

เบต้ากลูแคนแหล่งใหม่จาก NON-PATHOGENIC *PYTHIUM SPP.*  
NEW SOURCE OF BETA-GLUCAN FROM NON-PATHOGENIC  
*PYTHIUM SPP.*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2023-AG-M-065-412

NEW SOURCE OF BETA-GLUCAN FROM NON-PATHOGENIC  
*PYTHIUM SPP.*



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURE  
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2023

KMITL-2023-AG-M-065-412

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์      เบต้ากลูแคนแหล่งใหม่จาก Non-pathogenic *Pythium* spp.  
ชื่อนักศึกษา            นางสาวหนึ่งฤทัย ไหมพรหม  
รหัสประจำตัว            63604004  
ปริญญา                    วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา                เกษตรศาสตร์  
พ.ศ.                        2566  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์      รศ.ดร. พรหมมาศ คุณหากาญจน์

### บทคัดย่อ

แยกเชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงจากแหล่งน้ำทะเล น้ำจืด และพื้นที่ป่าไม้ ในจังหวัดนครนายก และกาญจนบุรีที่ได้เชื้อทั้งหมด 39 ไอโซเลทและเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกเบื้องต้นโดยดูจากโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive organs) พบว่า ทั้ง 39 ไอโซเลทมีลักษณะสัณฐานตรงกับเชื้อ *Pythium* spp. หรือสกุลใกล้เคียง การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเพื่อแยกสายพันธุ์ที่ก่อโรค (pathogenic strain) กับสายพันธุ์ที่ก่อโรคต่ำ (hypo-virulent strain) หรือไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) ได้ hypo-virulent strain จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อนำ hypo-virulent strain มาจัดจำแนกโดยเทคนิคทางอนุชีววิทยา พบว่า เชื้อที่ได้มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium vexans* 3 ไอโซเลท *Pythium torulosum* 2 ไอโซเลท *Phytophythium cucurbitacearum* 2 ไอโซเลท *Pythium declinum* 1 ไอโซเลท *Pythium acanthicum* 1 ไอโซเลท *Pythium catenulatum* 1 ไอโซเลท และ *Phytophythium* sp. unknow ไอโซเลท D37 1 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนพบว่าเชื้อ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. มีปริมาณเบต้ากลูแคนอยู่ที่ 24-32 g/100 g เส้นใยแห้ง เทียบกับชุดควบคุมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) มีปริมาณเบต้ากลูแคนอยู่ที่ 33 g/100 g เส้นใยแห้ง การวิเคราะห์โครงสร้างของเบต้ากลูแคนด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่าโครงสร้างที่ได้คือ (1,3)(1,6) beta-glucan การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเบต้ากลูแคนโดยทำการทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 juice broth (V8B), potato dextrose broth (PDB) และ cornmeal broth (CMB) ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลแตกต่างกัน คือที่ความเข้มข้น 0%, 2%, 4% และ 8% พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลเป็น 8% โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุด อย่างไรก็ตามปริมาณเบต้ากลูแคนที่ผลิตได้พบว่า ในอาหาร V8B ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาล 4% และอาหาร PDB ที่ไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลจะสามารถผลิตเบต้ากลูแคนมากได้สูงสุด การทดสอบประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. ในการเป็นสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาระหว่างพบว่าเบต้ากลูแคนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas oryzae* ได้ ส่วนในสิ่งมีชีวิตคล้ายราสามารถยับยั้งเชื้อ *Pythium splendens* และ *Pythium vexans* ได้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* จากการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (%) และวิธี ABTS radical scavenging activity assay (%) พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1 mg/ml จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ 10 mg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเบต้ากลูแคนที่ได้จากเชื้อ *Pythium* และสกุลใกล้เคียงยังมีคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (elicitor) การวัดด้วย Thin-layer chromatography (TLC) แสดงให้เห็นว่า เบต้ากลูแคนสามารถชักนำให้เกิดการสร้างสารสโคโปเลติน ซึ่งเป็นไฟโตเอสโตรเจนในต้นกล้าทุเรียนที่ต่อต้านการเกิดโรค (defensive compound) ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	New Source of Beta-glucan from Non-pathogenic <i>Pythium</i> spp.
<b>Student Name</b>	Miss Nuengrathai Maiprom
<b>Student ID</b>	63604004
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Department</b>	Agriculture
<b>Year</b>	2566
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Prommart Koohakan

### ABSTRACT

The morphological characteristics of 39 isolates of *Pythium* spp. and related genera isolated from marine, freshwater, and forest habitats in Nakhon Nayok and Kanchanaburi provinces were studied. The pathogenicity test was carried out to determine which oomycetes isolates were pathogenic and non-pathogenic strains. Eleven isolates of hypovirulent strain were identified by molecular techniques. The obtained strains were similar to *Phytophythium vexans*, *Pythium torulosum*, *Phytophythium cucurbitacearum* and *Pythium declinum*. *Pythium acanthicum*, *Pythium catenulatum* and unknown *Phytophythium* species. To investigate the cladistic relationships of *Pythium* and related genera, phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining (NJ) algorithm based on rDNA-ITS sequences, combining with the tree topology data reconstructed by maximum-likelihood and maximum-parsimony algorithm. Beta-glucan quantity analysis showed that *Pythium* spp. and *Phytophythium* spp. contained 24-32 g/100 g dry mycelium weight compared to the control yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with approximately 33 g/100 g dry mycelium weight. Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analysis revealed the structure of *Pythium* sp. and *Phytophythium* sp. is (1,3),(1,6) beta-glucan. On three different types of medium, V8 juice broth, potato dextrose broth, and cornmeal broth, factors influencing the growth and beta-glucan synthesis were examined with 0%, 2%, 4%, and 8% sugar concentration. The isolates cultivated in media

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นแก่ประโยชน์ด้านการศึกษา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

containing 8% sugar produced the highest quantity of the mycelium, and the highest beta-glucan levels were observed in V8B and PDB medium with 4% sugar and 0% sugar, respectively. More importantly, biological activity tests demonstrated that beta-glucan derived from *Pythium* spp. and *Phytophythium* spp. may inhibit the growth of various pathogens, including *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae*, *Pythium splendens* and *Pythium vexans*. The antioxidant assay revealed high antioxidant properties after evaluating the obtained beta-glucan with DPPH radical scavenging activity test (%) and ABTS radical scavenging activity assay (%). It was shown that beta-glucan from the lowest concentration of 1 mg/ml to the highest concentration of 10 mg/ml can inhibit the free radicals. Thin-layer chromatography measurement of scopoletin in durian seedlings also showed that beta-glucan is a promising elicitor of this defensive compound.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้เริ่มต้นขึ้นจากความสนใจใฝ่รู้ และจบลงด้วยความอุทิศสละของตัวข้าพเจ้าเอง ขอขอบคุณตัวข้าพเจ้าที่ทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. พรหมมาศ คุณหากาญจน์ ที่คอยให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทาง ขอขอบคุณ นายรัฐสิทธิ์ แซ่ลี้ ที่คอยช่วยเหลือทุกอย่างตั้งแต่วันแรกที่ข้าพเจ้าตัดสินใจก้าวเท้าเข้ามาที่นี่ไม่ว่าเรื่องงานหรือเรื่องส่วนตัวก็ดี นางสาวสรลีสุวรรณดี เพื่อนร่วมทุกข์ของข้าพเจ้า นายทศพล อนันตวิทยานนท์ ผู้ที่อยู่ข้างๆ และสนับสนุนพาข้าพเจ้าไปเก็บตัวอย่างอย่างไม่มีย่อท้อ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ อาจารย์ทุกท่านที่เกี่ยวข้องและพี่น้องๆ เพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือมาโดยตลอดอันข้าพเจ้าไม่อาจเอ่ยนามได้หมด

ขอขอบคุณครอบครัว คุณพ่อคุณแม่ นายสุนันและนางขวัญหญิง ไหมพรหมและน้องชายนายณัฐดนัย ไหมพรหม ที่อดทนรอข้าพเจ้าจนเรียนจบ

สุดท้ายงานวิจัยนี้จะเริ่มต้นอย่างยากลำบากหากข้าพเจ้าไม่ได้รับการสนับสนุนที่ดีขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร ในการให้ทุนสนับสนุนโครงการทุนบัณฑิตศึกษาประจำปี 2564 และขอขอบคุณทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษา และเงินทุกบาทจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หนึ่งฤทัย ไหมพรหม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
กิตติกรรมประกาศ.....	v
สารบัญ.....	vi
สารบัญตาราง.....	viii
สารบัญภาพ.....	ix
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 สถานที่ดำเนินการ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ประวัติความเป็นมาของการศึกษาเบต้ากลูแคน.....	4
2.2 แหล่งที่มาและโครงสร้างของเบต้ากลูแคน.....	5
2.3 การสกัดเบต้ากลูแคน.....	6
2.4 ความสามารถในการใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ.....	7
2.4.1 ประโยชน์ทางการแพทย์.....	7
2.4.2 ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม.....	9
2.4.3 ประโยชน์ทางการเกษตร.....	11
2.5 วิวัฒนาการและการจัดกลุ่ม Oomycetes (Phylogeny and classification).....	12
2.6 สิ่งมีชีวิตคล้ายราในสกุล <i>Pythium</i> spp.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>16</b>
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	16
3.2 วิธีดำเนินงาน.....	19
3.2.1 เชื้อ <i>Pythium</i> sp. และสกุลใกล้เคียงที่นำมาศึกษา.....	19
3.2.2 ศึกษาปริมาณและชนิดของเบต้ากลูแคน.....	24
3.2.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเส้นใยที่มีเบต้ากลูแคน.....	26
3.2.4 ศึกษาคุณสมบัติ.....	26
3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	28
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>29</b>
4.1 เชื้อ <i>Pythium</i> sp. และสกุลใกล้เคียงที่นำมาศึกษา.....	29
4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเบื้องต้น.....	29
4.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test).....	61
4.1.3 การจัดจำแนก <i>Pythium</i> โดยเทคนิคทางอณูวิทยา.....	71
4.2 ปริมาณและชนิดของเบต้ากลูแคน.....	78
4.2.1 การศึกษาปริมาณเบต้ากลูแคน.....	78
4.2.2 การศึกษาชนิดและองค์ประกอบของเบต้ากลูแคน.....	79
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเส้นใยที่มีเบต้ากลูแคน.....	83
4.4 การศึกษาคุณสมบัติของเบต้ากลูแคน.....	85
4.4.1 คุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic).....	85
4.4.2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants).....	90
4.4.3 คุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors).....	94
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>97</b>
เอกสารอ้างอิง.....	100
ประวัติผู้เขียน.....	108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ประวัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเบต้ากลูแคน.....	5
2.2 การใช้งานในอุตสาหกรรมของเบต้ากลูแคน.....	9
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลท.....	31
4.2 ผลทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของของ <i>Pythium</i> sp. และ <i>Phytophythium</i> sp. ที่แยกได้ เพื่อจัดกลุ่ม Non-pathogenic หรือ hypovirulence strain.....	64
4.3 น้ำหนักต้นกล้าแต่ละชนิดหลังการปลูกเชื้อทดสอบไอโซเลทต่างๆ เพื่อจัดกลุ่ม Non-pathogenic หรือ hypovirulence strain.....	68
4.4 ผลการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ITS เทียบกับฐานข้อมูล GenBank.....	72
4.5 ปริมาณกลูแคนที่ได้จาก <i>Pythium</i> sp. และ <i>Phytophythium</i> sp. เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์.....	79
4.6 ชนิดของอาหารและการเพิ่มปริมาณน้ำตาลต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณเบต้ากลูแคน.....	84
4.7 ผลของเบต้ากลูแคนที่ได้จาก <i>Pythium</i> sp. และ <i>Phytophythium</i> sp. ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี paper disc diffusion.....	87
4.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity assay).....	91
4.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging activity assay).....	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบเคมีของเบต้ากลูแคน.....	6
2.2 กลไกและกิจกรรมของเบต้ากลูแคนซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาจำแนกเป็นแหล่งที่มา.....	8
2.3 การรับรู้และถ่ายทอดสัญญาณเบต้ากลูแคนของพืช.....	12
2.4 แผนภูมิวิวัฒนาการของ สกุล <i>Pythium</i> sp. ทั้ง 11 clade.....	14
4.1 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-18 ( <i>G. nunn</i> ).....	40
4.2 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-17 ( <i>P. acanthicum</i> ).....	41
4.3 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-1 ( <i>Ph. chamaehyphon</i> ).....	42
4.4 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-9, KS-11, NS-20 ( <i>Ph. cucurbitacearum</i> ).....	43
4.5 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-1 - KS-6 ( <i>Phytopythium</i> sp. D37).....	44
4.6 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-13, NL-15, NL-16, NL-17, NL-18 ( <i>Ph. helicoides</i> ).....	45
4.7 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-14 ( <i>P. helicoides</i> ).....	46
4.8 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-11 ( <i>P. helicoides</i> ).....	47
4.9 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NL-6 ( <i>Ph. iriomotense</i> ).....	48
4.10 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-15, KS-16 ( <i>P. torulosum</i> ).....	49
4.11 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-7, KS-8, KS-12 ( <i>Ph. vexans</i> ).....	50
4.12 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-3, NS-4, NS-9 ( <i>Ph. vexans</i> ).....	51
4.13 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NL-19 ( <i>P. vexans</i> ).....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.14 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท KS-10 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	53
4.15 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NL-12, NL-14 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	54
4.16 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-21 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	55
4.17 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-10 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	56
4.18 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-2 ( <i>Pythium</i> sp.).....	57
4.19 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NL-7 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	58
4.20 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NL-13 ( <i>Phytophthium</i> sp.).....	59
4.21 ลักษณะทางสัณฐานของ Oomycetes ไอโซเลท NS-8 ( <i>Pythium</i> sp.).....	60
4.22 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Pythium</i> spp. บริเวณเนื้อเยื่อพืช.....	62
4.23 ระดับความรุนแรงที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าพืชทดสอบ.....	63
4.24 แผนภูมิวิวัฒนาการของ <i>Pythium</i> และสกุลใกล้เคียง.....	77
4.25 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ATR-FTIR spectra of the 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	81
4.26 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.....	82
4.27 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์และเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์จาก <i>Pythium</i> spp. และ <i>Phytophthium</i> spp.....	82
4.28 ประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนจาก non-pathogenic <i>Pythium</i> sp. และ <i>Phytophthium</i> sp. ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์.....	86
4.29 แผนภูมิการต้านอนุมูลอิสระ.....	93
4.30 ไมโครเพลทแสดงความเข้มข้นของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ.....	93
4.31 แผ่น TLC ที่แสดงการเรืองแสงของสโคโปเลตินและสiringक्टินในใบพืชที่ตัวทำลายเคลื่อนที่ต่างกัน.....	95
4.32 ผลการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ.....	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เบต้ากลูแคนเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลกลูโคสหลายโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบได้ในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เช่น ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ มีโครงสร้างแบบ 1,3 หรือ 1,4 beta-glucan เรียงเป็นเส้นตรง เห็ดและรามิโครงสร้างแกนกลางเป็น 1,3 beta-glucan และมี 1,6 beta-glucan สายสั้นๆ เป็นกิ่ง ยีสต์มีโครงสร้างแกนกลางเป็น 1,3 beta-glucan และมี 1,6 beta-glucan สายยาว เป็นกิ่ง แบบที่เรียกรวมโครงสร้าง 1,3 beta-glucan เรียงเป็นเส้นตรง นอกจากนี้เบต้ากลูแคนประเภทต่างๆ ยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน รวมไปถึงความสามารถในการละลายและความหนืด ทำให้เกิดการดำเนินงานทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย (Gayoung et al., 2019) โดยในปัจจุบันมีการนำเบต้ากลูแคนไปใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายตามความสามารถและคุณสมบัติบางประการที่มีความเฉพาะตัว เช่น ในยีสต์สุรา (*Saccharomyces cerevisiae*: brewer's yeast) จะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีจึงมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เป็นสารปรุงแต่งอาหาร ใส่ในโยเกิร์ต มายองเนส ใช้เป็นตัวทดแทนไขมันเพื่อเพิ่มความหนืดและความน่ารับประทาน เบต้ากลูแคนในยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*: Baker yeast) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดไมตาเกะ (*Grifola frondosa*) และเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) ที่มีคุณสมบัติในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันสามารถกระตุ้นการสร้างสมดุล Th1 (เซลล์ประเภท T helper ที่สร้างการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อปรสิตภายในร่างกาย เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และ มะเร็ง) ในมนุษย์ได้ เบต้ากลูแคนที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Laminaria* spp.) และแบคทีเรีย (*Alcaligenes faecalis*) สามารถกระตุ้นการสร้างสมดุล Th17 (เซลล์ที่กระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันจัดการกับสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายที่หลุดจากการจัดการของ Th1) ในมนุษย์ได้ ส่วนเบต้ากลูแคนที่ได้จากยีสต์ดำ (*Aureobasidium pullulans*) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างสมดุล Th1 และ Th17 ในมนุษย์แต่สามารถกระตุ้นในหนูได้ ในขณะที่ในยีสต์สุรา (*Saccharomyces cerevisiae*: brewer's yeast) และรำข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างสมดุลใดๆ ได้เลย (วิทยา, 2559)

แม้ว่าเบต้ากลูแคนได้มาจากแหล่งที่มาที่หลากหลายจะส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ที่เฉพาะตัวแต่กลับไม่พบว่าส่งผลเสียหรือผลข้างเคียงเลย จากการศึกษาการให้เบต้ากลูแคนกับหนูทดลองปริมาณ 2000 mg ต่อน้ำหนักตัวต่อวันซึ่งมากกว่าการบริโภคปกติของมนุษย์ถึง 50 เท่าผลการทดลองพบว่า หนูยังคงมีสุขภาพสมบูรณ์ดี ไม่พบว่าหนูนั้นแสดงอาการผิดปกติใดๆ และไม่พบสารตกค้างในตัวหนูทดลอง (Stier et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการทดลองในมนุษย์โดยกลุ่มอาสาสมัคร 15 คน รับประทานเบต้ากลูแคน 150 mg ต่อน้ำหนักตัวต่อวันเป็นเวลา 8 สัปดาห์จากนั้นหยุดเป็นเวลา 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ ตรวจวัดระดับไขมันในพลาสมาทุกสัปดาห์ในช่วงเริ่มต้นและในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 ของการบริโภคน้ำมันและตรวจอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าผู้ทดลองมีระดับคอเลสเตอรอลลดลงและไม่พบผลข้างเคียงผิดปกติใดๆ (Nicolosi et al., 1999) จึงเป็นไปได้ว่าการเกิดอาการแพ้ คลื่นไส้ ท้องเสีย หรือผลข้างเคียงอื่นๆ ของผู้บริโภคน้ำมันนั้น เกิดจากปัจจัยอื่นเช่น กระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพต่ำทำให้เบต้ากลูแคนที่ได้ไม่บริสุทธิ์มีการเจือปนของโปรตีนและไขมันอื่นๆ ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนลดลงและเกิดอาการแพ้ในผู้ใช้น้ำมัน ดังนั้นในการเลือกใช้ควรมีการคำนึงถึงแหล่งที่มา ความบริสุทธิ์ สิ่งที่จะนำไปใช้ ปริมาณที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงขนาดของโมเลกุลด้วย

แหล่งเบต้ากลูแคนที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง เห็ด และธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโอ๊ต นอกจากนี้ Aronson et al. (1967) ได้ทำการศึกษาผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตคล้ายราในกลุ่ม Oomycetes โดยพบว่าใน *Atkinsiella dubia* และ *Achlya ambisexuali* ใน order Saprolegniales รวมถึง Order Peronosporales เช่น *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. มีเบต้ากลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์เช่นเดียวกับเชื้อที่ได้มีการศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ แต่เชื้อในกลุ่มนี้ยังมีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ค่อนข้างน้อย ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทดลองจึงให้ความสำคัญกับเชื้อ *Pythium* spp. เนื่องจากเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไป และมีการเจริญเติบโตเร็ว จากรายงานถึงประโยชน์เฉพาะตัวข้างต้นที่กล่าวมาจึงทำให้มีความเป็นไปได้ว่าเบต้ากลูแคนแหล่งใหม่จากเชื้อ *Pythium* spp. ในกลุ่ม Oomycetes อาจจะเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้ประโยชน์และต่อยอดศึกษาในด้านต่างๆ ในอนาคตได้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาเบต้ากลูแคนแหล่งใหม่จาก *Pythium* spp. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์หรืองานวิจัย
2. ศึกษาปริมาณ ชนิด และองค์ประกอบเคมีของเบต้ากลูแคน
3. ศึกษาศักยภาพคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors), การเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงในการนำมาสกัดเบต้ากลูแคนรวมถึงการประยุกต์ใช้ในการตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors) การเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. แหล่งของเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. รวมไปถึงสกุลใกล้เคียงเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์หรืองานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณเบต้ากลูแคนที่เชื้อแต่ละชนิดสามารถผลิตได้ ชนิด โครงสร้างและองค์ประกอบเคมีของเบต้ากลูแคน

3. ศักยภาพคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors), การเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดพัฒนาทางด้านงานวิจัยที่สูงขึ้น รวมถึงการพัฒนาใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

### 1.5 สถานที่ดำเนินการ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถานที่เก็บตัวอย่าง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร-เขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่พื้นที่เขตน้ำตกนางรอง น้ำตกสาลิกา น้ำตกวังตะไคร้ แม่น้ำนครนายก จังหวัดนครนายก อุทยานแห่งชาติเอราวัณพื้นที่น้ำตกเอราวัณ อุทยานแห่งชาติไทรโยคพื้นที่น้ำตกไทรโยคใหญ่ น้ำตกไทรโยคน้อย และพื้นที่แม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี

สิงหาคม 2563 - สิงหาคม 2566

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ประวัติความเป็นมาของการศึกษาเบต้ากลูแคน

เบต้ากลูแคนแม้จะมีการวิจัยเกือบ 150 ปี แต่กลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนโดยเริ่มมีการศึกษาและนำมาใช้ในศตวรรษที่ 18 ในปีค.ศ. 1940 หรือมากกว่า 70 ปีมาแล้ว โดย Louis Pillemer นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสที่มีการนำผนังเซลล์ของยีสต์มาใช้รักษาโรคติดเชื้อ โดยการผสมตัวยา (Crude Mixture) ซึ่งมีส่วนผสมประกอบประเภท โปรตีน ไขมัน และแป้ง โดยเรียกตัวยานี้ว่า ไซโมซาน (Zymosan) ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาอย่างแพร่หลายทั่วยุโรป ต่อมา Nicholas Di-Luzio ได้ทำการวิจัยขยายผลจนพบว่าสารซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานในยา Zymosan คือ beta 1,3-D-glucan และมีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกโดยจะมีการใช้มากในทางการแพทย์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (ตารางที่ 2.1) ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง เช่น ในปี ค.ศ.1975 Peter Mansell ได้เขียนผลการศึกษาลงในวารสารสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา โดยอธิบายถึงการฉีด beta 1,3-D-glucan เข้าไปในก้อนเนื้อของมะเร็งผิวหนัง (Melanoma) ของคนไข้ 9 คน พบว่ามะเร็งก้อนเล็กๆ จะหายไปอย่างสมบูรณ์ในขณะที่มะเร็งขนาดใหญ่มีการหดเล็กลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 5 วัน รวมไปถึงใช้ฉีดให้ผู้ป่วยเพื่อลดขนาดแผลผ่าตัด เช่น การศึกษาในยุคกลางทศวรรษ 1980 ที่ได้มีการทดลองฉีดเบต้ากลูแคนโดยตรงเข้าไปที่แผลที่ผ่าตัดรักษามะเร็งเต้านม (ร่วมกับการรักษาด้วยวิธีการฉายแสง) ผลที่ได้คือ แผลที่ได้รับการผ่าตัดหายสนิท และยังพบว่าเบต้ากลูแคนสามารถป้องกันการรับรังสีได้ของผู้ป่วยได้ และในปี ค.ศ. 1987 William Browder ได้ทำการศึกษากับคนไข้จำนวน 21 ราย ที่มีแผลจากการผ่าตัด โดยการฉีดเบต้ากลูแคนทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าการติดเชื้อของผู้ป่วยกลุ่มนี้ลดลงอย่างมากมีเพียง 9.5% เท่านั้นที่พบการติดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคนมีประมาณมากถึง 49% ที่พบการติดเชื้อ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1989 Phil Wyde ยังพบว่า การให้เบต้ากลูแคนกับผู้ป่วยโดยการกินนั้นมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่ากับการให้เบต้ากลูแคนด้วยวิธีการฉีดอีกด้วย (สมศักดิ์, 2553)

