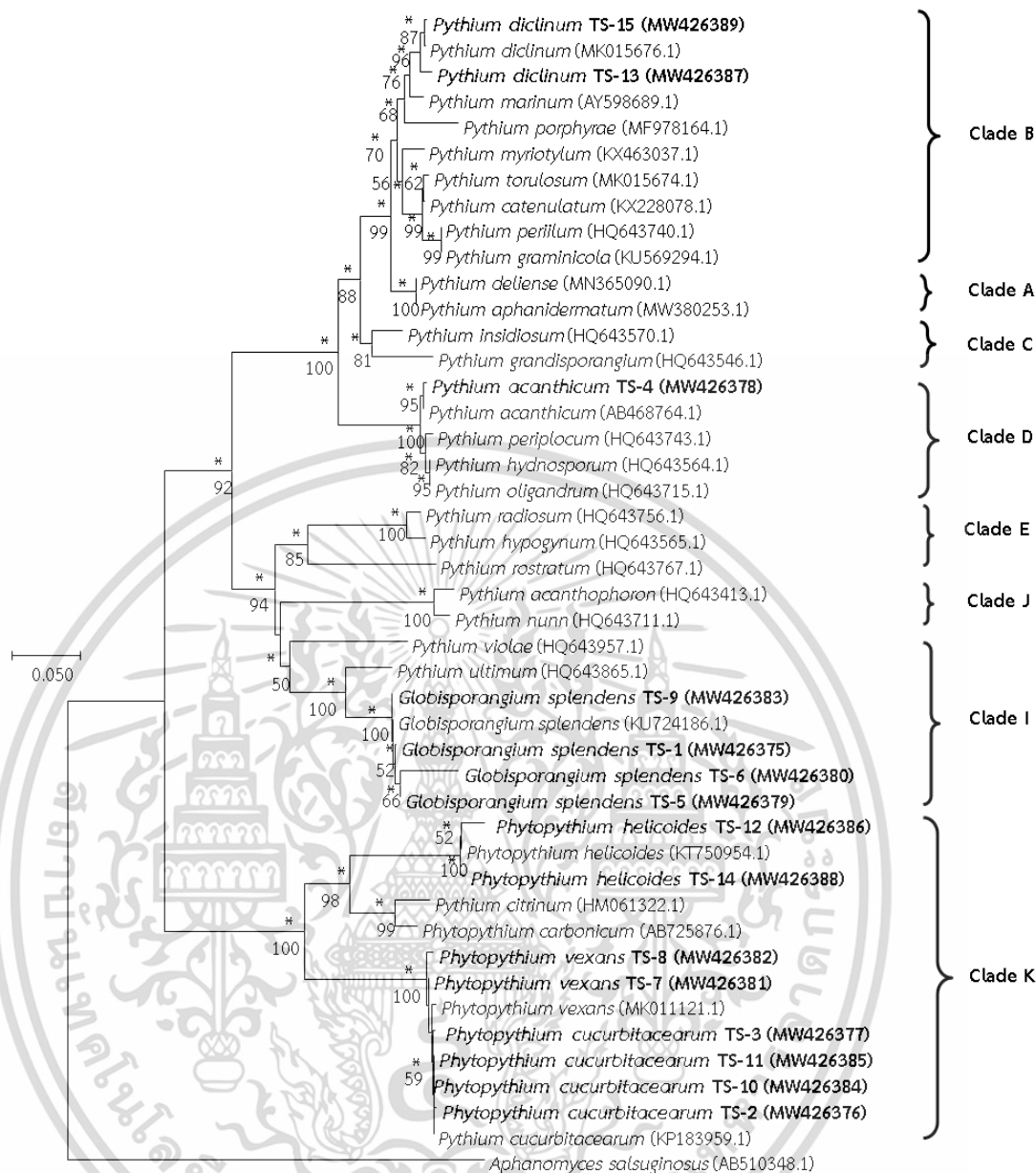
ภาพที่ 4.21 แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดจันทบุรี โดยใช้อัลกอริทึม Neighbour-joining, maximum-likelihood และ maximum-parsimony แต่จะแสดงผลเฉพาะแผนภูมิที่ได้จาก Neighbour-joining กิ่งก้านที่พบจากแผนภูมิอื่นๆจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายดอกจัน แต่แต่ละเคลดจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายวงเล็บปีกกา ตัวเลขที่แสดงบน node บ่งบอกถึงค่า bootstrap support ที่ 1000 ซ้ำ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aphanomyces salsuginosus* เป็น outgroup แถบ scale bar แสดงให้เห็นถึงการแทนที่เบส ที่ 0.05 เบสต่อนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดระยอง โดยใช้อัลกอริทึม Neighbour-joining, maximum-likelihood และ maximum-parsimony แต่จะแสดงผลเฉพาะแผนภูมิที่ได้จาก Neighbour-joining กิ่งก้านที่พบจากแผนภูมิอื่นๆจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายดอกจัน แต่ละเคลดจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายวงเล็บปีกกา ตัวเลขที่แสดงบน node บ่งบอกถึงค่า bootstrap support ที่ 1000 ซ้ำ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aphanomyces salsuginosus* เป็น outgroup แถบ scale bar แสดงให้เห็นถึงการแทนที่เบส ที่ 0.05 เบสต่อนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.23 แผนภูมิวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับ ITS ของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงจากจังหวัดตราด โดยใช้อัลกอริทึม Neighbour-joining, maximum-likelihood และ maximum-parsimony แต่จะแสดงผลเฉพาะแผนภูมิที่ได้จาก Neighbour-joining กิ่งก้านที่พบจากแผนภูมิอื่นๆจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายดอกจัน แต่ละเคลดจะถูกระบุด้วยเครื่องหมายวงเล็บปีกกา ตัวเลขที่แสดงบน node บ่งบอกถึงค่า bootstrap support ที่ 1000 ซ้ำ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aphanomyces salsuginosus* เป็น outgroup แถบ scale bar แสดงให้เห็นถึงการแทนที่เบส ที่ 0.05 เบสต่อนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

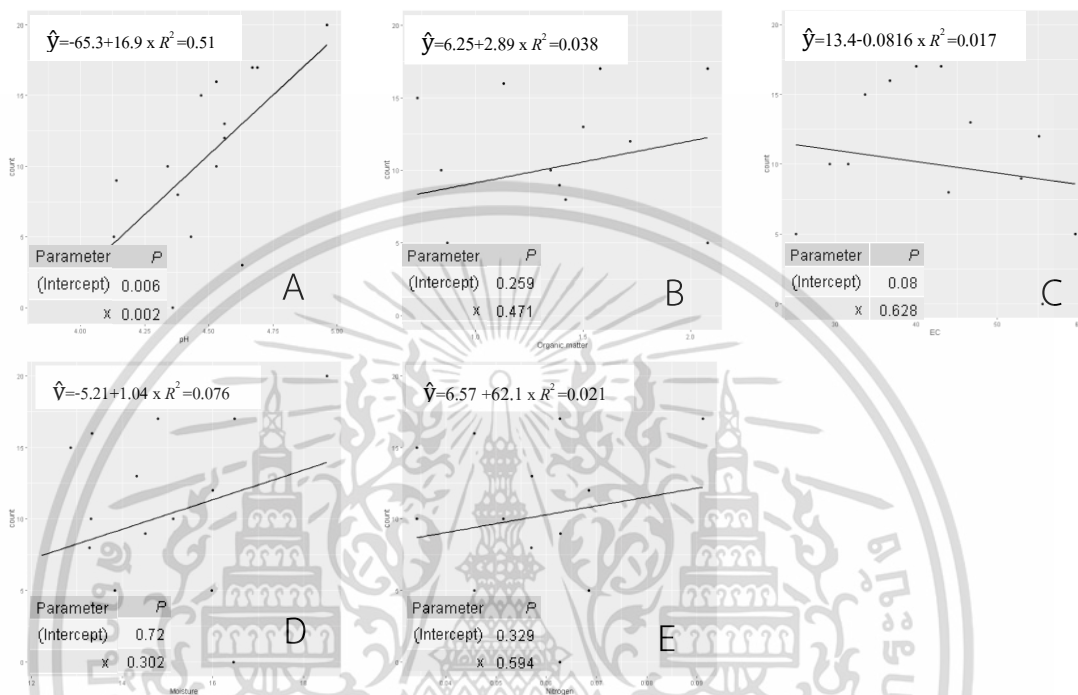
4.1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Pythium* และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

การวิเคราะห์ด้วย linear-regression บนสมการ $Y = a + bx$ โดย $Y =$ ปริมาณเชื้อ (ตัวแปรตาม) $a =$ ค่าคงที่ $b =$ อัตราความเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อจากระดับของปัจจัยทางสภาพแวดล้อม (ค่าความชันของเส้นกราฟ) และ $x =$ ปัจจัยทางสภาพแวดล้อม (ตัวแปรอิสระ) ทำการหาเส้นตรงที่เหมาะสมและเป็นตัวแทนของข้อมูล (best fit) ด้วยโปรแกรม R จากข้อมูลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่แล้วความเป็นกรด-ด่างภายในดินนั้นมีผลต่อการกระจายตัวของ *Pythium* ในระดับปานกลาง เชื้อที่สามารถพบและตรวจนับได้ คือ *G. splendens*, *P. acanthicum* และ *P. cucurbitacearum* โดย *G. splendens* ไอโซเลท RYS-1, RYS-3 และ TS-1 จะมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.51, 0.38 และ 0.34 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.24 – 4.26) เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ p-value (<0.05) พบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.002, 0.0107 และ 0.0183 ตามลำดับ บ่งบอกถึงการมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในเชื้อ *P. acanthicum* RYS-7 สำหรับ *P. cucurbitacearum* TS-10 จะมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.28 เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ p-value (<0.05) พบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.00613 เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อร่วมกับปัจจัยอื่นๆ พบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่มีความสัมพันธ์กับความชื้นในดิน นั่นคือ *P. acanthicum* RYS-7 พบว่ามีค่า R-squared อยู่ที่ 0.43 (ภาพที่ 4.27) เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ p-value (<0.05) พบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.006 ซึ่งหมายความว่าความชื้นภายในดิน รวมถึงความเป็นกรด-ด่าง มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

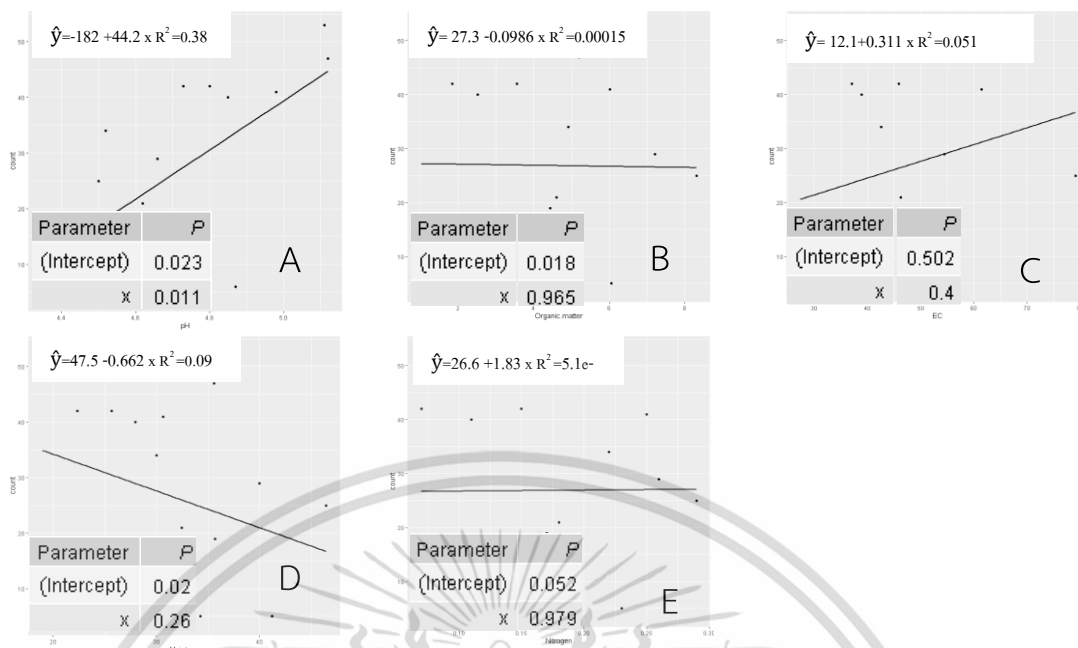
จากข้อมูลที่ได้ จะเห็นได้ว่าความเป็นกรดต่างนั้นเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณเชื้อในระดับหนึ่ง แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าความเป็นกรดต่างจะเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อเชื้อหรือไม่ หรือเป็นเพียงปัจจัยรองที่มีผลเกี่ยวเนื่องกันทางอ้อม ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Broders *et al.* (2009) ที่ได้ศึกษาผลของ pH ธาตุอาหารหลัก ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchange Capacity; CEC) และความจุความชื้นสนาม (field capacity) พบว่าทุกปัจจัยมีผลทางบวกกับความหลากหลายของเชื้อ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม พบว่าทุกปัจจัยที่ได้ศึกษามีค่า R-squared อยู่ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าแต่ละปัจจัยมีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของเชื้อ *Pythium* ในระดับต่ำ และจากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ พบว่ามีเพียงระดับความจุความชื้นสนามเท่านั้นที่มีค่าสหสัมพันธ์ที่บ่งบอกถึงการมีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของเชื้อ โดยการที่ค่า R-squared อยู่ในระดับต่ำ อาจเป็นเพราะอิทธิพลของตัวแปรอื่นๆ นอกเหนือจากที่ทำการศึกษา ซึ่งมีอยู่มากมายในพื้นที่หนึ่งๆนั่นเอง

ประเภทของเนื้อดินก็อาจจะส่งผลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อที่ได้เช่นกัน โดยเฉพาะดินร่วนปนทราย (sandy loam) กับดินร่วนเหนียวปนทราย (sandy clay loam) ที่มีความหลากหลายของเชื้อ *Pythium* spp. มากกว่าดินชนิดอื่น ๆ ที่นำมาแยกเชื้อ สาเหตุอาจเป็นเพราะประเภทของเนื้อดินนั้นมีความสามารถในการอุ้มน้ำที่แตกต่างกันไป จึงส่งผลให้ปริมาณพืชที่เจริญเติบโต จุลินทรีย์

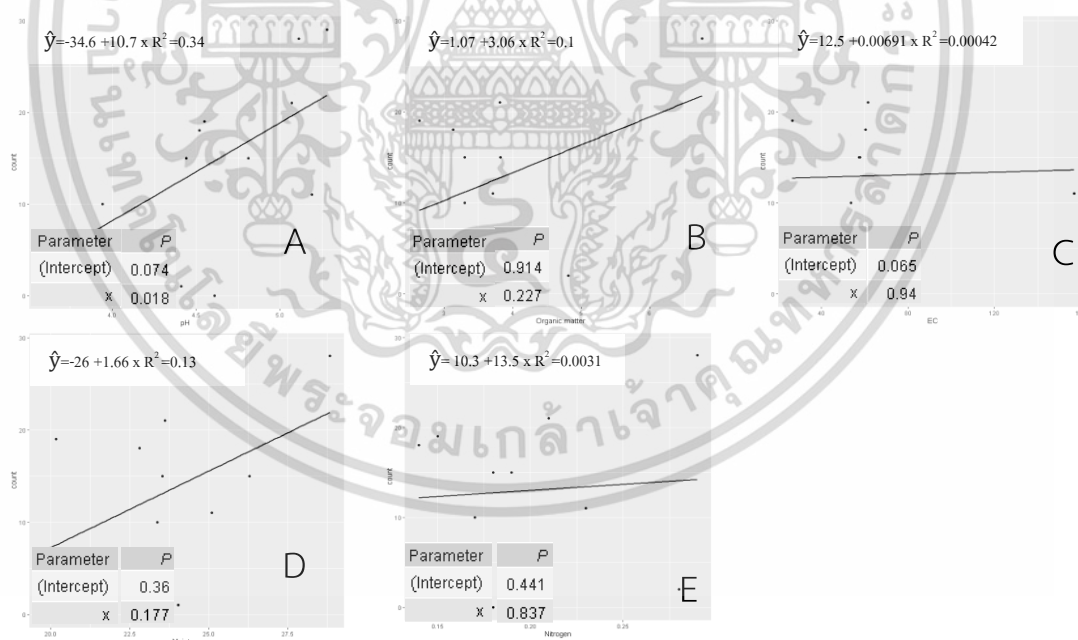
ประเภทต่าง ๆ ในบริเวณนั้นมีความแตกต่างกันออกไปเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีบางรายงาน (Broders *et al.*, 2009) ที่อ้างอิงเอาไว้ว่า การใช้ข้อมูลประเภทของเนื้อดินเพื่อคำนวณการเกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* อาจเป็นไปได้ยาก เนื่องจากคุณสมบัติของดิน รวมถึงเนื้อดินนั้นอาจมีความแปรปรวนเกิดขึ้นได้แม้จะอยู่ในพื้นที่เดียวกันก็ตาม



ภาพที่ 4.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *G. splendens* RYS-1 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.51, 0.038, 0.017, 0.076 และ 0.021

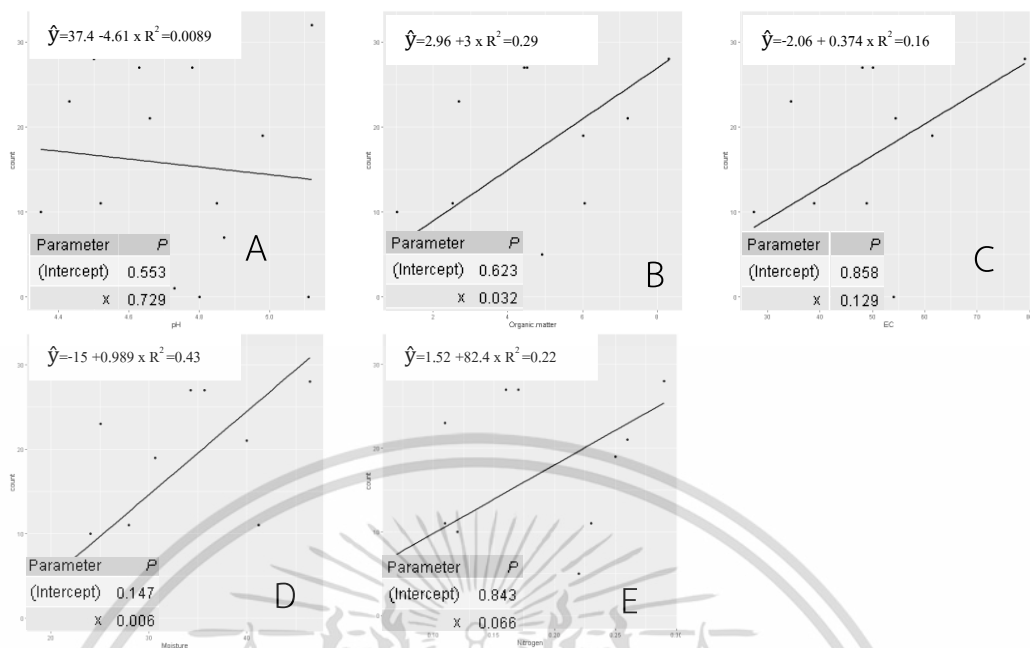


ภาพที่ 4.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *G. splendens* RYS-3 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.38, 0.00015, 0.051, 0.09 และ 0.000051 ตามลำดับ

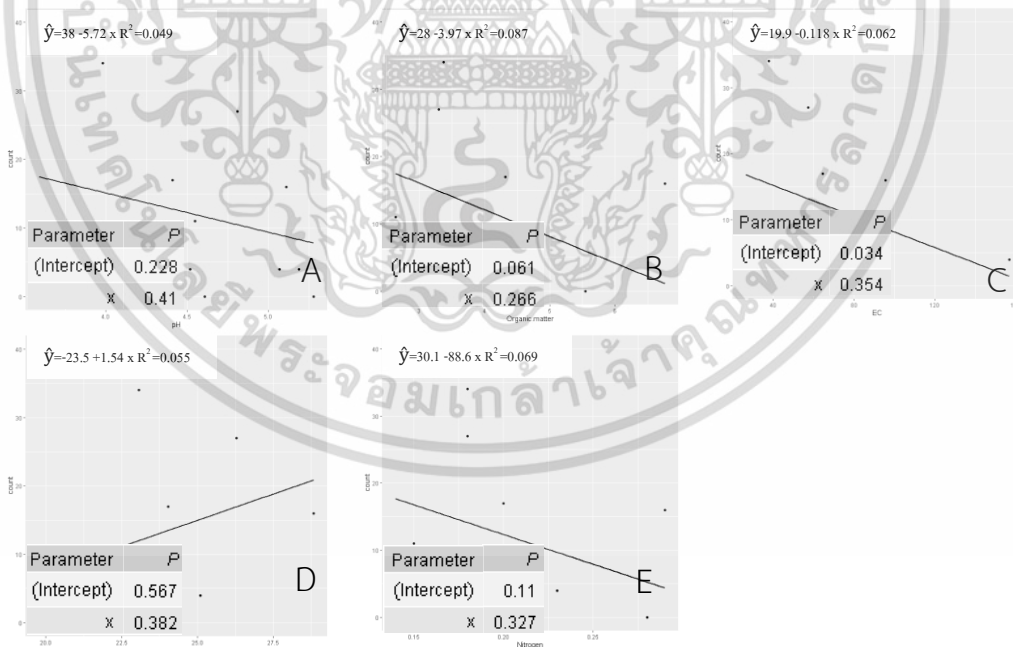


ภาพที่ 4.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *G. splendens* TS-1 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.34, 0.1, 0.00042, 0.13 และ 0.0031 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

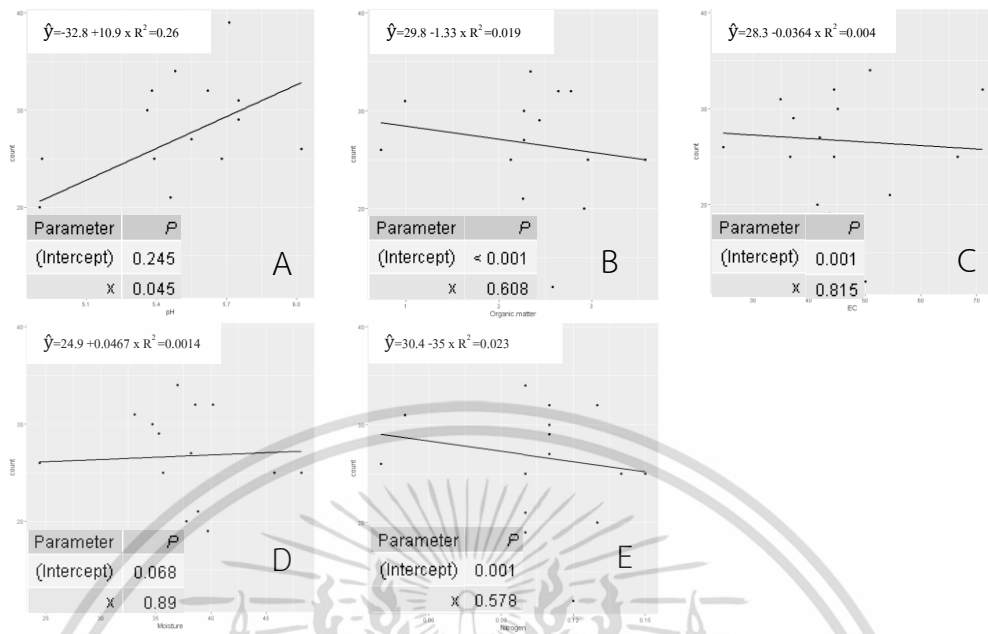


ภาพที่ 4.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. acanthicum* RYS-7 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.0089, 0.29, 0.16, 0.43 และ 0.22 ตามลำดับ

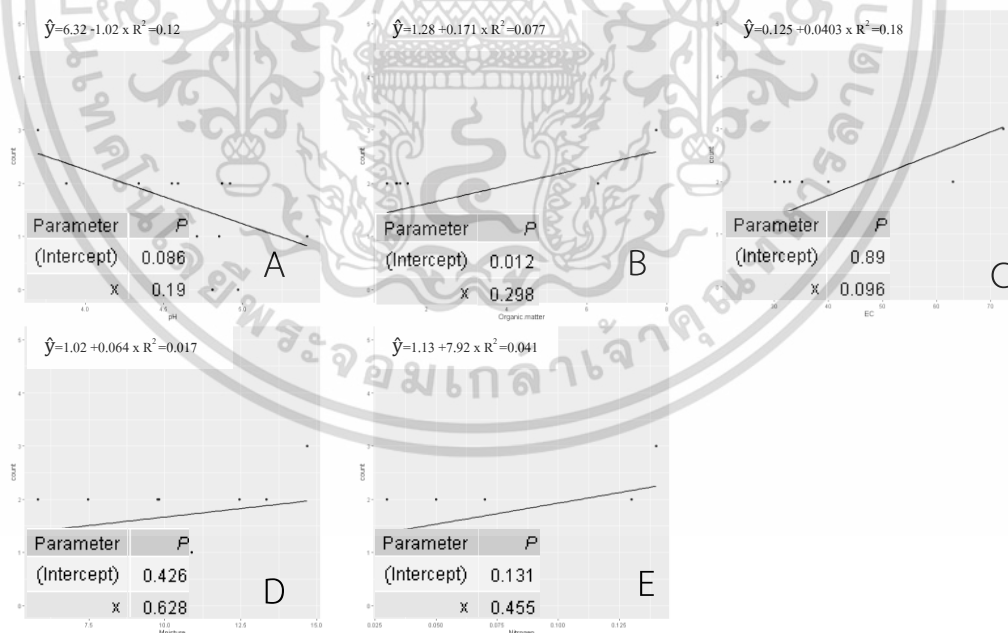


ภาพที่ 4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. acanthicum* TS-4 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.049, 0.087, 0.062, 0.055 และ 0.069 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

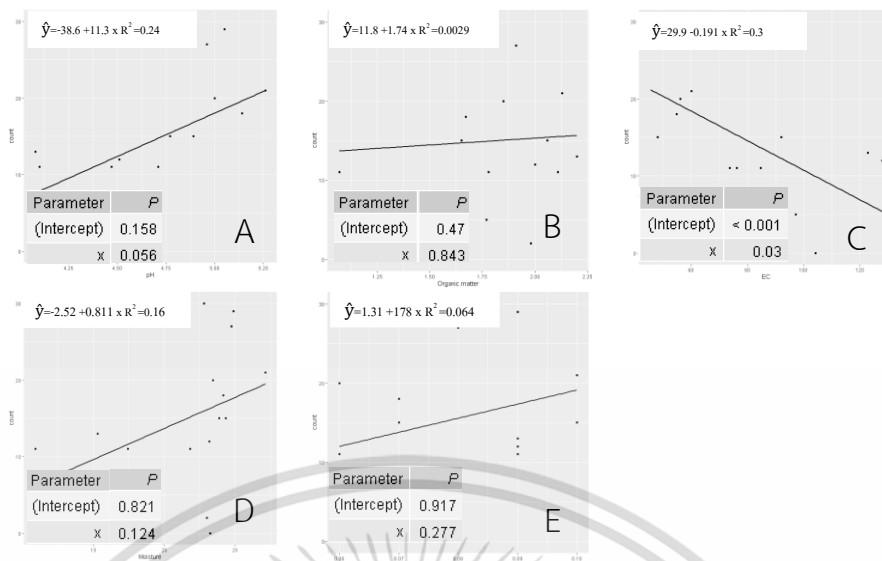


ภาพที่ 4.29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. cucurbitacearum* TS-10 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.26, 0.019, 0.004, 0.0014 และ 0.023 ตามลำดับ

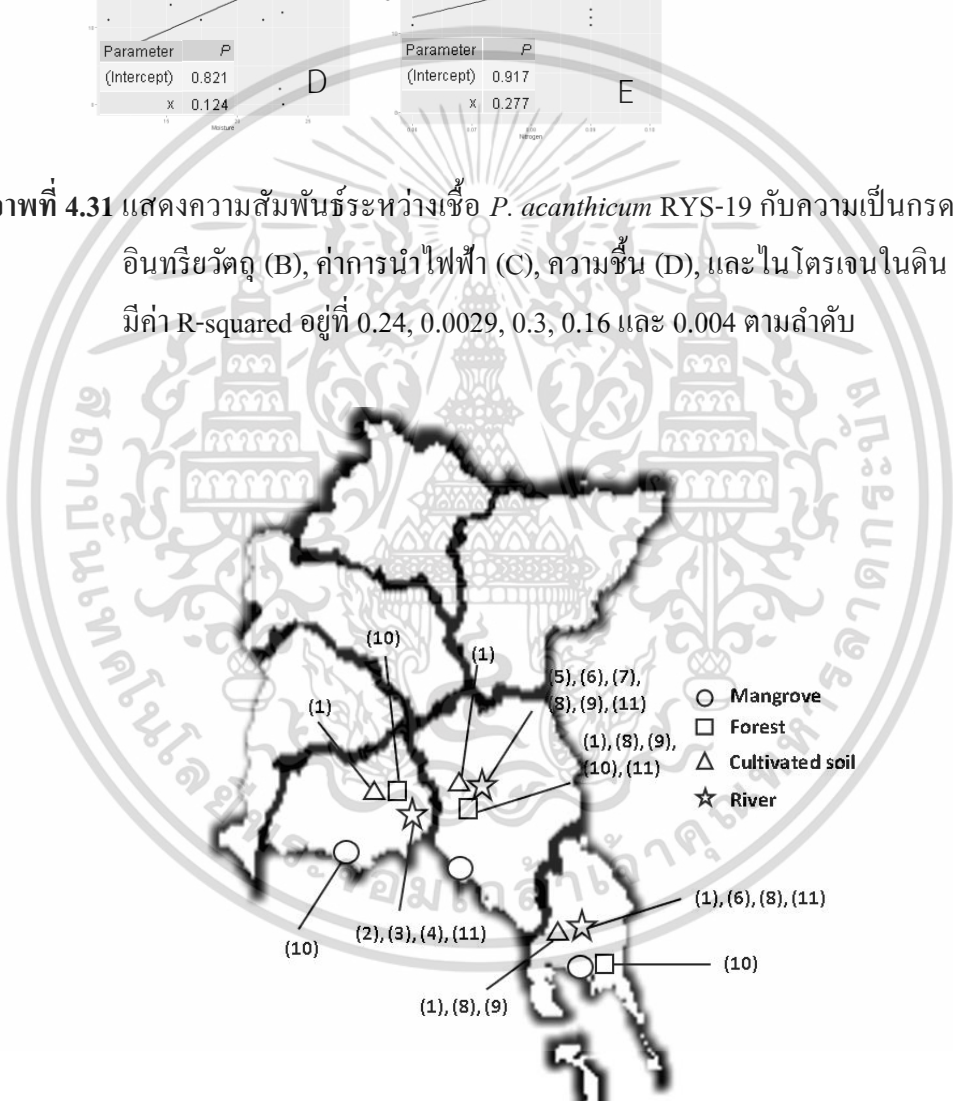


ภาพที่ 4.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. vexans* TS-8 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.12, 0.077, 0.18, 0.017 และ 0.041 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. acanthicum* RYS-19 กับความเป็นกรด-ด่าง (A), อินทรีย์วัตถุ (B), ค่าการนำไฟฟ้า (C), ความชื้น (D), และไนโตรเจนในดิน (E) โดยมีมีค่า R-squared อยู่ที่ 0.24, 0.0029, 0.3, 0.16 และ 0.004 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.32 การกระจายตัวของเชื้อ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในจังหวัด จันทบุรี ระยอง และตราด โดย 1=*G. splendens*; 2=*P. catenulatum*; 3=*P. longipapillum*; 4=*P. myriotylum*; 5=*P. deliense*; 6=*P. diclinum*; 7=*P. torulosum*; 8=*P. cucurbitacearum*; 9=*P. acanthicum*; 10=*P. vexans* และ 11=*P. helicoides*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช

4.2.1 ความสามารถในการก่อโรคและ host range

จากการทดสอบกับพืช 3 ชนิด คือ ต้นสลัดกรีน ไอล์ค ข้าวโพด และแตงกวา ผลการทดสอบพบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่เป็นเชื้อสาเหตุโรคในแทบทุกพืช โดยเฉพาะไอโซเลทที่แยกได้จากพื้นที่เพาะปลูกที่สามารถก่อโรคได้รุนแรง เช่น *G. splendens* แทบทุกไอโซเลทที่ก่อให้เกิดอาการเน่าอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงก็สามารถเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช และสร้างโครงสร้างขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ (ตารางที่ 4.3-4.5 และภาพที่ 4.33- 4.36)

ในต้นกรีน ไอล์ค เชื้อ *G. splendens* ไอโซเลท CHS-1, CHS-2, CHS-3, CHS-4, CHS-4, RYS-1, RYS-3, TS-1, TS-5, TS-6 และ TS-9 สามารถก่อโรคในพืชดังกล่าวได้ในระดับปานกลางจนถึงระดับรุนแรง โดยมีดัชนีความรุนแรงโรครอยู่ในช่วง 60-100 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวรากที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.5-1.5 มิลลิเมตร และทำให้เกิดความเสียหายได้ภายใน 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ ยังพบกับโครงสร้างขยายพันธุ์ รวมถึงเส้นใยภายในเนื้อเยื่อของพืชเป็นจำนวนมาก เมื่อเทียบกับชุดควบคุมจะเห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกเหนือจากนั้น ก็มีเชื้อสปีชีส์อื่นๆ ที่ก่อโรคได้รุนแรงเช่นกัน เช่น *P. deliense*, *P. helicoides* และ *P. acanthicum* เป็นต้น

เช่นเดียวกันกับผักสลัดกรีน ไอล์ค ในต้นแตงกวา พบว่าเชื้อที่สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด คือ *P. deliense* และ *G. splendens* โดยในหลายๆ ไอโซเลท เช่น *P. deliense* RYS-11, *G. splendens* CHS-1 และ *G. splendens* CHS-2 ที่สามารถก่อโรคได้ประมาณ 80-90% รวมถึงทำให้เกิดอาการเน่าจนมีน้ำหนักรากที่ลดลง

สำหรับต้นข้าวโพด พบว่าอาการโรคที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับต่ำจนถึงระดับปานกลาง โดยเชื้อที่ก่อโรครุนแรงมากที่สุด คือ ร่อง *G. splendens* RYS-1 ร่องลงมา *P. acanthicum* RYS-6 โดยมีอาการโรคอยู่ในระดับ 70 และ 50% ตามลำดับ

จากข้อมูล จะเห็นได้ว่า *G. splendens* แทบทุกไอโซเลท สามารถก่อโรคในพืชทดสอบได้ในระดับปานกลางจนถึงระดับรุนแรง ซึ่งเชื่อดังกล่าวสามารถถูกพบได้ในพื้นที่เพาะปลูกในทุกจังหวัด จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการกระจายตัวของ *G. splendens* ในสวนไม้ผลของพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และมีโอกาสที่ส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงอีกด้วย

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการก่อโรคในพืชสัคครีนโอ๊กของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยะเวลา ๓๐ วัน

ไอโซเลท	DI(%) ¹	DS(%) ²	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	จำนวน oospore ใน เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ โดยเฉลี่ย
Control	0.0	0.0	2.47a-h	0.00i
CHS-1	100.0	100.0	0.50m-p	16.22f-i
CHS-2	83.33	70.0	0.57m-p	31.39c-f
CHS-3	100.0	100.0	0.30n-p	17.61e-i
CHS-4	100.0	90.0	1.18h-p	76.17b
CHS-5	100.0	76.7	0.78kp	23.05e-h
CHS-6	0.0	0.0	3.28ab	0.00i
CHS-7	0.0	0.0	3.75a	0.00i
CHS-8	0.0	0.0	2.67a-g	0.00i
CHS-9	0.0	0.0	2.93a-e	0.00i
CHS-10	0.0	0.0	2.50a-g	0.00i
CHS-12	100.0	60.0	1.13i-p	22.44e-h
CHS-13	66.7	33.3	1.87c-l	7.78g-i
CHS-14	100.0	60.0	0.27n-p	3.83hi
CHS-15	0.0	0.0	2.10b-j	0.00i
CHS-16	50.0	50.0	1.40g-n	0.00i
CHS-17	0.0	0.0	2.42b-i	0.00i
RYS-1	100.0	63.3	0.33n-p	24.44d-g
RYS-2	100.0	100.0	0.00p	19.78e-i
RYS-3	100.0	100.0	0.00p	16.67f-i
RYS-4	100.0	100.0	0.00p	45.89c
RYS-5	0.0	0.0	3.02a-d	0.00i
RYS-6	100.0	100.0	0.00p	47.00c
RYS-7	0.0	0.0	2.17b-j	0.00i
RYS-8	0.0	0.0	2.52a-g	0.00i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลต	DI(%) ¹	DS(%) ²	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	จำนวน oospore ใน เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ โดยเฉลี่ย
RYS-9	100.0	100.0	0.32n-p	126.44a
RYS-10	16.7	3.3	2.97a-e	0.17i
RYS-11	100.0	60.0	1.35g-o	12.44f-i
RYS-12	100.0	60.0	0.93j-p	0.00i
RYS-13	100.0	33.3	2.48a-h	0.00i
RYS-14	0.0	0.0	2.33b-i	0.00i
RYS-15	100	100	0.93j-p	12.17f-i
RYS-16	0.0	0.0	2.75a-f	0.00i
RYS-17	100.0	76.7	0.63l-p	42.50cd
RYS-18	0.0	0.0	2.57a-g	0.00i
RYS-19	0.0	0.0	3.25ab	0.00i
RYS-20	0.0	0.0	3.28ab	0.00i
TS-1	100.0	100.0	0.00p	36.44c-e
TS-2	0.0	0.0	2.95a-e	0.00i
TS-3	100.0	50.0	1.68e-m	42.17cd
TS-4	0.0	0.0	1.45f-n	0.00i
TS-5	100.0	86.7	0.10op	16.72f-i
TS-6	100.0	100.0	0.00p	0.00i
TS-7	0.0	0.0	3.18a-c	0.00i
TS-8	100.0	33.3	1.73d-m	7.89g-i
TS-9	100.0	46.7	1.87c-l	13.50f-i
TS-10	0.0	0.0	2.73a-f	0.00i
TS-11	16.7	13.3	2.10b-j	0.00i
TS-12	0.0	0.0	2.55a-g	0.00i
TS-13	100.0	60.0	1.73d-m	0.00i
TS-14	33.3	6.7	1.77d-m	0.00i
TS-15	100.0	53.3	2.02b-k	0.00i
CV. (%)			55.05	113.61

¹DI (%) = (จำนวนต้นที่เกิดโรค / จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

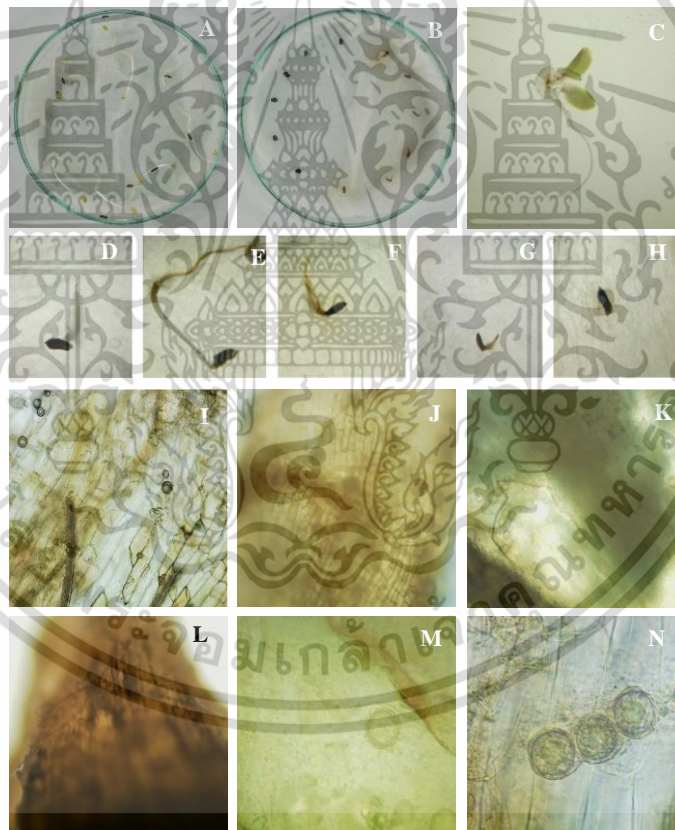
²DS (%) = ผลรวมของ (คะแนนการเป็นโรค x จำนวนต้นที่เป็นโรค) / (คะแนนโรคสูงสุด x จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Level 0 Level 1 Level 2 Level 3 Level 4 Level 5

ภาพที่ 4.33 แสดงระดับการเป็นโรคของผักสลัด ระดับ 0: ไม่แสดงอาการโรค ระดับ 1: แสดงอาการโรค 1-25% ระดับ 2: แสดงอาการโรค 26-50% ระดับ 3: แสดงอาการโรค 51-75% ระดับ 4: 76-100% ระดับ 5: ตายและเน่าทั้งเมล็ด



ภาพที่ 4.34 การทดสอบโรคในต้นสลัดกรีนโอ๊ค (อายุ 3 วัน) ที่ได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน
 A: Control; B: ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อ; C-D: ต้นผักสลัดกรีนโอ๊คที่ไม่เป็นโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (20×); E-H: แสดงอาการโรคในต้นผักสลัดกรีนโอ๊ค หลังการปลูกเชื้อ; I-N: Oospore แบบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อพืช; (I-L: 100×; M-N: 400×)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการก่อโรคในข้าวโพดของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระบุของ ทรายาด

ไอโซเลท	DI(%) ¹	DS(%) ²	น้ำหนักต้น (มิลลิกรัม)	น้ำหนักราก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักรวม (มิลลิกรัม)
Control	0.0	0.0	0.8442 a-e	0.3239 d-l	1.1681 b-g
CHS-1	66.7	26.7	0.6764 a-h	0.1931 i-l	0.8696 e-h
CHS-2	100.0	46.7	0.7233 a-g	0.2173 g-l	0.9406 c-h
CHS-3	0.0	0.0	0.7834 a-g	0.4543 b-g	1.2377 a-f
CHS-4	66.7	30.0	0.7616 a-g	0.3506 c-l	1.1122 b-h
CHS-5	100.0	60.0	0.7343 a-g	0.1153 l	0.8497 e-h
CHS-6	100.0	20.0	0.6227 a-i	0.1273 kl	0.7500 f-h
CHS-7	33.3	6.7	0.8409 a-e	0.4100 c-i	1.2508 a-e
CHS-8	33.3	13.3	0.6666 a-h	0.2253 g-l	0.8919 d-h
CHS-9	33.3	20.0	0.9070 a	0.3450 c-l	1.2520 a-e
CHS-10	0.0	0.0	0.9078 a	0.4772 b-f	1.3058 a-e
CHS-12	33.3	6.7	0.7038 a-g	0.3256 d-l	1.0294 ch
CHS-13	100	36.7	0.8595 a-d	0.4251 b-i	1.2846 a-e
CHS-14	66.7	26.7	0.6792 a-h	0.2408 e-l	0.9200 d-h
CHS-15	100	33.3	0.5359 d-i	0.3239 d-l	0.8598 e-h
CHS-16	0.0	0.0	0.9218 a	0.6640 ab	1.5858 ab
CHS-17	100.0	50.0	0.5263 e-i	0.1978 h-l	0.7242 gh
RYS-1	100.0	73.3	0.5503 b-i	0.2973 d-l	0.8476 e-h
RYS-2	66.7	13.3	0.7354 a-g	0.3780 c-j	0.9196 d-h
RYS-3	83.3	50.0	0.5416 c-i	0.5345 b-d	1.2699 a-e
RYS-4	33.3	20.0	0.6888 a-h	0.4131 c-i	1.1019 b-h
RYS-5	83.3	40.0	0.6840 a-h	0.5846 a-c	1.2686 a-e
RYS-6	83.3	56.7	0.6615 a-h	0.3788 c-j	1.0403 c-h
RYS-7	33.3	6.7	0.8562 a-d	0.5239 b-d	1.3801 a-d
RYS-8	100.0	33.3	0.7905 a-f	0.2324 f-l	1.0229 c-h
RYS-9	100.0	36.7	0.7046 a-g	0.3566 c-l	1.0613 c-h
RYS-10	0.00	0.00	0.8629 a-c	0.4428 b-i	1.3058 a-e
RYS-11	33.3	10.0	0.8036 a-f	0.3647 c-k	1.1684 b-g
RYS-12	50.0	30.0	0.7304 a-g	0.3273 d-l	1.0577 c-h
RYS-13	50.0	13.3	0.9360 a	0.3623 c-k	1.2983 a-e
RYS-14	83.3	16.7	0.8750 ab	0.4248 b-i	1.2999 a-e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ไอโซเลข	DI(%) ¹	DS(%) ²	น้ำหนักต้น (มิลลิกรัม)	น้ำหนักราก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักรวม (มิลลิกรัม)
RYS-15	50.0	10.0	0.7182 a-g	0.3042 d-l	1.0224 c-h
RYS-16	50.0	16.7	0.7643 a-g	0.4898 b-e	1.2541 a-e
RYS-17	100.0	53.3	0.6700 a-h	0.3133 d-l	0.9833 c-h
RYS-18	50.0	13.3	0.7933 a-f	0.4401 b-i	1.2334 a-f
RYS-19	50.0	13.3	0.8991 a	0.7793 a	1.6784 a
RYS-20	16.7	3.3	0.9248 a	0.5073 b-d	1.4322 a-c
TS-1	66.7	13.3	0.7390 a-g	0.4466 b-h	1.1856 b-g
TS-2	50.0	10.0	0.7270 a-g	0.3328 d-l	1.0598 c-h
TS-3	83.3	20.0	0.7287 a-g	0.4863 b-e	1.2151 a-g
TS-4	83.3	46.7	0.6913 a-h	0.3516 c-l	1.0430 c-h
TS-5	100.0	36.7	0.4927 f-i	0.1517 j-l	0.6445 h
TS-6	33.3	13.3	0.8724 ab	0.4210 c-i	1.2933 a-e
TS-7	100.0	43.3	0.6332 a-i	0.4914 b-e	1.1246 b-h
TS-8	50.0	43.3	0.4635 g-i	0.3880 c-j	0.8516 e-h
TS-9	0.00	0.00	0.7600 a-g	0.3226 d-l	1.0826 c-h
TS-10	66.7	53.3	0.3473 i	0.2882 d-l	0.6355 h
TS-11	100.0	63.3	0.3873 hi	0.2840 d-l	0.6713 h
TS-12	83.3	23.3	0.7777 a-g	0.4657 b-g	1.2435 a-f
TS-13	83.3	50.0	0.7243 a-g	0.3925 c-j	1.1169 b-h
TS-14	83.3	46.7	0.6492 a-i	0.4512 b-g	1.1004 b-h
TS-15	50.0	23.3	0.7093 a-g	0.3992 c-j	1.1085 b-h
CV. (%)			30.91	45.71	31.04

¹DI (%) = (จำนวนต้นที่เกิดโรค / จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