## ตารางที่ 2.1 ประวัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเบต้ากลูแคน

History of immunomodulators	
1865	T. Bilroth: endotoxin (LPS)
1894	W. B. Coley: erysipiel toxins, <i>B. prodigiosus</i>
1936	J. Freund: mykobukJ J. Freund: mycobacterial adjuvants (BCG)
1941	L. Pillemer: zymosan
1943	M. J. Shear: polysaccharides from <i>S. marcescens</i>
1963	R. Prevot, B. Halpern, G. Biozzi: <i>Corynebacterium parvum</i>
1964-1971	A. White, A. Goldtein, J.F. Bach <i>et al.</i> : thyme
1967	H. Okamoto: picibanil (OK-432)
1968	N. DiLuzio: yeast glucan
1969	G. Chihara: lentinan
1967	W. Braun: double-stranded polynucleotides
1970	N. Najjar: tuftsia
1971	G. Renoux: levamisol
1975	E. Lederer, L. Chedid: MDP

ที่มา: Novak and Vetvicka (2008)

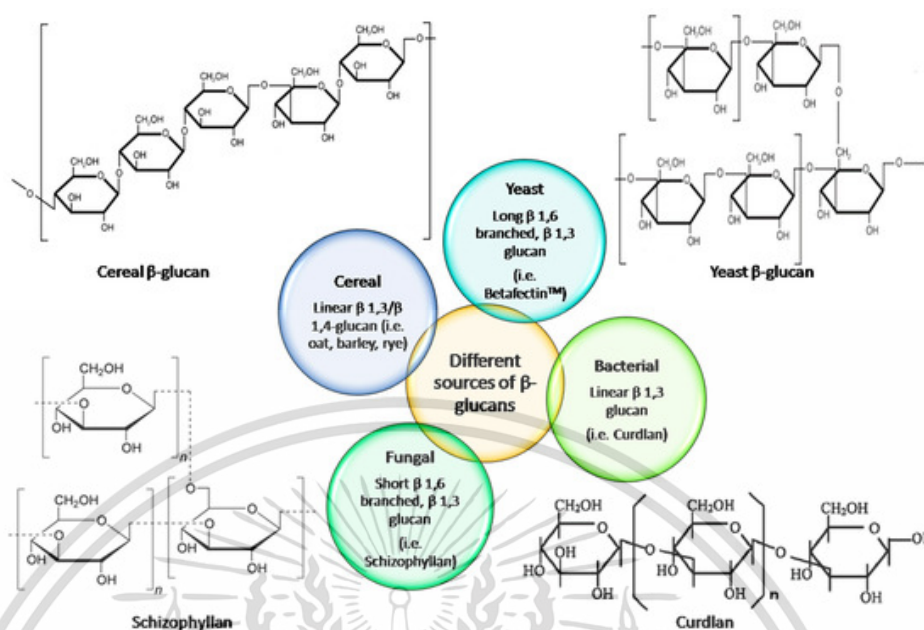
## 2.2 แหล่งที่มาและโครงสร้างของเบต้ากลูแคน

เบต้ากลูแคนเป็นสารที่มีแหล่งที่มาจากธรรมชาติซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*: baker yeast) และยีสต์สุรา (*S. cerevisiae*: brewer's yeast) ซึ่งเป็นของเหลือที่ได้จากอุตสาหกรรม เห็ดต่างๆ เช่น เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดไมตาเกะ (*Grifola frondosa*) และเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) สาหร่ายทะเล (*Laminaria* spp.) แบคทีเรีย เชื้อรา ผัก สมุนไพรต่างๆ ธัญพืชโดยเฉพาะข้าวบาร์เลย์ และข้าวโอ๊ต ซึ่งนิยมนำมาใช้ เนื่องจากผลิตได้มาก หาได้ทั่วไป และยังมีปริมาณเบต้ากลูแคนสูงถึง 2-11% และ 2-7.5% ตามลำดับ โดยเบต้ากลูแคนเป็นช่องทางเคมีของโพลีเมอร์ที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบ เป็นน้ำตาลกลูโคสเชิงเดี่ยว มีโมเลกุลเป็นรูปร่างวงเรียงต่อกันเป็นเส้นตรงยาว ซึ่งการเรียงจะแตกต่างกันตามตำแหน่งของพันธะไกลโคซิดิก โดยโครงสร้างของเบต้ากลูแคนที่พบจากแหล่งต่างๆ มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 2.1) เช่น เบต้ากลูแคนจากธัญพืชมีโครงสร้างเรียกว่า beta (1,3)(1,4)-D-glucan เป็นเส้นตรงไม่มีกิ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะ beta 1,4 glycosidic (ประมาณร้อยละ 70) และ beta 1,3 glycosidic (ประมาณร้อยละ 30) สำหรับยีสต์เรียกว่า beta (1,3)(1,6)-D-glucan มีโครงสร้าง beta 1,3-D-glucan เป็นโครงสร้างหลักและมีพันธะ beta 1,6 glycosidic ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักแยกออกไปเป็นแขนง ซึ่งโครงสร้างเบต้ากลูแคนจากยีสต์จะแตกต่างจากรา และเห็ด เนื่องจากมีสายแขนงที่ยาวกว่า สำหรับเบต้ากลูแคนจากแบคทีเรียจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนง

เรียกว่า curdlan เป็นการเชื่อมต่อกันของ beta 1,3 D glucan (Volman et al., 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 องค์ประกอบเคมีของเบต้ากลูแคน  
ที่มา: Du et al., (2019)

### 2.3 การสกัดเบต้ากลูแคน

วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการสกัดเบต้ากลูแคน ได้แก่ การสกัดด้วยน้ำร้อน (hot water extraction) สกัดด้วยอัลคาไลน์ (alkali extraction) สกัดด้วยเอนไซม์ (enzyme extraction) สกัดด้วยกรด (acidic extraction) และวิธีการสกัดอื่นๆ เช่น สกัดด้วยอัลตราซาวด์หรือคลื่นไมโครเวฟ (ultrasound, microwave) โดยพบว่าน้ำร้อนเป็นวิธีการสกัดที่ดีที่สุดในการสกัดเบต้ากลูแคนที่สามารถละลายน้ำได้ ส่วนเบต้ากลูแคนที่ไม่ละลายน้ำนั้นสามารถสกัดได้โดยการสกัดอัลคาไลน์จากนั้นแยกโดยการหมวนเหวี่ยงหรือการตกตะกอนด้วย ethanol, 2-propanol และ ammonium sulfate การสกัดเบต้ากลูแคนจากธัญพืชส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับ การแยกโปรตีน และหลังจากละลายเบต้ากลูแคนในน้ำร้อน และสารละลายอัลคาไลน์โปรตีนที่ละลายจะถูกแยกออกโดยการตกตะกอนแบบ isoelectric precipitation และแป้งที่เหลือจะถูกแยกโดยการตกตะกอนซ้ำๆ และการนำมาแยกด้วยเอนไซม์จะทำให้เบต้ากลูแคนมีความบริสุทธิ์ได้ถึง 99% (Bai et al., 2019) โดยปริมาณเบต้ากลูแคนที่สกัดได้นอกจากขึ้นอยู่กับวิธีการที่สกัดแล้วยังขึ้นอยู่กับ แหล่งที่มา อุณหภูมิและค่า pH อีกด้วย (Temelli, 1997)

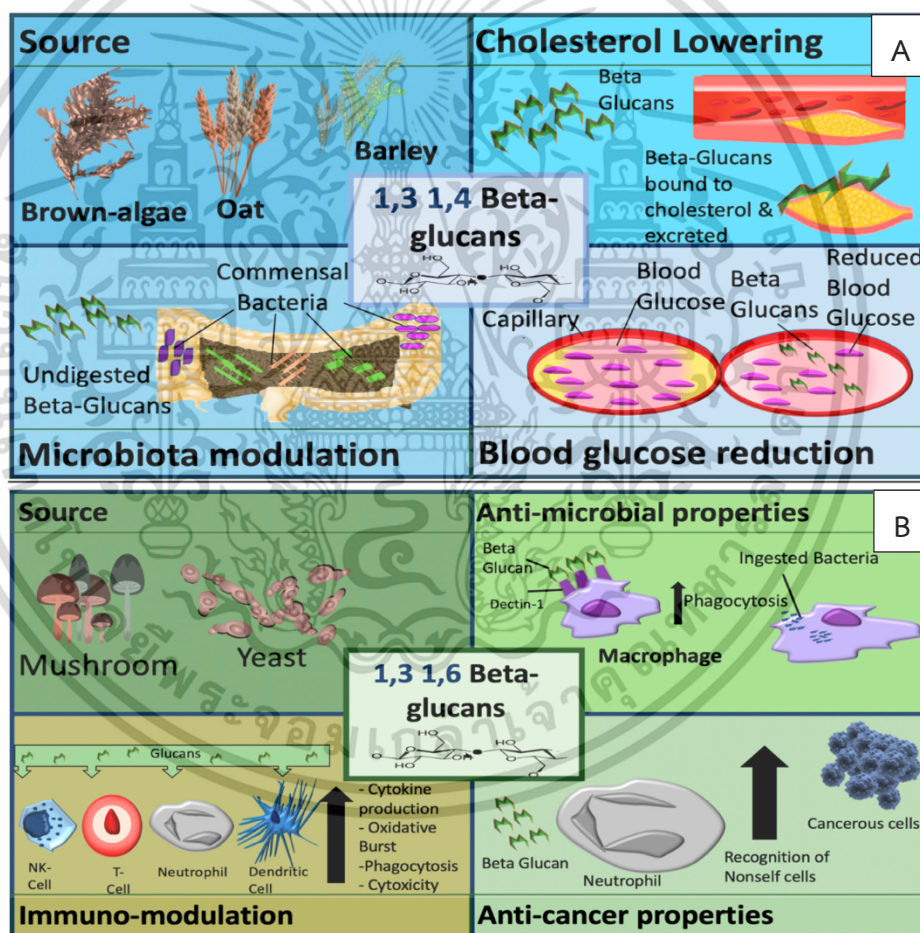
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 ความสามารถในการใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ

### 2.4.1 ประโยชน์ทางการแพทย์

มีการศึกษาและทดลองใช้เบต้ากลูแคนมายาวนานมากกว่า 50 ปี และในปัจจุบันมีงานวิจัยมากกว่า 6,000 ฉบับที่ทำการศึกษาระดับเบต้ากลูแคนในด้านการแพทย์ โดยใช้เป็นตัวตอบสนองทางชีวภาพ (biological response modifiers) ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Vannucci et al., 2013) ในด้านการรักษาในผู้ป่วยโดยตรงรวมไปถึงได้มีการวิจัยเพิ่มเติมว่าเบต้ากลูแคนสามารถกระตุ้นการทำงานของยาหลายชนิดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น ยาปฏิชีวนะ หรือยาสำหรับผู้ป่วยเบาหวานได้อีกด้วย การนำไปใช้ร่วมกับยาหรือการบำบัดต่างๆ เช่น ฉายรังสี หรือเคมีบำบัดได้พร้อมๆ กันได้ โดยมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาระดับเบต้ากลูแคนทางการแพทย์ไว้หลายฉบับที่น่าสนใจ เช่น Kirmaz et al., (2005) ได้ทำการศึกษาน่าสนใจโดยใช้ beta 1,3-D-glucan ในการรักษาผู้ป่วยโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ ผลการศึกษาพบว่าระดับของ IL-4 และ IL-5 ซึ่งเป็นเซลล์ที่รับผิดชอบต่อการตอบสนองต่อการอักเสบจากภูมิแพ้ลดลง จึงสรุปได้ว่า beta 1,3-D-glucan อาจมีส่วนช่วยในการรักษาผู้ป่วยโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ และการศึกษาของ Tondolo et al. (2017) ที่ได้ทำการสกัด beta (1,3)(1,6) D glucan จาก *Pythium insidiosum* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Pythiosis ในม้า สุนัข และมนุษย์ การศึกษานี้เป็นครั้งแรกในการประเมินปริมาณ glucan และกิจกรรมทางชีววิทยาของ *P. insidiosum* โดยได้ปริมาณเบต้ากลูแคนของ *P. insidiosum* จากน้ำหนักเส้นใยแห้งเท่ากับ  $19.24 \pm 3.57\%$  (% w/w, mean  $\pm$  SD) เมื่อเปรียบเทียบกับ *P. aphanidermatum* โดยพบว่าได้เบต้ากลูแคนทั้งหมด 22.18% ซึ่งจากการอ้างอิงของสปีชีส์ที่คล้ายคลึงกันมีปริมาณเบต้ากลูแคนอยู่ที่ 20.81 ถึง 28.85% โดยสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้สามารถส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์เม็ดเลือดขาวของม้าอย่างมีนัยสำคัญ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของมนุษย์ ม้าและหนูได้รับการฉีดวัคซีนใต้ผิวหนังด้วยเบต้ากลูแคนพบว่า IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  และ IL-17A เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเบต้ากลูแคนก่อให้เกิดการตอบสนองภูมิคุ้มกันของเซลล์ Th17 อย่างมีนัยสำคัญและเฉพาะเจาะจง ซึ่งเป็นพื้นฐานทางทฤษฎีสำหรับการทดลองการศึกษาในอนาคตมีจุดมุ่งหมายเพื่อทำให้เบต้ากลูแคนบริสุทธิ์สร้างบทบาทในกระบวนการติดเชื้อและศักยภาพในการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันเป็นสิ่งจำเป็นและจะช่วยให้เข้าใจถึงฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติในการรักษาของเบต้ากลูแคนในการรักษาโรค Pythiosis และการติดเชื้ออื่นๆ ได้ EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2009) ทั้งนี้คณะกรรมการผลิตภัณฑ์อาหารโภชนาการและโรคภูมิแพ้ ได้กล่าวถึงประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนในข้าวบาร์เลย์ รำข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต และรำข้าวโอ๊ตว่าสามารถช่วยในการรักษาระดับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด และช่วยรักษาน้ำหนักตัวให้เป็นปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าการบริโภคเบต้ากลูแคนในปริมาณที่มากกว่า 3 g ต่อวัน ยังสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดให้อยู่ในระดับที่เป็นปกติได้อีกด้วย นอกจากนี้วารสาร Better Way Health (2018) ได้ทำการสัมภาษณ์ Dr. Vaclav Vetvicka ซึ่งกล่าวถึงปริมาณเบต้ากลูแคนที่เพียงพอในการบริโภคต่อวัน โดยทั่วไปผู้มีสุขภาพปกติที่ต้องการได้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบต้ากลูแคนเสริมภูมิคุ้มกันควรรับประทานที่ 100 mg ต่อวัน สำหรับผู้ป่วยโรคร้ายแรง เช่น เบาหวานเรื้อรังหรือมะเร็งควรรับประทานที่ 500-1,000 mg ต่อวัน ทั้งนี้องค์การอาหารและยา (FDA: U.S. Food and Drug Administration, HHS. 2008) แห่งสหรัฐอเมริกายังได้จัดให้เบต้ากลูแคนเป็นอาหารเสริมที่ปลอดภัย (GRAS: Generally Regcosnized as SAFE) สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารและบริโภคได้โดยตรง และยังมีการใช้เบต้ากลูแคนเป็นอาหารเสริมช่วยกระตุ้นเซลล์ในด้านต่างๆ ทั้งการสร้างเส้นใยที่ทำหน้าที่ผลิตสารสำคัญที่จำเป็นต่อผิวไม่ว่าจะเป็นคอลลาเจน ฮีลาสติน รวมถึงกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้ผิวหนังยืดหยุ่น กระชับ การประยุกต์ใช้ในด้านเครื่องสำอาง พบว่ามีแนวโน้มเป็นสารออกฤทธิ์ในกิจกรรมการต้านริ้วรอย ต่อต้านแสงอัลตราไวโอเล็ต รักษาแผล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเพิ่มความชุ่มชื้นซึมซาบสู่ผิวหนังได้ดี (Du et al., 2014) ด้วยสรรพคุณดังกล่าวทำเบต้ากลูแคนมีแนวโน้มว่าจะมีการศึกษา และพัฒนาเพิ่มมากขึ้นต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 2.2 กลไกและกิจกรรมของเบต้ากลูแคนที่จำแนกจากแหล่งต่างๆ A: จากธัญพืช B: จากจุลินทรีย์ ที่มา: Murphy et al. (2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4.2 ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม

เบต้ากลูแคนมีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย (ตารางที่ 2.2) ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ การแพทย์ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพอื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้เบต้ากลูแคนสำหรับทำเจล เพิ่มเนื้อสัมผัสและเพิ่มความหนืดในสารละลายนำไปสู่การผลิตอาหารที่มีไขมันต่ำพร้อมคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น (Du et al., 2019) ใช้เป็นแหล่งของเส้นใยอาหารในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เลียนแบบไขมันเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่ลดแคลอรี ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์เช่น โยเกิร์ต น้ำสลัด ของหวาน แขนงแข็ง การทำเป็นผลิตภัณฑ์นม ชีส ไอศกรีม และเนยแข็งไขมันต่ำ นำมาผสมกับแป้งสำหรับการเตรียมขนมปังเพื่อเพิ่มความนุ่ม เป็นส่วนผสมในการทำไส้กรอก ใช้เป็นวัสดุปิดแผลในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเพิ่มความชุ่มชื้นผิวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง รวมถึงใช้ผสมอาหารสัตว์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Ahmad et al., 2012)

ตารางที่ 2.2 การใช้งานในอุตสาหกรรมของเบต้ากลูแคน

Applications	Products	Functionality
Foods	Prebiotic sausage formulation with beta-glucan	Noticeable effect on physical and sensory properties
	Gluten-free bread with beta-glucan	Acceptable results of sensory analysis
	Dairy products with beta-glucan	Calorie-reduced and cholesterol-lowering
	Yogurts with beta-glucan	Faster proteolysis, lower release of large peptides and a higher proportion of free amino acids
	Extruded ready-to-eat snacks	Manipulate the glycemic response
	Beverage containing Beta-glucan	Control food intake and reduce 24 h energy intake
	Cakes containing beta-glucan	Good quality attributes
Feeds	Used in food products	As a thickening, water-holding, or oil-binding agent and emulsifying stabilizer
	Animal feed additive	Enhance immunity and as a potential antitumor agent
Medicines	Fish feed additive	Increase the number of specific antibody secreting cells and specific Ig levels in serum
	Wound dressing material	Larger inner cavity diameter
	Transparent wound dressing sheet	Therapeutic efficacies comparable or superior to a commercial wound dressing

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Curing partial-thickness burns	Decrease post injury pain
	Curing burn-induced remote organ injury	Be effective against burn-induced oxidative tissue damage
	Poly-membranes containing beta-glucan	Accelerated wound healing effects
	A bone-substituting material	Easy manipulation and good adaptation to the shape and dimensions of even large bone defects
	Vaccine delivery platform	Can be exploited for vaccine development
Cosmetics	Film-forming moisturizer	Efficacy for reducing fine-lines and wrinkles
	Skin and dermatological compositions	Moisturization of skin or mucosa and anti-aging and revitalizing effect on the skin
	Cosmetic product	Defer skin aging, impart skin whitening effect and cure skin damage effectively
	Cosmetic product	Treat collagen loss in aging skin
	Cosmetic formulation containing CM beta-glucan	With good spread ability and skin smoothing effect
	Emulsion containing CM beta-glucan	Improve skin condition
	Cosmetic product containing yeast beta-glucan	Enhance ulcer healing and increase epithelia hyperplasia
	Eye drops with mushroom beta-glucan	Great moisture retention
Other health products	Materials for health foods	Useful
	Personal care compositions containing beta-glucan	Hair care actives
	Novel prebiotics	Health-promoting property
	Natraceutical product containing beta-glucan	Useful

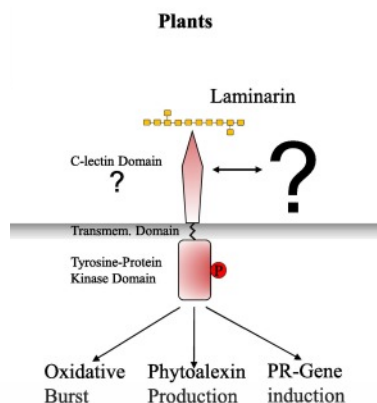
ที่มา: Zhu et al. (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.3 ประโยชน์ทางการเกษตร

การนำเบต้ากลูแคนมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรในปัจจุบันยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากเบต้ากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอยู่แล้วในผนังเซลล์ของพืช และจุลินทรีย์บางชนิด ทำให้ไม่มีบทบาทโดยตรงต่อการเข้าทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค แต่สามารถเป็นตัวกระตุ้นความต้านทาน และกระตุ้นการตอบสนองการป้องกันต่อจุลินทรีย์โรคพืช ซึ่งสามารถรับรู้ได้โดยตัวรับการจดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors: PRRs) ในเซลล์พืช และกระตุ้นการตอบสนองต่อการป้องกันต่อเชื้อโรคได้ทั้งการแสดงออกโดยกลไกป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้ารุกรานโดยการสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ขึ้นมา เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า oxidative burst การสร้าง phytoalexin และการแสดงออกระดับยีน (PR gene) ดังนั้นหากมีการศึกษาถึงกลไก และประโยชน์ที่แท้จริงอาจทำให้เบต้ากลูแคนเป็นหนึ่งในสารที่มีศักยภาพมาใช้ในทางโรคพืช (Fesel and Zuccaro, 2016) เช่น งานวิจัยของ Sun et al. (2019) ที่ได้ทำการศึกษา beta 1,3-D-glucan จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อตรวจสอบผลของการลดการสลายตัวหลังการเก็บเกี่ยวของผลแพร์ที่เกิดจากการขยายตัวของ *Penicillium expansum* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า beta 1,3-D-Glucan สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคต่อเชื้อ *P. expansum* ในขนาดผลที่ลูกแพร์ได้นอกจากนี้ยังพบว่า beta 1,3-D-glucan ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองได้แก่ *PR1*, *GLU*, *endoGLU9*, *CHI4*, *endoCHI*, *PR4*, *PR5*, *CHI3* และ *PAL* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นรายงานฉบับแรกที่ beta 1,3-D-glucan สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวได้ การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ beta 1,3-D-glucan อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการลดการเน่าของเชื้อราของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวได้ และงานวิจัยของ Anusuya and Sathiyabama (2015) ที่ได้มีการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของอนุภาคนาโนสารสกัดเบต้ากลูแคน (nano-biopolymer) ในการป้องกันโรคเน่าของขมิ้นที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* โดยการฉีดพ่นทางใบเพื่อเสริมกลไกการป้องกันของพืช พบว่าอนุภาคนาโนจากสารสกัดเบต้ากลูแคน (GNPs) ช่วยลดการเน่าของเหง้าขมิ้นได้ โดยให้การปกป้องถึง 77% มีการแสดงออกทางสรีระวิทยาโดยการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ป้องกันตนเอง เช่น peroxidases (E.C.1.11.1.7), polyphenol oxidases (E.C.1.14.18.1), protease inhibitors (E.C.3.4.21.1) และ beta 1,3 glucanases (E.C.3.2.1.39) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ป้องกันในพืชขมิ้นที่ใช้ GNPs อาจมีบทบาทในการจำกัดการเกิดอาการของโรค และ GNPs สามารถใช้เป็นตัวกระตุ้นการดื้อยาที่มีประสิทธิภาพในขมิ้นเพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของเหง้าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 การรับรู้และถ่ายทอดสัญญาณเบต้ากลูแคนของพืช

ที่มา: Fesel and Zuccaro (2016)