²DS (%) = ผลรวมของ (คะแนนการเป็นโรค x จำนวนต้นที่เป็นโรค) / (คะแนนโรคสูงสุด x จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.35 การทดสอบโรคในต้นข้าวโพด (อายุ 7 วัน) หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน A: Control (ความรุนแรงโรค 0%); B-E: ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อ (ความรุนแรงโรค 25%, 50%, 75% และ 100% ตามลำดับ); F-H: ข้าวโพดก่อนการปลูกเชื้อ; I-K: การเจริญของเชื้อสาเหตุบนวัสดุปลูกบริเวณโคนต้นข้าวโพดหลังการปลูกเชื้อ; L: บริเวณโคนต้นข้าวโพดที่เป็นโรค; M-O: โคนต้นข้าวโพดที่เป็นโรคภายใต้ stereo microscope (20×)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการก่อโรคในต้นแตงกวาของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ระยะเวลาของ ทรายาค

ไอโซเลท	DI(%) ¹	DS(%) ²	น้ำหนักต้น (มิลลิกรัม)	น้ำหนักราก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักรวม (มิลลิกรัม)
Control	0.0	0.0	0.2650 e-j	0.0425 a-e	0.3075 i-o
CHS-1	100.0	86.7	0.2704 e-j	0.0022 op	0.2726 j-p
CHS-2	100.0	86.7	0.4154 a-g	0.0165 f-p	0.4320 a-k
CHS-3	0.0	0.0	0.5048 ab	0.0350 b-j	0.5399 a-d
CHS-4	100.0	96.7	0.1178 j	0.0020 p	0.1198 p
CHS-5	83.3	56.7	0.3179 c-i	0.0121 i-p	0.3301 f-o
CHS-6	16.7	3.3	0.4578 a-d	0.0129 h-p	0.4708 a-i
CHS-7	100.0	66.7	0.3651 a-h	0.0123 i-p	0.3774 b-n
CHS-8	100.0	20.0	0.4891 a-c	0.0307 b-m	0.5197 a-e
CHS-9	0.0	0.0	0.3945 a-g	0.0195 e-p	0.4140 a-m
CHS-10	0.0	0.0	0.3556 a-h	0.0308 b-m	0.3864 a-n
CHS-12	83.3	50.0	0.3524 a-h	0.0237 d-p	0.3761 b-n
CHS-13	100.0	26.7	0.4967 a-c	0.0321 b-l	0.5288 a-d
CHS-14	66.7	13.3	0.4937 a-c	0.0303 b-m	0.5240 a-d
CHS-15	83.3	23.3	0.3717 a-h	0.0240 d-p	0.3957 a-m
CHS-16	100.0	20.0	0.4015 a-g	0.0253 d-p	0.4268 a-l
CHS-17	83.3	53.3	0.2941 d-i	0.0276 c-n	0.3218 g-o
RYS-1	83.3	66.7	0.3293 b-i	0.0093 k-p	0.3386 e-o
RYS-2	83.3	50.0	0.2522 e-j	0.0592 a	0.3115 h-o
RYS-3	100.0	60.0	0.2631 e-j	0.0130 h-p	0.2761 j-p
RYS-4	83.3	60.0	0.2502 f-j	0.0260 d-p	0.3547 d-o
RYS-5	83.3	26.7	0.4962 a-c	0.0383 a-g	0.5345 a-d
RYS-6	83.3	83.3	0.1758 ij	0.0025 op	0.1784 op
RYS-7	0.0	0.0	0.4835 a-c	0.0417 a-e	0.5252 a-d
RYS-8	100.0	60.0	0.4020 a-g	0.0348 b-j	0.4368 a-j
RYS-9	66.7	36.7	0.2026 h-j	0.0111 j-p	0.2136 n-p
RYS-10	16.7	3.3	0.5000 ab	0.0357 b-i	0.5358 a-d
RYS-11	100.0	93.3	0.2381 g-j	0.0036 n-p	0.2417 m-p
RYS-12	83.3	36.7	0.3646 a-h	0.0236 d-p	0.3881 a-n
RYS-13	0.0	0.0	0.4641 a-d	0.0330 b-k	0.4971 a-g
RYS-14	0.0	0.0	0.5124 a	0.0507 a-c	0.5630 a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ไอโซเลท	DI(%) ¹	DS(%) ²	น้ำหนักต้น (มิลลิกรัม)	น้ำหนักราก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักรวม (มิลลิกรัม)
RYS-15	16.7	3.3	0.4101 a-g	0.0372 a-h	0.4474 a-j
RYS-16	0.0	0.0	0.4210 a-f	0.0471 a-d	0.5431 a-c
RYS-17	0.0	0.0	0.3799 a-g	0.0400 a-f	0.4199 a-m
RYS-18	50.0	10.0	0.4620 a-d	0.0360 a-i	0.4980 a-g
RYS-19	50.0	16.7	0.4577 a-d	0.0363 a-i	0.4941 a-h
RYS-20	0.0	0.0	0.4892 a-c	0.0528 ab	0.5420 a-c
TS-1	50.0	26.7	0.4026 a-g	0.0187 e-p	0.4213 a-m
TS-2	83.3	80.0	0.2373 g-j	0.0083 l-p	0.2456 l-p
TS-3	66.7	13.3	0.5317 a	0.0250 d-p	0.5567 ab
TS-4	66.7	33.3	0.3625 a-h	0.0221 e-p	0.3845 a-n
TS-5	83.3	50.0	0.2911 d-i	0.0131 h-p	0.3042 i-o
TS-6	83.3	63.3	0.2409 g-j	0.0101 k-p	0.2510 k-p
TS-7	100.0	66.7	0.3666 a-h	0.0069 m-p	0.3734 b-n
TS-8	83.3	46.7	0.3609 a-h	0.0470 a-d	0.4079 a-m
TS-9	83.3	76.7	0.4295 a-e	0.0265 d-o	0.5118 a-f
TS-10	66.7	50.0	0.3545 a-h	0.0149 g-p	0.3695 c-n
TS-11	33.3	20.0	0.3965 a-g	0.0382 a-g	0.4347 a-j
TS-12	100.0	90.0	0.4869 a-c	0.0106 j-p	0.4975 a-g
TS-13	50.0	10.0	0.4685 a-d	0.0278 c-n	0.4964 a-g
TS-14	66.7	63.3	0.2545 e-j	0.0188 e-p	0.2733 j-p
TS-15	33.3	6.7	0.3999 a-g	0.01607 f-p	0.4159 a-m
CV. (%)			32.82	67.04	31.58

¹DI (%) = (จำนวนต้นที่เกิดโรค / จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

²DS (%) = ผลรวมของ (คะแนนการเป็นโรค x จำนวนต้นที่เป็นโรค) / (คะแนนโรคสูงสุด x จำนวนต้นทั้งหมด) x100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.36 การทดสอบโรคในต้นแตงกวา (อายุ 10 วัน) หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน
 A: Control (ความรุนแรงโรค 0%); B-E: ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อ (ความรุนแรงโรค 25%, 50%, 75% และ 100% ตามลำดับ); F-G: แตงกวาก่อนการปลูกเชื้อ; H-I: การเจริญของเชื้อสาเหตุบนวัสดุปลูกบริเวณโคนต้นแตงกวาหลังการปลูกเชื้อ; J: โคนต้นแตงกวาที่เป็นโรค; K: บริเวณโคนต้นและรากของต้นแตงกวาภายใต้ stereo microscope (20×)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค หรือก่อโรคไม่รุนแรง

จากการปลูกเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบ *Pythium* ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic *Pythium* : NpP) หรือ *Pythium* ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (hypo-virulence *Pythium* : HvP) โดยพบชนิด HvP จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. acanthicum* RYS-7, *P. cucurbitacearum* RYS-20, *P. diclinum* RYS-16 และ *P. torulosum* RYS-10 และ NpP จำนวน 1 สปีชีส์ ได้แก่ *P. catanulatum* CHS-10 (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 สรุปความรุนแรงในการก่อโรคของสายพันธุ์ที่แยกได้เพื่อคัดเลือก NpP หรือ HvP

ไอโซเลต	ข้าวโพด	Green oak	แตงกวา	Severity index (%) ¹
Control	0.0	0.0	0.0	0.00 g
CHS-1	26.7	100.0	86.7	71.13 ab
CHS-2	46.7	70.0	86.7	67.80 a-c
CHS-3	0.0	100.0	0.0	33.33 a-g
CHS-4	30.0	90.0	96.7	72.23 ab
CHS-5	60.0	76.7	56.7	64.47 a-d
CHS-6	20.0	0.0	3.3	7.77 d-g
CHS-7	6.7	0.0	66.7	24.47 a-g
CHS-8	13.3	0.0	20.0	11.10 c-g
CHS-9	20.0	0.0	0.0	6.67 d-g
CHS-10	0.0	0.0	0.0	0.00 g
CHS-12	6.7	60.0	50.0	38.90 a-g
CHS-13	36.7	33.3	26.7	32.23 a-g
CHS-14	26.7	60.0	13.3	33.33 a-g
CHS-15	33.3	0.0	23.3	18.87 b-g
CHS-16	0.0	50.0	20.0	23.33 a-g
CHS-17	50.0	0.0	53.3	34.43 a-g
RYS-1	73.3	63.3	66.7	67.77 a-c
RYS-2	13.3	100.0	50.0	54.43 a-g
RYS-3	50.0	100.0	60.0	70.00 ab
RYS-4	20.0	100.0	60.0	60.00 a-e
RYS-5	40.0	0.0	26.7	22.23 a-g
RYS-6	56.7	100.0	83.3	80.00 a
RYS-7	6.7	0.0	0.0	2.23 e-g
RYS-8	33.3	0.0	60.0	31.10 a-g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ไอโซเลท	ข้าวโพด	Green oak	แตงกวา	Severity index (%) ¹
RYS-9	36.7	100.0	36.7	57.80 a-g
RYS-10	0.00	3.3	3.3	2.20 e-g
RYS-11	10.0	60.0	93.3	54.43 a-g
RYS-12	30.0	60.0	36.7	42.23 a-g
RYS-13	13.3	33.3	0.0	15.53 b-g
RYS-14	16.7	0.0	0.0	5.57 e-g
RYS-15	10.0	100	3.3	37.77 a-g
RYS-16	16.7	0.0	0.0	5.57 e-g
RYS-17	53.3	76.7	0.0	43.33 a-g
RYS-18	13.3	0.0	10.0	7.77 d-g
RYS-19	13.3	0.0	16.7	10.00 c-g
RYS-20	3.3	0.0	0.0	1.10 fg
TS-1	13.3	100.0	26.7	46.67 a-g
TS-2	10.0	0.0	80.0	30.00 a-g
TS-3	20.0	50.0	13.3	27.77 a-g
TS-4	46.7	0.0	33.3	26.67 a-g
TS-5	36.7	86.7	50.0	57.80 a-g
TS-6	13.3	100.0	63.3	58.87 a-f
TS-7	43.3	0.0	66.7	36.67 a-g
TS-8	43.3	33.3	46.7	41.10 a-g
TS-9	0.00	46.7	76.7	41.13 a-g
TS-10	53.3	0.0	50.0	34.43 a-g
TS-11	63.3	13.3	20.0	32.20 a-g
TS-12	23.3	0.0	90.0	37.77 a-g
TS-13	50.0	60.0	10.0	40.00 a-g
TS-14	46.7	6.7	63.3	38.90 a-g
TS-15	23.3	53.3	6.7	27.77 a-g
CV. (%)				82.90

¹ คัดจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรคที่ได้จากแต่ละพืช

	ไม่ก่อให้เกิดโรค
	เกิดโรคไม่รุนแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของสายพันธุ์ NpP และ HvP กับเชื้อสาเหตุโรค

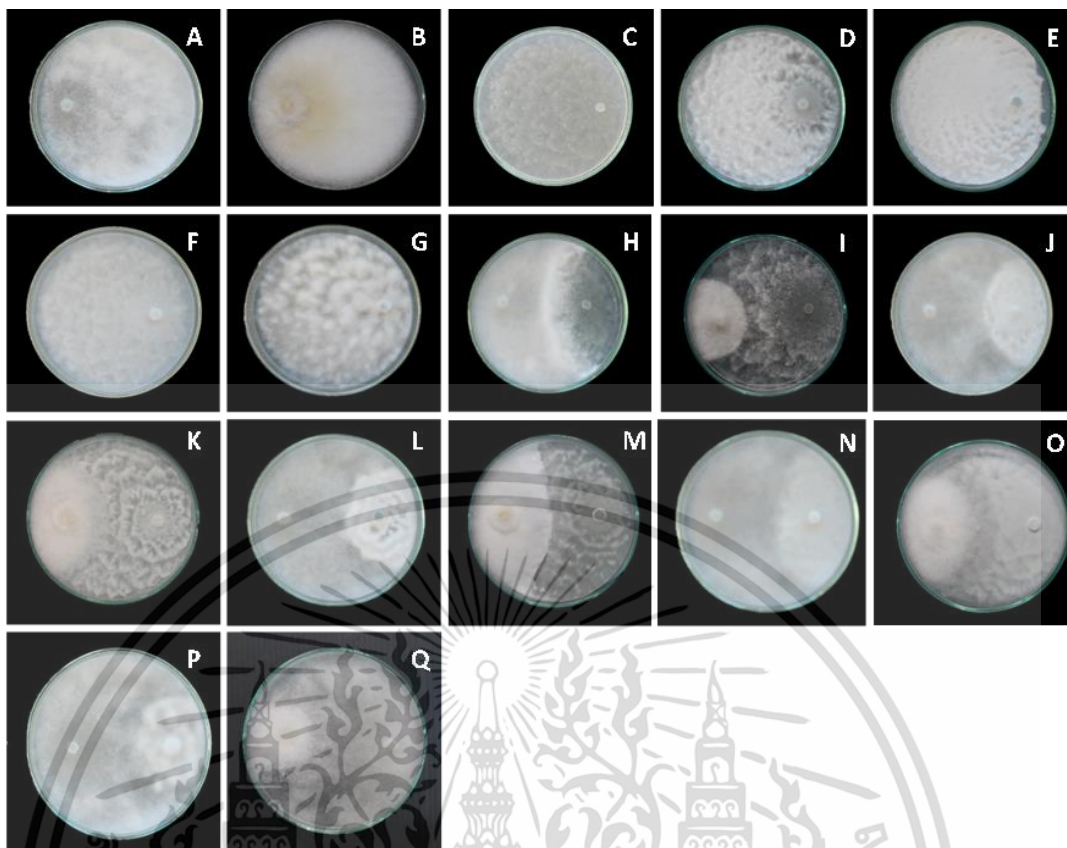
1) การทดสอบด้วยกรรมวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม (dual culture)

การทดสอบการเลี้ยงเชื้อร่วม พบว่ามี 1 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ คือ *P. acanthicum* RYS-7 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* และ *Fusarium* สาเหตุโรค อยู่ที่ 35.28 และ 53.75% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7, ภาพที่ 4.37H, และ 4.37I)

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของ non-pathogenic *Pythium* (NpP) หรือ hypo-virulence *Pythium* (HvP) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

เชื้อสาเหตุ	สายพันธุ์ NpP, HvP	ขนาดโคโลนี (ซม.)	% การยับยั้งการเจริญ
<i>Pythium</i> sp.	Control	9.00 a	0.00 c
	CHS-10	6.01 bc	33.19 ab
	RYS-7	5.82 c	35.28 a
	RYS-10	6.00 bc	33.33 ab
	RYS-16	6.02 bc	33.06 ab
	RYS-20	6.11 b	32.08 b
	CV. (%)	2.20	5.72
<i>Fusarium</i> sp.	Control	9.00 a	0.00 e
	CHS-10	5.49 cd	39.03 bc
	RYS-7	4.16 e	53.75 a
	RYS-10	5.92 bc	34.17 cd
	RYS-16	5.10 d	43.33 b
	RYS-20	6.19 b	31.25 d
	CV. (%)	4.94	9.76

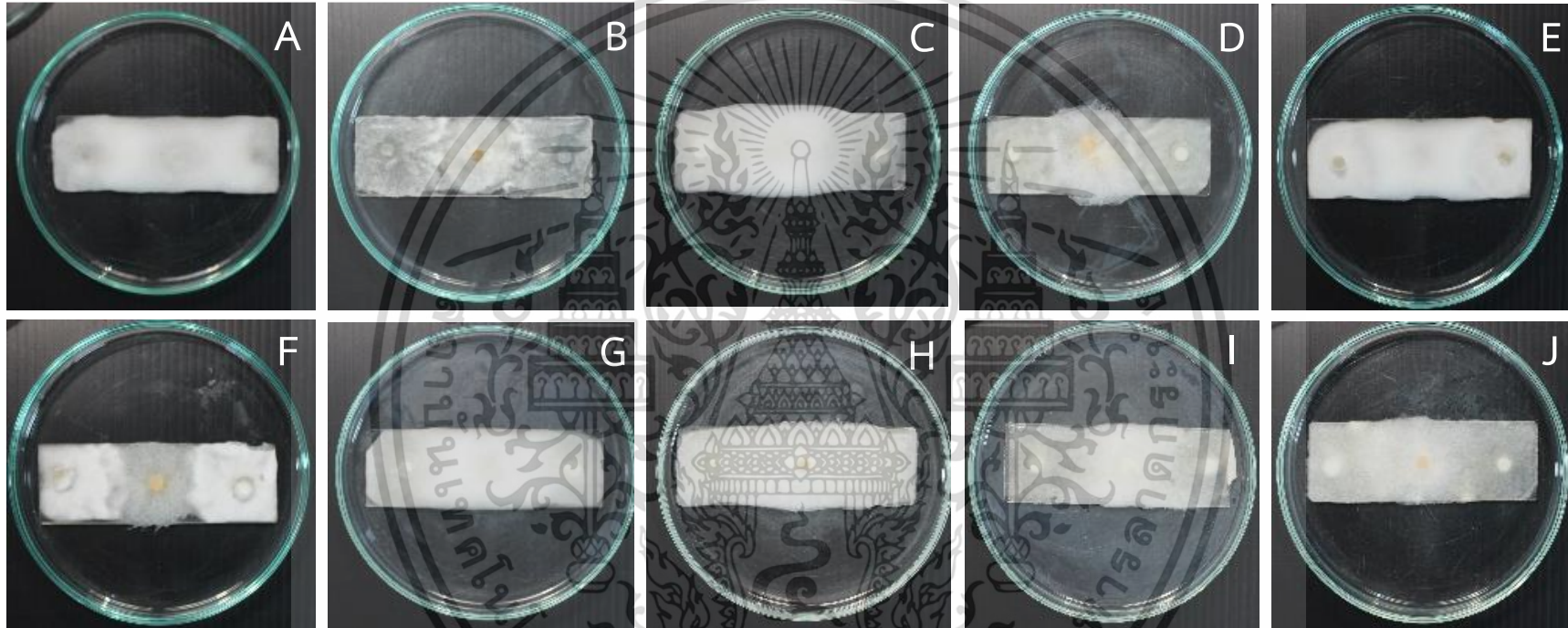
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



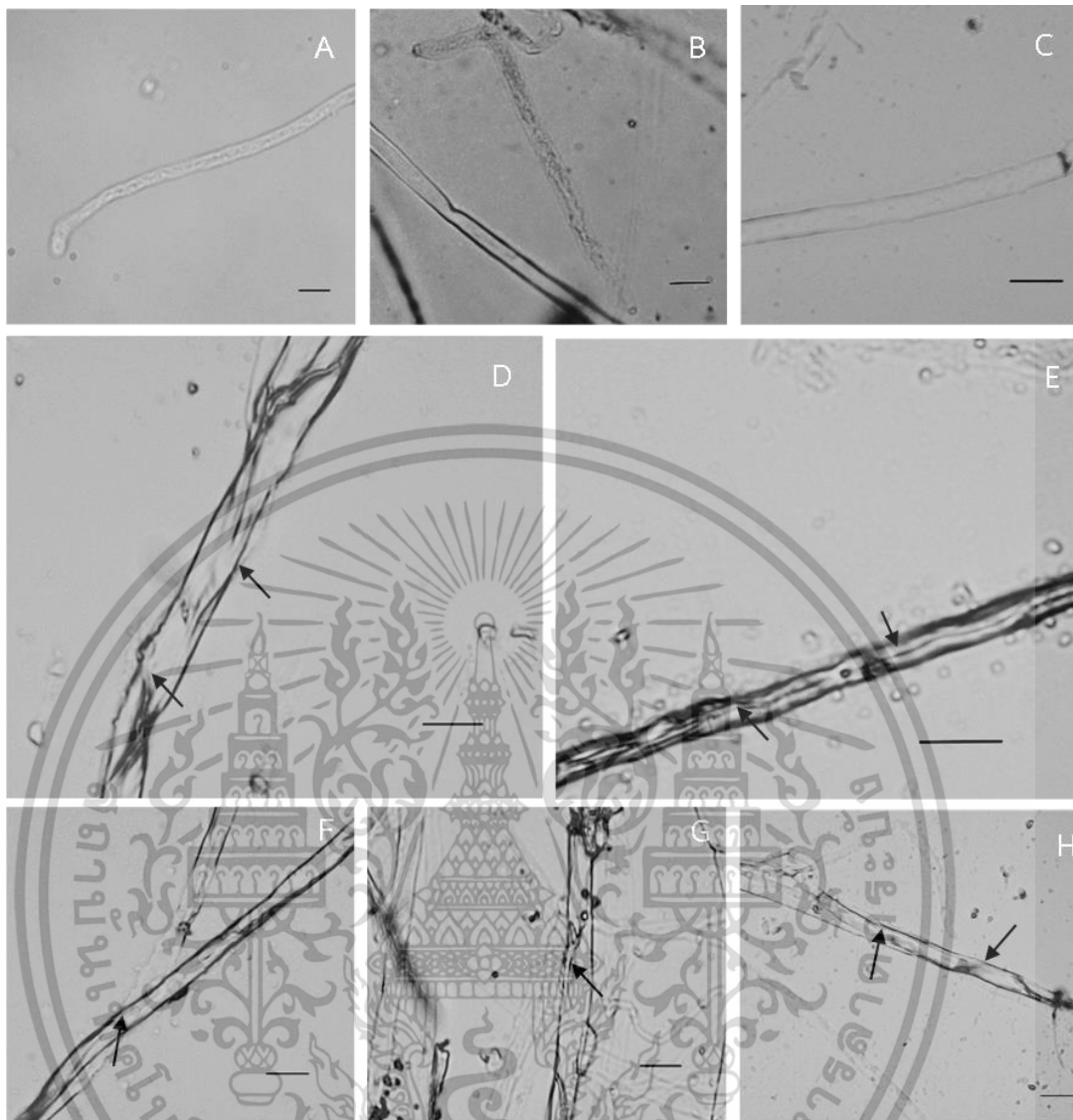
ภาพที่ 4.37 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อร่วม (dual culture) ระหว่างเชื้อ *Pythium* sp. (P) และ *Fusarium* sp. (F) สาเหตุโรคพืช (ข้าว) กับสายพันธุ์ NpP หรือ HvP (ข้าว) โดย A: Control ของเชื้อ *Pythium* sp.; B: Control ของเชื้อ *Fusarium* sp.; C: *P. acanthicum* RYS-7; D: *P. catenulatum* CHS-10; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20; H: P+ *P. acanthicum* RYS-7; I: F+P. *acanthicum* RYS-7; J: P+*P. catenulatum* CHS-10; K: F+*P. catenulatum* CHS-10; L: P+*P. torulosum* RYS-10; M: F+*P. torulosum* RYS-10; N: P+*P. diclinum* RYS-16; O: F+*P. diclinum* RYS-16; P: P+ *P. cucurbitacearum* RYS-20; Q: F+*P. cucurbitacearum* RYS-20

2) การทดสอบเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ (slide culture)

เมื่อนำเชื้อทั้งหมดไปทดสอบเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ (slide culture) (ภาพที่ 4.38) เพื่อดูปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการเกิดสภาวะการปรสิตในเชื้อรา (mycoparasite) ในทริตเมนต์ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อ *P. acanthicum* RYS-7 ทั้งในกรณีที่ทดสอบกับเชื้อ *Pythium* และ *Fusarium* สาเหตุโรค โดยพบทั้งกระบวนการพันรัดเส้นใยและการแทงผ่านเข้าไปในไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 4.39 และ ภาพที่ 4.40)

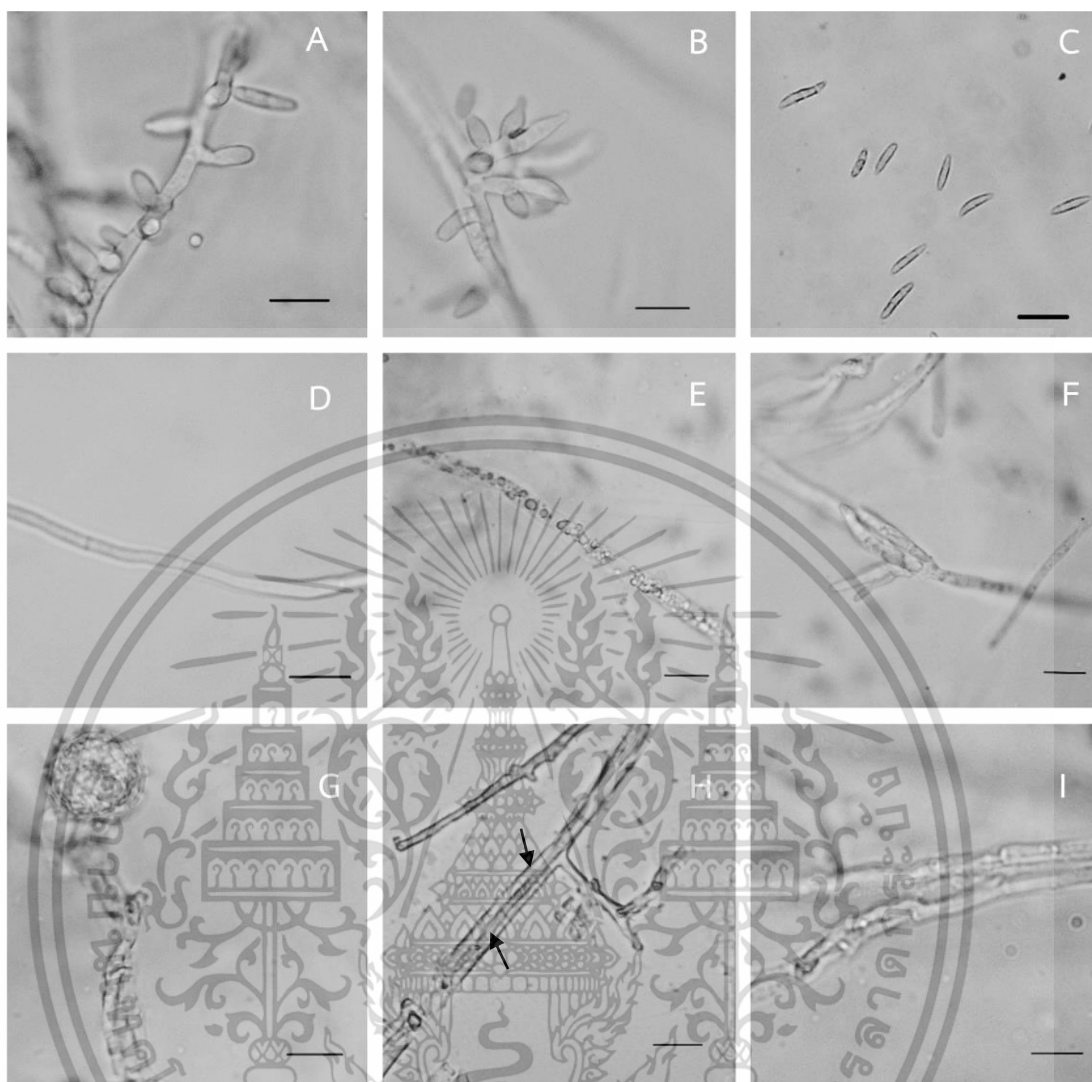


ภาพที่ 4.38 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อรวมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ *Pythium* sp. (P) และ *Fusarium* sp. (F) สาเหตุโรคพืช กับ NpP หรือ HvP สายพันธุ์ที่แยกได้ โดย A: P+ *P. acanthicum* RYS-7; B: F+*P. acanthicum* RYS-7; C: P+*P. catenulatum* CHS-10; D: F+*P. catenulatum* CHS-10; E: P+*P. torulosum* RYS-10; F: F+*P. torulosum* RYS-10; G: P+*P. diclinum* RYS-16; H: F+*P. diclinum* RYS-16; I: P+ *P. cucurbitacearum* RYS-20; J: F+*P. cucurbitacearum* RYS-20



ภาพที่ 4.39 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อร่วมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรครากับ *P. acanthicum* RYS-7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย A-C: เส้นใยปกติของเชื้อ *Pythium* (400×); D-H: ภาพถ่ายจากสไลด์ที่ทำการเลี้ยงเชื้อร่วม โดยลูกศรสีดำจะแสดงให้เห็นถึงเส้นใยของ *P. acanthicum* ที่พันรัดเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรค (scale bar: 10 ไมโครเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.40 แสดงผลการทดสอบเลี้ยงเชื้อรวมบนสไลด์ (slide culture) ระหว่างเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรครากับ *P. acanthicum* RYS-7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย A-B: เซลล์ให้กำเนิดโคนิเดีย (conidiogenous cells) (40×); C: Macrospore (100×); D: เส้นใยพร้อมผนังกัน (septate hypha); E-I: ภาพถ่ายจากสไลด์ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรวม; E: เส้นใยที่เสียหาย; F: เซลล์ให้กำเนิดโคนิเดียที่เสียหาย; G: oospore ของ *P. acanthicum*; H: การแทงผ่านเส้นใยเชื้อสาเหตุ โดยลูกครีสีดำจะแสดงให้เห็นถึงเส้นใยของ *P. acanthicum*; I: การพันรัดเส้นใยของเชื้อสาเหตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

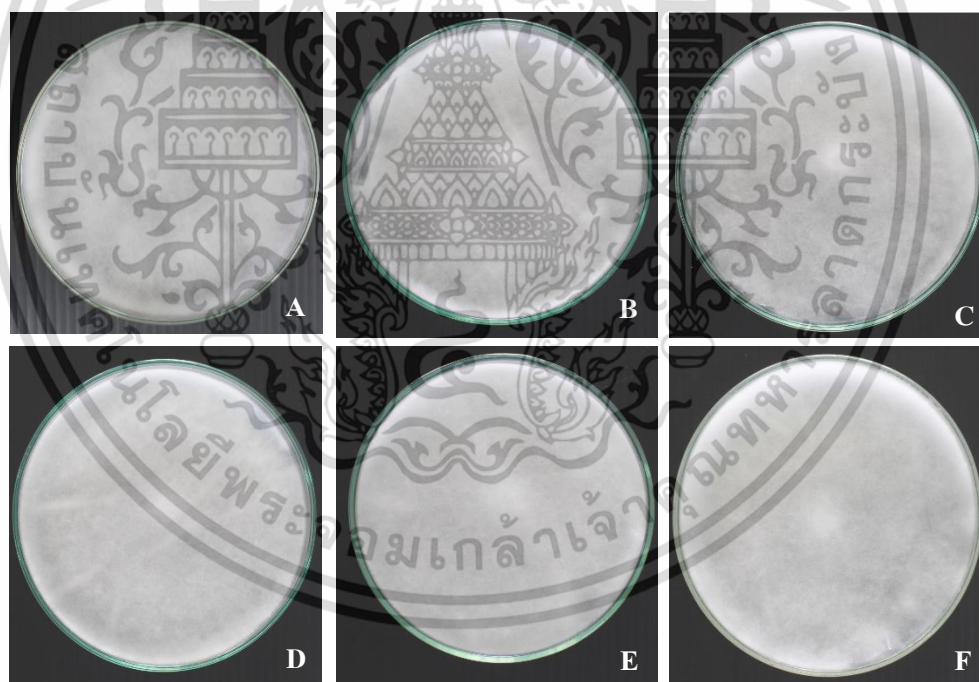
3) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและงอกของชิ้นส่วนขยายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคด้วย culture filtrate

สำหรับผลการทดสอบความสามารถของ culture filtrate ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรค พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของโคโคโคนี (ภาพที่ 4.41) โดยแต่ละทรีตเมนต์ รวมถึงชุดควบคุม มีน้ำหนักของเส้นใยโดยเฉลี่ย ขนาดโคโคโคนี อยู่ที่ประมาณ 50% และ 9.00 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) เช่นเดียวกันกับผลการทดสอบการยับยั้งการงอกของเส้นใยเชื้อ *Fusarium* ด้วยการผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อกับ culture filtrate โดยพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ (ภาพที่ 4.42) โดยในชุดควบคุมแบบใส่น้ำนิ่งมาเชื้ออาหารเหลว จะมีความยาวเส้นใยอยู่ที่ 0.00 และ 105.67 ไมครอน และมีจำนวนสปอร์ที่ 14.30 และ 19.12×10^4 spore/ml (ตารางที่ 4.9) ตามลำดับ ในขณะที่แต่ละทรีตเมนต์ คือ CHS-10, RYS-7, RYS-10, RYS-16 และ RYS-20 มีความยาวเส้นใยอยู่ที่ 144.30, 91.89, 82.63 105.30 และ 79.30 ไมครอน มีจำนวนสปอร์ที่ 18.67, 14.25, 15.47, 17.25 และ 13.75 spore/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ผลของ culture filtrate จาก non-pathogenic *Pythium* (NpP) หรือ hypo-virulence *Pythium* (HvP) ในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรคพืช

Treatment (NpP, HvP)	น้ำหนักเส้นใย (กรัม)	ขนาดโคโลนี (ซม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้ง ¹
Control	0.54 a	9.00	0.00
CHS-10	0.51 a	9.00	0.00
RYS-7	0.53 a	9.00	0.00
RYS-10	0.51 a	9.00	0.00
RYS-16	0.51 a	9.00	0.00
RYS-20	0.52 a	9.00	0.00
CV. (%)	12.11		

¹ผลการวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ค่า F ที่ได้แสดงถึงความไม่แตกต่างกันทางสถิติ

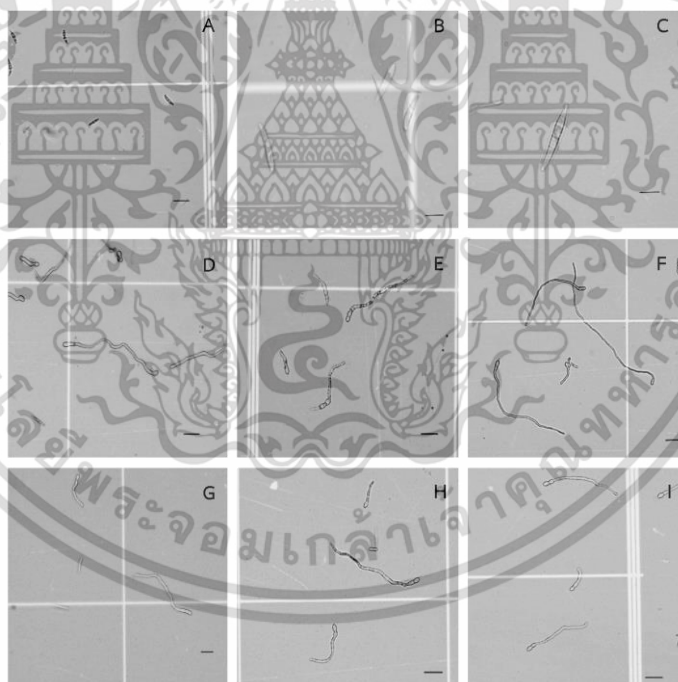


ภาพที่ 4.41 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate จาก NpP หรือ HvP ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรคพืชหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน โดย A: Control โคโลนีของเชื้อ *Pythium*; B: CHS-10 C:RYS-7; D: RYS-10; E: RYS-16; F: RYS-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลของ culture filtrate จาก non-pathogenic *Pythium* (NpP) หรือ hypo-virulence *Pythium* (HvP) ในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรครีซ

Treatment (NpP, HvP)	ความยาวเส้นใยที่งอก (μm)	จำนวนสปอร์ (1×10^4 spore/ml)
Control น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ	0.00 c	14.30 a
Control อาหารเหลว	105.67 b	19.12 a
CHS-10	144.30 a	18.67 a
RYS-7	91.89 b	14.25 a
RYS-10	82.69 b	15.47 a
RYS-16	105.30 b	17.25 a
RYS-20	79.30 b	13.75 a
CV. (%)	23.14	32.05



ภาพที่ 4.42 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate จาก NpP หรือ HvP ต่อการออกของสปอร์ของเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรครีซภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง โดย A-C: Control สปอร์ของเชื้อ *Fusarium* ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ; D: Control สปอร์ของเชื้อ *Fusarium* ในอาหารเหลว PDB; E: RYS-7; F: CHS-10; G: RYS-10; H: RYS-16; I: RYS-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การควบคุมเชื้อสาเหตุโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของสายพันธุ์ NpP หรือ HvP ที่แยกได้

4.2.4.1 การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture)

จากการทดสอบ พบว่าพืชที่ได้รับการแช่รากด้วย NpP หรือ HvP strain ได้แก่ *P. diclinum* RYS-16 และ *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 นั้นมีความรุนแรงของโรคโคนเน่ารากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทริตเมนต์อื่นๆ โดยมีความรุนแรงโรคลงอยู่ที่ 10-20% ในขณะที่ชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื่อนั้นมีอาการโรคสูงที่สุด คือ 75% นอกจากนี้ อาการโรคสามารถแพร่ขยายลุกลามไปยังโคนต้น หรือรากฝั่งตรงข้ามของรากที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อได้อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบความยาวรากกับชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ พบว่าทริตเมนต์ที่แช่ด้วยด้วยเส้นใยของเชื้อแต่ละไอโซเลทยังไม่สามารถกระตุ้นให้พืชทดสอบเจริญเติบโตเท่ากันได้ในขณะที่ชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื่อนั้นมีความยาวรากน้อยที่สุด คือ 5.42 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.10 ภาพที่ 4.43 และ 4.44) ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 มีอาการโรคลงอยู่ที่ประมาณ 18% นอกจากนั้นยังมีน้ำหนักรวมใกล้เคียงกับชุดควบคุม นั่นคืออยู่ที่ 12.84 กรัม (ตารางที่ 4.11 ภาพที่ 4.45 และ 4.46)

ตารางที่ 4.10 การทดสอบความสามารถในการควบคุม โรคเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture) ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP

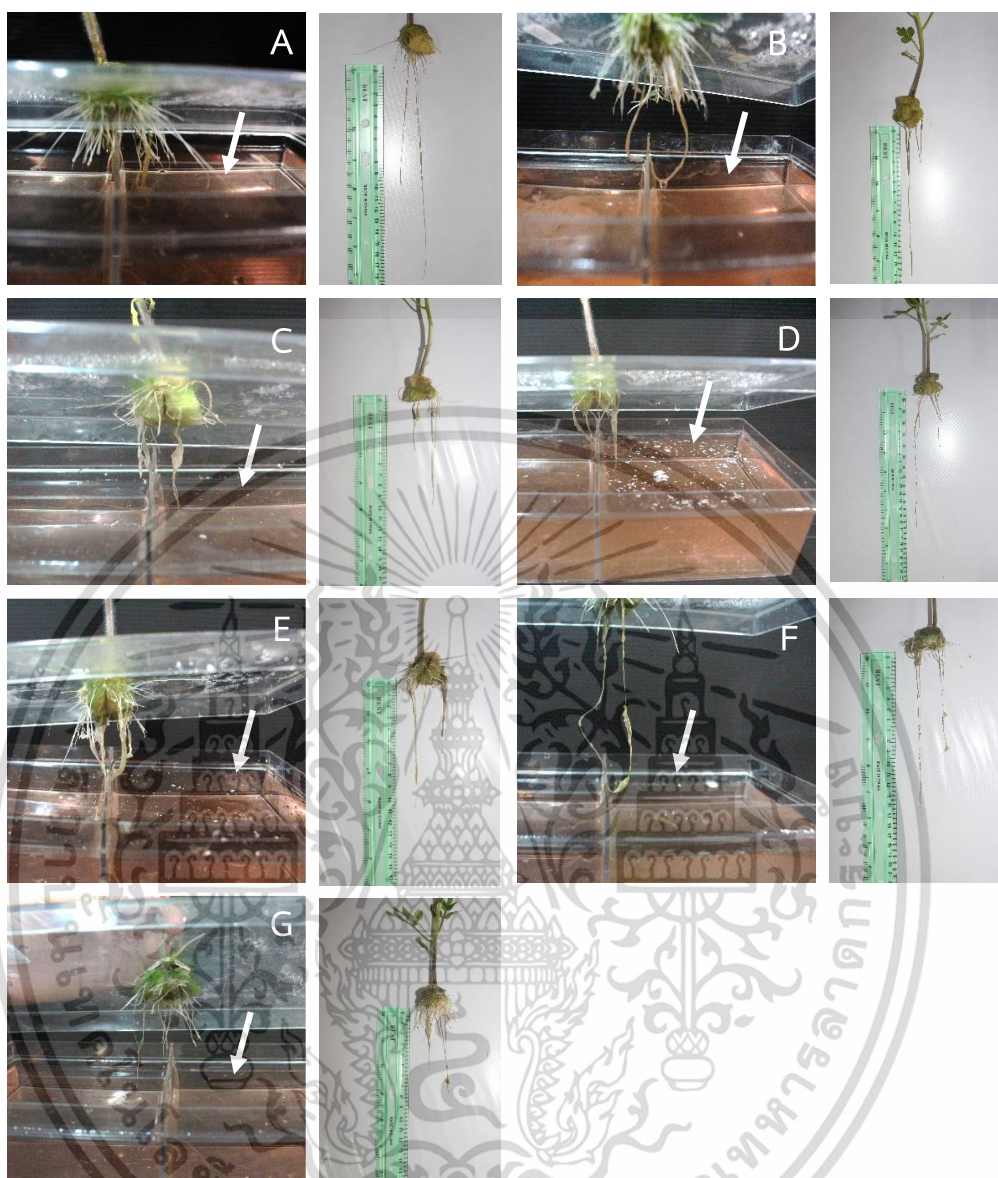
สายพันธุ์ NpP หรือ HvP	Disease incident (%)	Disease severity (%)	ความยาวราก (ซม.) ¹
Control ไม่ปลูกเชื้อ	0.00	0.00	12.65 a
Control ปลูกเชื้อ	100.00	75.00	5.42 b
CHS-10	100.00	18.75	8.47 ab
RYS-7	100.00	43.75	6.62 ab
RYS-10	100.00	31.25	8.22 ab
RYS-16	100.00	12.50	7.90 ab
RYS-20	100.00	31.25	5.92 b
CV. (%)			50.51

¹ ความยาวรากส่วนที่ทำการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 4.43 การทดสอบการควบคุม โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* ในต้นมะเขือเทศที่แช่ด้วย cell culture ของ NpP หรือ HvP ด้วยเทคนิค split-root A: Control ที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ; B: Control ที่ทำการปลูกเชื้อ; C: *P. acanthicum* RYS-7; D: *P. catenulatum* CHS-10; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20; ลูกศรแสดงรากส่วนที่ทำการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.44 แสดงรากของต้นมะเขือเทศที่แช่ด้วย cell culture ของ NpP หรือ HvP เพื่อควบคุมเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรคเน่าด้วยเทคนิค split-root โดยรากฝั่งซ้ายคือฝั่งที่ได้รับการกระตุ้น โดย NpP หรือ HvP ฝั่งขวา (ลูกศรสีขาว) คือส่วนที่ปลูกเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรค A: Control ที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ; B: Control ที่ทำการปลูกเชื้อ; C: *P. acanthicum* RYS-7; D: *P. catenulatum* CHS-10; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20

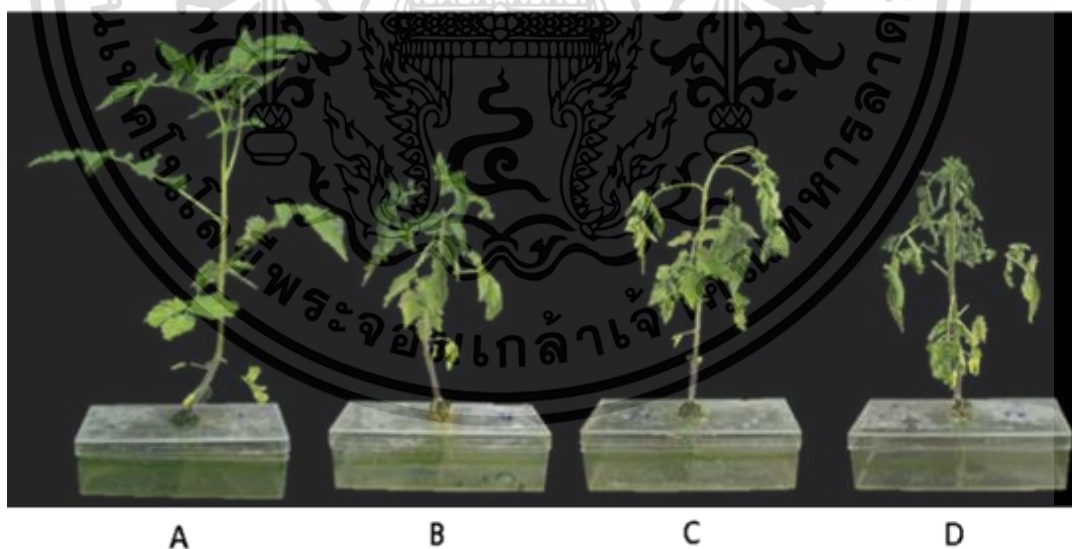
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความสามารถของเซลล์ที่มีชีวิต (cell culture) ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP ในควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ *Fusarium* sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์)

สายพันธุ์ NpP หรือ HvP	Disease incidence (%)	Disease severity (%)	น้ำหนักสด (กรัม)		
			ราก ¹	ต้น	รวม ²
Control ไม่ปลูกเชื้อ	0.00	0.00	0.44 a	12.90 a	13.72 a
Control ปลูกเชื้อ	75.00	44.00	0.24 a	8.42 b	8.89 b
CHS-10	50.00	18.75	0.42 a	11.37 ab	12.84 ab
RYS-7	50.00	37.50	0.33 a	12.87 a	13.71 a
RYS-10	75.00	43.75	0.34 a	11.35 ab	11.94 ab
RYS-16	50.00	37.50	0.36 a	8.57 b	9.34 b
RYS-20	75.00	25.00	0.18 a	10.20 ab	11.04 ab
CV. (%)			51.15	22.15	21.00

¹ น้ำหนักรากส่วนที่ทำการปลูกเชื้อ

² น้ำหนักรวมทั้งต้นและรากทั้ง 2 ส่วน



ภาพที่ 4.45 ตัวอย่างอาการต้นมะเขือเทศที่ทำการปลูกเชื้อ *Fusarium* sp. โดย คือ A: ระดับ 0 (ไม่แสดงอาการโรค); B: ระดับ 1 (เกิดอาการเหี่ยวและเหี่ยวเล็กน้อย); C: ระดับ 2 (เกิดอาการเหี่ยว และเนื้อเยื่อลำเลียงเกิดการเปลี่ยนสีเล็กน้อย); D: ระดับ 3 (เกิดอาการเหี่ยวอย่างหนัก รวมถึงเนื้อเยื่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.46 แสดงต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ cell culture ของ NpP หรือ HvP เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค split-root โดยรากฝั่งซ้ายคือฝั่งที่ได้รับการกระตุ้นโดย NpP หรือ HvP ฝั่งขวาคือส่วนที่ปลูกเชื้อสาเหตุ A: Control ที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ; B: Control ที่ทำการปลูกเชื้อ; C: *P. catenulatum* CHS-10; D: *P. acanthicum* RYS-7; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.2 การควบคุมโรคด้วยการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ (cell fragments)

จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรค พบว่าพืชที่ทำการแช่ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของ *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 และ *P. torulosum* RYS-10 นั้นมีความรุนแรงของโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* น้อยกว่าชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความรุนแรงโรคโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 50-60% และเมื่อเทียบความยาวรากกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ พบว่าทริตเมนต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไอโซเลท CHS-10 มีความยาวรากอยู่ที่ 13.20 เซนติเมตร ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อก็ยังถือว่ามีความแตกต่างกัน ในขณะที่ทริตเมนต์อื่นๆ มีรากที่สั้นกว่า แสดงให้เห็นว่าการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อ *Pythium* ที่เป็น HvP strain นั้น ไม่ได้กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน (ตารางที่ 4.12 ภาพที่ 4.47) ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการควบคุม *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. acanthicum* ไอโซเลท RYS-7 มีอาการโรคน้อยที่สุด อยู่ที่ 31.25% นอกจากนั้นยังมีน้ำหนักรวมที่มากกว่าชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้ออีกด้วย (ตารางที่ 4.13 ภาพที่ 4.48)

ตารางที่ 4.12 การทดสอบความสามารถในการควบคุม โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP

สายพันธุ์ NpP หรือ HvP	Disease incidence (%)	Disease severity (%)	ความยาวราก (ซม.)
Control ไม่ปลูกเชื้อ	0.00	0.00	17.60 a
Control ปลูกเชื้อ	100.00	56.25	14.40 b
CHS-10	100.00	50.00	13.20 b
RYS-7	100.00	50.00	9.44 c
RYS-10	100.00	43.75	7.47 c
RYS-16	100.00	50.00	7.95 c
RYS-20	100.00	50.00	9.55 c
CV. (%)			12.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.47 แสดงลำต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของ NpP หรือ HvP เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรค โดย A: Control ที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ; B: Control ที่ทำการปลูกเชื้อ; C: *P. catenulatum* CHS-10; D: *P. acanthicum* RYS-7; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 การทดสอบความสามารถในควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. ในต้นมะเขือเทศ (อายุ 2 สัปดาห์) ด้วยการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ NpP หรือ HvP

สายพันธุ์ NpP หรือ HvP	Disease incidence (%)	Disease severity (%)	น้ำหนักสด (กรัม)		
			ราก	ต้น	รวม
Control ไม่ปลูกเชื้อ	0.00	0.00	0.03 ab	1.01 ab	1.04 ab
Control ปลูกเชื้อ	100	75.00	0.03 ab	0.41 b	0.44 b
CHS-10	75	43.75	0.03 ab	0.40 b	0.43 b
RYS-7	100	31.25	0.08 a	1.22 a	1.30 a
RYS-10	100	50.00	0.07 ab	0.62 ab	0.68 ab
RYS-16	100	43.75	0.07 ab	0.68 ab	0.75 ab
RYS-20	100	50.00	0.02 b	0.63 ab	0.65 b
CV. (%)			72.76	52.83	52.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.48 แสดงลำต้นและรากของมะเขือเทศที่แช่ด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของ NpP หรือ HvP ในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค โดย A: Control ที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ; B: Control ที่ทำการปลูกเชื้อ; C: *P. catenulatum* CHS-10; D: *P. acanthicum* RYS-7; E: *P. torulosum* RYS-10; F: *P. diclinum* RYS-16; G: *P. cucurbitacearum* RYS-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ศึกษาการแพร่กระจายของ Oomycetes ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน

5.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการการจัดจำแนก

การศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อ *Pythium* และจุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท จากจำนวนเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับข้อมูลทางอณูชีววิทยา พบว่าทั้ง 52 ไอโซเลทนั้นประกอบด้วย 3 จีนัสคือ *Pythium*, *Phytophythium* และ *Globisporangium* รวมทั้งหมด 11 สปีชีส์ คือ *Globisporangium splendens*, *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium deliense*, *Pythium diclinum*, *Pythium longipapillum*, *Pythium myriotylum*, *Pythium torulosum*, *Phytophythium helicoides* และ *Phytophythium vexans* โดยส่วนใหญ่จะถูกจัดให้อยู่ในเคลดแบบ monophyletic ยกเว้น *Phytophythium*

โดยไอโซเลทที่พบได้ส่วนใหญ่จะเป็น *G. splendens* ซึ่งแยกได้จากดินเกษตร ยกเว้น TS-9 ที่แยกได้จากดินแม่น้ำ เชื่อในสกุลนี้เคยมีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคนทุเรียน โดยจากงานศึกษาของ Saksiri *et al.* (2018) ได้ค้นพบเชื้อ *P. splendens* (*G. splendens*) ที่ก่อโรคนทุเรียนเป็นครั้งแรกในประเทศไทย จึงอาจหมายความว่าอาจมีความเป็นไปได้ที่ *G. splendens* จะเกิดการแพร่กระจายไปในพื้นที่เพาะปลูกในเขตภาคตะวันออก อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมว่ามีความเป็นไปได้หรือไม่ที่สปีชีส์ดังกล่าวจะมีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์เด่นในสิ่งแวดล้อมใหม่ (dominant species)

สำหรับ *Phytophythium* เคยถูกจัดให้เป็น *Pythium* ในเคลด K เนื่องจากมีการสร้างถุง vesicle เหมือน *Pythium* ถึงแม้จะมีความสามารถในการสร้าง sporangium ที่คล้ายกับ *Phytophthora* (*Phytophthora*-like sporangium) ก็ตาม จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื่อในสกุลนี้มีลักษณะโครงสร้างทางชีววิทยา ร่วมกันระหว่างเชื้อ *Pythium* และ *Phytophthora* (Nam and Choi, 2019) โดยหากย้อนกลับไปจะพบว่ามีหลายรายงานที่จะพยายามจัดกลุ่มให้ *Pythium* ข้างต้น ซึ่งก็สามารถทำได้สำเร็จในปี 2004 (Lévesque and de Cock, 2004) อย่างไรก็ตาม ในรายงานฉบับดังกล่าวก็ยังตั้งข้อสังเกตว่าเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อในเคลด K พบว่าทุกสายพันธุ์ถูกจัดให้อยู่ในเคลดแบบ polyphyletic นอกจากนี้ การศึกษาวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่องด้วยการศึกษาตำแหน่ง ITS และ ribosomal large subunit (de Cock *et al.*, 2015; Lévesque and de Cock, 2004) ก็ช่วยยืนยันข้อสงสัยดังกล่าว คือมีความน่าจะเป็นที่ *Phytophythium* นั้นอาจเป็น สกุลแรกๆ ที่มีวิวัฒนาการมาก่อน (early divergence) สกุลอื่นในวงศ์ Peronosporaceae (Bourret *et al.*, 2018) ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นประกอบกับ

ความก้าวหน้าทาง microbial systematics จึงมีการเปลี่ยนชื่อ *Pythium* sp. ในเคลด K เป็นสกุลใหม่ เช่น *Ovatisporagium* [(Uzuhashi *et al.*, 2010) ซึ่งเป็นอีกชื่อหนึ่งของ *Phytophythium*] นอกจากนี้ในบางรายงานก็จัดให้อยู่ในเคลดเฉพาะของสกุลนี้เลย (เคลด 1-3) (Baten *et al.*, 2014; de Jesus *et al.*, 2016)

5.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่แยกได้กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

ความสำคัญของปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ที่ส่งผลต่อการเจริญและการกระจายตัวของเชื้อกลุ่มดังกล่าว เช่น อินทรีย์วัตถุ ที่เป็นเหมือนแหล่งคาร์บอนของสิ่งมีชีวิตภายในดิน และไนโตรเจน ซึ่งทั้ง 2 ปัจจัยดูเหมือนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการงอกของ oospore (Elad and Chet, 1987) นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตเช่นกัน โดยส่งผลในระดับเซลล์ เช่น การผลิต ATP หรือการรบกวนโครงสร้างของโมเลกุลขนาดใหญ่ การที่ดินเป็นกรดหรือด่างเกินไปจนส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Pythium* หรือไม่นั้น สามารถอ้างอิงได้จากการศึกษาของ Kazama and Fuller (1973) โดย Kazama and Fuller รายงานว่ามีความหลากหลายของ *Pythium* ในระบบนิเวศน้ำเค็มหรือทะเลนั้นค่อนข้างต่ำ โดยมี dominant species คือ *P. marinum* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่มีการแยก *Phytophythium vexans* ไอโซเลท CHS-6 CHS-7 และ CHS-8 จากบริเวณป่าชายเลนของจังหวัดจันทบุรี โดยไม่พบเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ในตัวอย่างดินและพืชในพื้นที่ป่าชายเลนจากจังหวัดอื่นเลย สำหรับความชื้นที่บ่งบอกปริมาณน้ำภายในดิน และประเภทของเนื้อดิน (soil texture) อาจส่งผลต่อการงอกและการกระจายตัวของ zoospore ของเชื้อ *Pythium* และปริมาณของเชื้อได้ (Barton, 1958; Alhussain, 2012) สำหรับสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มจัดนั้น ส่งผลต่อปริมาณของเชื้อเช่นกัน โดยเนื้อดินจะเกี่ยวข้องความสามารถในการอุ้มน้ำ ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของ zoospore ของ *Pythium* (Kerr, 1964)

อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ข้อมูลชุดอื่น ยกเว้น 2 ปัจจัยดังที่กล่าวไปข้างต้น คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดภายในดิน ค่าการนำไฟฟ้า และอินทรีย์วัตถุ เมื่อพิจารณาจากโมเดลเส้นตรงที่ได้ รวมถึงค่า F และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) พบว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันน้อย หรือแทบจะไม่สัมพันธ์กันเลย จึงอาจหมายความว่าปัจจัยที่ทำการศึกษาเป็นเพียงปัจจัยเสริมเท่านั้น โดยในงานวิจัยของ Barton (1958) ได้รายงานว่าปัจจัยที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษานั้นไม่ใช่ปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการกระจายตัว ถึงแม้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างภายในดินแต่ละที่ และการกระจายตัวของ *Pythium* จะมีความแตกต่างกันจนดูเหมือนจะเกี่ยวข้องกันก็ตาม จึงอาจหมายความว่าสิ่งที่ทำให้เกิดการกระจายตัว และกำหนดความหลากหลายของ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงนั้นเกี่ยวข้องกับการมีอยู่และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่อาศัยรวมกันในพื้นที่นั้นๆ แทนที่จะเกิดจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมโดยปัจจัยทางสภาพแวดล้อมนั้นจะเป็น

ตัวกำหนดความสามารถในการก่อโรค หรือกำหนดพืชอาศัย หรือกำหนดความสามารถในการดำรงชีพ อย่างเช่นที่มีการกล่าวถึงในงานศึกษาที่ใหม่กว่า (Broders *et al.*, 2009; You *et al.*, 2017; Zitnick-Anderson *et al.*, 2017) ที่กล่าวว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมบางอย่าง เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความจุ ความชื้นสนาม และประเภทของดินนั้นสำคัญต่อความสามารถในการก่อโรคของ *Pythium* เป็นอย่างมาก

5.2 ศึกษาคุณสมบัติและความเป็นประโยชน์ทางด้านโรคพืช

สำหรับการทดสอบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่ามีเพียง *P. acanthicum* RYS-7 ที่แสดงศักยภาพในการเป็นปรสิตในเชื้อราชนิดอื่น (mycoparasite) เห็นได้จากการทำให้โคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคเสียหาย หรือการพันรัดเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคและแทงผ่านเข้าไปภายใน อย่างไรก็ตามในการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *Pythium* และ *Fusarium* ได้ สาเหตุอาจเป็นเพราะเชื้อไอโซเลทที่นำมาทดสอบไม่สามารถสร้างสาร secondary metabolite หรือ enzyme ที่สามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุอื่นได้จากข้อมูลดังกล่าว จึงอาจพิจารณาได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ไม่ก่อโรค หรือสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงที่พบไม่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ ยกเว้น *P. acanthicum* RYS-7 ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในระดับปานกลาง ซึ่งไม่เป็นที่น่าแปลกใจ เนื่องจากมีบางรายงานที่กล่าวถึงความสามารถของ *P. acanthicum* และเชื้อหลายสปีชีส์ที่อยู่ในคลัดเดียวกัน (clade D) ในการเป็นปรสิตในเชื้อราชนิดอื่นอย่าง *P. oligandrum* และ *P. periplocum* (Ali-Shtayeh *et al.*, 1999)

ในการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในพืชด้วยเทคนิค split-root พบว่าเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกสามารถกระตุ้นความต้านทานพืชได้ในระดับหนึ่ง รวมถึงมีบางไอโซเลทที่ไม่สามารถกระตุ้นความต้านทานได้ในกรณีของการใช้ cell culture หรือเซลล์ที่ยังมีชีวิต พบว่าพืชที่นำรากไปแช่เซลล์ของ *P. diclimum* RYS-16 และ *P. catenulatum* CHS-10 นั้นมีความรุนแรงของโรคโคนเน่า รากเน่า น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ NpP หรือ HvP สายพันธุ์อื่นๆ โดยมีความรุนแรงโรคโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 10-20% นอกจากนี้ ยังพบอีกว่าทริตเมนต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไอโซเลท CHS-10 มีความยวรากรากในระดับที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ทริตเมนต์อื่นๆ มีรากที่น้อยกว่า ส่วนชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื่อนั้นมีความยวรากรากน้อยที่สุด สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 18% นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักรวมใกล้เคียงกับชุดควบคุมอีกด้วย นั่นคืออยู่ที่ 12.84 กรัม โดยการที่ความรุนแรงของโรคในแต่ละทริตเมนต์น้อยกว่าชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการ

เจริญเติบโตแบบแก่งแย่งแข่งขัน (competition) เนื่องจากความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วของเชื้อ *Pythium* ทั้งที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคหรือไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สามารถเจริญลุกลามไปยังรากอีกฝั่ง ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ในรูปแบบดังกล่าว เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ พบว่าพืชที่ทำการแช่รากด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์นั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อ *Pythium* ที่เป็น HvP strain นั้น ไม่ได้กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่วนผลการทดสอบความสามารถในควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคโดยใช้ชิ้นส่วนเซลล์กระตุ้นพืชให้เกิดความต้านทาน พบว่าพรีตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. acanthicum* ไอโซเลท RYS-7 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 30% นอกจากนั้นยังมีน้ำหนักรวมที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้ออีกด้วย จากการพิจารณาผลการทดลองทั้งหมด พบว่ามีหลายความเป็นได้ที่เชื้อที่คัดเลือกมาแต่ละชนิดจะให้ผลการควบคุมเชื้อสาเหตุ รวมถึงการส่งเสริมการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น การที่พืชไม่มี receptor ที่สามารถจดจำโมเลกุลบางชนิดของเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน หรือการที่แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการสร้าง elicitin (ELIs) หรือ elicitin-like protein (ELs) ได้แตกต่างกัน (Derevnina *et al.*, 2016) จึงทำให้เกิดผลการเกิดความต้านทาน โรคที่แตกต่างกันออกไป ซึ่ง elicitin ก็คือ MAMPs (Microbe-associated molecular pattern) ชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycete สร้างโดยโมเลกุลดังกล่าวสามารถกระตุ้นพืชให้เกิดการตายของเซลล์แบบยับยั้ง (hypersensitive response หรือ HR cell death) อันเนื่องมาจากกระตุ้นให้เกิดการสะสม reactive oxygen species จากกระบวนการ oxidative burst (การเกิด NAPDH oxidase, calcium influx และการกระตุ้น MAP kinase) ตัวโมเลกุลมีลักษณะ โครงสร้างที่มีการอนุรักษณ์ ไม่มีลำดับที่เหมือนกับโปรตีนพืช ตัวพืชจึงจะจดจำในฐานะโมเลกุลแปลกปลอมด้วย receptor ที่เรียกว่า pattern recognition receptors (PRR) และยีนสร้างโมเลกุลดังกล่าวมีการแสดงออกในระหว่างที่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ โดยทั้ง ELIs และ ELs จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ELIs ประกอบด้วยโดเมนของกรดอะมิโน 98 ชนิดที่มีตำแหน่งอนุรักษณ์เป็น cysteine 6 โมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ และ ELs เองก็มีลักษณะที่คล้ายกัน

ในบางครั้ง elicitin อาจกระตุ้นพืชให้เกิดการสร้างความต้านทานแบบ basal defense ตัวอย่างเช่น ใน *P. oligandrum* ที่เมื่อกระตุ้นมะเขือเทศด้วยโปรตีนผนังเซลล์ก็สามารถต้านทานโรคเหี่ยวจาก *Ralstonia solanacearum* ได้ (Hase *et al.*, 2008) ดังนั้น การที่ *P. acanthicum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใกล้ชิดกับ *P. oligandrum* จะสามารถกระตุ้นให้ต้นพืชเกิดความต้านทานนั้นก็เป็นไปได้เช่นกัน ทั้งนี้ ก็ยังมีความเป็นไปได้ที่แต่ละไอโซเลทจะเป็นเชื้อแบบฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นความต้านทานของ *P. acanthicum*, *P. catenulatum* และ *P. diclinum* เองนั้นก็ยังคงอยู่ในระดับต่ำ จึงอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาความสามารถในการ

ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคด้วยการใช้โปรตีนผนังเซลล์ (cell wall protein; elicitin) เช่นเดียวกับเชื้อ *P. oligandrum* ที่มีการศึกษามาจนถึงปัจจุบัน (Yacoub *et al.*, 2018) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ receptor ตัวรับ เช่น ในงานศึกษาของ (Derevnina *et al.*, 2016) ที่อ้างถึงการถ่ายยีนสร้างโปรตีนตัวรับ (elicitin response หรือ ELR) ใส่พืชชนิดอื่นๆ และทำให้พืชชนิดนั้นๆเกิดความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคในกลุ่ม Oomycete ด้วยกัน แบบ broad-spectrum ได้ โดยนอกจาก ELR ก็อาจมีโปรตีนชนิดอื่นที่ทำหน้าที่เป็น co-receptor เช่น BAK1/SERK3 และ SOBIR ดังนั้น การศึกษาการใช้โปรตีนผนังเซลล์ ร่วมกับการศึกษาโปรตีนตัวรับ แทนการใช้ mild strain เพื่อกระตุ้นความต้านทานพืชแบบ cross protection เพียงอย่างเดียว จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes ที่สามารถกลายเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพชนิดใหม่ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินเกษตร ดินป่า ดินแม่น้ำ ดินป่าชายเลน ตัวอย่างน้ำ และเศษซากใบพืช สามารถแยก *Pythium* sp. และสกุลใกล้เคียงได้ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลทจากตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 70 ไอโซเลท โดยมีลักษณะโคโลนีหลายรูปแบบตั้งแต่แบบปุยฝ้าย (cottony) ดอกเบญจมาศ (chrysanthemum) หรือดอกกุหลาบ (rosette) บางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่บางสายพันธุ์อาจใช้เวลาเกือบหนึ่งสัปดาห์ แต่ละไอโซเลทมีการสร้างโครงสร้างขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเพศแทบทุกรูปแบบ ซึ่งล้วนแต่เป็นลักษณะของเชื้อในสกุล *Globisporangium*, *Pythium* และ *Phytophythium* โดยเมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าอยู่ในคลด A, B, D, I และ K เป็นจำนวน 1, 12, 7, 11 และ 21 ไอโซเลท ตามลำดับทั้งหมด 11 สปีชีส์ นั่นคือ *Globisporangium splendens*, *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium deliense*, *Pythium diclinum*, *Pythium longipapillum*, *Pythium myriotylum*, *Pythium torulosum*, *Phytophythium helicoides* และ *Phytophythium vexans*

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมด้วย simple linear-regression แสดงให้เห็นว่าความเป็นกรด-ด่างดิน รวมถึงความชื้นในดินมีผลต่อการกระจายตัวของ *Pythium* ในระดับปานกลาง โดยเชื้อที่สามารถพบและนับได้ คือ *G. splendens*, *P. acanthicum* และ *P. cucurbitacearum* เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ p-value (<0.01 หรือ <0.05) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ นอกเหนือจากนั้น เมื่อพิจารณาค่า R-squared พบว่าโมเดลที่ได้สามารถอธิบายปริมาณของจุลินทรีย์ได้ในช่วง 30-50%

จากการทดสอบกับพืชเพื่อดูความสามารถในการก่อโรค พบว่าไอโซเลทที่แยกได้ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะไอโซเลทที่แยกได้จากพื้นที่เพาะปลูกที่สามารถก่อโรคในพืชทดสอบได้อย่างรุนแรง 50-100% เช่น *G. splendens* ที่ก่อให้เกิดอาการเน่าอย่างรุนแรงที่โคนต้น รากหรือเมล็ด ในส่วนของการค้นหา non-pathogenic หรือ hypo-virulent *Pythium* พบว่าบางไอโซเลท ได้แก่ *P. acanthicum* RYS-7, *P. torulosum* RYS-10, *P. diclinum* RYS-16, *P. cucurbitacearum* RYS-20 และ *P. catenulatum* CHS-10 ที่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (hypo-virulent strain) จึงได้ทำการเลือกมาทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ผลปรากฏว่า *P. acanthicum* RYS-7 เป็นไอโซเลทที่สามารถเข้าทำลายเส้นใยและเป็นปรสิตรในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

(mycoparasite) อย่างไรก็ตาม การทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate พบว่าไม่สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคพืชได้

ในการทดสอบความสามารถของเซลล์ที่ยังมีชีวิตและชิ้นส่วนเซลล์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในต้นพืช พบว่าพืชที่ทำการกระตุ้นด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตของ *P. diclinum* RYS-16 และ *P. catenulatum* CHS-10 นั้นมีความรุนแรงของอาการโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* น้อยที่สุดในขณะที่ชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชือนั้นมีอาการโรคสูงที่สุดเมื่อเทียบความยาวรากกับชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นความยาวรากของแต่ละทริตเมนต์นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. catenulatum* ไอโซเลท CHS-10 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 18% นอกจากนั้นยังมีน้ำหนักรวมใกล้เคียงกับชุดควบคุมอีกด้วย ส่วนในผลการทดสอบการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ในการควบคุมโรคเน่าที่เกิดจาก *Pythium* spp. พบว่าพืชที่ทำการแช่รากด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการใช้ชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อ *Pythium* ที่เป็น HvP strain นั้นไม่ได้กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรค พบว่าทริตเมนต์ที่ทดสอบด้วย *P. acanthicum* ไอโซเลท RYS-7 มีอาการโรคน้อยที่สุด คืออยู่ที่ประมาณ 30% นอกจากนั้นยังมีน้ำหนักรวมที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้ออีกด้วย

จากผลการทดลอง จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกสามารถกระตุ้นความต้านทานพืชได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ยกเว้น *P. acanthicum* มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และเชื้อทั้งหมด มีโอกาสที่จะเป็นเชื้อสาเหตุโรคแบบฉวยโอกาส หรือเกิดการกลายจนสามารถเป็นเชื้อก่อโรครุนแรงได้ ดังนั้น การศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคด้วยการใช้โปรตีนผนังเซลล์ (cell wall protein; elicitin) แทนการใช้ mild strain เพื่อกระตุ้นความต้านทานพืชแบบ cross protection จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Oomycetes ที่สามารถกลายเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ เช่นเดียวกับเชื้อ *P. oligandrum* ที่เป็น *Pythium* ปฏิบัติชนิดเดียวที่มีการศึกษามาจนถึงปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- Abad, Z.G., Shew, H.D. and Lucas, L.T. 1994. Characterization and pathogenicity of *Pythium* species isolated from turfgrass with symptoms of root and crown rot in North Carolina. **Phytopathology** 84: 913-921.
- Adhikari, B.N., Hamilton, J.P., Zerillo, M.M., Tisserat, N., Levesque, C.A. and Buell, C.R. 2013. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic Oomycetes. **PLOS ONE** 8: e75072.
- Agrawal, T. and Kotasthane, A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus** 1: 73.
- Ahn, P., Chung, H.-S. and Lee, Y.-H. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. **Plant Disease** 82(2): 244–246.
- Al-Balushi, Z.M., Agrama, H., Al-Mahmooli, I.H., Maharachchikumbura, S.S.N. and Al-Sadi AM 2018. Development of resistance to hymexazol among *Pythium* Species in cucumber greenhouses in Oman. **Plant Disease** 102: 202-208.
- Alhussaen, K.M. 2012. Effect of soil acidity on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* on Tomato Plant. **Journal of Biological Sciences** 12: 416-420
- Ali-Shtayeh, M. S. and Saleh, A.S.F. 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. **Mycopathologia** 145: 143–153.
- Allain-Boulé, N., Lévesque, C.A., Martinez, C., Bélanger, R.R. and Tweddell, R.J. 2004. Identification of *Pythium* species associated with cavity-spot lesions on carrots in eastern Quebec. **Canadian Journal of Plant Pathology** 26, 365-370.
- Ayers, W.A. and Lumsden, R.D. 1975. Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. **Phytopathology** 65: 1094–1100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Barsanti, L., Passarelli V., Evangelista, V., Frassanito, A.M. and Gualtieri, P. 2011. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. **Natural Product Reports** 28(3): 457–466.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review Microbiology** 22: 87-108.
- Barton, R. 1958. Occurrence and establishment of *Pythium* in soils. **Transactions of the British Mycological Society** 41: 207-222.
- Baten, M.A., Asano, T., Motohashi, K., Ishiguro, Y., Rahman, M.Z., Inaba, S., Suga, H. and Kageyama, K 2014. Phylogenetic relationships among *Phytophthium* species, and re-evaluation of *Phytophthium fagopyri comb. nov.*, recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. **Mycological Progress** 13:1145-1156.
- Beakes, G.W. and Sekimoto, S. 2009. The evolutionary phylogeny of Oomycetes-insight gained from studies of holocarpic parasites of algae and invertebrates, Pages 1-24 in: **Oomycetes Genetics and Genomics**. Lamour, K. and Kamoun, S. eds. John Wiley & Sons, New York.
- Beakes, G.W., Glockling, S.L. and Sekimoto, S. 2011. The evolutionary phylogeny of the Oomycetes “Fungi”. **Protoplasma** 249: 3–19.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. and Kauserud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in-silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiology** 10:189.
- Benhamou, N., Rey, N., Picard, K. and Tirilly, Y. 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. **Phytopathology** 89(6): 506-517.
- Bennett, R., Nam, B., Dedeles, G. and Thines, M. 2018. *Phytophthium leanoi* sp. nov. and *Phytophthium dogmae* sp. nov., *Phytophthium* species associated with mangrove leaf litter from the Philippines. **Acta Mycologic** 52.
- Berry, L.A., Jones, E.E., and Deacon, J. W. 1993. Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* Species. **Biocontrol Science and Technology** 3: 247-260.