## 2.5 วิวัฒนาการและการจัดกลุ่ม Oomycetes (Phylogeny and classification)

การจัดหมวดหมู่ของ Oomycete ในอดีตถูกจัดให้อยู่รวมกับราใน Division Eumycota, Subdivision Mastigomycotina, Class Oomycetes, Order Peronosporales, Family Pythiaceae (วิชัย, 2551) ปัจจุบันมีการจัดให้อยู่ในอาณาจักร Chromista หรือ Straminipila (=stramenopiles) แยกย่อยเป็น Subphylum Oomycota และมีชื่อคลาสว่า Oomycetes (Schroeder et al., 2013) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ในคลาสดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราที่แท้จริง (true fungi) โดยลักษณะทางชีวเคมีและเซลล์วิทยาที่แยกความแตกต่างของ Oomycetes จากเชื้อราที่แท้จริงในอาณาจักร Fungi คือ (1) เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเส้นใย (2) cytoplasmic dense body/fingerprint vacuoles (DBV/FP) ที่ประกอบด้วย phosphorylated Beta 1,3 mycolaminarin glucans; (3) thalli เป็นแบบ diploid ใน meiosis ก่อนการสร้าง gamete (4) มี mitochondria และ tubular cristae (5) การใช้ประโยชน์จาก the  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimelic acid และ lysine synthetic pathway (Beakes, 2012)

## 2.6 สิ่งมีชีวิตคล้ายราในสกุล *Pythium* spp.

*Pythium* spp. ไม่ใช่รา แต่เป็นสกุลของสิ่งมีชีวิตคล้ายราหรือ Fungal like organism ที่อยู่ในคลาสน Oomycetes หรือ Peronosporomycetes โดยที่สามารถเรียกได้ทั้ง 2 แบบ ขึ้นอยู่กับรูปแบบของผู้วิจัยนั้นๆ (Schroeder et al., 2013) โดยสามารถจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ได้ดังนี้

Kingdom: Chromista

Phylum: Oomycota

Class: Oomycetes

Order: Pythiales

Family: Pythiaceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genus: *Pythium*

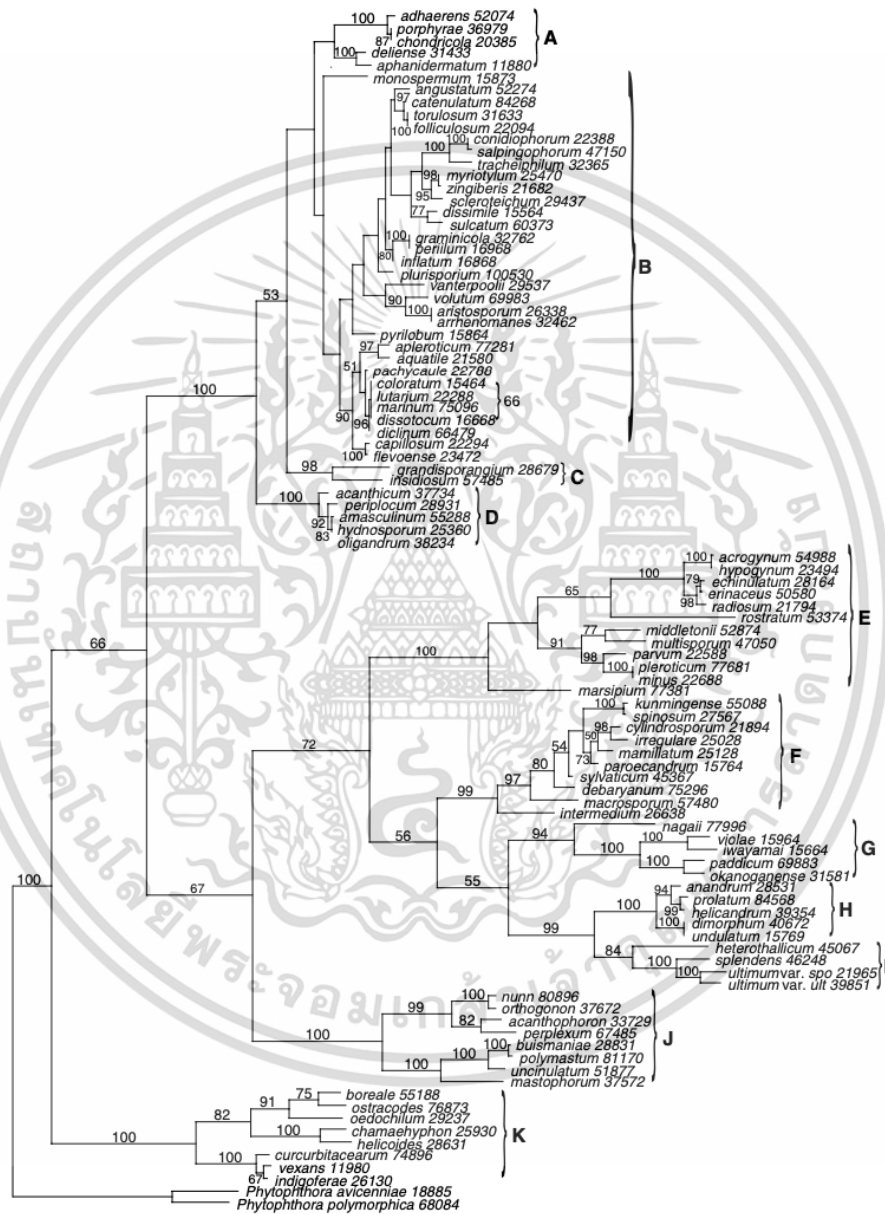
ทีมา (Kirk et al., 2008; Uzuhashi et al., 2010)

*Pythium* spp. เป็นเชื้อสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญมากทางเศรษฐกิจในด้านการเกษตรซึ่งเป็นปัญหาต่อเกษตรกรทั้งก่อให้เกิดโรคในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ตลอดจนสร้างความเสียหายร้ายแรงในแปลงธัญพืช หญ้าสนามหญ้าซึ่งส่วนใหญ่นำไปสู่การเน่าของเมล็ดก่อนและหลังการงอก ต้นกล้า ผลไม้ ราก และลำต้น โดย สามารถพบได้บ่อยในเขตร้อนถึงเขตหนาว แต่ในบางสปีชีส์ มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชจากเชื้อราอื่นๆ เช่น การพัฒนา *Pythium oligandrum* เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับเป็น seed dressing, overhead spraying และ soil drenches นอกจากนี้ *Pythium* spp. บางสปีชีส์ยังเป็นเชื้อราก่อโรคในแมลง (entomopathogenic) และสามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (biological control agent) ของยุงและแมลงที่เป็นอันตรายอื่นๆ ได้ บางสปีชีส์นอกจากทำความเสียหายให้กับพืชแล้วยังมีความสามารถก่อโรคในปลา สาหร่ายสีแดงในทะเล และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ด้วย ทำให้เกิดโรค Pythiosis ในทางกลับกันบางชนิดสามารถผลิตสารประกอบที่มีคุณค่าสำหรับอุตสาหกรรมยาและอาหาร เช่น polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid และ cis-pentanoic acid, synthesize biotin, folic acid, pantothenic acid, riboflavin, thiamine และ vitamin C เป็นต้น และมีความสามารถในการเปลี่ยน sterol เป็น cholesterol, ergosterol และ sitosterol ในขณะที่การผลิต hydrolytic enzyme จำนวนมาก เช่น pectinase, amylase และ cellulase อาจพบการใช้ในอุตสาหกรรมเช่นในการย่อยสลายของเสียจากพืชสำหรับการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Ho, 2018)

*Pythium* spp. เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นพวกที่อาศัยในดินก่อให้เกิดโรคเน่าคอดินของต้นกล้าพืช โรคโคนเน่า และรากเน่าของพืชตระกูลหญ้าบางชนิด จัดเป็น saprobe อาศัยในน้ำ และบางพวกจัดเป็นปรสิตแบบชั่วคราวของพืช และสัตว์ตัวเล็กๆ บางชนิด สำหรับการแบ่งสปีชีส์ของ *Pythium* ตามการแบ่งของ (waterhouse, 1968) จะดูจากอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ จำนวน และการเกาะติดของ antheridium บน oogonium การใช้ขนาด และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ sporangium รูปร่าง ขนาด และการมีหรือไม่มีหนามที่ผนังเซลล์ของ oogonium ผนังเซลล์และการเกิดของ oospore ใน plerotic หรือ aplerotic เป็นต้น การดูลักษณะทางสัณฐานนั้นเป็นพื้นฐานในการจัดจำแนกเชื้อมากกว่า 50 ปี ปัจจุบันได้มีการพยายามศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลต่างๆ เพื่อเข้ามาช่วยในการศึกษาวิวัฒนาการของสปีชีส์ต่างๆ เพื่อให้ถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น (Ho, 2018)

ปัจจุบันการจัดหมวดหมู่อนุกรมวิธานของ *Pythium* spp. เช่น การจัดหมวดหมู่โดยการแบ่งเป็น 11 clade (A-K) ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอนุชีววิทยา อ้างอิงจาก Levesque and De Cock (2004) นอกจากการแบ่ง clade ข้างต้น Uzuhashi et al. (2010) ยังได้มีการเปลี่ยนชื่อใหม่ตามรูปแบบ

sporangium เพิ่มเติมเป็น 4 สกุลใหม่ ได้แก่ *Ovatisporangium*, *Globisporangium*, *Elongisporangium* และ *Pilasporangium* หนึ่งใน clade ที่มีการจัดกลุ่ม และตั้งชื่อสกุลใหม่ซึ่งจัดเป็นสกุล *Phytopythium* เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการรายงานก่อนหน้านี้จัดอยู่สกุล *Pythium* ต่อมาพบว่านอกจาก *Pythium* spp. เชื้อในสกุลนี้มีความเกี่ยวข้องนี้ใกล้ชิดกับสกุล *Phytophthora* จึงได้มีการจัดหมวดหมู่ใหม่โดยการรวบรวมไว้ใน clade K (Tkaczyk, 2020)



ภาพที่ 2.4 แผนภูมิวิวัฒนาการของ สกุล *Pythium* spp. ทั้ง 11 clade วิเคราะห์จากตำแหน่งยีน ITS (1 และ 2) และ 5.8S ของ nuclear rDNA ตัวเลขภายในแผนผังแสดงค่า bootstrap support การทำซ้ำ 100 ครั้ง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Phytophthora* spp. แสดงเป็น outgroup

ที่มา: จาก Levesque and De Cock (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่เกี่ยวกับเบต้ากลูแคนใน *Pythium* หรือสกุลใกล้เคียงในปัจจุบัน ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่นการสกัดเบต้ากลูแคนเพื่อใช้ทางการแพทย์ เช่น งานวิจัยของ Tondolo et al. (2017) ในการศึกษา *Pythium insidiosum* ถึงศักยภาพการกระตุ้นการสร้างเซลล์ Th1/Th17 เพื่อตอบสนองภูมิคุ้มกันและกระบวนการติดเชื้อ ในการรักษาโรค pythiosis และการติดเชื้อราอื่นๆ ผลที่เห็นได้ชัดนี้ ส่งผลให้ในปี 2020 โดย Tondolo et al. (2020) ได้พัฒนาเบต้ากลูแคนดังกล่าวออกมาในรูปวัคซีน PitiumVac® และมีการทดลองใช้ในหนูพบว่าวัคซีนช่วยเสริมการตอบสนอง Th1/Th17 ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้ฉีดวัคซีน ทางด้านการเกษตร เช่น งานวิจัยของ Anusuya and Sathiyabama (2015) ในการสกัดเบต้ากลูแคนจาก *Pythium aphanidermatum* และพัฒนาเป็นอนุภาคนาโนเพื่อป้องกันโรคเน่าของขมิ้นที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ซึ่งนอกจากป้องกันโรคเน่า ยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่เพิ่มขึ้นในสภาพแปลงปลูก ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้จะมีงานวิจัยเกี่ยวกับเบต้ากลูแคนออกมามากแต่การศึกษาถึงเบต้ากลูแคนในกลุ่ม *Pythium* มีให้เห็นไม่มากนัก งานวิจัยฉบับนี้จึงต้องการศึกษาเบต้ากลูแคนใน *Pythium* สปีชีส์อื่นๆ เพื่อเป็นทางเลือก รวมถึงชี้ให้เห็นศักยภาพที่เพิ่มขึ้นของเชื้อชนิดนี้เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาวิจัยอื่นๆ และต่อยอดในอนาคต

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

##### 3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1. เข็มเย็บเยื่อ (Needles)
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. Cuvette และ Microplate (96-Well Plate) รุ่น F bottom ยี่ห้อ Nunclon
4. ไมโครเวฟ
5. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 cm
6. หลอดทดลอง
7. ถังพลาสติก
8. ปีกเกอร์
9. Centrifuge tube 50 ml
10. หลอด PCR tube
11. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง ยี่ห้อ Nikon รุ่น Eclipse E200
12. กระจกสไลด์
13. แผ่นปิดกระจกสไลด์
14. Syringe
15. Microcentrifuge tube 1.5 และ 2 ml
16. สำลี
17. กระดาษทิชชู
18. เครื่อง spectrophotometer รุ่น biophotometer plus ยี่ห้อ Eppendorf, USA
19. เครื่อง Thermal cycle PCR รุ่น Biometra TGradient Thermocycler
20. เครื่อง microplate reader รุ่น Infinite 200 Pro ยี่ห้อ Tecan
21. เครื่อง Vortex mixture รุ่น GENIE 2
22. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ NUVE รุ่น NF400
23. เครื่อง gel electrophoresis ยี่ห้อ Biorad, USA
24. Water bath ยี่ห้อ Memmert, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ Autoclave ยี่ห้อ TOMY รุ่น ES-315
26. ขวดโซดา
27. กระดาษ Litmus ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL, Germany
28. Wifi camera eyepiece รุ่น MC-500W
29. กล้องดิจิทัล ยี่ห้อ Canon รุ่น EOS 700D
30. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ รุ่น z61-sz51 ยี่ห้อ Olympus
31. Micropipette ยี่ห้อ CAPP, Denmark
32. เครื่อง Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy รุ่น Nicolet 5700 FT-IR spectrometer
33. เครื่อง Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) รุ่น Bruker AVANCE III 400 WB spectrometer
34. ชุดวิเคราะห์ Thin layer chromatography (TLC)
35. ชุดวัดค่า pH (pH meter)
36. เครื่อง rotary shaker หรือ orbital shaker
37. เครื่อง linear shaker รุ่น SSL2 ยี่ห้อ Stuart
38. เครื่อง incubate shaker รุ่น EW-79520-00 ยี่ห้อ Cole-Parmer
39. เครื่อง UV chamber (SW + LW)
40. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น Accuplus i250
41. Cork borer
42. กระดาษ cellophane (กระดาษแก้ว)

### 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA; มันฝรั่ง 200 g น้ำตาลกลูโคส 20 g และวุ้น 17 g)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar (CMA) ยี่ห้อ Himedia, India
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 agar และ V8 broth (น้ำผลไม้รวม V8 วุ้น 17 g สำหรับอาหารแข็ง และ CaCo<sub>3</sub>)
4. สารเคมีกำจัดเชื้อรา Benomyl
5. Pentachloronitrobenzene (PCNB)
6. สารปฏิชีวนะ nystatin ยี่ห้อ TYSTATIN
7. สารปฏิชีวนะ rifampicin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. สารปฏิชีวนะ ampicillin
9. Forward primer ITS6 และ Reverse primer ITS4
10. ชุดสกัด DNA รุ่น GF-1 Fungus DNA Extraction Kit ยี่ห้อ Vivantis, Malaysia
11. Master Mix PCR ยี่ห้อ Vivantis, Malaysia
12. 6X DNA gel loading dye ยี่ห้อ Novel juice Thermo scientific, USA
13. 1 kb DNA ladder ยี่ห้อ GeneRuler Thermo scientific, USA
14. Absolute ethanol 99% ยี่ห้อ Merck, Germany
15. TE buffer 50x
16. Lactophenol
17. ชุดสกัดเบต้ากลูแคน รุ่น K-YBGL ยี่ห้อ Megazyme
18. Ethanol 95%
19. Ethanol 70%
20. Methanol 99% ยี่ห้อ RCI labscan, Ireland
21. Sulfuric acid ยี่ห้อ RCI labscan, Ireland
22. Acetic acid ยี่ห้อ RCI labscan, Ireland
23. Liquid nitrogen
24. Potassium persulfate ยี่ห้อ Loba Chemie, India
25. Ethyl Acetate ยี่ห้อ Merck, Germany
26. Sodium hypochlorite ยี่ห้อ Clorox

### 3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะต้นพืช

1. หลอดไฟ LED สำหรับปลูกต้นไม้ รุ่น VÄXER LED plant light bulb PAR20
2. ฟืทมอสสำหรับปลูกพืช ขนาด 100 L ยี่ห้อ VAN EGMOND
3. กะบะเพาะกล้า
4. กระดาษเพาะ
5. แก้วพลาสติกขนาด 6 oz.
6. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด, มะเขือเทศ และแตงกวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีดำเนินงาน

### 3.2.1 เชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงที่นำมาศึกษา

#### 3.2.1.1 ตัวอย่างและสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง

เชื้อที่นำมาศึกษาประกอบไปด้วยไอโซเลทที่แยกใหม่จากแหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำทะเล และพื้นที่ป่าไม้ ร่วมกับไอโซเลทที่แยกและจัดจำแนกไว้แล้วจำนวน 11 ไอโซเลทจากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเก็บรวบรวมโดย Saelee et al. (2022)

##### 3.2.1.1.1 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำจืด

เก็บตัวอย่างดิน และน้ำ บริเวณแม่น้ำนครนายก ต.บางอ้อ อ.บ้านนา จ.นครนายก และแม่น้ำแควน้อย ต.ท่าเสา อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี บันทึกวันที่ และบริเวณที่เก็บไว้ที่ภาชนะ

เก็บตัวอย่างบริเวณน้ำตก โดยเก็บตัวอย่างเรียงจากชั้นสูงสุดไล่ลงมาถึงชั้นล่างโดยให้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนิ่ง น้ำไหล และเศษซากใบพืชที่ขึ้นหรือสัมผัสน้ำในบริเวณ วนอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครนายก อุทยานแห่งชาติเอราวัณ และอุทยานแห่งชาติไทรโยค จ.กาญจนบุรี บันทึกวันที่และบริเวณที่เก็บไว้ที่ภาชนะ

##### 3.2.1.1.2 ตัวอย่างจากพื้นที่ป่าไม้

เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกไม่เกิน 15 cm โดยเลือกดินที่มีลักษณะร่วน (Loam) ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครนายก อุทยานแห่งชาติเอราวัณ และอุทยานแห่งชาติไทรโยค จ.กาญจนบุรี บันทึกวันที่และบริเวณที่เก็บไว้ที่ภาชนะ

##### 3.2.1.1.3 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างพื้นที่ชายฝั่งบริเวณชายฝั่ง โขดหินช่วงน้ำลงและน้ำขึ้น ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังวิทยาเขตชุมพร เขตอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร บันทึกวันที่และบริเวณที่เก็บ

#### 3.2.1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *Pythium* spp.

ตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีเหยื่อล่อ (baiting technique) โดยการเทตัวอย่างน้ำจำนวน 10 ml บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และวางเมล็ดแตงกวาจำนวน 3 เมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย ethanol 70% และ Sodium hypochlorite 10% เป็นเหยื่อล่อทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C สังเกตเมล็ดแตงกวาที่กัล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบเส้นใยที่เกิดขึ้นบนเมล็ดแตงกวา ตัดส่วนของเส้นใยนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) แยกต่อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้ นำมาฝังให้แห้งจากนั้นทำการแยกเชื้อโดยใช้ 2 เทคนิค ดังนี้ soil plate techniques (Masago et al., 1977) โดยการโรยตัวอย่างดินประมาณ 1 g บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

PDA+BNPRA (benomyl 10 ppm, Nystatin 25 ppm, Pentachloronitrobenzene 25 ppm, Rifampicin เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 ppm และ Ampicillin 500 ppm) + rose bengal สังเกตลักษณะของเส้นใยที่เจริญจากตัวอย่างดิน ตัดปลายเส้นใยย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แยกต่อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ soil baiting techniques (Dhingra and Sinclair, 1994) โดยการโรยตัวอย่างดินหรือเศษซากพืชตัวอย่างประมาณ 1 g ลงบนจานเลี้ยงเชื้อหน้ากลั่นให้ท่วมจานประมาณ 10 ml ล่อเชื้อด้วยเมล็ดแตงกวาจำนวน 3 เมล็ดทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C จากนั้นย้ายเมล็ดแตงกวาลงอาหาร PDA+BNPRA+rose bengal สังเกตเมล็ดแตงกวาใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบเส้นใยที่เกิดขึ้นบนเมล็ดแตงกวา ตัดส่วนของเส้นใยนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แยกต่อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

### 3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในข้อ 3.2.1.2 ไปศึกษาโครงสร้างโดยการตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์สังเกตอวัยวะที่ใช้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ด้วยการทำ water culture, grass blade culture และเลี้ยงใน poor media เพื่อดูการสร้าง sporangium และ zoospore

สำหรับวิธีการศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 juice agar (V8A; V8 juice 200 ml CaCO<sub>3</sub> 2 g และวัน 17 g) จากนั้นเขี่ยเส้นใยเชื้อที่เจริญไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูเพื่อลักษณะ antheridia, oogonia และ oospore ตามหลักการจัดจำแนกของ (Plaats-Niterink, 1981)

ลักษณะทั้งหมดที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำการบันทึกภาพโดยใช้ eyepiece wifi camera (MC-500W) และวัดขนาดส่วนขยายพันธุ์โดยโปรแกรม Pixit pro program

### 3.2.1.4 การทดสอบการก่อโรค (Pathogenicity test)

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ โดยนำเชื้อ Pythium แต่ละ isolate มาเลี้ยงในอาหารเหลว V8 juice broth (V8B; V8 juice 200 ml CaCO<sub>3</sub> 2 g ปรับ pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาณให้ได้ 1 L) บ่มเชื้อบน rotary shaker เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการกรองและล้างเส้นใยให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ปั่นเส้นใยและเตรียมสารแขวนลอยเส้นใย (mycelial suspension) ให้ได้ 10<sup>4</sup> propagules/ml ทำการปลูกเชื้อทดสอบโรคทั้งก่อนการงอก (pre-emergence) และหลังการงอก (post-emergence)

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคก่อนการงอก (pre-emergence) ทำการทดลองในเมล็ดพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Complete randomized design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ โดยจะแบ่งพืชทดสอบ 2 กลุ่ม คือพืชใบเลี้ยงคู่ (มะเขือเทศและถั่วเขียว) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (ข้าวโพด) จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุที่เตรียมไว้ด้วยวิธีการจุ่มเมล็ดลงในสารแขวนลอยเส้นใย (mycelial suspension) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมเป็นเมล็ดพืชที่จุ่มด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำเมล็ดมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษเพาะเก็บไว้ในที่มืด เก็บผลทุกวันจนครบ 3 วัน เก็บข้อมูลจำนวนเมล็ดที่เป็นโรคเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคลงหลังการงอก (post-emergence) ทำการทดลองในต้นกล้า วางแผนการทดลองแบบ Complete randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยจะแบ่งพืชทดสอบ 2 กลุ่ม คือพืชใบเลี้ยงคู่ (มะเขือเทศและถั่วเขียว) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (ข้าวโพด) จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุที่เตรียมไว้ด้วยวิธีการทาสารแขวนลอยเส้นใย (mycelial suspension) ลงบริเวณ โคนต้นต้นละ 1 ml โดยมีชุดควบคุมเป็นต้นพืชที่เทด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว จากนั้นเก็บผลทุกวันจนครบ 7 วันเก็บข้อมูลจำนวนต้นที่เป็นโรคเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค

$$\% \text{ การเกิดโรค (disease incidence) } = \left\{ \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \right\} \times 100$$

$$\% \text{ ความรุนแรงของโรค (disease severity) } = \left\{ \frac{\text{ระดับความรุนแรงของโรค} \times \text{จำนวนต้นที่เป็นโรค}}{\text{ระดับความรุนแรงสูงสุด} \times \text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \right\} \times 100$$

โดยระดับความรุนแรงของโรคจะแบ่งดังนี้

ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการโรค

ระดับ 1 = รากจำนวนน้อยลงมีอาการเน่าหรือช้ำเพียงเล็กน้อย (1-25%)