- Bouket, A.C., Ahari, A.B., Lassaad, B. and Tojo, M. 2016. Morphological and molecular identification of newly recovered *Pythium* species, *P. abapressorium* and *P. spinosum* from Iran, and evaluation of their pathogenicity on cucumber seedlings. **Austrian Journal of mycology** 25: 39-50.
- Bourret, T.B., Choudhury, R., Mehl, H.K., Blomquist, C.L., McRoberts, N. and Rizzo, D.M. 2018. Multiple origins of downy mildews and mito-nuclear discordance within the paraphyletic genus *Phytophthora*. **Phytopathology** 108: 41-41.
- Broders, K.D., Wallhead, M.W., Austin, G.D., Lipps, P.E., Paul, P.A., Mullen, R.W. and Dorrance, A.E. 2009. Association of soil chemical and physical properties with *Pythium* species diversity, community composition, and disease incidence. **Phytopathology**. 99: 957-967.
- Campion, C., Massiot, P. and Rouxel, F. 1997. Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. **European Journal of Plant Pathology** 103: 725–735.
- Choudhary, C.E., Burgos-Garay, M.L., Moorman, G.W. and Hong C 2016 *Pythium* and *Phytophythium* species in two Pennsylvania greenhouse irrigation water tanks. **Plant Disease** 100: 926-932.
- Cook, D. E., Mesarich, C. H. and Thomma, B. P. H. J. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. **Annual Review of Phytopathology** 53(1): 541–563.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology** 30:17-32.
- Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. and Samson, R.A. 2009. **Fungal Biodiversity** Fungal Biodiversity centre Utrecht. The Netherlands.
- Czeezuga, B., Kiziewicz, B. and Mazalska, B. 2003. Further studies on aquatic fungi in the River Biebrza within Biebrza National Park. **Polish Journal of Environmental Studies** 12: 531-543.
- de Cock, A.W., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad S, *et al.* 2015. *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. **Persoonia** 34: 25-39.

- de Jesus, A.L., Goncalves, D.R., Rocha, S.C.O., Marano, A.V., Jeronimo, G.H., De Souza, J.I., Boro, M.C. and Pires-Zottarelli, C.L.A. 2016. Morphological and phylogenetic analyses of three *Phytopythium* species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. **Cryptogamie, Mycologie** 37: 117-128.
- Deacon, J. W. and Henry, C.M. 1978. Mycoparasitism by *Pythium oligandrum* and *P. acanthichum*. **Soil Biology and Biochemistry** 10: 409-405.
- Deacon, J.W. 1979. Cellulose decomposition by *Pythium* and its relevance to substrate-group of fungi. **The British Mycological Society** 77(3): 469-477.
- Derevnina, L., Dagdas Y.F., De la Concepcion, J.C., Bialas, A., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Wu, C-H., Lin, X., Aguilera-Galvez, C. et al., 2016. Nine things to know about elicitors. **New Phytologist** 212: 888–895.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1994. **Basic plant pathology methods (2nd edition)**. Florida: CRC Press.
- Dorrance, A., Berry, S.A., Bowen, P. and Lipps, P.E. 2004. Characterization of *Pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. **Plant Health Progress** 5: 1-7.
- Elad, Y. and Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-Off by bacteria. **Phytopathology** 77: 190-195.
- Estefan, G., Sommer, R. and Ryan, J. 2013. **Methods of Soil, Plant and Water Analysis (3rd Edition): A manual for the West Asia and North Africa Region**. Beirut: International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas (ICADA). 2013
- Fang, J.G. and Tsao, P.H. 1994. Evaluation of *Pythium nunn* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora* root rot of azalea and sweet orange. **Phytopathology** 85: 29-36.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 783-791.
- Gherbawy, Y.A.M.H., Abdelzaher, H.M.A., Meens, J. and El-Hariry H. 2005. Morphological and molecular identification of some closely related *Pythium* species in Egypt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 38: 193-208.

- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y. and Takahashi, H. 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. **Plant Pathology** 57: 870–876.
- Hattapanichaporn, C., Hakhunthod, W., Wongkasemsiri, A., Assavalapsakul, W. and Kriangkripiat, T 2020. A novel, virus-like double-stranded RNA in *Phytopythium cucurbitacearum* isolated from para rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in eastern Thailand. **Agriculture and Natural Resources** 54: 180-189.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concept. **Plant Disease** 87: 4-10.
- Hung, P. M., Wattanachai, P., Kasem, S. and Poeaim, S. 2015. Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in Citrus. **Mycobiology** 43(3): 288–296.
- Intaparn, P., Noireung, P., Maumoon, R., McGovern, R., Unartngam, J., Tapingkae, T. and To-anun, C. 2019. First report of *Pythium deliense* causing root and crown rot on *Catharanthus roseus*. in Thailand. **Plant Pathology Quarantine** 9: 239–247.
- Ivors, K. L., 2015. Laboratory protocols for *Phytophthora* species. **The American Phytopathological Society** 3340.
- Jones, E. E. and Deacon, J. W. 1994. Comparative physiology and behaviour of the mycoparasites *Pythium acanthophoron*, *P. oligandrum* and *P. mycoparasiticum*. **Biocontrol Science and Technology** 5(1): 27-40.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. 2006. The Plant immune system. **Nature** 444(7117): 323–329.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969) CHAPTER 24 - Evolution of protein molecules. In: H. N. Munro (Ed), **Mammalian Protein Metabolism**. Academic Press, pp. 21-132.
- Kammarnjesadakul, P., Palaga, T., Sritunyalucksana, K., Mendoza, L., Krajaejun, T., Vanittanakom, N., Tongchusak, S., Denduangboripant, J, *et al.* 2011. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Journal of Medical Mycology** 49: 289-295.

- Kamoun, S. 2003. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. **Eukaryotic Cell** 2(2): 191-199.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D.G., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J.D., Roy, S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Mukhtar, M. S., Tomé, D.F.A., Tör, M., Ackerveken, G.V.D, McDowell, J., Daay, F., Fry, W.E., Kreuze, H.L., Meijer, H.J.G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P.R.J. and Govers, F. 2016. The Top 10 Oomycetes pathogens in molecular plant pathology. **Molecular in Plant Pathology** 16(4): 413–434.
- Karaca, G., Tepedelen, G., Belghouthi, A. and Paul, B. 2008. A new mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, isolated in Isparta, Turkey: morphology, molecular characteristics, and its antagonism with phytopathogenic fungi. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 288: 163–170.
- Kazama, F and Fuller, M. 1973. Mineral nutrition of *Pythium marinum*, a marine facultative parasite. **Canadian Journal of Botany** 51: 693-699.
- Kerr, A. 1964. The influence of soil moisture on infection of Peas by *Pythium Ultimum*. **Australian Journal of Biological Sciences** 17: 676-685.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. Tenth Edition CAB International. Wallingford.
- Kluge, A. G. and Farris, J. S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. **Systematic Biology** 18: 1-32.
- Koohakan, P., Jeanakorn, T., Nuntagij, I. 2008. Major diseases of lettuce grown by commercial nutrient film technique in Thailand. **KMITL Science and Technology Journal** 8: 56-56.
- Latijnhouwers, M., Pierre, J.G.M. and Govers, F. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **TRENDS in Microbiology** 11: 462-469.
- Le, D.P., Smith, M.K. and Aitken, E.A.B. 2017. Genetic variation in *Pythium myriotylum* based on SNP typing and development of a PCR-RFLP detection of isolates recovered from *Pythium* soft rot ginger. **Letters in Applied Microbiology** 65: 319-326.
- Lévesque, C.A. 2011. Fifty years of Oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration. **Fungal Diversity** 50: 35–46.

- Levesque, C.A. and De Cock, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research** 108: 1363-1383.
- Li, Y. P., You, M. P. and Barbetti, M. J. 2014. Species of *Pythium* associated with seedling root and hypocotyl Disease on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Australia. **Plant Disease** 98(9): 1241–1247.
- Liebrand, T.W.H., van den Burg, H.A. and Joosten, M.H.A.J. 2014. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. **Trends in Plant Science** 19: 123-132.
- Lodhi, A.M., Shahzad, S. and Ghaffar, A. 2004. *Pythium deliense*, a new record from Pakistan. **Pakistan Journal of Botany** 36: 673-676.
- Martinez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G.B., Pozo, M.J. Pieterse, C.M. J. and Van Wees, S.C.M. 2017. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist** 2016: 1-15.
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. and Nakanishi, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. **Phytopathology** 67: 425-428.
- Mendoza, L., Hernandez, F., Ajello L. 1993. Life cycle of the human and animal Oomycetes pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical microbiology** 31: 2967-2973.
- Mufunda, F., Muzhinji, N., Sigobodhla, T., Marunda, M., Chinheya, C.C. and Dimbi, S. 2017. Characterization of *Pythium* spp. associated with root rot of tobacco seedlings produced using the float tray system in Zimbabwe. **Journal of Phytopathology** 165: 737-745.
- Nam, B. and Choi, Y.J. 2019. *Phytopythium* and *Pythium* Species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. **Mycobiology** 47, 261-272.
- Park, D. 1980. A two-year study of numbers of cellulolytic *Pythium* in river water. **The British Mycological Society** 74(2): 253-258.
- Paul, B. 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 176: 25-30.

- Paul, B. 2003. Characterisation of a new species of *Pythium* isolated from a wheat field in northern France and its antagonism towards *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of the grapevine. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 224: 215-223.
- Paul, B. 2004. A new species of *Pythium* isolated from Burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 234: 269–274.
- Paul, B., Abdelghani, E.L., Bala, K. 2003. Characterisation of *Pythium paroecandrum* and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of grey mould disease of grape. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 230: 177-183.
- Phillips, A.J.M., Anderson, V.L., Robertson, E.J., Secombes, C.J. and West, P.V. 2007. New insights into animal pathogenic Oomycetes. **TRENDS in Microbiology** 16: 13-19.
- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.-P., Rey, P., Tirilly, Y. and Benhamou, N. 2000. Oligandrin: a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. **Plant Physiology** 124:379–395.
- Rey, P., Floch, G.L., Vallance, J. and Benhamou, N. 2009. Combining the Oomycetes *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: root relationships and tomato grey mold biocontrol. **Biological Control** 50: 288–298.
- Robertson, G.I. 1973 Pathogenicity of *Pythium* spp. to seeds and seedling roots. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 16: 367-372
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4: 406-425.
- Salmaninezhad, F. and Mostowfizadeh-Ghalemfarsa, R. 2019. Three new *Pythium* species from rice paddy fields. **Mycologia** 111: 274-290.
- Sánchez, J. and Gallego, E. 2001. *Pythium* spp. present in irrigation water in the poniente region of Almería (south-eastern Spain). **Mycopathologia** 150: 29-38.
- Sayed, S.R.M., Abdelmohsen, S.A.M., Abdelzاهر, H.M.A., Elnaghy, M.A., Mostafa, A.A., Al-Harbi, F.F. and Abdelbacki, A.M.M. 2021. Myco-suppression analysis of soybean

- (*Glycine max*) damping-Off caused by *Pythium aphanidermatum*. **Plants** 10: 788. <https://doi.org/10.3390/plants10040788>.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A. and Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109: 6241.
- Schroeder, K.L., Martin, F.N., De Cock, Arthur, W.A.M., Lévesque, C.A., Spies, C.F.J., Okubara, P.A. and Paulitz, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new Tools, and challenges. **Plant Disease** 97(1): 4-20.
- Sewell, G.W.F. 1981. Effects of *Pythium* species on the growth of apple and their possible causal role in apple replant disease. **Annals of Applied Biology** 97: 31-42.
- Stanghellini, M. E. and Kronland, W. C. 1985. Bioassay for quantification of *Pythium aphanidermatum* in soil. **Phytopathology** 75: 1242-1245.
- Suksiri, S., Laipas, P., Soyong, K., Poem, S. 2018. Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand. **International Journal of Agricultural Technology** 14: 389-401.
- Takenaka, S., Nakamura, Y., Kono, T, Sekiguchi, H., Masunaka, A. and Takahashi, H. 2006. Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. **Molecular plant pathology** 7(5): 325-339.
- Thines, M. 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic Oomycetes—a Global Overview. **European Journal of Plant Pathology** 138: 431-447.
- Uzuhashi, S., Nakagawa, S., Abdelzaher, H.M.A., Tojo, M. 2019. Phylogeny and morphology of new species of *Globisporangium*. **Fungal Systematics and Evolution** 3: 13-18.
- Uzuhashi, S., Tojo, M. and Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience** 51: 337-365.
- Vallance, J., Le Floch, G., Déniel, F., Barbier, G., Lévesque, C.A. and Rey P. 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and Oomycetes population dynamics in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology** 75: 4790-4800.
- Van der Hoorn, R. A. L. and Kamoun, S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The Plant Cell Online** 20(8): 2009-2017.

- Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology** 21: 1–242.
- Verma, S.K., Kingsley, K., Bergen, M., English, C., Elmore, M., Kharwar, R.N. and White J.F. 2017. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant Soil** 422: 223–238.
- Watanabe, T. 1981. Distribution and populations of *Pythium* species in the northern and southern part of Japan. **Annual Meeting of the Phytopathological Society of Japan** 47: 449-456.
- Wielgoss A, Nechwatal J, Bogs C, Mendgen K 2009. Host plant development, water level and water parameters shape *Phragmites australis*-associated oomycete communities and determine reed pathogen dynamics in a large lake. **FEMS Microbiology Ecology** 69: 255-265.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 87: 4576-4579.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Haidar, R., Compant, S. and Rey, P. 2018. Transcriptional analysis of the interaction between the oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum* and the roots of *Vitis vinifera* L. **Biological Control** 120: 26–35.
- Yang, D. H., Hettenhausen, C., Baldwin, I. T. and Wu, J. 2011. The multifaceted function of BAK1/SERK3: plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores. **Plant signaling & behavior** 6(9): 1322–1324.
- You, M.P., Rensing, K., Renton, M. and Barbetti, M.J. 2017. Modeling effects of temperature, soil, moisture, nutrition and variety as determinants of severity of *Pythium* damping-off and root disease in subterranean clover. **Frontiers in Microbiology** 8.
- Zadoks, J. C. 2009. The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. **Potato Research** 51: 5–45.
- Zitnick-Anderson, K.K., Norland, J.E., Del Rio Mendoza, L.E., Fortuna, A.M. and Nelson BD, 2017. Probability models based on soil properties for predicting presence-absence of *Pythium* in soybean roots. **Microbial Ecology** 74: 550-560



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

Saelee, R., Busarakam, K. and Koohakan, P. 2020. Morphological Characterization and Phylogeny of *Pythium* and Related Genera in Rayong Province, Thailand. **Current Applied Science and Technology** 21.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morphological Characterization and Phylogeny of *Pythium* and Related Genera in Rayong Province, Thailand

Rattasit Saelee¹, Kanungnid Busarakam² and Prommart Koohakan^{1*}

¹Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

²Biodiversity Research Centre, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani, Thailand

Received: 12 March 2020, Revised: 5 August 2020, Accepted: 21 August 2020

Abstract

Most well-known microorganisms in the class Oomycetes (notably genera *Phytophthora* and *Pythium*) are pathogenic to both animals and plants due to their diverse lifestyle patterns. This study was designed to recover *Pythium* from composite soils (cultivated and forest soils) and water sources (fresh and brackish water) from Rayong Province. Twenty isolates of hyaline and non-septate fungal-like organisms were isolated from those sources. The primer pair ITS4 and ITS6 were used to amplify approximately 900 bp products from Internal transcribed spacer (ITS) region and morphological characteristics including sporangium, oogonium, antheridium and oospore, were noted. Morphological characteristics data of recovered *Pythium* strain can be classified into 12 source groups. ITS sequencing results revealed that eight closely related species had been recovered: *Globisporangium splendens*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium acanthicum*, *Pythium deliense*, *Pythium dictinum*, *Pythium torodosum*, *Phytopythium vexans* and *Phytopythium hellicoides*, which had similarities in the range 94.67-100% values at between 656 and 922 locations. Most of these species were reported as plant pathogens. Therefore, this report can be used as a guide for disease control planning.

Keywords: Oomycetes; identification; phylogeny; Rayong Province; *Pythium*
DOI 10.14456/cast.2021.14

1. Introduction

The microbes in class Oomycetes are classified in kingdom Chromista and subphylum Oomycota. Some species: like *Pythium* sp., live in many types of ecosystems, including a wide range of soil and water sources [1]. Many species in this class affect the environment and economy due to their capability to be plant and animal pathogens [2, 3]. *Pythium* and related genera in family Pythiaceae are one of the most important Oomycete distributed worldwide. They can survive under different location and environments such as tropical forests, natural and agricultural ecosystems, arid zones, temperate zones or even polar regions [4], because they have an ability to produce thick-walled resting spore or sexual reproductive structure called oospore, and asexual reproductive structure called sporangium which form zoospore inside which can be released through vesicle discharge tube

*Corresponding author: E-mail:prommart.ko@kmitl.ac.th

[1]. *Pythium* and related genera can be isolated from both terrestrial and aquatic habitats, and many of them are plant pathogens. Oomycetes have a high distribution rate, which results in a infecting a wide range of host plants, notably succulent plants causing pre- and post- emergence damping off disease [1, 5, 6]. Moreover, *Pythium* can infect mammals, mainly in tropical and subtropical area, and causes pythiosis disease [7-9]. However, there were many reports about the capability of *Pythium* spp. as biological control agent (BCA), for example: *Pythium oligandrum* [10], *Pythium periplocum* and *Pythium acanthicum* [11]. Moreover, there have been a few reports that indicated that *Pythium* could also produce cellulolytic enzymes [12, 13]. Then, it can be seen that *Pythium* exists in every type of ecosystems, and can cause both positive and negative effects on a wide range of hosts. Therefore, good cultivation plan and pathogenicity data are necessary for disease control measures. Simultaneously, it can be applied as additional data for *Pythium* and related genera distribution in Thailand. Generally, a conventional procedure such as morphological study has been widely used to identify Oomycetes genera and the internal transcribed spacer (or ITS) sequences have also been used to classify to species level [1]. Thus, the purpose of this investigation was to study the diversity group of *Pythium* spp. that could be isolated from cultured-dependent methods. The samples were collected from cultivated areas, natural forests, mangrove forests and rivers in Rayong province <12.686277, 101.271261>. All *Pythium* isolates in this study were classified using morphological characteristics and ITS sequence data.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling and isolation

Vertical soil samples (300 mm soil depth) were obtained from a cultivated field <12.85099178, 101.55733498>, a natural forest <12.849345, 101.555479>, a mangrove soil <12.698767, 101.707131> and a river <12.776806, 101.714779>. Moreover, plant debris from river and mangrove were also collected. Three techniques were used for isolation:

1) Modified soil plate technique [14]: Approximately 1g of soil sample was put on the surface of selective agar media (CMA (corn meal agar) + BNPRA (benomyl 10 ppm, Nystatin 25 ppm, Pentachloronitrobenzene 25 ppm, Rifampicin 10 ppm and Ampicillin 500 ppm) media + Rose Bengal (0.05 g/liters) [15]. Then an agar plug was transferred onto new agar media (CMA, potato dextrose agar (PDA) and V8 juice agar) to obtain a pure culture.

2) Soil baiting technique [16]: Approximately 1g soil or 1ml water sample was mixed with 9 ml sterile distilled water in a Petri dish, then 10 cucumber seeds were added and spread carefully. The sample was incubated (room temperature, 24 h), and a seed was transferred onto selective agar media. Then again an agar plug was transferred onto CMA, PDA and V8 agar media to obtain a pure culture.

3) Soil dilution technique [17]: Approximately 1g soil sample was mixed with 9 ml of sterile distilled water in a test tube and serially diluted to obtain a 10^{-4} dilution. One milliliter of the soil suspension was then pipetted onto Petri dishes containing CMA + BNPRA + Rose Bengal media and then an agar plug was transferred to CMA, PDA and V8 agar media to obtain a pure culture.