ระดับ 2 = รากและโคนต้นเกิดอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล (26-50%)

ระดับ 3 = เกิดอาการเน่าลุกลามบริเวณรากและโคนต้นอย่างชัดเจน (50-75%)

ระดับ 4 = รากและต้นเกิดอาการเน่าทั้งระบบใบและต้นเป็นสีเขียวเหลือง-น้ำตาล (76-100%)

ระดับ 5 = ตันตาย

$$\text{ดัชนีความรุนแรงของโรค (disease severity index) } = \frac{(\% \text{ ความรุนแรงของโรค})}{(\% \text{ ความรุนแรงของโรคทั้งหมด})}$$

เก็บผลข้อมูลการเกิดโรคทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) หรือสปิซิสที่ก่อโรคได้ต่ำ (hypovirulent strain) โดยการคัดเลือกสปิซิสที่มีดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่า 20

### 3.2.1.5 การจัดจำแนกโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

#### 3.2.1.5.1 การเตรียมเชื้อ

นำตัวอย่างเชื้อ Non-pathogenic และ hypovirulent stain ที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.1.4 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

ตัดกระดาษ cellophane (กระดาษแก้ว) เป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 mm หนึ่งแผ่นเช็ดด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นอบให้แห้งแล้วนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ Cork borer ตัดปลายเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างเชื้อ Non-pathogenic และ hypovirulent stain ที่เลี้ยงก่อนหน้านั้นมาวางบนกระดาษแก้ว ปิดฝาป่มเป็นเวลา 7 วันที่ยูณหภูมิห้อง

#### 3.2.1.5.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการชูดเส้นใยเชื้อตัวอย่างจากข้อ 3.2.1.5.1 ประมาณ 30 mg ใส่ Microcentrifuge tube จากนั้นใส่ Buffer FuL (Lysis buffer) 280 ul จากนั้นผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vortex เป็นเวลา 30 วินาที เติม Proteinase K 20 ul ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับหลอดไปมา จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที ใน water bath โดยนำออกมาผสมทุกๆ 5 นาทีระหว่างการ incubation โดยวิธีการดีดให้หลอดเกิดฟองอากาศ จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบสูงสุด (centrifuge 14,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสเหนือตะกอน (suspension) ลงในหลอด Microcentrifuge tube เติม Buffer FuB 600 ul จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม absolute ethanol 200 ul ย้ายตัวอย่างโดยการดูดตัวอย่างประมาณ 600 ul ไปที่ column ที่ประกอบด้วย clean collection tube จากนั้น Centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งน้ำด้านล่างใน collection tube (หากตัวอย่างยังคงเหลือค้างในหลอดให้ทำการดูดตัวอย่างให้หมดใส่ใน column) ล้าง Column ด้วย Wash buffer 650 ul จากนั้น Centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งน้ำด้านล่างใน collection tub (ล้าง DNA ด้วย Wash buffer 2 ครั้ง) จากนั้น Centrifuge Column ที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด Ethanol ที่ตกค้างออก วาง Column ลงในหลอด Microcentrifuge tube ที่สะอาดจากนั้นเติม Elution buffer 50 ul ลงใน column membrane โดยตรงแล้วทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้น Centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้าง DNA ให้ลงไป Microcentrifuge tube และเก็บ DNA stock ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -20 °C (ขั้นตอนทั้งหมดดำเนินการตาม Protocol GF-1 Fungus DNA Extraction Kit, Vivantis Malaysia)

#### 3.2.1.5.3 การตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ DNA

##### 3.2.1.5.3.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ spectrophotometer

นำ DNA ที่ได้มาวัดค่า Optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Eppendorf, USA) ตั้งค่าเครื่องเป็น DNA เลือก dsDNA ตั้งค่าเป็น dilution (sample 2 ul + 98 ul, Blank 100 ul โดยก่อน dilution ให้นำ DNA ที่สกัดได้ spin down เพื่อให้ DNA มารวมกันที่ปลายหลอด จากนั้นดูด DNA 2 ul ลงใน cuvette จากนั้นเติมน้ำกลั่น 98 ul ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเพื่อผสมตัวอย่าง) จากนั้นนำใส่เครื่องที่ตั้งค่าไว้แล้วก่อนหน้านี้

### 3.2.1.5.2 การตรวจสอบคุณภาพและขนาด DNA โดยการให้ gel-electrophoresis

ละลาย agarose gel จำนวน 0.25 g ใน TAE buffer (0.5% agarose gel) ด้วยไมโครเวฟ เเทงลาดพลาสติกแม่แบบเมื่อเจลแข็งตัว จากนั้นนำ DNA 2 ul ผสมกับ gel loading dye (Nobel juice) 2 ul และ DNA leader 2 ul ผสมกับ gel loading dye ขนาด 1000 base pair (Nobel juice) 2 ul ทำการโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงในเจล ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 v เป็นเวลาทั้งหมด 40 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ส่องดู DNA ได้แสง ultraviolet และเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ DNA leader

### 3.2.1.5.3 การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR 1 ขบวนการประกอบด้วย DNA template สกัดได้ก่อนหน้านี้ 2 ul, DNA Master Mix PCR (Vivantis, Malaysia) 25 ul, universal primer ITS6 forward (5' GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG 3') 1 ul, universal primer ITS4 reward (ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') 1 ul (Hung et al., 2015) และใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 21 ul เพื่อปรับให้ได้ 25 ul จากนั้นนำใส่ในเครื่อง Thermal cycle โดยมีสภาวะในกระบวนการ PCR ดังนี้ (Cooke et al., 2000)

- 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 2 นาที
  - 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 20 วินาที
  - 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C 25 วินาที
  - 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 50 วินาที และทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ
  - 5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 10 นาที
- จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

### 3.2.1.5.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งตัวอย่าง DNA ในข้อ 3.2.1.4 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท U2bio (Bionics Co., Ltd, Seoul, Korea) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (NCBI database) โดยวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องมือ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ของ National Center for Biotechnology (NCBI; Bethesda, USA) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เสร็จ จึงนำข้อมูลของชื่อที่ได้เข้าสู่ฐานข้อมูล Genbank (NCBI database) ต่อไป

### 3.2.1.6 การทำแผนภูมิวิวัฒนาการ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้รับการตรวจสอบและแก้ไขโดยใช้โปรแกรม Finch TV 1.4 sequence analysis software (<https://finchtv.software.informer.com/1.4/>) (โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ใกล้เคียงจาก NCBI) จากนั้นไฟล์ DNA Sequence FASTA ถูกรวบรวมเป็น Contiguous DNA Sequence โดยใช้โปรแกรม BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการแก้ไขและรวบรวมถูกนำมาสร้างลำดับแผนภูมิวิวัฒนาการขึ้นโดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software (<https://www.megasoftware.net/>) เปรียบเทียบกับ *Pythium* spp. ใน clade ต่างๆ เป็น ingroup และมี *Aphanomyces salsuginosus* (Oomycetes, Saproleginales) เป็น outgroup โดยใช้อัลกอริทึม neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) เป็นหลัก ประกอบกับอัลกอริทึม Maximum-likelihood (Felsenstein, 1985) และ maximum-parsimony (Kluge and Farris, 1969) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่าง และใช้โมเดลของ Jukes และ Cantor (Jukes and Cantor, 1969) สำหรับการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ความน่าเชื่อถือของโครงสร้างแผนภูมิจะถูกประเมินโดยใช้การวิเคราะห์ค่า bootstrap ที่ 1,000 ซ้ำ (Felsenstein, 1985)

## 3.2.2. การศึกษาปริมาณและชนิดของเบต้ากลูแคน

### 3.2.2.1 ปริมาณเบต้ากลูแคน

นำเชื้อที่ได้รับการคัดเลือกในขั้นตอนก่อนหน้านี้มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 juice broth เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเส้นใยและทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C เพื่อให้ได้น้ำหนักเส้นใยที่คงที่ ทำการบดที่ก้าน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งที่ปลอดเชื้อ ตรวจสอบปริมาณกลูแคนด้วยชุดตรวจสอบ Megazyme® assay แล้วนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 nm จากนั้นวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเบต้ากลูแคนโดย Mega-Calc Data calculator ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (McCleary and Codd, 1991)

### 3.2.2.2 สารประกอบและชนิดของเบต้ากลูแคน

#### 3.2.2.2.1 การสกัดเบต้ากลูแคน

วิธีสกัดประยุกต์ใช้จากการสกัดยีสต์โดยการนำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1 ประกอบด้วย *P. catenulatum*, *P. acanthicum*, *P. cucurbitacearum*, *P. helicoides*, *P. diclinum*, *P. vexans*, *P. torulosum*, *P. splendens*, *P. aphanidermatum*, *P. delicense*, *P. longipapillum* จำนวน 11 isolate และ isolate ที่แยกได้ใหม่ในกลุ่ม Non-pathogenic และ hypovirulent stain เลี้ยงในอาหารเหลว V8B เป็นเวลา 14 วัน จึงนำเส้นใยมากรองด้วยกระดาษกรอง ล้างให้สะอาดและปรับปริมาตรเส้นใยเป็น 15% w/w ด้วยน้ำกลั่น (ตัวอย่าง 15 g ในน้ำกลั่น 100 ml) เติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 3% ของปริมาณเส้นใย เพื่อชักนำให้เกิดการ autolysis แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มด้วย orbital shaker ที่อุณหภูมิ 55 °C 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไป centrifuge ที่ 4,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนตะกอนไว้ เส้นใยที่ผ่านการ autolysis นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 10% w/w ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 M pH 7.5 นำมาให้ความร้อนโดยการ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแมนโนโปรตีนและสารตกค้าง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเส้นใยที่ล้างน้ำก่อนหน้านี้นำมาปรับปริมาตรเป็น 15% w/w แล้วปั่นเพื่อทำลายผนังเซลล์และ centrifuge ที่ 4,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทน้ำออกและเติมน้ำกลั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบสูงสุดจนกว่า supernatant ที่ได้จะใส นำตะกอนที่ได้มาแขวนลอยในตัวทำละลายไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:4 w/v (ตัวอย่าง 1 ส่วนตัวทำละลาย 4 ส่วน) และให้ความร้อนภายใต้การ Reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อดีงไขมันออกทำให้เบต้ากลูแคนมีความบริสุทธิ์ จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้ว centrifuge ที่ 4,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทตัวทำละลายออกและล้างด้วย Acetone อัตราส่วน 1:1 w/v 3 ครั้งเพื่อดีงไขมันมีขี้ขี้ที่เหลือนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 15% w/w เติมโปรตีนเอส อัตราส่วน 20 mg/g เพื่อกำจัดแมนโนโปรตีนคอมเพล็กซ์ให้คงเหลือแต่เบต้ากลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจาก enzymatic hydrolysis ให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น centrifuge ที่ 4,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างหลายๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่นเย็นจนกว่า supernatant จะใสไม่มีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ผสมอยู่เบต้ากลูแคนที่ได้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C ตามวิธีที่ได้รายงานไว้ของ Tondolo et al. (2017)

### 3.2.2.2.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของสารสกัด

#### 3.2.2.2.2.1 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

นำเบต้ากลูแคนที่ได้มาทำการ lyophilized และทำให้เป็นผงด้วยโรงแข็งเย็นปลอดเชื้อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy บันทึกโดย Nicolet 5700 FT-IR spectrometer ความถี่ 4,000-400  $\text{cm}^{-1}$  ณ ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการอ่านผลและวิเคราะห์ผล

#### 3.2.2.2.2.2 วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

นำเบต้ากลูแคนที่ได้มาทำการ lyophilized และทำให้เป็นผงด้วยโรงแข็งเย็นปลอดเชื้อ จากนั้นเบต้ากลูแคนปริมาณ 5 mg ผสม trifluoroethanoic acid ความเข้มข้น 2M ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารตกค้างที่ได้นำมาละลายด้วย D<sub>2</sub>O ปริมาตร 0.5 ml ที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์โครงสร้าง

ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy บันทึกโดย Bruker AVANCE เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

III 400 WB spectrometer ความถี่ 100.62 MHz ณ ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการอ่านผลและวิเคราะห์ผล

### 3.2.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเส้นใยที่มีเบต้ากลูแคน

นำเชื้อ *Pythium* spp. ในกลุ่ม Non-pathogenic และ hypovirulent stain ซึ่งได้รับการระบุและจัดจำแนกแล้วในข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตเส้นใยที่มีการสะสมเบต้ากลูแคน ดัดแปลงจาก (Zonneveld, 1974) โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x4 Factorial in Complete randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ 1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Non-Synthetic media 3 ชนิดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Cornmeal broth Potato broth และ V8 juice broth ปัจจัยที่ 2 คือการเพิ่มความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคสที่ 0 2 4 และ 8% วัดการเจริญเติบโตทางชีวภาพ (biomass) ของแต่ละไอโซเลทจากนั้นเปรียบเทียบเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุด

### 3.2.4 การศึกษาคคุณสมบัติของเบต้ากลูแคน

#### 3.2.4.1 คุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors)

ตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors) ในการชักนำให้เกิดความต้านทานของพืชโดยการแสดงออกของ Scopoletin (Scp) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Phytoalexin ในกลุ่ม Coumarins ที่สะสมและกระจายอยู่ในพืชชนิดต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นทางเคมีหรือทางชีวภาพ รวมไปถึงความเป็นพิษในการต้านเชื้อราและจุลชีพ โดยสามารถเรืองแสงได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Stringlis et al., 2019; Gnonlonfin et al., 2012)

##### 3.2.4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเบต้ากลูแคนที่ได้ มาระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) จากนั้นบดด้วยโกร่งแช่เย็นและนำไปปรับให้ได้ความเข้มข้น 5 mg/ml เตรียมเชื้อก่อโรค *Phytophthora palmivora* โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำส่วนของเส้นใยมากรอง และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นบดและปรับปริมาตรให้ได้  $5 \times 10^8$  propagules/ml นำสารและเชื้อที่ได้ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าทุเรียนอายุ 8 เดือน (ความสูง 50 cm) โดยวิธีการแทรกซึม (infiltration) ลงบนใบอ่อนที่ปริมาตร 50 ul (ดัดแปลงจาก Klarzynski et al., 2000) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปที่ปลูกเชื้อมาบดด้วยโกร่ง ตะกอนที่ได้นำมาละลายโดยการผสม methanol 1 ml โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือเชื้อก่อโรคทุเรียน *Phytophthora palmivora* (positive control) และน้ำกลั่น (negative control)

##### 3.2.4.1.2 การตรวจสอบสโคโปเลติน (Scopoletin)

ดำเนินการด้วย Thin layer chromatography (TLC) บนซิลิกาเจล 60 F<sub>254</sub> (Merck Co., Ltd.) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการทดสอบเปรียบเทียบกัน 3 ชนิด คือ ethyl acetate: methanol: น้ำ ratio 100: 16.5: 13.5 (v/v) (Giesemann et al., 1986)

12% acetic acid (Tongon and Soyong, 2012) และ methanol:น้ำ ratio 9:1 (v/v) (Cojocar et al., 2012) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2010) จากนั้นคัดเลือกตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด นำมาตรวจสอบภายใต้ UV 365 nm ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer การตรวจสอบการแสดงออกของสโคโปเลติน (scopoletin) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน scopoletin (Sigma Co., Ltd.) (Tongon and Soyong, 2012) โดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

### 3.2.4.2 คุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

#### 3.2.4.2.1 การเตรียมสาร

นำเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากข้อ 3.2.2.2.1 ที่ความเข้มข้น 1-10 mg/ml มาละลายใน methanol 95% บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายใน methanol เทสารใส่แผ่นกระดาษกรองมาตรฐาน Whatman® เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จากนั้นซับด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อระเหย methanol

#### 3.2.4.2.2 การเตรียมเชื้อและการทดสอบ

ทำการทดสอบโดยวิธี Agar disk diffusion test กับเชื้อก่อโรค 6 ชนิด ได้แก่ *Pythium splendens*, *Pythium vexans*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas oryzae*, *Ralstonia solanacearum* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการทดสอบกับเชื้อราจะใช้ Cork borer เจาะที่ปลายเส้นใยและวางลงบนอาหาร PDA จากนั้นวางแผ่นกระดาษกรองชุบสารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.2.1 รอบเชื้อที่ทดสอบบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C เปรียบเทียบกับชุดควบคุมกระดาษกรองชุบ Ampicillin ความเข้มข้น 500 mg/ml (positive control) และกระดาษกรองชุบ methanol (negative control) การทดสอบในเชื้อแบคทีเรียและยีสต์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วรับปริมาตรให้ได้ค่า Optical density (OD) เท่ากับ 1.2 ที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นเทลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ปริมาตร 100 ul แล้วใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (cotton swab) สตรีกบนหน้าอาหารจนกว่าจะแห้ง (Streak plate technique) วางแผ่นกระดาษกรองชุบสารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.2.1 ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการใส่เชื้อและบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C เปรียบเทียบกับชุดควบคุมกระดาษกรองชุบ Ampicillin ความเข้มข้น 500 mg/ml (positive control) และกระดาษกรองชุบ methanol (negative control)

วางแผนการทดลองแบบ Complete randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณโซนใสของการยับยั้ง (clear zone inhibition) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

### 3.2.4.3 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

#### 3.2.4.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิเคราะห์การมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีของ (Khan et al., 2017)

โดยเตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH reagent) 0.1 mM ละลายใน methanol 2 ml (สารละลายเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DPPH เตรียมใหม่ทุกครั้งสำหรับการทดสอบ) จากนั้นเติมลงในสารละลายที่มีการผสมเบต้ากลูแคน ความเข้มข้นต่างกัน (1-10 mg/ 1 ml ) 2 ml นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้เครื่อง UV-vis Spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (positive control) อัตราการกำจัดอนุมูล DPPH ของตัวอย่างคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{DPPH Inhibition\%} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  = การดูดซับคลื่นแสง DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง

$A_{\text{sample}}$  = การดูดซับคลื่นแสง DPPH ที่มีตัวอย่าง

% Inhibition = ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาสร้างกราฟและคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ =inhibitory concentration at 50%)

3.2.4.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ตามวิธีของ (Khan et al., 2017) โดยเตรียมสารละลาย ABTS<sup>+</sup> โดยผสมระหว่างสาร ABTS 7.4 mM และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ( $K_2S_2O_8$ ) 2.6 mM ในอัตราส่วนเท่ากัน (1:1) ผสมทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเพื่อให้สารทำปฏิกิริยาจนได้อนุมูลอิสระที่มีประจุบวกเป็นสารละลายสีเขียวเข้ม (ABTS<sup>+</sup>) จากนั้นนำมาเจือจางด้วยการผสมสารละลาย ABTS<sup>+</sup> 1 ml กับ methanol 60 ml ปรับปริมาตรโดยใช้ methanol เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น  $1.170 \pm 0.02$  unit ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้เครื่อง UV-vis Spectrophotometer (สารละลาย ABTS<sup>+</sup> เตรียมใหม่ทุกครั้งสำหรับการทดสอบ) เตรียมตัวอย่างเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่างกัน (1-10 mg/ 2 ml) ผสมสาร ABTS<sup>+</sup> ปริมาตร 2 ml แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เปรียบเทียบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (positive control) อัตราการกำจัดอนุมูล ABTS<sup>+</sup> ของตัวอย่างคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ABTS inhibition\%} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  = การดูดซับคลื่นแสง ABTS<sup>+</sup> ที่ไม่มีตัวอย่าง

$A_{\text{sample}}$  = การดูดซับคลื่นแสง ABTS<sup>+</sup> ที่มีตัวอย่าง

% Inhibition = ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาสร้างกราฟ และคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ =inhibitory concentration ที่ 50%)

### 3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผลการทดลองให้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p <$

0.05) โดยใช้โปรแกรม R statistics

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 เชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงที่นำมาศึกษา

##### 4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเบื้องต้น

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ระบุไว้โดย van der Plaats-Niterink's key (Plaats-Niterink, 1981) ได้เชื้อในสกุลดังกล่าวจำนวน 39 ไอโซเลท จาก 2 พื้นที่ คือ จังหวัดกาญจนบุรี ได้จากดินจำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ KS-1-KS-18 จังหวัดนครนายกจำนวน 21 ไอโซเลท ได้จากดินจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ NS1-4, NS-8-NS-11, NS-20-NS-21 จากเศษซากพืชและน้ำจำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ NL-5-NL-7 และ NL-12-NL-19 เชื้อที่ได้ทั้งหมดพบว่าเส้นใยมีสีขาว มีการเจริญเติบโตเต็มที่บนอาหาร V8A, PDA และ CMA อยู่ที่ 2-4 วัน สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีได้เป็น 3 แบบ คือ chrysanthemum, cottony และ rosette (ตารางที่ 4.1)

โดยไอโซเลท KS-1-KS-7, KS-9-KS-13, KS-15, KS-16, NS-1, NS-3, NS-4, NL-7, NS-8-NS-11, NL-13, NL-14, NL-16, NL-18, NL-19, NS-20 และ NS-21 พบส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ; ไอโซเลทที่ KS-8, KS-14, NS-2, NL-6, NL12 และ NL-15 พบเฉพาะส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (sporangium); ไอโซเลท KS-17, KS-18 และ NL-17 พบเฉพาะส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (oogonium และ oospore); ส่วนไอโซเลท NL-5 ไม่พบส่วนขยายพันธุ์โดย oogonium และ oospore ที่พบส่วนใหญ่จะมีลักษณะกลมและผนังเรียบ ได้แก่ ไอโซเลท KS-18 (ภาพที่ 4.1); NS-1 (ภาพที่ 4.3); KS-9, KS-11 และ NS-20 (ภาพที่ 4.4); KS-1-KS-6 (ภาพที่ 4.5); KS-13, NL-15, NL-16, NL-17 และ NL-18 (ภาพที่ 4.6); ไอโซเลท NS-11 (ภาพที่ 4.8); ไอโซเลท KS-15 และ KS-16 (ภาพที่ 4.10); KS-7 และ KS-12 (ภาพที่ 4.11) NS-3, NS-4 และ NS-9 (ภาพที่ 4.12); NL-19 (ภาพที่ 4.13); KS-10 (ภาพที่ 4.14); NS-21 (ภาพที่ 4.16); NS-10 (ภาพที่ 4.17); NS-2 (ภาพที่ 4.18); NL-7 (ภาพที่ 4.19); NL-13 (ภาพที่ 4.20); NS-8 (ภาพที่ 4.21); มีเพียงไอโซเลท KS-17 ซึ่งพบ oogonium มีลักษณะกลมและผนังมีหนาม (ภาพที่ 4.2) และ sporangium ส่วนใหญ่พบว่า มีลักษณะกลม (globose) หรือค่อนข้างกลม (sub-globose) บางไอโซเลทอาจพบทั้งแบบกลมและทรงรี (ovoid) นอกจากนี้ไอโซเลท KS-15 และ KS-16 พบการสร้าง sporangium แบบเส้นใยโป่งพอง (filamentous และ inflated filamentous) (ภาพที่ 4.10)

โดยเมื่อจัดกลุ่มตามลักษณะของสัณฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลท ประกอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดจำแนกไว้บางส่วน สามารถจัดจำแนกในเบื้องต้นได้ดังนี้

ไอโซเลท KS-18 มีความใกล้เคียงกับ *Globisporangium nunn* (ภาพที่ 4.1)

ไอโซเลท KS-17 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium acanthicum* (ภาพที่ 4.2)

ไอโซเลท NS-1 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium chamaehyphon* (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์อื่นใดเป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท KS-9, KS-11 และ NS-20 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium cucurbitacearum* (ภาพที่ 4.4)

ไอโซเลท KS-1-KS-6 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium* species D37 (ภาพที่ 4.5)

ไอโซเลท KS-13, KS-14, NS-11, NL-15, NL-16, NL-17 และ NL-18 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium helicoides* (ภาพที่ 4.6 – 4.8)

ไอโซเลท NL-6 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium iriomotense* (ภาพที่ 4.9)

ไอโซเลท KS-15 และ KS-16 มีความใกล้เคียงกับ *Pythium torulosum* (ภาพที่ 4.10)