2.2 Morphology identification

Water culture, grass blade culture and low nutrient media were used to study asexual reproduction (Sporangium development) [18]. All techniques used were as follows:

- 1) The water culture technique: an agar plug of pure culture was placed on a Petri dish filled with sterile distilled water.
- 2) Grass blade culture technique: a boiled grass leaf was placed in a Petri dish and sterile distilled water was then added.
- 3) Low nutrient media culture: each isolate was cultured in CMA and then checked for asexual structures under a light microscope.
- 4) Checking for sporangium and zoospore formation within 24-48 h to study sexual reproduction: each isolate was cultured in V8 juice agar and the sexual organs (antheridia, oogonia, and oospores) were observed under a light microscope. All experiments were performed with 3 replicates and observed within 7 days. The taxonomic key used for identification was referred to Van der Plaats-Niterink [19]

2.3 DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Oomycetes strains were cultured in PDA at room temperature and genomic DNA was extracted according to Ivors protocol [20]. The internal transcribed spacer (ITS) regions were amplified using the primer ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3') [21]. The PCR conditions were the same as those used by Cooked *et al.* [22]. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis. Gels were extracted and purified using GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo scientific). The purified products were stored at -20C° until required. The sequencing of ITS region was determined by Bionics Co. Ltd.

2.4 Phylogenetic analyses

Sequences were determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) at the National Center for Biotechnology (NCBI; Bethesda, USA). The aligned sequences were used to construct phylogenetic trees. The neighbour-joining algorithm [23] was from the MEGA X program. The resultant tree was evaluated in bootstrap analyses [24] based on 1000 resamplings of the neighbour-joining dataset from the PHYLIP package. All DNA sequences were submitted to GenBank (NCBI database).

3. Results and Discussion

3.1 Isolation and morphological identification

Twenty isolates containing 2 genera, *Pythium* and *Phytophthium*, were obtained from soil and water samples and could be classified into 8 species. They were well delineated into 12 groups based on the origin (cultivated field, degraded forest, fresh water or marine). Most isolates produced both asexual and sexual structures, but some isolates did not. RYS-13, RYS-6, RYS- 7, RYS- 13 and RYS- 16 showed no asexual organs, while RYS-9, RYS-10, RYS-12, RYS-13, RYS-14, RYS-15, RYS-16 and RYS-17 presented no sexual organs (Table 1, Figures 1-12). However, in mangrove soil, there were no isolates of Oomycetes found.

- Group 1: No zoospore, produce only sexual reproductive structure obtained from cultivated soil (Figure 1).
- Group 2: Subglobose or pyriform proliferating zoospore and smooth wall oospores obtained from natural forest soil (Figure 2).
- Group 3: No zoospore formation, produced only sexual reproductive organs obtained from natural forest soil (Figure 3).
- Group 4: Oomycete with non-internal and internal proliferating subglobose or pyriform zoospore, acute spines oospore obtained from natural forest soil (Figure 4).
- Group 5: Subglobose or pyriform zoospore with papillae and smooth wall oospores obtained from natural forest soil (Figure 5).
- Group 6: Subglobose or pyriform of non-papillate zoospore obtained from natural forest soil (Figure 6).
- Group 7: Non-inflated zoospore obtained from river water (Figure 7).
- Group 8: Inflated zoospore with smooth wall oospore obtained from river leaf debris (Figure 8).
- Group 9: Papillate subglobose or pyriform zoospore obtained from river leaf debris (Figure 9).
- Group 10: Inflated filamentous sporangia (Figure 10)
- Group 11: Non-internal and internal proliferating subglobose or pyriform zoospore, acutely spine oospores obtained from river soil (Figure 11).
- Group 12: Subglobose or pyriform zoospore with papillae and smooth wall oospores obtained from river soil (Figure 12). The distribution of all isolates is shown in Figure 15.

Table 1. Morphology of Oomycetes isolates

Isolate	Full growth (days)			Sporangia	Oogonia	Antheridia	Oospores (μm)	Source group
	PDA	CMA	V8					
RYS-1	2	2	2	-	Smooth wall, intercalary	3-4 monoclinous antheridia per oogonia	Aplerotic (68.76)	1
RYS-2	2	2	2	Subglobose or pyriform proliferating	Smooth wall, terminal or intercalary	1 monoclinous or hypogynous antheridia per oogonia	Nearly Plerotic (47.31)	2
RYS-3	2	2	2	-	Smooth wall, intercalary	1 monoclinous or hypogynous antheridia per oogonia	Aplerotic (56.38)	3
RYS-4	5	5	4	Subglobose with discharge tube	Ornamented, terminal or intercalary	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (44.42)	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table I. (cont.)

RYS-5	5	5	5	Subglobose with discharge tube	Ornamented, terminal or intercalary	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (42.53)	4
RYS-6	4	4	5	-	Ornamented, terminal or intercalary	1 monoclinous of hyphogynous antheridia per oogonia	Plerotic (39.65)	4
RYS-7	7	7	6	-	Ornamented, terminal or intercalary	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (44.64)	4
RYS-8	6	6	6	Subglobose or pyriform, papillate	Smooth wall, terminal or intercalary	-	Plerotic (32.48)	5
RYS-9	2	2	2	Subglobose or pyriform	Smooth wall, terminal or intercalary	1 monoclinous antheridia per oogonia	-	6
RYS-10	5	5	5	Non-inflated filamentous	-	-	-	7
RYS-11	2	2	2	Inflated filamentous with vesicle	Smooth wall, terminal and intercalary	1 monoclinous antheridia per oogonia	Aplerotic (50.81)	8
RYS-12	2	2	2	Subglobose or pyriform	Smooth wall, terminal and intercalary	1 monoclinous antheridia per oogonia	-	9
RYS-13	2	2	2	-	-	-	-	9
RYS-14	5	5	4	Inflated filamentous	-	-	-	10
RYS-15	2	2	2	Subglobose or pyriform	Smooth wall, terminal and intercalary	-	-	9
RYS-16	4	4	3	-	-	-	-	10
RYS-17	2	2	2	Subglobose or pyriform	-	-	-	9
RYS-18	5	5	4	Subglobose	Ornamented, terminal or intercalary	1 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (28.11)	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. (cont.)

RYS-19	3	3	3	Subglobose	Ornamented, terminal or intercalary	1 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (42.75)	11
RYS-20	5	5	5	Pyriiform	Smooth wall, terminal or intercalary	1-2 monoclinous antheridia per oogonia	Plerotic (34.11)	12

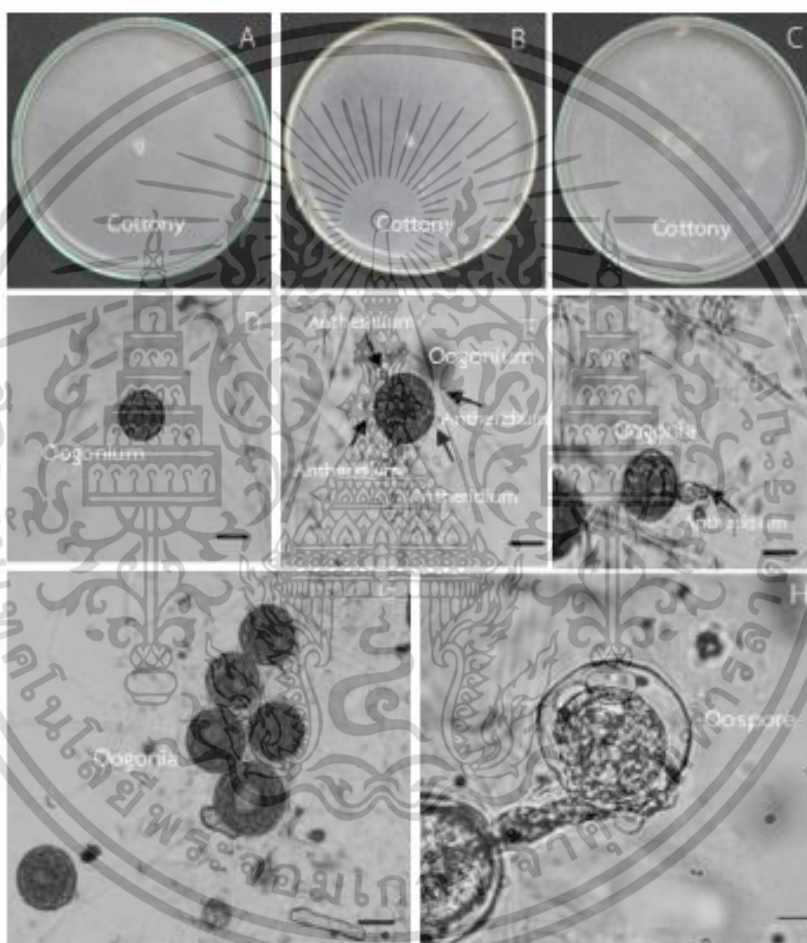


Figure 1. Morphology of an isolate obtained from cultivated soil (group 1: RYS-1). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-G: 10 \times ; H: 40 \times (scale bars D-H: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

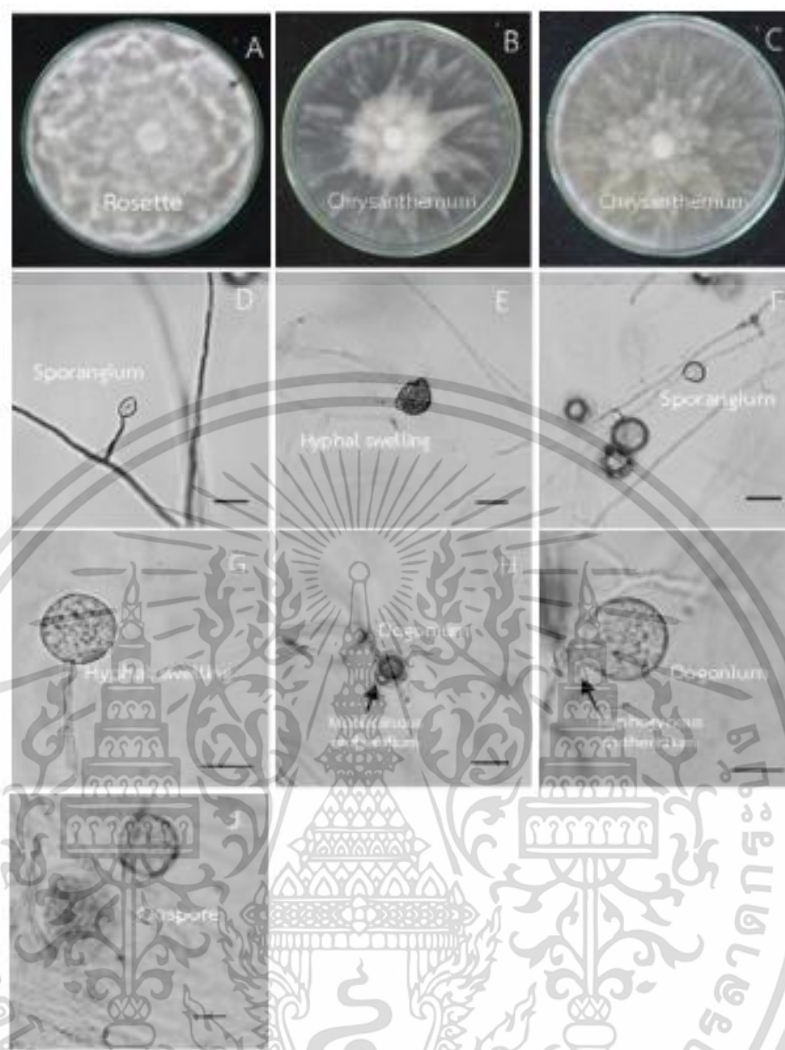


Figure 2. Morphology of an isolate obtained from natural forest soil (group 2: RYS-2). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F and H: 10 \times ; G, I and J: 40 \times (scale bars D-J: 20 μ m); black arrows indicate antheridia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

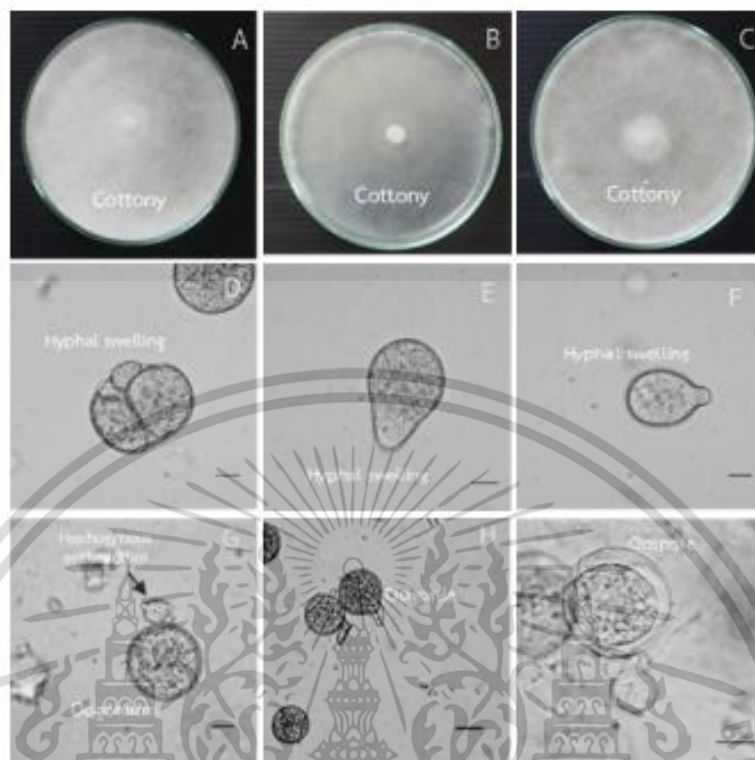


Figure 3. Morphology of an isolate obtained from natural forest soil (group 3: RYS-3). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-H: 10 \times ; I: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

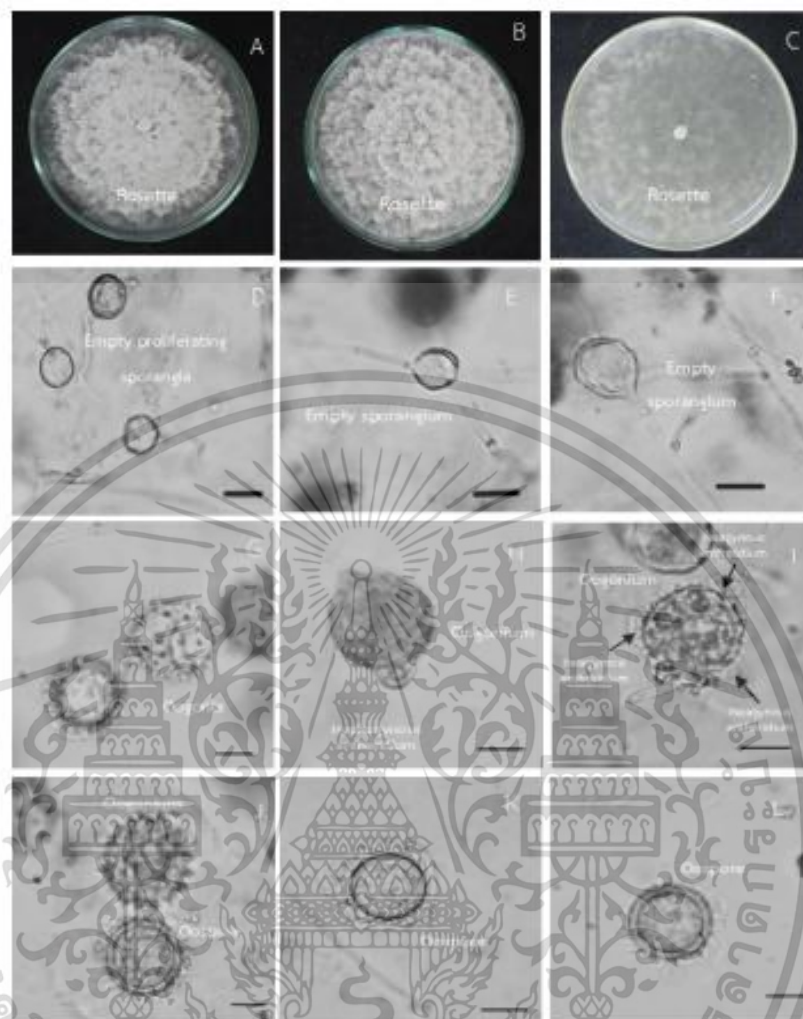


Figure 4. Morphology of an isolate obtained from natural forest soil (group 4: RYS-4, RYS-5, RYS-6 and RYS-7). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; G-L: 40 \times (scale bars D-L: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

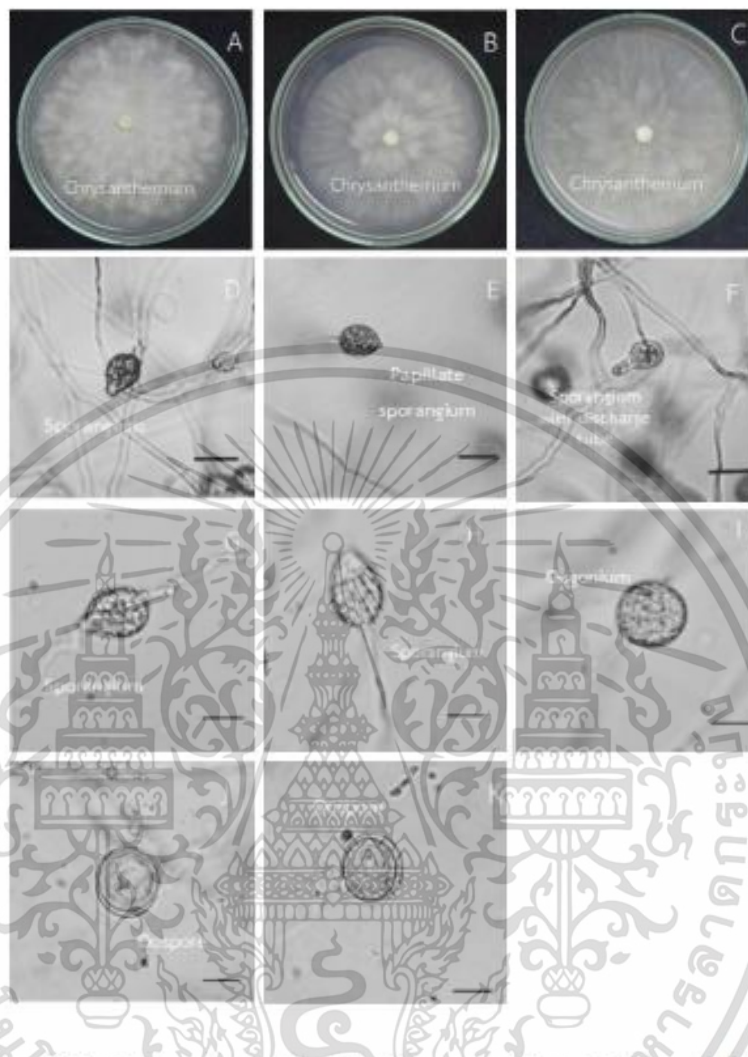


Figure 5. Morphology of an isolate obtained from natural forest soil (group 5; RYS-8). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; G-K: 40 \times (scale bars D-K: 20 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

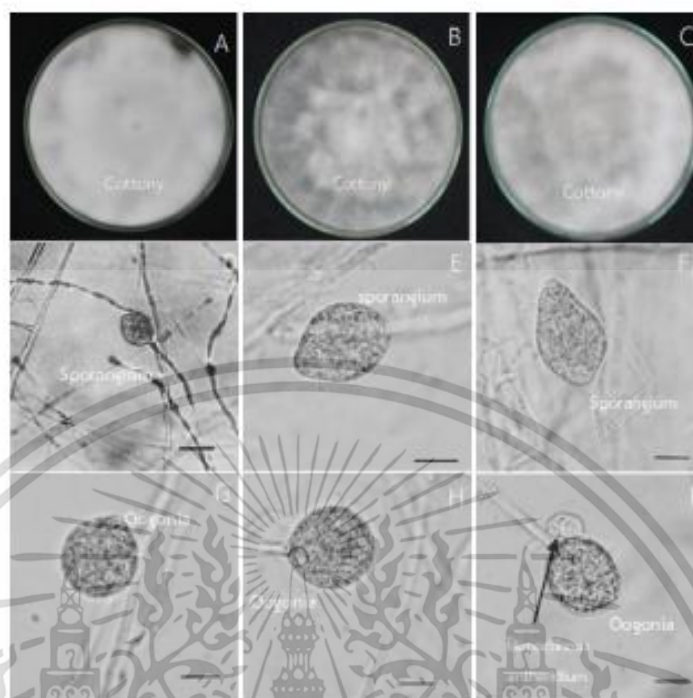


Figure 6. Morphology of an isolate obtained from natural forest soil (group 6: RYS-9). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D and G: 10 \times ; E-I: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.