ไอโซเลท KS-7, KS-8, KS-12, NS-3, NS-4, NS-9 และ NL-19 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium vexans* (ภาพที่ 4.11 – 4.13)

ไอโซเลท KS-10, NL-12, NS-21, NS-10, NS-2, NL-7, NL-13 และ NS-8 มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium* species (ภาพที่ 4.14 – 4.21) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ที่แน่นอนได้จากการเปรียบเทียบเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ระบุไว้โดย van der Plaats-Niterink's key (Plaats-Niterink, 1981) แต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากปัจจุบันเชื่อ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. มีการพัฒนาวิวัฒนาการสปีชีส์ มีการค้นพบจำนวนมากขึ้น และการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกันอาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน และถูกระบุเป็นคนละสปีชีส์ได้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย	Sporangia	Oogonia	Oospore	Antheridium
				(um)	(um, กว้าง × ยาว)	(um, กว้าง × ยาว)	(um, กว้าง × ยาว)	
KS-1	4	3	4					
KS-2	4	3	3					
KS-3	3	3	4	(av. 3.6)	Globose sporangium (av. 21.3x21.7) with more than 1 discharge tubes (av. 4.2x6.5) and zoospore (av. 6.8x10.0)	-	Smooth wall and plerotic oospores (av. 23.9x24.1) with thin-walled (av. 1.6)	-
KS-4	4	4	4					
KS-5	4	4	4					
KS-6	4	3	4					
KS-7	4	4	4	(av. 5.2)	Globose sporangium (av. 18.6x18.4) and zoospore (av. 5.9x8.8)	Smooth wall (av. 21.2x21.5)	Aplerotic oospores (av. 17.2x18.9) and thick wall (av. 2.4)	1-3 antheridium /oogonium
KS-8	3	3	4	(av. 2.8)	Globose sporangium (av. 17.2x17.4), a few spores with papilla are rare (av. 4.5x2.6) and zoospore (av. 8.1 × 10.6)	-	-	-

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia	Oogonia	Oospore	Antheridia
					(um, กว้าง × ยาว)	(um, กว้าง × ยาว)	(um, กว้าง × ยาว)	
KS-9	4	4	4	(av. 3.6)	Globose sporangium (av. 19.0x18.2) with zoospore (av. 7.8x9.9)	Smooth wall (av. 15.2x16.4)	Aplerotic oospores (av. 18.7x19.3) and thick wall (av. 1.9)	monoclinous antheridium
KS-10	2	3	3	(av. 4.2)	Globose sporangium (av. 17.2x21.6)	Smooth wall, oogonium (av. 22.0x20.6) and thick-walled (av. 2.6)	plerotic oospores (thinner walls as they become oospore), Smooth wall (av. 19.2x19.0)	1 antheridium /oogonium
KS-11	4	4	4	(av. 3.6)	Globose sporangium (av. 19.0x18.2) with zoospore (av. 7.8x9.9)	Smooth wall (av. 15.2x16.4)	Aplerotic oospores (av. 18.7x19.3) and thick wall (av. 1.9)	hypogynous antheridium
KS-12	4	3	4	(av. 5.2)	Globose sporangium (av. 18.6x18.4) and zoospore (av. 5.9x8.8)	Smooth wall (av. 21.2x21.5)	Aplerotic oospores (av. 17.2x18.9) and thick wall (av. 2.4)	1-3 antheridium /oogonium

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
KS-13	4	3	4	(av. 5.2)	Subglobose and proliferous sporangium (av. 25.5x27.9) with papillae (av. 4.8x4.9) and discharge tubes arising apically (av. 6.5x20.4)	Aplerotic, smooth wall (av. 15.8x15.6)	-	1 antheridium /oogonium winding around the oogonial stalk (av. 3.5x8.0)
KS-14	3	3	3	(av. 3.7)	Big Obovoid sporangium (av. 26.0x32.0) with papilla (3.8x6.1), ellipsoid sporangium (av. 23.0x46.3), globose or subglobose sporangium (av. 27.9x28.2) with discharge tube (av.6.1x16.3)	-	-	-

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลข	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
KS-15	4	4	3	(av. 5.2)	Filamentous and inflated filamentous sporangium	Smooth wall (av. 21.3x21.8)	Alerotic oospores (av. 19.7x19.5) thick wall (av. 2.6)	-
KS-16	4	4	3					
KS-17	3	3	4	(av. 2.9)	-	terminal or intercalary, globose, (av. 19.2x19.8), thin-walled (av. 1.7), projections conical with a blunt tip (av. 2.5x2.6)	-	1 or 2 antheridium /oogonium (av. 5.6x6.6)
KS-18	4	4	4	(av. 3.9)	-	Smooth wall, oogonium (av. 21.9x21.65) and thin- walled (av. 1.8)	-	diclinous antheridium (av. 7.0x8.6)

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
	NS-1	3	3	3	(av. 3.2)	Subglobose or Obovoid, non-papillate sporangia (av. 19.8x27.7) with more than 1 discharge tubes (av. 3.8x12.2)	Smooth wall (av. 24.9x25.3)	Aplerotic oospores (av. 23.0x23.7) thick wall (av. 2.5)
NS-2	3	3	3	-	small globose sporangium	-	-	-
NS-3	3	3	3	(av. 5.2)	Globose sporangium (av. 18.6x18.4) and zoospore (av.5.9x8.8)	Smooth wall (av. 21.2x21.5)	Aplerotic oospores (av. 17.2x18.9) and thick wall (av. 2.4)	1-3 antheridium per oogonium
NS-4	3	3	3	-	-	-	-	-
NL-5	3	3	3	-	-	-	-	-

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	แต่ละชนิด (วัน)			เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
	V8A	PDA	CMA					
NL-6	3	3	3	(av. 6.0)	Globose and non-proliferating sporangia (av. 25.5x24.9)	-	-	-
NL-7	3	3	3	(av. 4.6)	Small globose and non-proliferating sporangia (av.18.6 x21.3)	-	Aplerotic and Smooth wall (av. 18.4x19.0) and thick wall (av. 1.7)	1 antheridium /oogonium
NS-8	3	3	3	(av. 4.1)	Small globose sporangium (av.20.0x20.3) and non-proliferating sporangium	-	Smooth wall, Aplerotic oospores (av. 18.2x19.1) and thick wall (av. 2.9)	1 antheridium /oogonium
NS-9	3	4	4	(av. 5.2)	Globose sporangium (av. 18.6x18.4) and zoospore (av.5.9x8.8)	Smooth wall (av. 21.2x21.5)	Aplerotic oospores (av. 17.2x18.9) and thick wall (av. 2.4)	1-3 antheridium per oogonium

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง x ยาว)	Oogonia (um, กว้าง x ยาว)	Oospore (um, กว้าง x ยาว)	Antheridia
	NS-10	3	3	3	(av. 5.8)	Catenulate globose (av. 18.3x18.4) and non-proliferating sporangia, zoospore (av. 5.8x6.9)	-	Plerotic oospores, Smooth wall (av.15.4x16.6) with thin-walled (av. 1.1)
NS-11	2	3	3	-	Globose sporangium (av.22.8x24.1)	Smooth wall (av. 27.2x29.0) and thick wall (av. 3.2) with elongate antheridium	Aplerotic oospores, Smooth wall (av.28.7x29.3) with thin-walled (av. 2.1)	1 antheridium /oogonium
NL-12	3	3	3	-	Small globose and non-proliferating sporangia (av.17.1x18.6), papilla (av. 5.9x2.5)	-	-	-

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

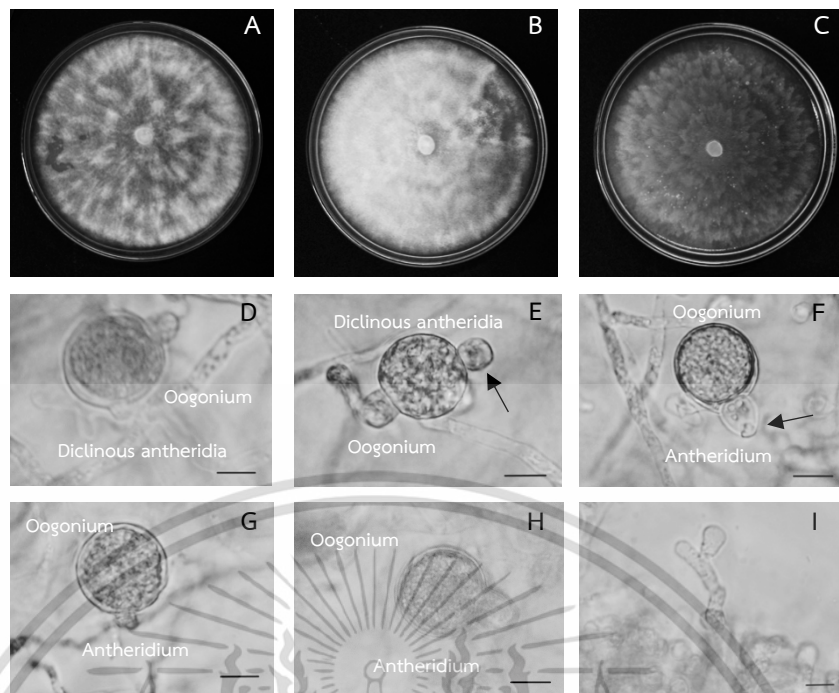
ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
NL-13	2	2	2	(av. 4.1)	Small globose sporangium (av.19.4x20.1) and non- proliferating sporangium	Smooth wall (av. 14.4x14.6) and thick wall (av. 1.6)	-	1 antheridium /oogonium
NL-14	4	3	3	-	Small globose sporangia	-	Aplerotic oospores, Smooth wall	-
NL-15	2	2	2	(av. 5.9)	Catenulate globose sporangium (av. 23.2x25.5)	-	-	-
NL-16	2	2	2	-	Small globose sporangia	-	Plerotic oospores, Smooth wall	-
NL-17	2	2	2	-	-	-	Aplerotic oospores, Smooth wall	-

av. = average

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

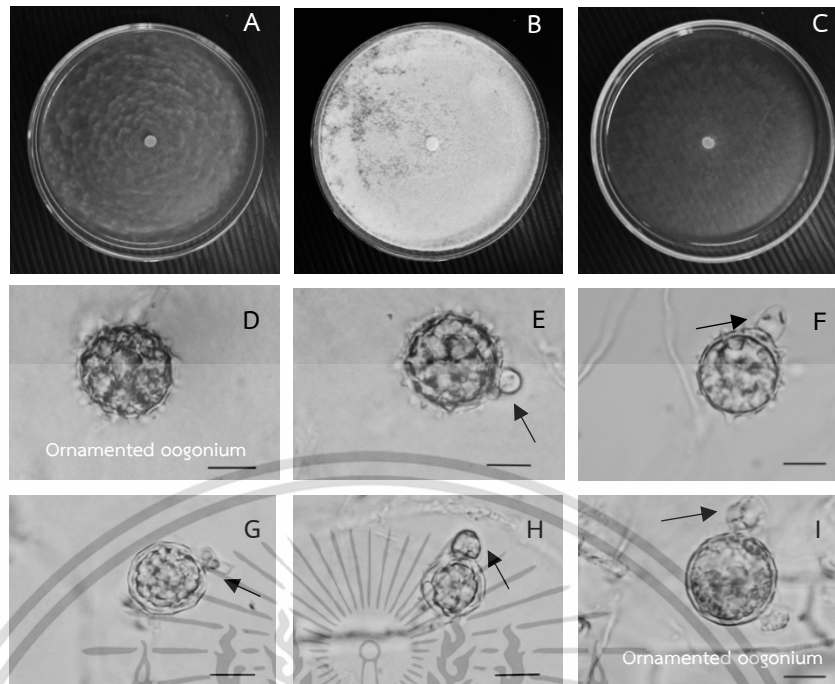
ไอโซเลท	การเจริญของอาหาร แต่ละชนิด (วัน)			โครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่พบ				
	V8A	PDA	CMA	เส้นใย (um)	Sporangia (um, กว้าง × ยาว)	Oogonia (um, กว้าง × ยาว)	Oospore (um, กว้าง × ยาว)	Antheridia
NL-18	2	2	2	(av. 5.2)	Subglobose sporangium, proliferous sporangium (av. 25.5x27.9) with papillae (av. 4.8x4.9) and discharge tubes arising apically (av. 6.5x20.4)	Aplerotic, smooth wall (av. 15.8x15.6)	-	1 antheridium per oogonium winding around the oogonial stalk (av. 3.5x8.0)
NL-19	3	3	3	(av. 5.2)	Globose sporangium (av. 18.6x18.4) and zoospore (av. 5.9x8.8)	Smooth wall (av. 21.2x21.5)	Aplerotic oospores (av. 17.2x18.9) and thick wall (av. 2.4)	1-3 antheridium per oogonium
NS-20	3	3	3	(av. 3.6)	Globose sporangium (av. 19.0x18.2) with zoospore (av. 7.8x9.9)	Smooth wall (av. 15.2x16.4)	Aplerotic oospores (av. 18.7x19.3) and thick wall (av. 1.9)	monoclinous antheridium
NS-21	3	3	3		Small globose sporangia		Aplerotic oospores, Smooth wall	

av. = average



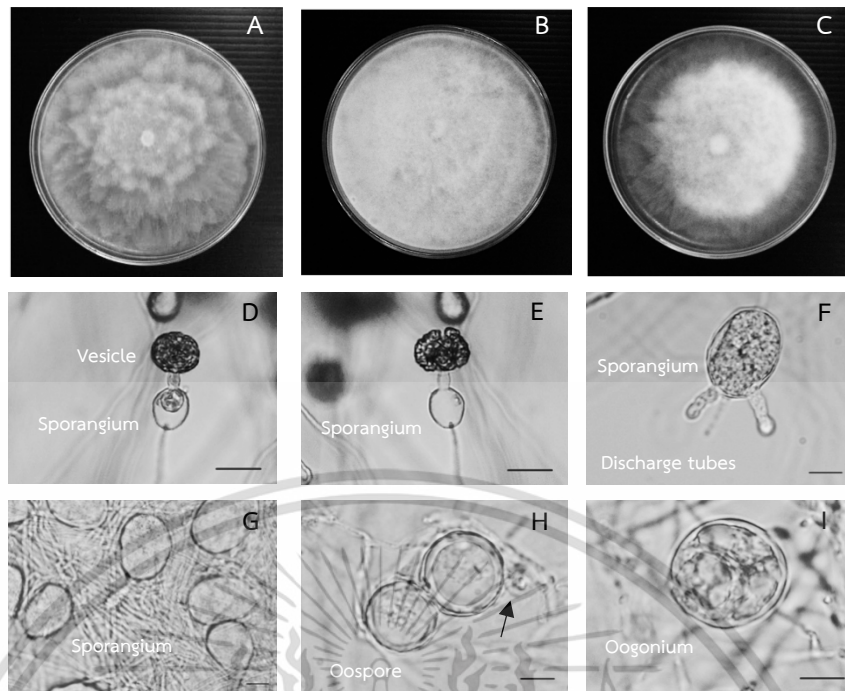
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-18 (*Globisporangium nunn*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน D-H: oogonium และ antheridium (scale bar= 10 μm); I: เส้นใย (scale bar= 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



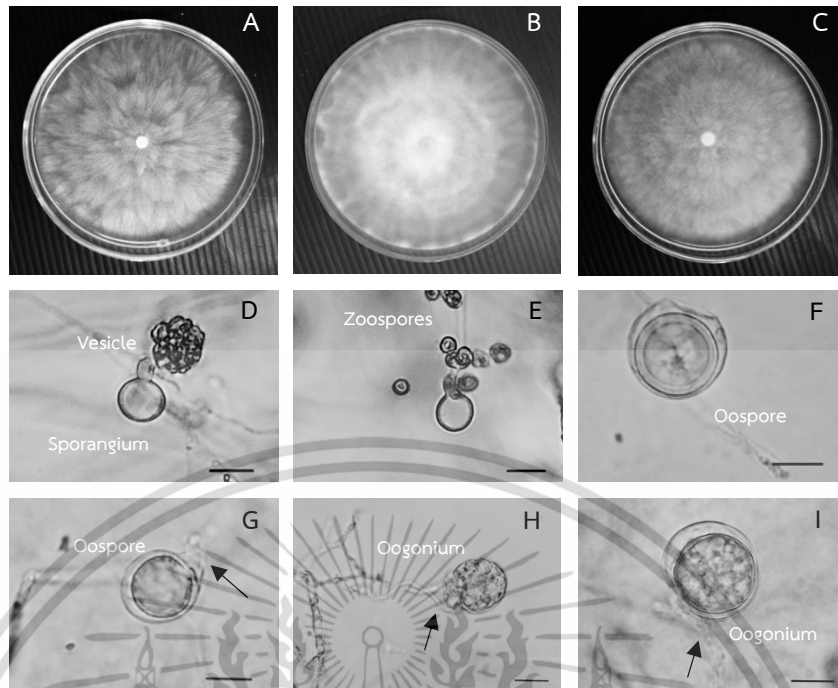
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-17 (*Pythium acanthicum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-I: oogonia และ antheridium (scale bar= 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



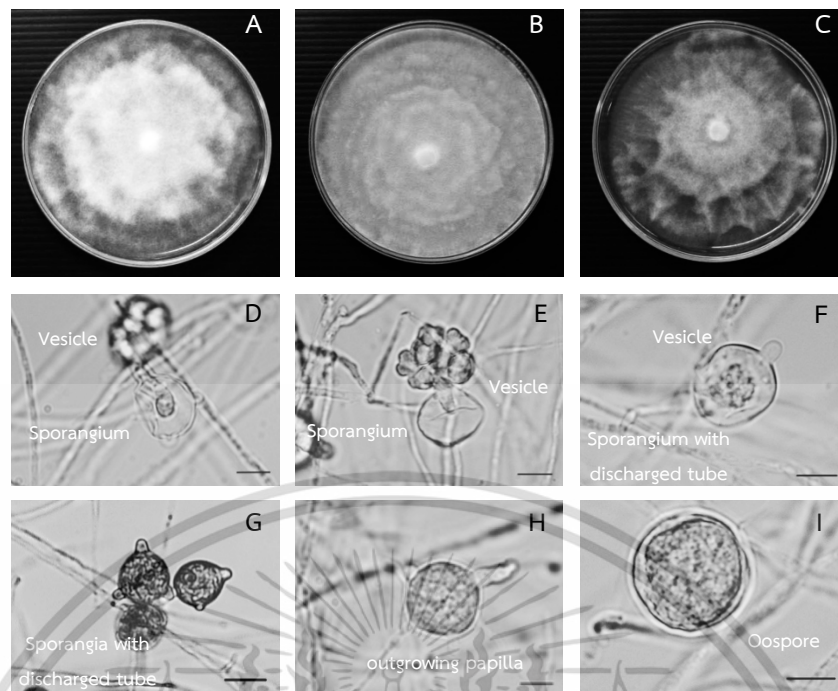
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-1 (*Phytophthora chamaeophyon*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-E: sporangium ที่กำลังสร้าง vesicle (scale bar= 20 μm); F-G: sporangium และ discharge tube (scale bar= 10 μm); H: oospore (scale bar= 10 μm); I: oogonium (scale bar= 10 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



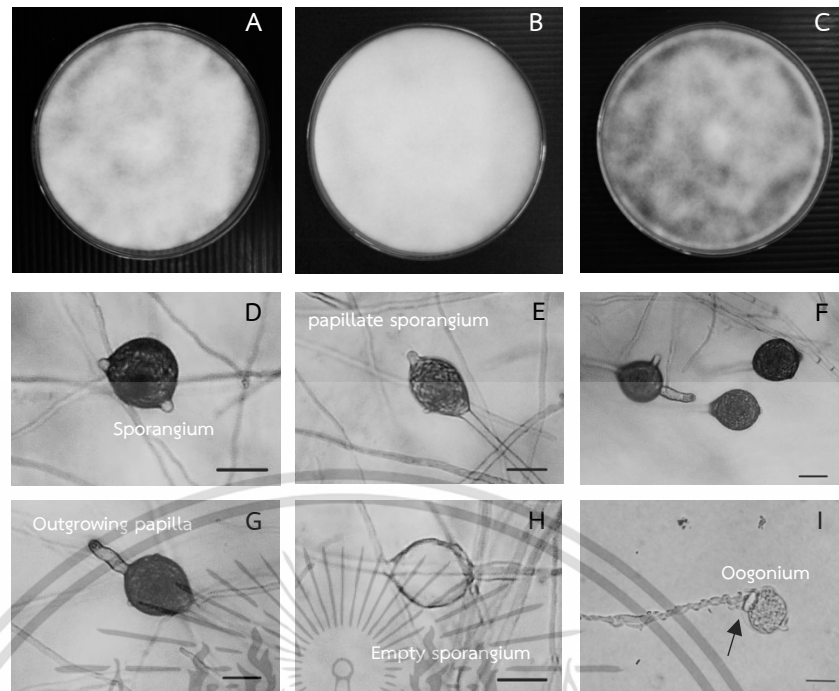
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-9, KS-11 และ NS-20 (*Phytophthora cucurbitacearum*) A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: sporangium ที่กำลังสร้าง vesicle (scale bar= 20 um); E: zoospores ที่ปลดปล่อยจากถุง vesicle (scale bar= 20 um); F-G: oospore (scale bar= 10 um); H-I: oogonium และ antheridium (scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำ แสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



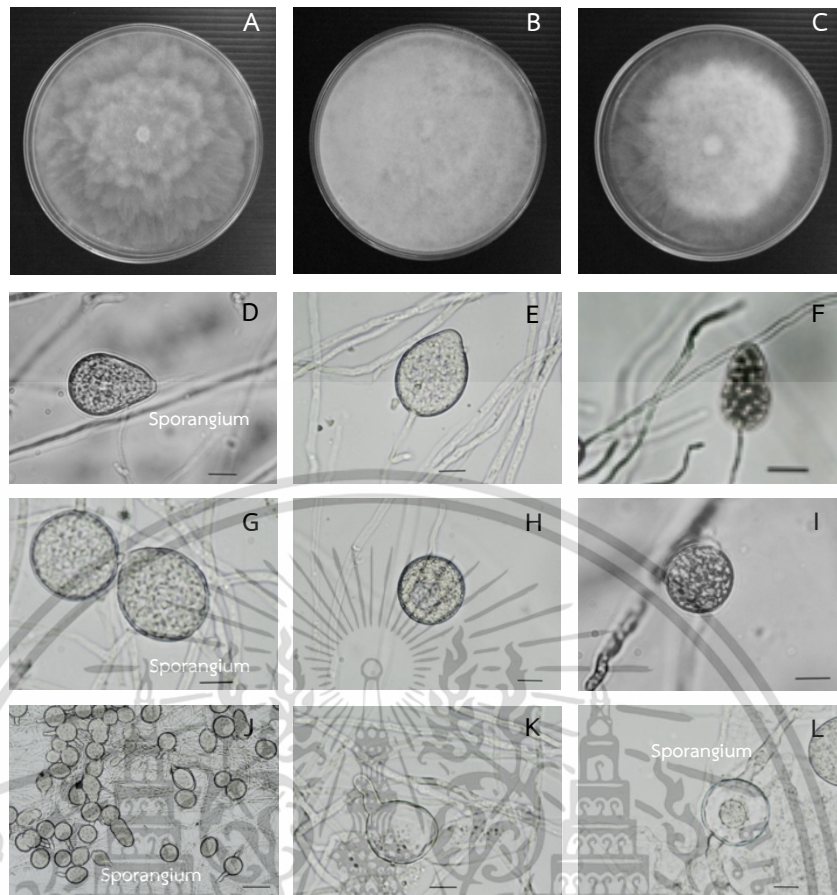
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-1-KS-6 (*Phytophthium* species D37) A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A (A), PDA (B) และ CMA (C) ที่อายุ 6 วัน; D-E: sporangia ที่สร้างจาก vesicle (scale bar= 10 um); F: sporangium และ discharged tube (scale bar= 10 um); G: sporangia และท่อ discharge tube (scale bar= 20 um); H: sporangium และการยึดของ papilla (scale bar= 10 um); I: oospore (scale bar= 10 um)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



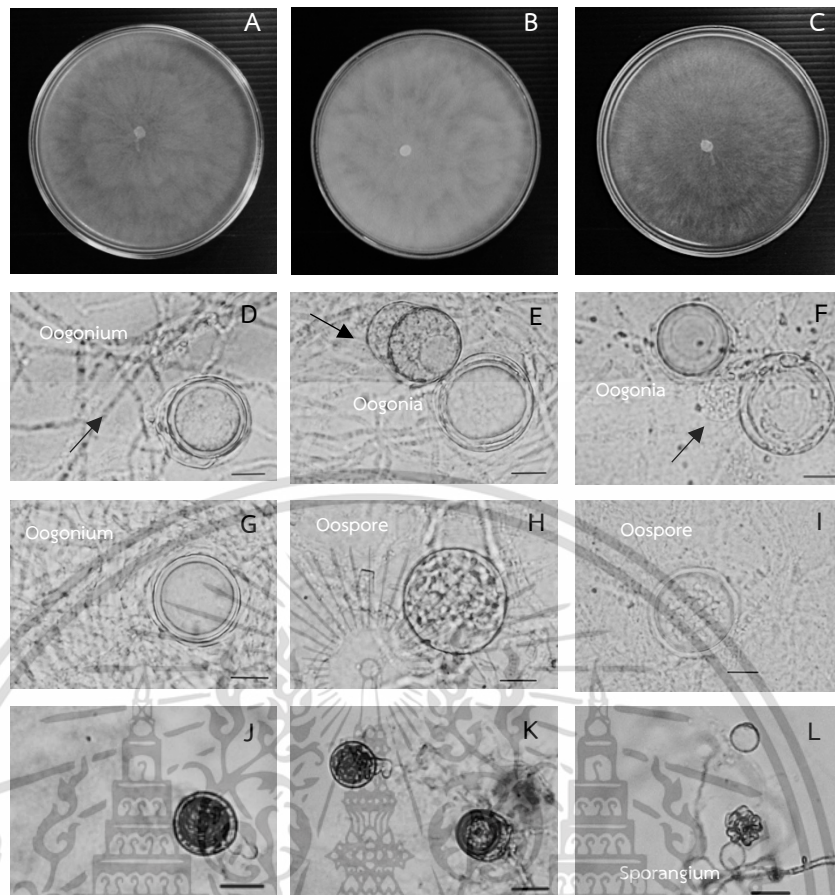
ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-13, NL-15, NL-16, NL-17 และ NL-18 (*Phytophthora helicoides*) A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-E: papillate sporangium (scale bar= 20 μm); F-G: sporangium และการยืดของ papilla (scale bar= 20 μm); H: Empty sporangium (scale bar= 20 μm); I: Antheridium ที่พันรอบก้าน oogonial; ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



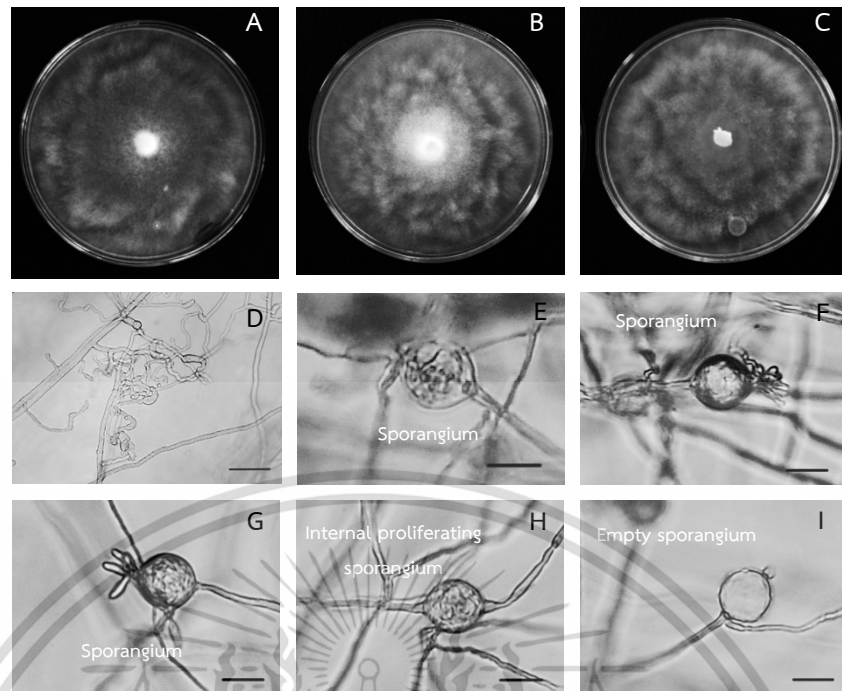
ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-14 (*Phytophthium helicoides*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: sporangium แบบ ovoid (scale bar= 10 um); G-I: sporangium แบบ globose (scale bar= 10 um); J: sporangium กับ discharge tube (scale bar= 20 um); K: ถุง sporangium และ discharge tube (scale bar= 10 um); L: oogonium ก่อตัวในถุง sporangium (scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



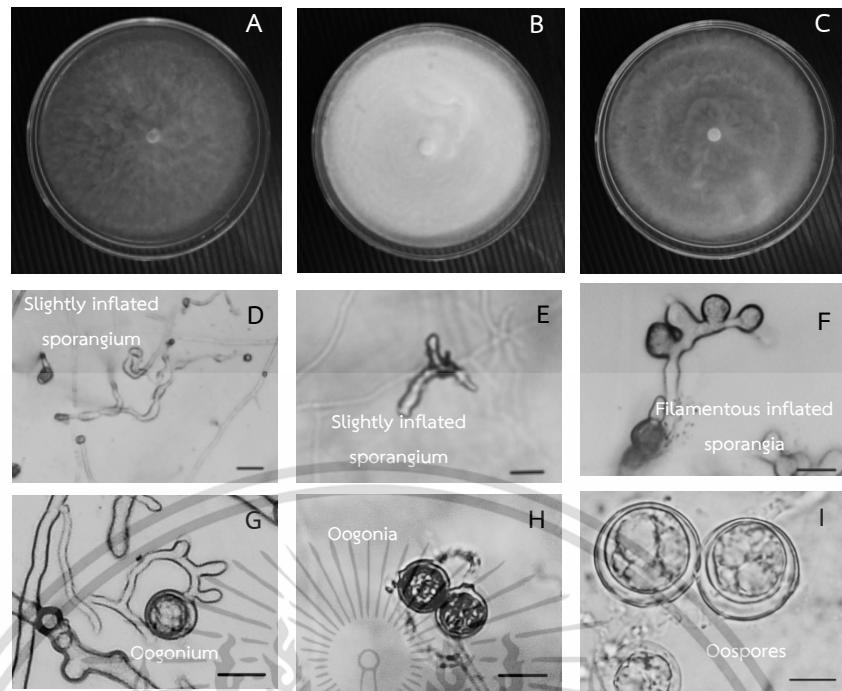
ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-11 (*Phytophthora helicoides*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: oogonium และ cylindrical antheridium (scale bar= 10  $\mu$ m); G-I: oospore (scale bar= 10  $\mu$ m); J-K: oogonia และ antheridium (scale bar= 20  $\mu$ m); L: sporangia กับ vesicle ที่มี zoospore (scale bar= 20  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



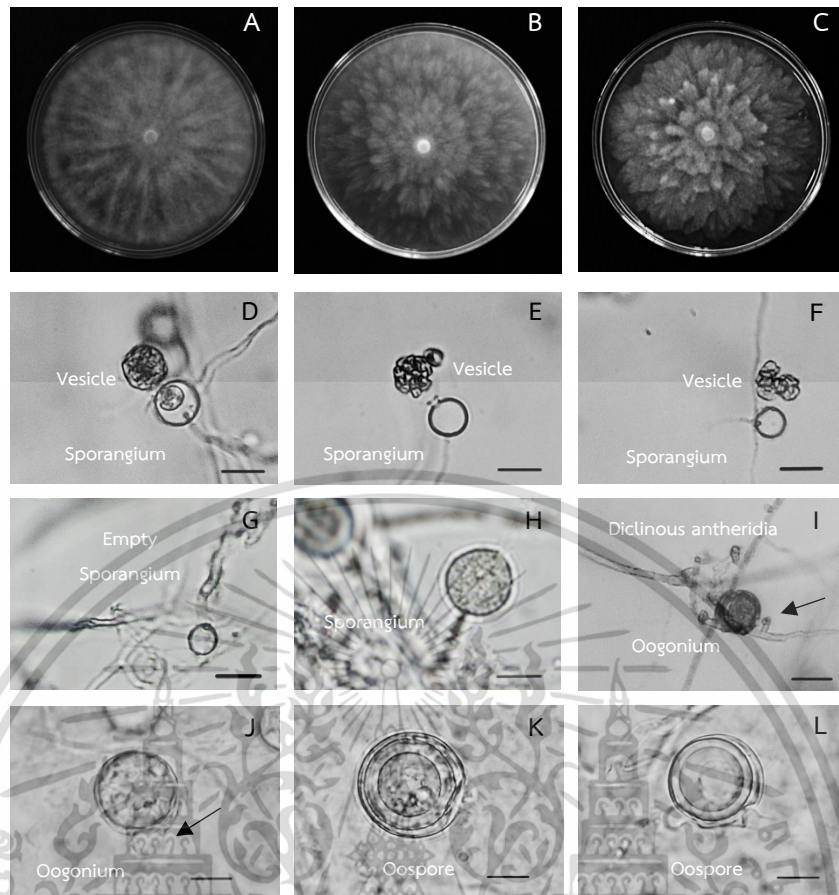
ภาพที่ 4.9 ลักษณะทางสัณฐานของไฮโซเลท NL-6 (*Phytophthora iriomotense*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: แขนงของเส้นใย (scale bar= 20 μm); E: sporangium (scale bar= 20 μm); F: contiguous sporangium (scale bar=20 μm); G: sporangium (scale bar= 20 μm); H: internal proliferating sporangium (scale bar= 20 μm); I: empty sporangium (scale bar= 20 μm); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



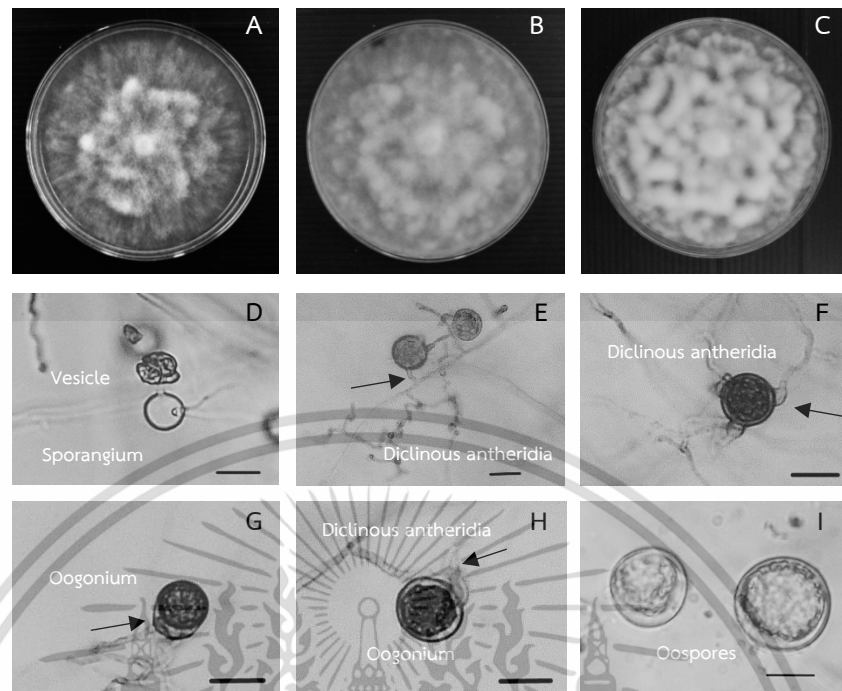
ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานของไฮโซเลท KS-15 และ KS-16 (*Pythium torulosum*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: sporangium แบบ inflated (scale bar= 20 um); G-H: oogonia (scale bar= 20 um); I: oospores (scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



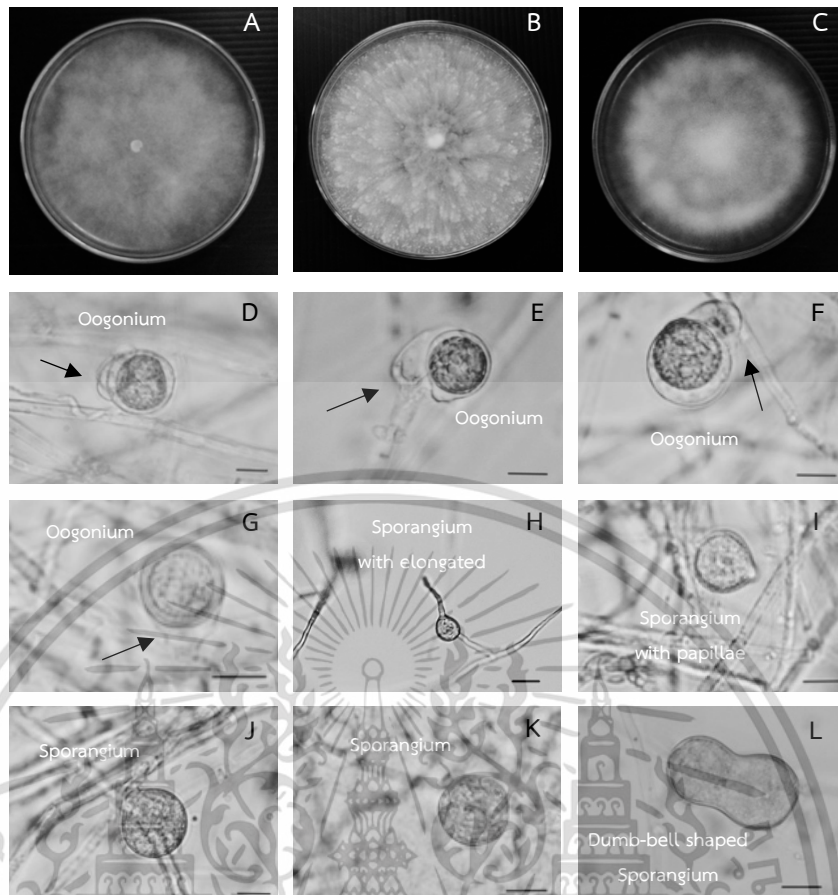
ภาพที่ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-7, KS-8 และ KS-12 (*Phytophthium vexans*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: sporangium ที่กำลังสร้าง vesicle (scale bar= 20 um); E-F: sporangium ที่กำลังปลดปล่อย zoospores (scale bar= 20 um); G: empty sporangium (scale bar= 20 um); H: sporangium (scale bar= 20 um); I: oogonium และ antheridium (scale bar= 10); J: oogonium และ antheridium (scale bar= 20 um); K-L: oospore (scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



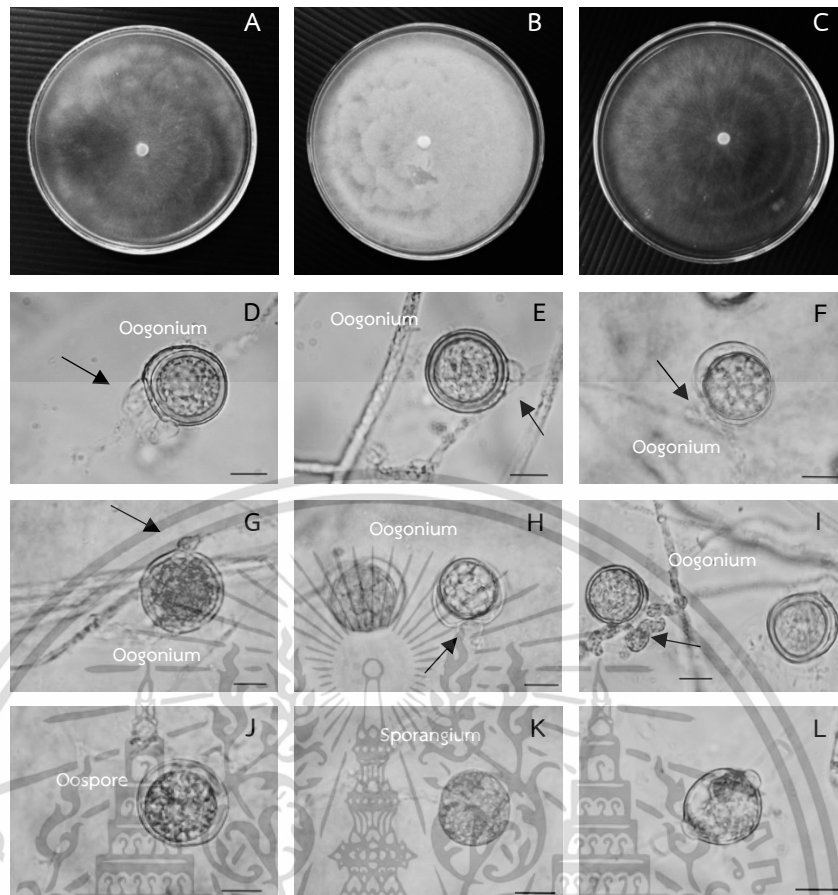
ภาพที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-3, NS-4 และ NS-9 (*Phytophthium vexans*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีนบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: sporangium ที่กำลังปลดปล่อย zoospores (scale bar= 20 um); E-H: oogonium และ antheridium (scale bar= 20 um); I: oospores (scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



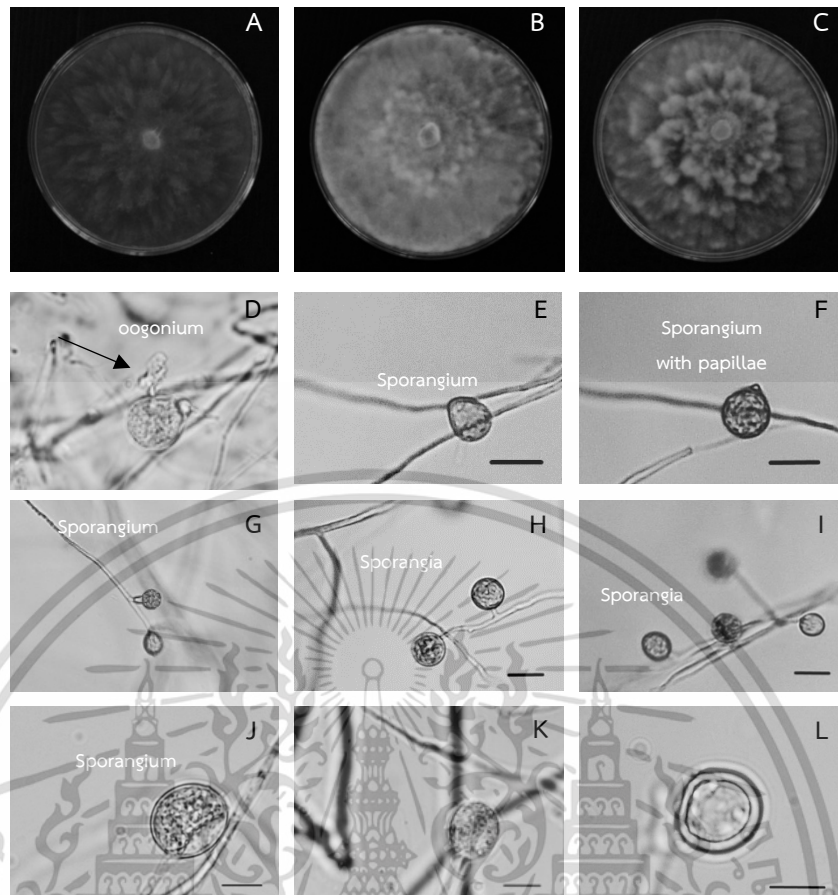
ภาพที่ 4.13 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NL-19 (*Phytophthora vexans*) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-G: oogonium และ antheridium (scale bar= 20  $\mu$ m); H: sporangium (scale bar= 20); J-L: sporangium (scale bar= 10  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



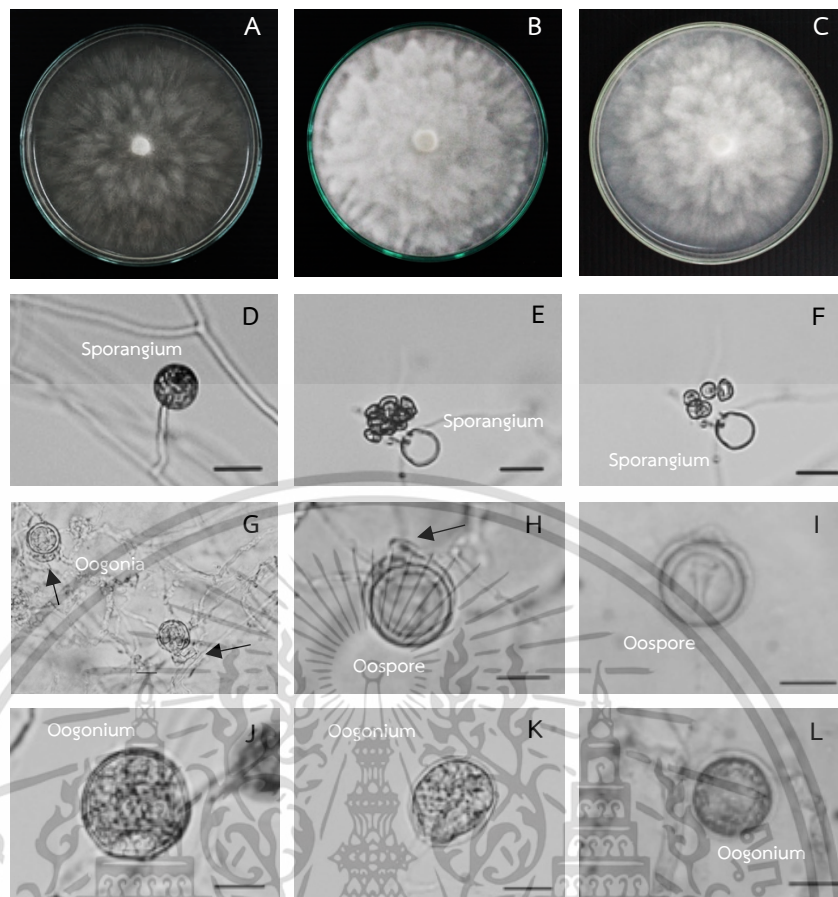
ภาพที่ 4.14 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท KS-10 (*Phytophthium* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-I: oogonium และ hyphogynous antheridium (scale bar= 10 um); J: oospore (scale bar= 10 um); K: sporangium (scale bar= 10 um); L: เส้นใยที่พองบวม ( scale bar= 10 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



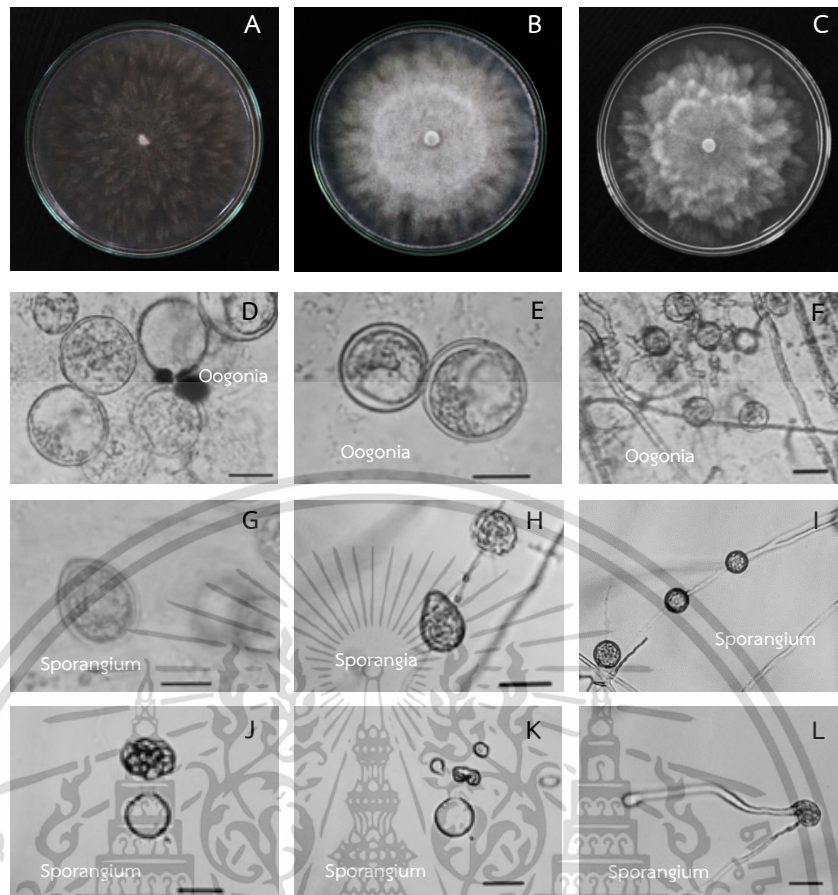
ภาพที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานของไฮโซเลท NL-12 (*Phytophthora* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: oogonium (scale bar= 20  $\mu$ m); E: sporangium แบบ ovoid (scale bar= 20  $\mu$ m); F: sporangium แบบ sub globose มี papillae (scale bar= 20  $\mu$ m); G-I: sporangium แบบ sub globose (scale bar= 20  $\mu$ m); J-L: sporangium แบบ sub globose (scale bar= 10  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