Figure 7. Morphology of an isolate obtained from river (fresh water; group 7: RYS-10). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; (scale bars D-F: 20 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

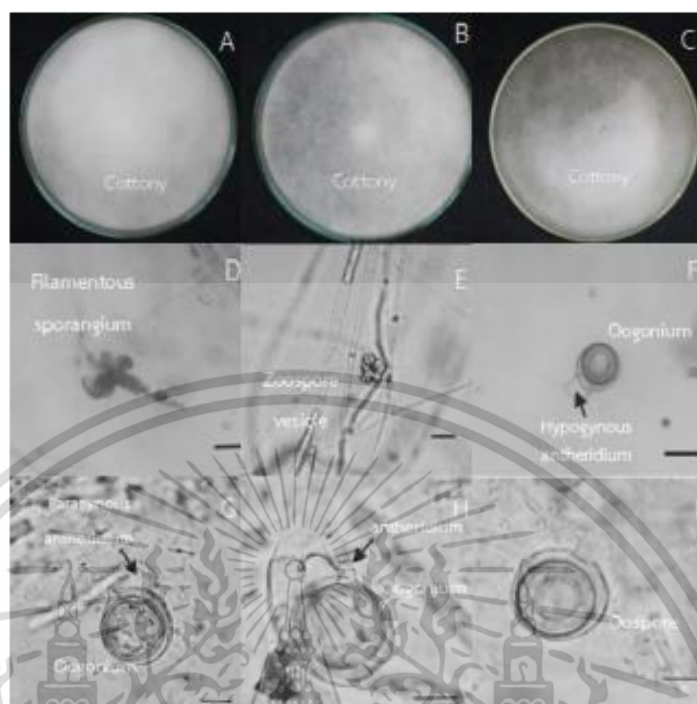


Figure 8. Morphology of an isolate obtained from river debris (group 8; RYS-11). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; G-I: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

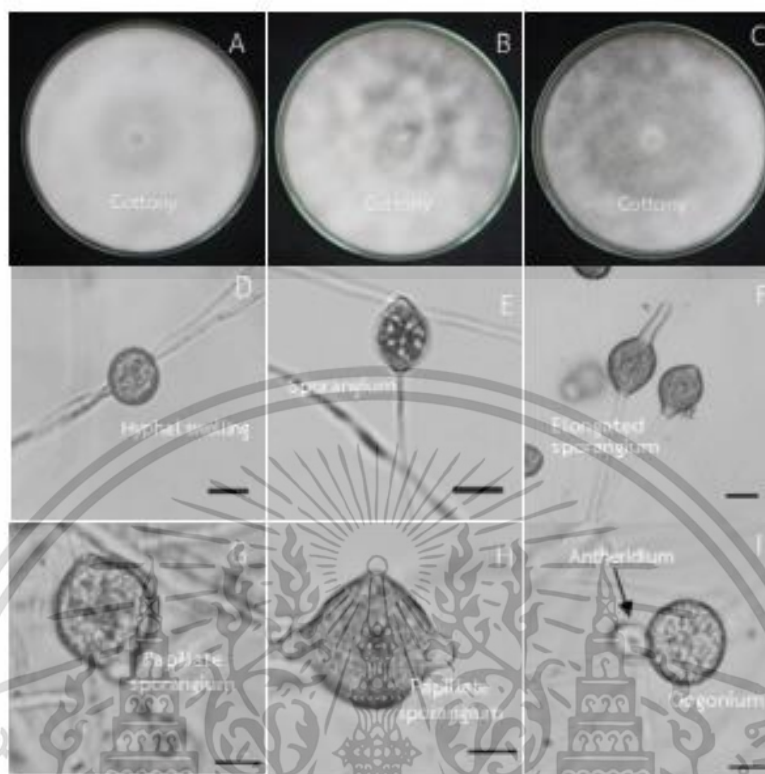


Figure 9. Morphology of an isolate obtained from river debris (group 9: RYS-12, RYS-13, RYS-15 and RYS-17). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; G-I: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

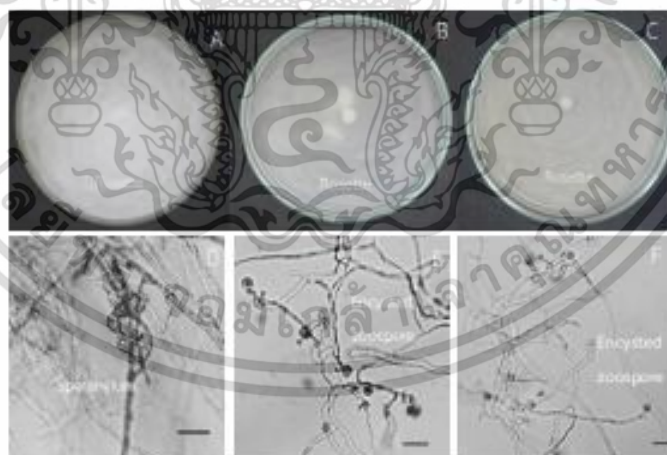


Figure 10. Morphology of isolate obtained from river debris (group 10: RYS-14 and RYS-16). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D-F: 10 \times ; (scale bars D-J: 20 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

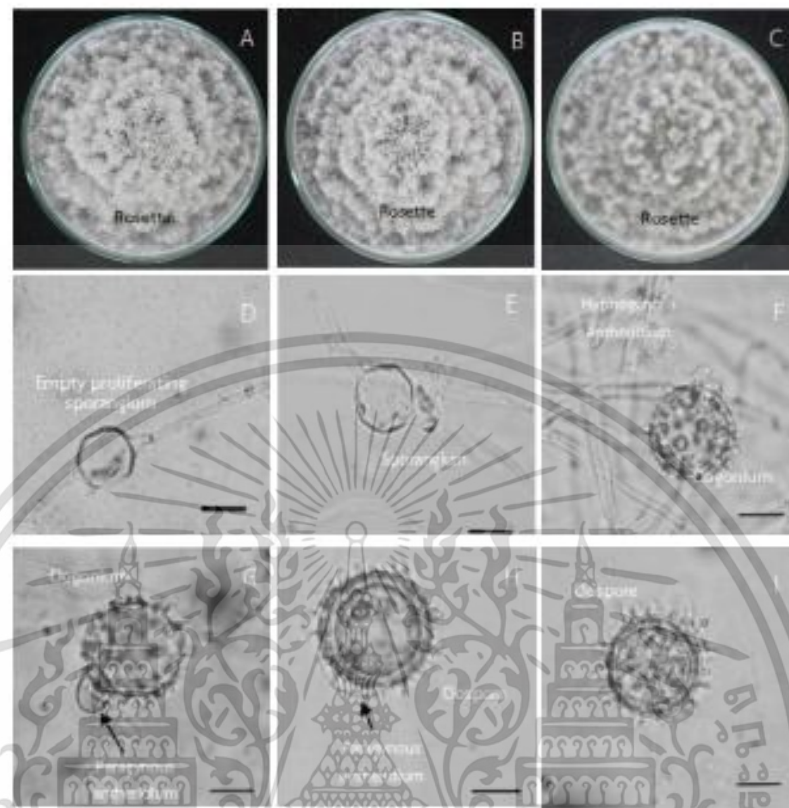


Figure 11. Morphology of an isolate obtained from river soil (group 11: RYS-18 and RYS-19). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D: 10 \times ; F-I: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

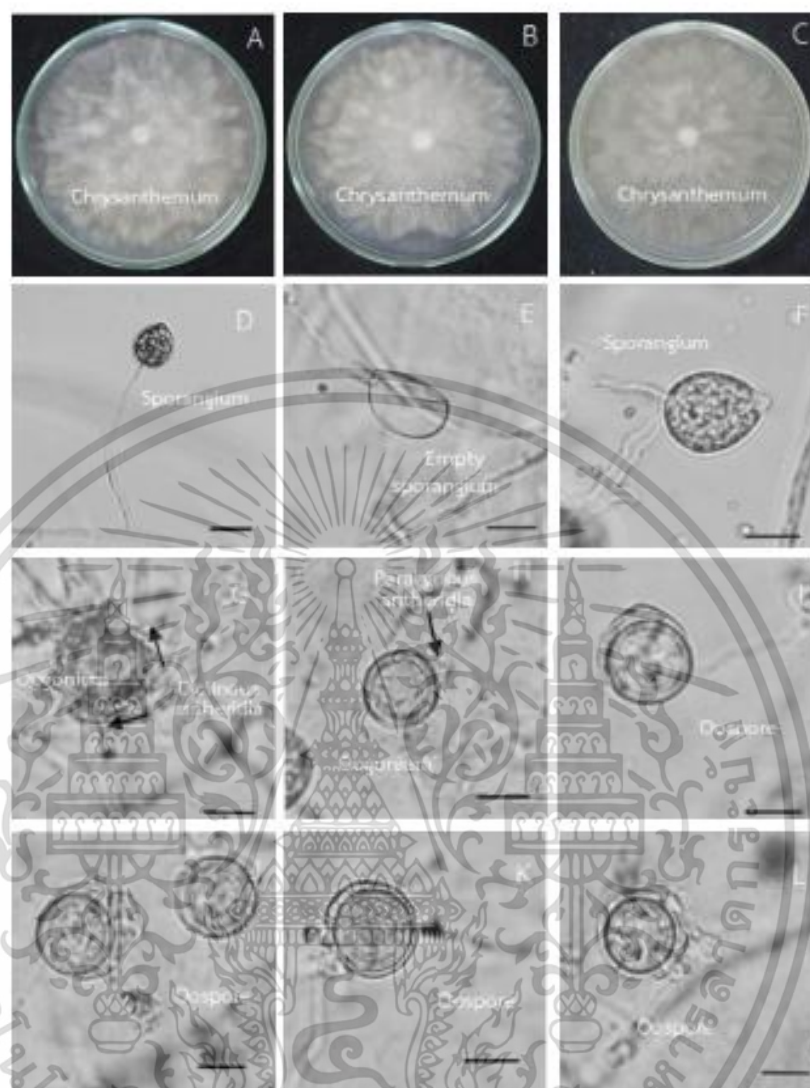


Figure 12. Morphology of an isolate obtained from river soil (group 12: RYS-20). A-C: Colony patterns on CMA (A), PDA (B) and V8 agar (C); D: 10 \times ; E-L: 40 \times (scale bars D-I: 20 μ m); black arrows indicate antheridia.

3.2 Phylogenetic analysis

After amplification of DNA sequence at ITS region using primers ITS4 and ITS6, approximately ~900 bp of PCR products were obtained (Figure 13). The comparison data between this study and the databases from NCBI found that the studied isolates were defined into eight Oomycetes species: *Globisporangium splendens* (formerly called *P. Splendens* [25], clade I), *Pythium cucurbitacearum* (clade K), *Pythium acanthicum* (clade D), *Pythium deliense* (clade A), *Pythium declinum* (clade B), *Pythium torulosum* (clade B), *Phytopythium vexans* and *Phytopythium helicoides* (clade K) (Table

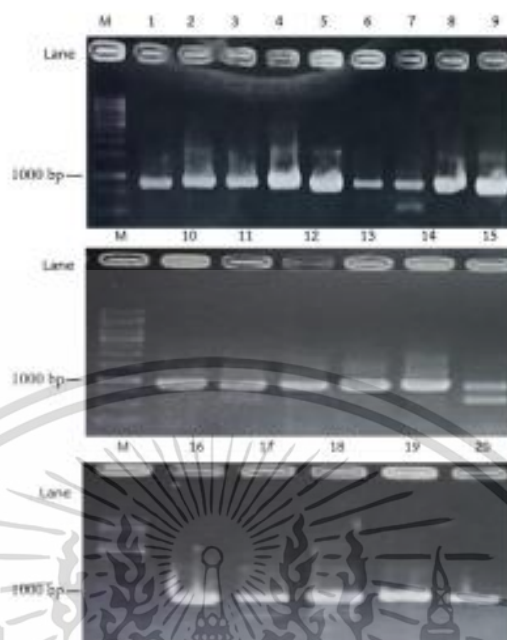


Figure 13. The primer pair ITS4 and ITS6 were used to amplified a 900 bp product compared with 1 kb marker (lane M); Lane 1-20: RYS-1 + RYS-20

2). All species showed the common morphological traits of each clade as reported by Lévesque and de Cock [26] and de Cock *et al.* [27]. It was found that *G. splendens* is a member of clade I in which most species in this clade do not produce zoospores. *Pythium cucurbitacearum* belongs to clade K with some common characteristics between *Pythium* and *Phytophthora* sp. like papillae sporangia, *Phytopythium* also belongs to this clade. *Pythium acanthicum* is in clade D, the members of which have oogonia with spines. Most of the species in this clade are mycoparasites, such as *P. oligandrum*. *Pythium deliense* belongs to clade A, which produce filamentous sporangia with intercalary antheridia. *Pythium diclinum* and *P. torulosum* are in clade B, which produce filamentous sporangia with smooth wall oogonia. Most species in this study are waterborne Oomycetes [28] (Figure 14). As stated, *Pythium* and related genera in the same class exist in many types of ecosystems. Therefore, the same genus can be found in a variety of habitats. A good example of this is *P. aphanidermatum*, now known to live in sea water [29] although this species was mostly found in cultivation area.

Table 2. Similarity and origin of each isolate

Species	GenBank Accession no. (ITS)	Origins	Hits	Sequence length (bp)	Similar (%)
<i>G. splendens</i> RYS-1	MT758164	Cultivated soil	<i>P. splendens</i> AY598655.2	853	98.71
<i>P. vexans</i> RYS-2	MT758165	Forest soil	<i>P. vexans</i> MK011121.1	922	99.21
<i>G. splendens</i> RYS-3	MT758166	Forest soil	<i>P. splendens</i> KU724186.1	793	99.62
<i>P. acanthicum</i> RYS-4	MT758167	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> LC332027.1	772	98.71
<i>P. acanthicum</i> RYS-5	MT758168	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	863	98.61
<i>P. acanthicum</i> RYS-6	MT758169	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	871	98.74
<i>P. acanthicum</i> RYS-7	MT758170	Forest soil	<i>P. acanthicum</i> KU210470.1	858	98.49
<i>P. cucurbitacearum</i> RYS-8	MT758171	Forest soil	<i>P. cucurbitacearum</i> KP183959.1	856	99.42
<i>P. helicoides</i> RYS-9	MT758172	Forest soil	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	797	99.75
<i>P. torulosum</i> RYS-10	MT758173	Fresh water	<i>P. torulosum</i> MK015674.1	877	99.42
<i>P. deliense</i> RYS-11	MT758174	Leaf debris	<i>P. deliense</i> MN365090.1	823	99.88
<i>P. helicoides</i> RYS-12	MT758175	Leaf debris	<i>P. helicoides</i> KT595686.1	656	96.68
<i>P. helicoides</i> RYS-13	MT758176	Leaf debris	<i>P. helicoides</i> KY084740.1	793	94.67
<i>P. diclinum</i> RYS-14	MT758177	Leaf debris	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	782	99.22
<i>P. helicoides</i> RYS-15	MT758178	Leaf debris	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	819	99.63
<i>P. diclinum</i> RYS-16	MT758179	Leaf debris	<i>P. diclinum</i> MK015676.1	774	99.21
<i>P. helicoides</i> RYS-17	MT758180	Leaf debris	<i>P. helicoides</i> KT750954.1	841	99.88
<i>P. acanthicum</i> RYS-18	MT758181	River soil	<i>P. acanthicum</i> AY598617.2	822	99.03
<i>P. acanthicum</i> RYS-19	MT758182	River soil	<i>P. acanthicum</i> HQ643411.1	770	98.83
<i>P. cucurbitacearum</i> RYS-20	MT758183	River soil	<i>P. cucurbitacearum</i> MK416211.1	868	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Figure 14. Neighbour-joining tree based on ITS region sequences (~900 bp) showing relationships between the studied-isolates and related *Pythium* species. Asterisks indicate branches of the tree that were also found using the maximum-likelihood and maximum-parsimony tree-making algorithms. Numbers of the nodes are percentage bootstrap values based on a neighbour-joining analysis of 1,000 sampled datasets. The root position of the tree was determined using *Aphanomyces stellatus* AY455774.1. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

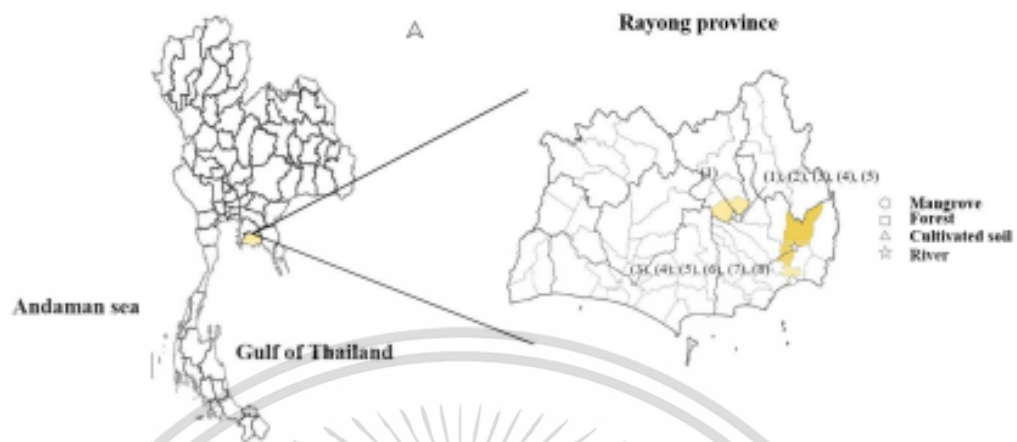


Figure 15. The distribution of *Pythium* and related genera in class Oomycetes; 1: *Globisporangium splendens*; 2: *Phytophthora vexans*; 3: *Pythium acanthicum*; 4: *Pythium cucurbitacearum*; 5: *Phytophthora helicoides*; 6: *Pythium torulosum*; 7: *Pythium deliense* and 8: *Pythium dielinum*

It can be seen that all strains of *Pythium* and related genera found in this study are more diverse in marginally disturbed or undisturbed habitats like natural forests or rivers, and less diverse in cultivated soil. Detection of these species was not that unexpected because there had been many reports of the discoveries of *Phytophthora* and *Pythium* species in similar locations. For example, *Phytophthora gonapodyides*, *Phy. lacustris*, *Pythium oopapillum*, etc., were discovered in rivers crossing the Polish-Ukrainian border area [30], *Pythium sukaiense*, from undisturbed natural forest in Taiwan [31], and *P. aphanidermatum* was discovered a decades ago [32]. However, there has still been no discoveries of any Oomycetes species in mangrove soil. This might be because the condition of mangrove soil with obviously high salinity limits the diversity of soil and freshwaterborne Oomycetes. There was a report about specific halotolerant *Pythium* species being able to inhabit in salt water and infect algae, but as mentioned, only a few particular species, such as *Pythium porphyrae*, can live in such conditions. However, there was also the discovery of *P. aphanidermatum* strain that inhabited leaf debris in sea water [29]. Based on this observation, the possibilities of finding well known plant or animal pathogenic Oomycetes in mangrove forests can not be ignored. A pathogenicity test can be carried out in a future study.

4. Conclusions

Fungal-like microorganisms in class Oomycetes are important in cultivation and environmental stability in many ways. Here, this paper provided new and detailed information about the distribution of *Pythium* and related genera in Rayong Province, Thailand. Eight *Pythium* species and related genera were identified, i.e. *Globisporangium splendens*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium acanthicum*, *Pythium deliense*, *Pythium dielinum*, *Pythium torulosum*, *Phytophthora vexans* and *Phytophthora helicoides*. Moreover, it was found that Oomycetes in the undisturbed locations were more diverse than those found in disturbed locations. From the results, the distribution data can be used for advanced study or further field investigation. However, further study of the obtained isolates is needed, and in particular further studies of pathogenicity and environmental factors that affect

Pythium and related genera will be required to formulate a universal overview of Oomycetes representatives in Thailand.

5. Acknowledgements

This study was funded and supported by the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) and Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR).

References

- [1] Schroeder, K.L., Martin, F.N., De Cock, Arthur, W.A.M., Lévesque, C.A., Spies, C.F.J., Okubara, P.A. and Paulitz, T.C., 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease*, 97(1), 4-20.
- [2] Phillips, A.J.M., Anderson, V.L., Robertson, E.J., Secombes, C.J. and West, P.V., 2007. New insights into animal pathogenic Oomycetes. *TRENDS in Microbiology*, 16, 13-19.
- [3] Kamoun, S., Fürzer, O., Jones, J.D.G., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J.D., Roy, S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Mukhtar, M. S., Tomé, D.F.A., Tör, M., Ackerveken, G.V.D, McDowell, J., Daay, F., Fry, W.E., Kreuze, H.L., Meijer, H.J.G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P.R.J. and Govers, F., 2016. The top 10 Oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular in Plant Pathology*, 16(4), 413-434.
- [4] Tojo, M., van West, P., Hoshino, T., Kida, K., Fujii, H., Hakoda, A., Kawaguchi, Y., Mühlhauser, H.A., Van Den Berg, A.H., Küpper, F.C., Herrero, M.L., Klemsdal, S.S., Tronsmo, A.M. and Kanda H., 2012. *Pythium polare*, a new heterothallic oomycete causing brown discoloration of *Sanioniauncinata* in the Arctic and Antarctic. *Fungal Biology*, 116(7), 756-768.
- [5] Navi, S.S., Huynh, T., Mayers, C.G. and Yang, X.B., 2019. Diversity of *Pythium* spp. associated with soybean damping-off, and management implications by using foliar fungicides as seed treatments. *Phytopathology Research*, 1, <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0015-9>
- [6] Qiu, L., Mao, Y., Tang, L., Tang, X., and Mo, Z., 2018. Characterization of *Pythium chondricola* associated with red rot disease of *Pyropiaezoensis* (Ueda) (Bangiales, Rhodophyta) from Lianyungang, China. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37, 1102-1112.
- [7] Phillips, A.J.M., Anderson, V.L., Robertson, E.J., Secombes, C.J. and West, P.V., 2007. New insights into animal pathogenic Oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16, 13-19.
- [8] Bernheim, D., Dupont, D., Aptel, F., Dard, C., Chiquet, C., Normand, A.C., Piarroux, R., Cornet, M. and Maubon, D., 2019. Pythiosis: case report leading to new features in clinical and diagnostic management of this fungal-like infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 86, 43-46.
- [9] Gaastra, W., Lipman, L.J.A., De Cock, A.W.A.M., Exel, T.K., Pegge, R.B.G., Scheurwater, J., Vilela, R. and Mendoza, L., 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Veterinary Microbiology*, 146, 1-16.

- [10] Benhamou, N., Rey, N., Picard, K. and Tirilly, Y., 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, 89(6), 506-517.
- [11] Ali-Shtayeh, M.S. and Saleh, A.S.F., 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. *Mycopathologia*, 145, 143-153.
- [12] Deacon, J.W., 1979. Cellulose decomposition by *Pythium* and its relevance to substrate-group of fungi. *The British Mycological Society*, 77(3), 469-477.
- [13] Park, D., 1980. A two-year study of numbers of cellulolytic *Pythium* in river water. *The British Mycological Society*, 74(2), 253-258.
- [14] Warcup, J. H., 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature*, 166(4211), 117-118.
- [15] Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. and Nakanishi, N., 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, 67, 425-428.
- [16] Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B., 1994. *Basic Plant Pathology Methods*. 2nd ed. Florida: CRC Press.
- [17] Stanghellini, M.E. and Kronland, W.C., 1985. Bioassay for quantification of *Pythium aphanidermatum* in soil. *Phytopathology*, 75, 1242-1245.
- [18] Abad, Z.G., Shew, H.D. and Lucas, L.T. 1994. Characterization and pathogenicity of *Pythium* species isolated from turfgrass with symptoms of root and crown rot in North Carolina. *Phytopathology*, 84, 913-921.
- [19] Van der Plaats-Niterink, A.J., 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, 21, 1-242.
- [20] Ivors, K.L., 2015. *Laboratory Protocols for Phytophthora Species*. St. Paul: The American Phytopathological Society (APS).
- [21] Hung, P.M., Pongnak, W., Soyong, K. and Pocaïm, S., 2015. Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus. *Mycobiology*, 43(3), 288-296.
- [22] Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and Brasier, C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30, 17-32.
- [23] Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- [24] Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- [25] Uzuhashi, S., Ikeda, H., Kamekawa, A., Radmer, L. E., Kobayashi-Yamazaki, S., Kuroda, K., Funakubo, T., Ichikawa, K. And Tojo, M., 2019. Presence of two species-level groups in *Globisporangium splendens* isolates in Japan. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 751-766.
- [26] Lévesque, C.A. and de Cock A.W.A.M., 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108, 1363-1383.
- [27] de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S. and Lévesque, C.A., 2015. *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia*, 34, 25-39.
- [28] Nam, B. and Choi, Y.J., 2019. *Phytophythium* and *Pythium* species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. *Mycobiology*, 47(3), 261-272.
- [29] Ho, H.H., Chen, X.X., Zeng, H.C., and Zheng, F.C., 2012. The occurrence and distribution of *Pythium* species on Hainan Island of South China. *Botanical Studies*, 53, 525-534.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [30] Matsiakh, I., Oszako, T., Kramarets, V. and Nowakowska, J.A., 2016. *Phytophthora* and *Pythium* species detected in rivers of the Polish-Ukrainian border areas. *Baltic Forestry*, 22(2), 230-238.
- [31] Ko, W.H., Wang, S.-Y. and Ann, P.-J., 2004. *Pythium sukuiense*, a new species from undisturbed natural forest in Taiwan. *Mycologia*, 96(3), 647-649.
- [32] Burr, T.J. and Stanghellini, M.E., 1973. Propagule nature and density of *Pythium aphanidermatum* in field soil. *Phytopathology*, 63, 1499-1501.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นาย รัฐสิทธิ์ แซ่ลี

วัน เดือน ปีเกิด 9 กันยายน พ.ศ. 2538

ที่อยู่ 1947 ตำบลตลาด อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

โทร 0970685064

ติดต่อ mr.kimrebio@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปี	ระดับการศึกษา
2556	จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 โรงเรียนวัดอินทาราม กรุงเทพมหานคร
2560	จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี ปริญญาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2564	จบการศึกษาในระดับปริญญาโท ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชั้นปีที่ 4 หลักสูตรเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่ตีพิมพ์

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในประเทศ

- ปี 2563 รัฐสิทธิ์ แซ่ลี และ พรหมมาศ กุหากาญจน์ 2563. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 38(4): 494-503

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในระดับ

นานาชาติ

- ปี 2562 Saelee, R. and Koochakan, P. 2019. “The Efficacy of Rice Endophytic Bacteria Isolated from Sanpatong 1 and RD6 to Control Blast Disease Caused by *Pyricularia oryzae*”. 75-85 in 3rd International Symposium on Agricultural Technology (ISAT 2019) at Krabi Resort, Krabi province, Thailand.
- ปี 2563 Saelee, R., Busarakam, K. and Koochakan, P. 2020. Morphological Characterization and Phylogeny of *Pythium* and Related Genera in Rayong Province, Thailand. **Current Applied Science and Technology** 21.