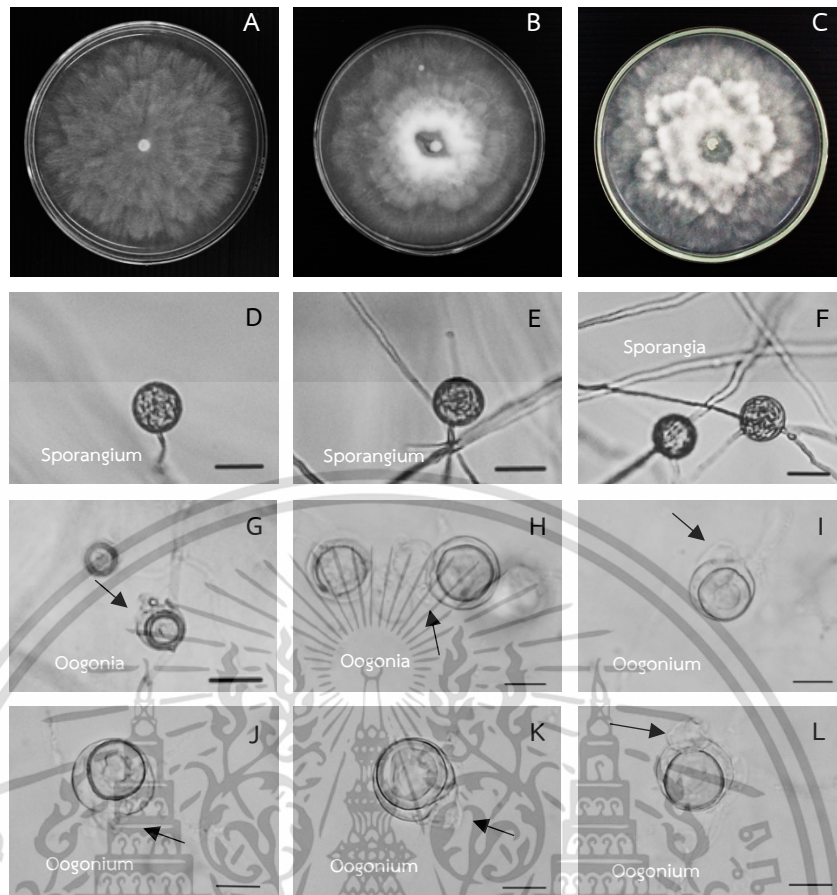
ภาพที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-21 (*Phytophthora* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D: sporangium (scale bar= 20  $\mu$ m); E: sporangium ที่กำลังจะปล่อย zoospore (scale bar= 20  $\mu$ m); F: sporangium ที่กำลังปลดปล่อย zoospores (scale bar= 20  $\mu$ m); G-H: oogonium และ antheridium (scale bar= 20  $\mu$ m); I: oospore; J-K: oospore (scale bar= 10  $\mu$ m); L: plerotic oospore (scale bar= 20  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



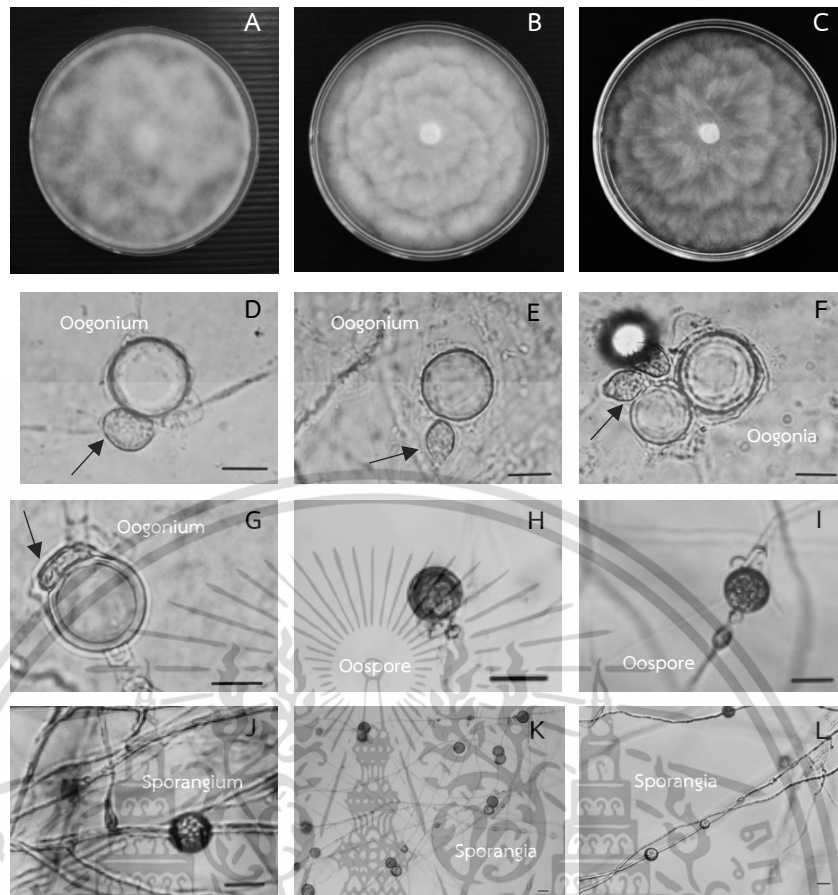
ภาพที่ 4.17 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-10 (*Phytophthora* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: oogonium (scale bar= 10 um); G: sporangium (scale bar= 10); H-L: sporangium (scale bar= 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



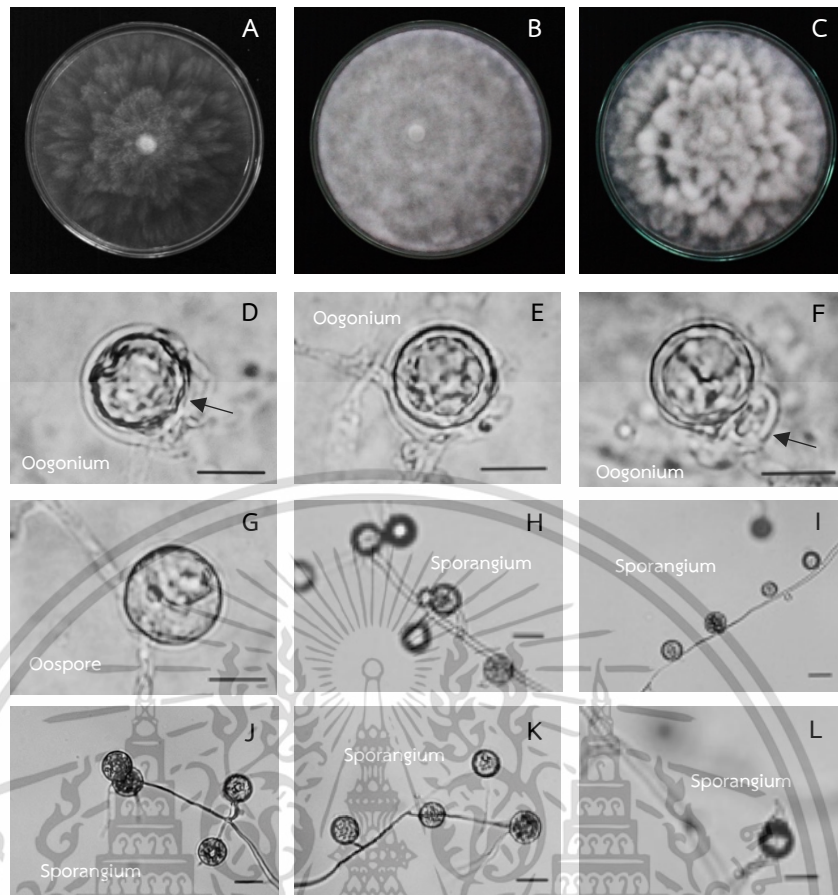
ภาพที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-2 (*Pythium* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: sporangium (scale bar= 20  $\mu$ m); G-L: oogonium และ antheridium (scale bar= 10  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



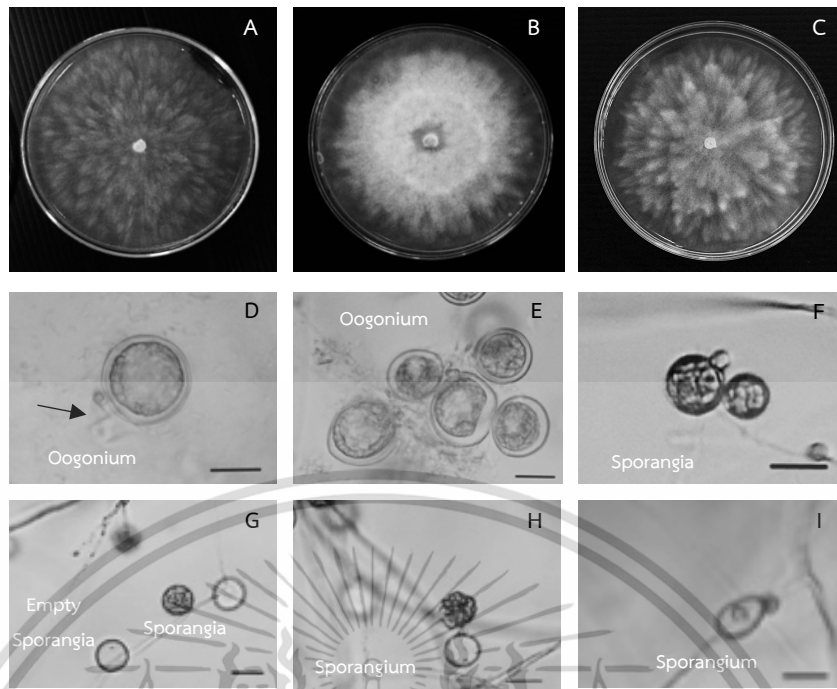
ภาพที่ 4.19 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NL-7 (*Phytophthora* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-G: oogonium และ antheridium (scale bar= 20  $\mu$ m); H-I: oospore (scale bar= 20  $\mu$ m); J: sporangium (scale bar= 20  $\mu$ m); K-L: Catenulate globose sporangia (scale bar= 20  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลต NL-13 (*Phytophthora* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-F: oogonium และ antheridium (scale bar= 10 um); G: oospore (scale bar= 10 um); H-L: sporangia (scale bar= 20 um); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 ลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลท NS-8 (*Pythium* spp.) โดยรูป A-C: ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร V8A(A), PDA(B) และ CMA(C) ที่อายุ 6 วัน; D-E: oogonium และ antheridium (scale bar= 10  $\mu$ m); F-G: sporangium (scale bar= 20  $\mu$ m); H: sporangiumที่กำลังจะปล่อย zoospore (scale bar= 20  $\mu$ m); I: sporangiumที่ปล่อย zoospore แล้ว (scale bar= 20  $\mu$ m); ลูกศรสีดำแสดงให้เห็นถึง antheridium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

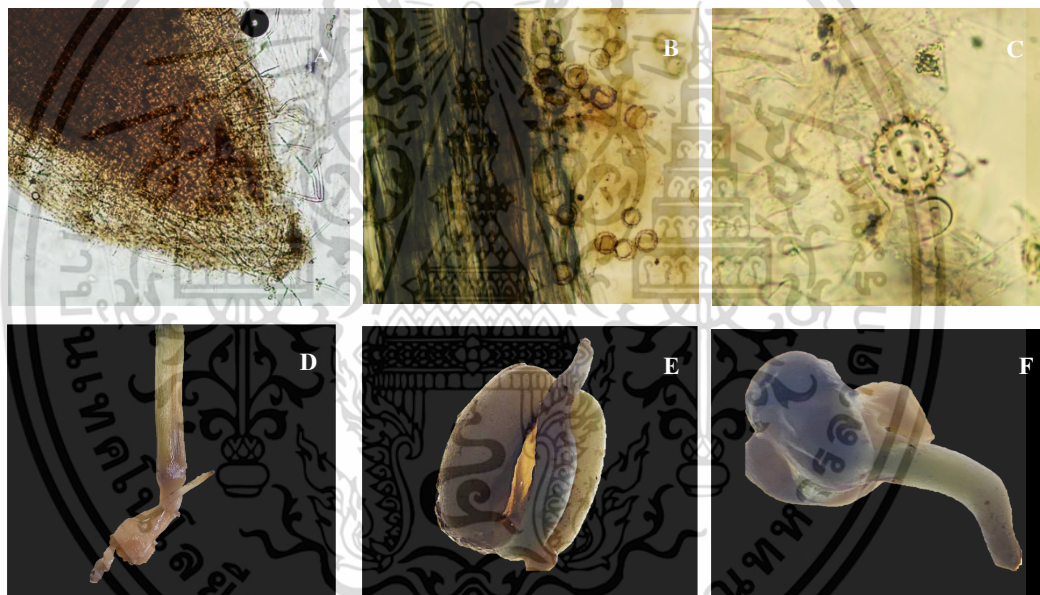
#### 4.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคแสดงให้เห็นว่าเชื้อโคโนสเลทต่างๆ ที่เก็บรวบรวมได้จากสภาพแวดล้อมธรรมชาติ เมื่อนำมาทดสอบบนพืชอาศัยใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด และใบเลี้ยงคู่ คือ มะเขือเทศ และแตงกวา ซึ่งเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อ *Pythium* spp. โดยทดสอบทั้งในเมล็ดและต้นกล้า เมื่อทำการสังเกตตุ่มก้อนจะพบการเจริญของเส้นใยและส่วนขยายพันธุ์บริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกเข้าทำลาย พบอาการเน่า ไม้งอก และมีการปกคลุมของเส้นใยสีขาวในเมล็ดพันธุ์ และการเข้าทำลายแทรกซ้อนจากแบคทีเรีย ทำให้เมล็ดเน่าและ มีกลิ่น และเป็นเมือก (ภาพที่ 4.22 และ 4.23) โดยทั่วไปเชื้อ *Pythium* spp. สามารถเจริญเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ภายใน 2-4 วัน (ตารางที่ 4.1) แต่การแสดงอาการบนพืชระยะเวลากลับอาจต่างออกไป ดังนั้นการทดสอบความสามารถในการก่อโรคจึงเก็บผลที่ 14 วัน การทดสอบในเมล็ดพันธุ์ 3 ชนิด (Pre-emergences) ได้แก่ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดมะเขือเทศ และเมล็ดถั่วเขียว พบว่าทั้ง 3 ชนิดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ และชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสปอร์ที่แข็งแรง มีดัชนีความรุนแรงโรค (SVI) อยู่ที่ 26-92 ขึ้นอยู่กับแต่ละโคโนสเลท โดยพบโคโนสเลทที่มีดัชนีความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับต่ำกว่า 20 จำนวน 5 โคโนสเลท ได้แก่ KS-10, NS-1, NS-4, NL-6, NL-7 มีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 26.6, 26.6, 28.0, 29.3 และ 29.3 ตามลำดับ การทดสอบโรคในต้นกล้า (Post-emergences) พบว่าโคโนสเลทที่ทำการทดสอบมีดัชนีความรุนแรงโรค (SVI) อยู่ที่ 13.3-41.6 เท่านั้น โดยพบลักษณะอาการโคนต้นและรากของต้นกล้าเน่า และรากมีการเจริญน้อยลงและมีน้ำหนักลดลง จากการทดสอบโคโนสเลทที่มีดัชนีความรุนแรงโรค (SVI) ต่ำกว่า 20 จำนวน 6 โคโนสเลท ได้แก่ KS-5, KS-11, KS-15, NS-3, NS-9 และ NL-19 มีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 20.6, 13.3, 15.0, 13.3, 20.0 และ 18.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

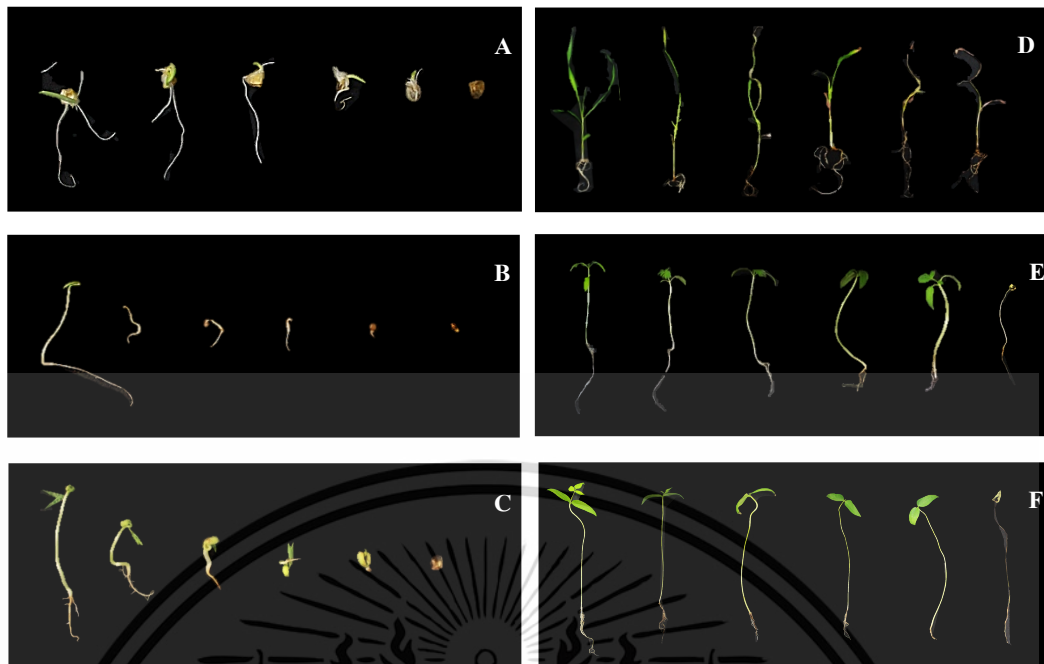
สำหรับน้ำหนักต้นกล้าข้าวโพด มะเขือเทศ และถั่วเขียว หลังจากการปลูกเชื้อพบว่า KS-5 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.4 g, 0.2 g และ 0.8 g ตามลำดับ KS-11 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.7 g, 0.1 g และ 0.7 g ตามลำดับ KS-15 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.7 g, 0.1 g และ 0.9 g ตามลำดับ NS-3 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.3 g, 0.1 g และ 0.8 g ตามลำดับ NS-9 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.1 g, 0.1 g และ 0.8 g ตามลำดับ NL-19 มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 1.4 g, 0.1 g และ 0.6 g ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ทำการปลูกเชื้อมีน้ำหนักรวมเท่ากับ 2.2 g, 0.2 g และ 1.0 g ตามลำดับและชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 0.9 g, 0.0 g และ 0.7 g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. ที่รวบรวมได้จากตัวอย่างดิน น้ำ และเศษซากพืชในพื้นที่ธรรมชาติ เมื่อทำการทดสอบโรคพบว่าเชื้อที่ได้ก่อโรคไม่รุนแรง โดยส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคในเมล็ดพันธุ์ระดับปานกลาง และก่อโรคในต้นกล้าในระดับต่ำ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโคโนสเลทที่เป็นชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อ *Pythium* spp. สปอร์ที่แข็งแรง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกโคโนสเลทที่จัดเป็น hypo-virulent strain จำนวน 6 โคโนสเลท ได้แก่ KS-5, KS-11, KS-15, NS-3, NS-9 และ NL-19

อย่างไรก็ตามเชื้อในกลุ่ม oomycetes ซึ่งจัดเป็นสิ่งมีชีวิตคล้ายราที่บ่งชี้ว่ามีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับสาหร่ายมากกว่าเชื้อราที่แท้จริง สามารถอาศัยอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย มีหลายรายงานที่พบเชื้อ *Pythium* spp. ดำรงชีวิตอยู่ในธรรมชาติ เช่น รายงานของ Uzuhashi et al. (2015) พบ *Pythium* spp. 4 สปีชีส์ในน้ำจืด ในประเทศญี่ปุ่น รายงานของ Nam and Choi. (2019) ที่พบ *Phytophythium* spp. 8 สปีชีส์จากตะกอนดิน สาหร่ายและซากพืชที่เน่าเปื่อยในลำธารน้ำจืดของประเทศเกาหลี รายงานของ Senda et al. (2009) แยก *Pythium sendicosum* และ *P. takayamanum* ได้จากดินป่าเขตนาวในญี่ปุ่น รายงานของ Slavov (2018) ที่แยก *Pythium* spp. ได้จากแหล่งน้ำ พื้นที่เพาะปลูกและดินป่าของประเทศบัลแกเรีย เป็นต้น ซึ่งนอกจากไม่ก่อโรคแล้ว บางสปีชีส์สามารถยับยั้งการเกิดโรคใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Brozova, 2002; Gerbore et al., 2014) ชักน้ำให้เกิดความต้านทานในพืชได้อีกด้วย (Akenaka and Tamagake, 2009)



ภาพที่ 4.22 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Pythium* spp. บริเวณเนื้อเยื่อพืช A: เส้นใยที่แทงเข้าเนื้อเยื่อพืช; B-C: ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อที่แทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช; D-F: พืชที่แสดงอาการหลังการเข้าทำลาย



ภาพที่ 4.23 ระดับความรุนแรงที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าพืชทดสอบ ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการโรค, ระดับ 1 = รากจำนวนน้อยลงมีอาการเน่าหรือชำรุดเล็กน้อย (1-25%), ระดับ 2 = รากและโคนต้นเกิดอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล (26-50%), ระดับ 3 = เกิดอาการเน่าลุกลามบริเวณรากและโคนต้นอย่างชัดเจน (50-75%), ระดับ 4 = รากและต้นเกิดอาการเน่าทั้งระบบใบและต้นเป็นสีเขียวเหลือง-น้ำตาล (76-100%), ระดับ 5 = ต้นตาย. A= เมล็ดข้าวโพด B= เมล็ดมะเขือเทศ C= เมล็ดถั่วเขียว D= ต้นกล้าข้าวโพด E= ต้นกล้ามะเขือเทศ F= ต้นกล้าถั่วเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของ *Pythium* sp. และ *Phytophthium* sp. ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ เพื่อจัดกลุ่ม Non-pathogenic หรือ hypovirulence strain

ไอโซเลต	Pre-emergences							Post-emergences						
	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI
	DS	DI	DS	DI	DS	DI		DS	DI	DS	DI	DS	DI	
ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0.0 i	0	0	0	0	0	0	0.0 h
ชุดควบคุมปลูกเชื้อ	100	100	100	100	100	100	100.0 j	100	100	50	100	50	100	66.6 a
KS-1	48	60	36	100	100	100	61.3 a-h	20	100	20	100	50	100	30.0 b-f
KS-2	88	40	20	80	100	100	69.3 a-d	20	100	10	50	45	100	25.0 c-g
KS-3	88	60	88	100	100	100	92.0 a	25	100	0	0	55	100	26.6 b-g
KS-4	36	60	20	100	44	60	33.3 e-h	20	100	10	50	50	100	26.6 b-g
KS-5	44	80	16	60	60	60	40.0 c-h	15	75	5	50	45	100	20.6 d-g
KS-6	92	100	32	100	100	100	74.6 a-c	20	100	20	100	45	100	28.3 b-g
KS-7	4	20	80	100	80	80	54.6 b-h	40	100	35	100	40	100	38.3 b
KS-8	16	60	40	100	80	80	45.3 c-h	20	100	10	50	45	100	25.0 c-g
KS-9	40	100	20	60	96	100	52.0 b-h	20	100	35	100	55	100	36.6 b-d
KS-10	0	0	12	60	68	80	26.6 h-i	20	100	20	100	50	100	30.0 b-f
KS-11	68	100	12	60	100	100	60.0 a-h	5	25	10	75	25	100	13.3 g-h

Severity index (SVI), Disease severity (%DS), Disease Incidence (%DI)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	Pre-emergences						Post-emergences							
	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI
	DS	DI	DS	DI	DS	DI		DS	DI	DS	DI	DS	DI	
KS-12	92	100	8	40	80	80	60.0 a-h	20	100	20	75	25	75	21.6 d-g
KS-13	92	100	64	100	100	100	85.3 a-b	35	100	25	100	65	100	41.6 b
KS-14	32	40	20	100	88	100	46.6 c-h	20	100	15	75	40	100	25.0 c-g
KS-15	52	60	24	80	80	80	52.0 b-h	25	100	0	0	20	100	15.0 f-g
KS-16	56	60	16	80	100	100	57.3 b-h	20	100	10	50	50	100	26.6 b-g
KS-17	36	40	12	60	68	100	38.6 d-h	40	100	5	25	30	100	25.0 c-g
KS-18	0	0	16	40	100	100	38.6 d-h	25	100	15	75	50	100	30.0 b-f
NS-1	20	40	20	60	40	40	26.6 h-i	40	100	15	75	10	75	21.6 d-g
NS-2	60	100	24	80	84	100	56.0 b-h	25	100	25	100	50	100	33.3 b-e
NS-3	68	100	32	100	100	100	66.6 a-e	15	75	5	25	20	75	13.3 g-h
NS-4	0	0	16	80	68	80	28.0 g-i	20	100	5	25	40	75	21.6 d-g
NL-5	20	20	12	60	84	100	38.6 d-h	25	100	5	25	45	100	25.0 c-g
NL-6	24	40	32	100	32	80	29.3 f-i	35	100	15	50	50	100	33.3 b-e

Severity index (SVI), Disease severity (%DS), Disease Incidence (%DI)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	Pre-emergences							Post-emergences						
	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด		SVI
	DS	DI	DS	DI	DS	DI		DS	DI	DS	DI	DS	DI	
NL-7	28	60	20	80	40	40	29.3 f-i	15	75	25	75	50	100	30.0 b-f
NS-8	68	80	40	100	80	80	62.6 a-g	20	100	10	50	50	100	26.6 b-g
NS-9	60	80	32	100	100	100	64.0 a-f	25	100	5	25	30	100	20.0 e-g
NS-10	8	40	32	100	100	100	46.6 c-h	35	100	20	100	30	100	28.3 b-g
NS-11	64	60	28	100	72	80	54.6 b-h	15	75	15	75	65	100	31.6 b-e
NL-12	56	100	12	40	80	100	49.3 c-h	20	100	25	100	45	100	30.0 b-f
NL-13	56	80	24	100	80	80	53.3 b-h	15	75	40	100	55	100	36.6 b-d
NL-14	52	100	32	100	92	100	58.6 a-h	20	100	20	75	55	100	31.6 b-e
NL15	20	40	20	60	100	100	46.6 c-h	15	75	30	100	40	100	28.3 b-g
NL16	84	100	88	100	84	100	85.3 a-b	20	75	20	75	30	100	23.3 c-g
NL17	84	100	28	80	100	100	70.6 a-d	15	100	15	75	45	100	25.0 c-g
NL18	80	100	12	40	100	100	64.0 a-f	30	100	10	50	40	100	26.6 b-g
NL-19	76	100	20	60	80	80	58.6 a-h	20	100	10	50	25	100	18.3 e-g

Severity index (SVI), Disease severity (%DS), Disease Incidence (%DI)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	Pre-emergences							Post-emergences								
	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด			SVI	มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ข้าวโพด			SVI
	DS	DI	DS	DI	DS	DI	DS		DI	DS	DI	DS	DI			
NS-20	88	100	12	60	100	100	66.6 a-e	15	75	15	75	65	100	31.6 b-e		
NS-21	20	60	96	100	100	100	72.0 a-d	20	100	5	25	40	100	21.6 d-g		
C.V. (%)	32.4							29.6								

<sup>1</sup>DI (Disease Incidence %) = (จำนวนต้นที่เกิดโรค / จำนวนต้นทั้งหมด) x100

<sup>2</sup>DS (Disease severity %) = ผลรวมของ (คะแนนการเป็นโรค x จำนวนต้นที่เป็นโรค) / (คะแนนโรคสูงสุด x จำนวนต้นทั้งหมด) x100

<sup>3</sup>Severity index (SVI) = ผลรวมของ (Disease severity / จำนวนทั้งหมด)

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักต้นกล้าแต่ละชนิดหลังการปลูกเชื้อทดสอบไอโซเลทต่างๆ เพื่อจัดกลุ่ม Non-pathogenic หรือ hypovirulence strain

ไอโซเลท	ต้นกล้าข้าวโพด (g)			ต้นกล้ามะเขือเทศ (g)			ต้นกล้าถั่วเขียว (g)		
	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม
ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ	1.3 a	0.7 a-c	2.2 a	0.2 a	0.05 a	0.2 a	0.8 a	0.2 a-b	1.0 a
ชุดควบคุมปลูกเชื้อ	0.4 c-e	0.4 b-d	0.9 b-c	0.0 c	0.00 d	0.0 d	0.6 a-c	0.0 e	0.7 b-f
KS-1	0.6 b-e	0.5 a-d	1.3 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 b-c	0.4 d-e	0.1 d-e	0.5 e-f
KS-2	0.5 b-e	0.5 a-d	1.0 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 a-d	0.6 b-f
KS-3	0.4 c-e	0.4 a-d	0.9 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.6 b-f
KS-4	0.7 b-e	0.5 a-d	1.3 b-c	0.1 b	0.01 d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-d	0.7 b-f
KS-5	0.8 b-e	0.6 a-d	1.4 b-c	0.1 b	0.04 a-b	0.2 b	0.6 a-c	0.1 a-d	0.8 a-d
KS-6	0.6 b-e	0.4 a-d	1.0 b-c	0.1 b	0.03 a-c	0.1 b-c	0.6 a-e	0.1 b-e	0.7 b-f
KS-7	0.7 b-e	0.4 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.3 e	0.1 d-e	0.5 f
KS-8	0.7 b-e	0.5 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 a-d	0.7 b-f
KS-9	0.6 b-e	0.5 a-d	1.1 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 d-e	0.6 d-f
KS-10	0.5 b-e	0.3 b-d	0.9 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 d-e	0.6 b-f
KS-11	1.0a-b	0.6 a-d	1.7 a-b	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.6 a-d	0.1 b-d	0.7 a-f
KS-12	0.8 b-e	0.6 a-d	1.4 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.6 b-f

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ต้นกล้าข้าวโพด (g)			ต้นกล้ามะเขือเทศ (g)			ต้นกล้าถั่วเขียว (g)		
	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม
KS-14	0.6 b-e	0.6 a-d	1.0 b-c	0.1 b	0.06 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 c-e	0.6 b-f
KS-15	0.9 a-c	0.7 a-b	1.7 a-b	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.7 a-c	0.2 a	0.9 a-b
KS-16	0.4 c-e	0.6 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.6 a-c	0.1 a-d	0.8 a-d
KS-17	0.9 a-c	0.8 a	1.7 a-b	0.1 b	0.00 d	0.1 c	0.6 a-c	0.1 a-d	0.8 a-d
KS-18	0.6 b-e	0.5 a-d	1.1 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.6 b-e	0.1 b-e	0.7 b-f
NS-1	0.8 b-e	0.5 a-d	1.3 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 c	0.6 b-e	0.1 b-d	0.7 b-f
NS-2	0.4 c-e	0.2 d	0.7 c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.6 b-f
NS-3	0.8 a-d	0.5 a-d	1.3 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.6 a-c	0.1 a-d	0.8 a-d
NS-4	0.7 b-e	0.4 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.7 b-f
NL-5	0.7 b-e	0.4 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 c	0.5 b-e	0.1 b-d	0.7 b-f
NL-6	0.6 b-e	0.4 a-d	1.1 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 c	0.5 b-e	0.1 d-e	0.6 b-f
NL-7	0.3 d-e	0.3 c-d	0.6 c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 d-e	0.6 b-f
NS-8	0.6 b-e	0.5 a-d	1.1 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 a-d	0.7 b-f
NS-9	0.7 b-e	0.6 a-d	1.1 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 c	0.6 a-c	0.1 a-c	0.8 a-d

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ต้นกล้าข้าวโพด (g)			ต้นกล้ามะเขือเทศ (g)			ต้นกล้าถั่วเขียว (g)		
	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	น้ำหนักรวม
NS-10	0.7 b-e	0.7 a-b	1.4 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.7 b-f
NS-11	0.3 e	0.3 c-d	0.6 c	0.1 b	0.02 b-d	0.1 b-c	0.6 a-e	0.1 a-d	0.7 a-e
NL-12	0.5 b-e	0.4 b-d	1.0 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.7 a-b	0.2 a-b	0.9 a-c
NL-13	0.4 c-e	0.4 b-d	0.8 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.4 c-e	0.1 b-d	0.6 d-f
NL-14	0.4 c-e	0.4 b-d	0.9 b-c	0.1 b	0.01 d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 a-d	0.7 b-f
NL-15	0.8 a-d	0.5 a-d	1.4 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.0 d-e	0.6 d-f
NL-16	0.7 b-e	0.5 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.0 d-e	0.6 d-f
NL-17	0.4 c-e	0.4 b-d	0.8 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.6 b-f
NL-18	0.6 b-e	0.5 a-d	1.2 b-c	0.1 b	0.00 d	0.1 c	0.5 b-e	0.1 d-e	0.6 b-f
NL-19	0.8 b-e	0.5 a-d	1.4 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.1 b-e	0.6 b-f
NS-20	0.5 c-e	0.3 b-d	0.8 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.5 b-e	0.0 d-e	0.6 c-f
NS-21	0.6 b-e	0.4 a-d	1.0 b-c	0.1 b	0.01 c-d	0.1 b-c	0.6 a-c	0.1 a-d	0.8 a-d
C.V. (%)	46.2	42.4	42.3	35.1	92.3	36.4	23.2	31.3	23.1

#### 4.1.3 การจัดจำแนก *Pythium* โดยเทคนิคทางอณูวิทยา

จากการคัดเลือกไอโซเลทที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) หรือก่อโรครดต่ำ (hypo-virulent strain) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ KS-5, KS-11, KS-15, NS-3, NS-9, NL-19 และไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ KS-1, KS-3, KS-7, KS-9, KS-12, KS-13, KS-16, KS-17, KS-18, NS-1, NS-4, NL-6, NL-18 และ NS-20 มาทำการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ตำแหน่งยีนที่ ITS4 และ ITS6 นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology; Bethesda, USA) สามารถจัดจำแนกได้เป็น 9 สปีชีส์ คือ *Pythium acanthicum*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythopythium chameahyphon*, *Pythium* species (D37), *Phytopythium helicoides* (ชื่อเดิม *Pythium helicoides*), *Pythium iriomotense*, *Pythium torulosum*, *Phytopythium vexans* (ชื่อเดิม *Pythium vaxans*) และ *Globisporangium nunn* (ชื่อเดิม *Pythium nunn*) (ตารางที่ 4.2)

โดยการเปรียบเทียบศึกษา ITS region gene พบว่า *Pythium* และสกุลใกล้เคียงในคลาส oomycetes ที่แยกได้ (ตารางที่ 4.4) นั้นมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงดังต่อไปนี้ ได้แก่

*Pythium acanthicum* โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 98.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในช่วง 853 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ KS-17

*Pythium cucurbitacearum* โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 98.39-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในช่วง 899-937 คู่เบส จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ KS-9, KS-11 และ NS-20

*Phytopythium chameahyphon* โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 99.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในช่วง 833 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NS-1

*Pythium* spp. D37 โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 98.46-99.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในช่วง 816-851 คู่เบส จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ KS-1, KS-3 และ KS-5

*Phytopythium helicoides* (ชื่อเดิม *Pythium helicoides*) โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 91.17-96.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในช่วง 781-804 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ KS-13 และ NL-18

*Pythium iriomotense* โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 98.23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในช่วง 798 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NL-6

*Pythium torulosum* โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 98.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในช่วง 853 คู่เบส จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ KS-9 และ KS-11

*Phytopythium vexans* (ชื่อเดิม *Pythium vaxans*) โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 94.10-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในช่วง 748-907 คู่เบส จำนวน 6 ไอโซเลท KS-7, KS-12, NS-3, NS-4, NS-9 และ NL-19

*Globisporangium nunn* (ชื่อเดิม *Pythium nunn*) โดยมีคล้ายคลึงประมาณ 97.72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในช่วง 962 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ KS-18

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ITS เทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลท	หมายเลขการเข้าถึงใน GenBank	สถานที่เก็บตัวอย่าง (จังหวัด)	แหล่งที่เก็บ	ไอโซเลทอ้างอิง	ความยาวลำดับเบส (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	clade	อัตราส่วนความแตกต่างของลำดับเบส (ความแตกต่าง/ทั้งหมด)
KS-1	OM346740	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Pythium</i> spp. D37 KP183943.1	851	98.46		13/843
KS-3	ON394659	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Pythium</i> spp. D37 KP183943.1	885	98.75		11/881
KS-5	ON394661	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Pythium</i> spp. D37 KP183943.1	816	99.75		2/814
KS-7	ON394660	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>P. vexans</i> GU133594.1	748	94.10		38/644
KS-9	ON394670	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Ph.</i> <i>cucurbitacearum</i> KP183959.1	893	100	K	0/893
KS-11	ON394664	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Ph.</i> <i>cucurbitacearum</i> MW426384.1	899	100		0/899
KS-12	ON394668	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Ph. vexans</i> MW426381.1	870	100		0/870
KS-13	ON394665	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>Ph. helicoides</i> KY084742.1	781	91.17		69/781
KS-15	ON394663	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>P. torulosum</i> MT758173.1	869	99.65		3/869
KS-16	ON394674	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>P. torulosum</i> MT758173.1	874	99.66	B	3/874

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

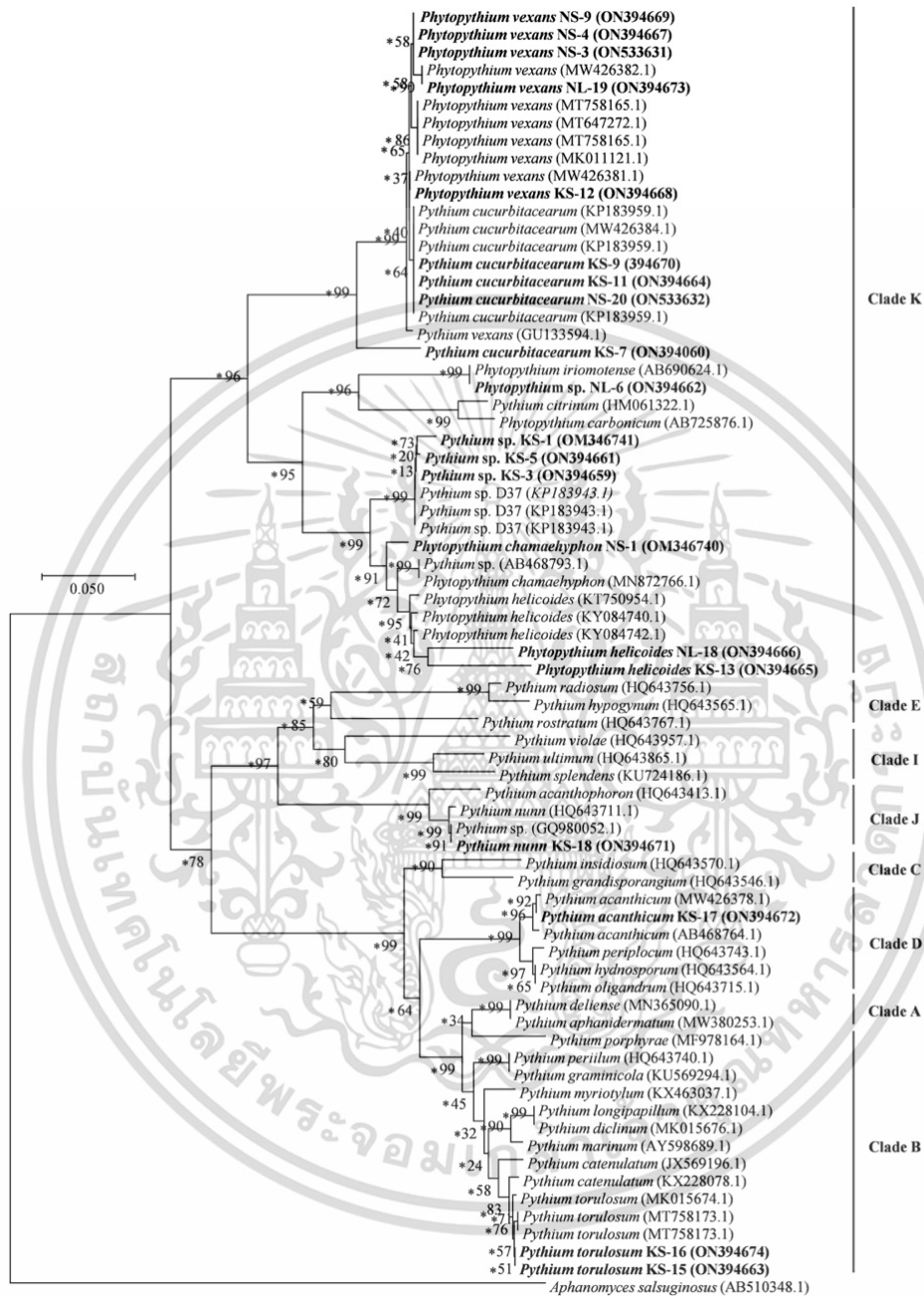
ไอโซเลข	หมายเลขการเข้าถึงใน GenBank	สถานที่เก็บตัวอย่าง (จังหวัด)	แหล่งที่เก็บ	ไอโซเลขอ้างอิง	ความยาวลำดับเบส (bp)	ความคล้ายคลึง (%)	clade	อัตราส่วนความแตกต่างของลำดับเบส (ความแตกต่าง/ทั้งหมด)
KS-17	ON394672	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>P. catenulatum</i> MW426378.1	853	98.71	B	11/854
KS-18	ON394671	กาญจนบุรี	ดินป่าไม้	<i>P. nunn</i> KU211484.1	962	97.72	J	22/964
NS-1	OM346740	นครนายก	ดินป่าไม้	<i>Ph. chamaehyphon</i> MN872766.1	833	99.73		2/735
NS-3	ON533631	นครนายก	ดินป่าไม้	<i>Ph. vexans</i> MH671329.1	907	98.68		12/906
NS-4	ON394667	นครนายก	ดินป่าไม้	<i>Ph. vexans</i> MT758165	880	99.54		4/875
NL-6	ON394662	นครนายก	เศษซากพืช (ป่าไม้)	<i>Ph. iriomotense</i> AB690624.1	798	98.23	K	14/793
NS-9	ON394669	นครนายก	ดินป่าไม้	<i>Ph. vexans</i> MT647272.1	871	99.54		4/871
NL-18	ON394666	นครนายก	เศษซากพืช (ป่าไม้)	<i>Ph. helicoides</i> KY084740.1	804	96.64		27/804
NL-19	ON394673	นครนายก	เศษซากพืช (ป่าไม้)	<i>Ph. vexans</i> MW426382.1	876	99.89		1/876
NS-20	ON533632	นครนายก	ดินป่าไม้	<i>cucurbitacearum</i> KP183959.1	937	98.39		15/934

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ

จากข้อมูลการจัดจำแนกลำดับเบสที่ได้จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology; Bethesda, USA) ทั้ง 20 ไอโซเลทนำมาจัดทำแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้อัลกอริทึม Neighbour-joining, maximum-likelihood และ maximum-parsimony และเปรียบเทียบ clade โดยการอ้างอิงจากรายงานของ Lévesque and de Cock (2004) พบว่าผลการวิเคราะห์การจัดลำดับสายวิวัฒนาการ แบ่งได้ดังนี้ คือ clade B ได้แก่ *Pythium torulosum* 2 ไอโซเลท, clade D ได้แก่ *Pythium acanthicum* ได้แก่ 1 ไอโซเลท, clade J ได้แก่ *Globisparangium nunn* 1 ไอโซเลทและ clade K ประกอบด้วย 16 ไอโซเลท ได้แก่ *Pythium* spp. (D37) 3 ไอโซเลท, *Phytopythium vexans* 6 ไอโซเลท, *Phytopythium cucurbitacearum* 3 ไอโซเลท, *Phytopythium helicoides* 2 ไอโซเลท, *Phytopythium chamaeaphon* 1 ไอโซเลท และ *Phytopythium iriomotense* 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 4.24)

โดยเชื่อที่จำแนกได้สามารถแยกสายวิวัฒนาการได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (Polyphyletic taxa) คือ clade A-J ยังคงจัดอยู่ในกลุ่ม *Pythium* spp. และ clade K ที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Phytopythium* spp. เชื่อส่วนใหญ่ว่าแยกได้ในครั้งนี้ พบว่ามีสปีชีส์ใกล้เคียงกับที่ได้รายงานไว้ของ Saelee et al. (2022) ในการแพร่กระจายของ *Pythium* และ *Phytopythium* spp. ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่ามีหลายสปีชีส์ที่ได้รับการระบุในครั้งนี้เป็นสปีชีส์ที่ไม่ทำให้เกิดโรครักกับพืช เช่น *Pythium acanthicum* ที่จัดอยู่ใน clade D ตรงตามรายงานของ Allain-Boulé et al. (2004) ที่ระบุว่าสปีชีส์นี้ไม่ทำให้เกิดโรคบนแครอท และมีรายงานการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสปีชีส์ก่อโรครุนแรงอื่นๆ อีกด้วย (Ali-Shtayeh and Saleh, 1999) *Globisparangium nunn* ที่จัดอยู่ใน clade J นั้น Fang and Tsao (1994) ได้มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* หลายสปีชีส์ และ *Pythium torulosum* ที่จัดอยู่ใน clade B รายงานของ Lerch-Olson et al. (2020) ที่ศึกษาความต้านทานในถั่วเหลือง พบว่า *Pythium torulosum* และ *Pythium lutarium* ทำให้เกิดอาการเน่าของถั่วเหลืองต่ำและอัตราการงอกยังคงสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ *Pythium oopapillum* และ *Pythium sylvaticum* นอกจากนี้ใน *Phytopythium* แม้ไม่ได้มีรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรค แต่พบว่าหลายสปีชีส์สามารถอาศัยได้ในพื้นที่ธรรมชาติหรือแหล่งน้ำได้โดยไม่จำเป็นต้องมีพืชอาศัยหรือก่อโรคในพืช (Tkaczyk, 2020) รายงานของ Nam and Choi (2019) ที่พบ *Phytopythium chamaeaphon*, *Phytopythium litorale*, *Phytopythium vexans*, *Pythium diclinum*, *Pythium heterothallicum*, *Pythium inflatum*, *Pythium intermedium* และ *Pythium oopapillum* จากตะกอนดิน สาหร่าย และซากพืชที่เน่าเปื่อยในลำธารน้ำจืดของประเทศเกาหลี รายงานของ Baten et al. (2015) แยก *Phytopythium iriomotense* และ *Phytopythium aichiense* ได้เป็นครั้งแรกจากผิวน้ำในแม่น้ำ และตะกอนน้ำเสียประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้ยังมีการนำเชื้อในสกุล *Pythium* spp. มาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Deacon (1979) ที่ใช้ประโยชน์ *Pythium* spp. ในการเป็นเซลล์โลไลติกเอนไซม์ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถย่อยเศษซากพืช เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม งานวิจัยของ Tondolo et al. (2017) ที่สกัดเบต้ากลูแคนใน *Pythium insidiosum* เพื่อกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดขาวเพื่อใช้ในการแพทย์ เป็นต้น



ภาพที่ 4.24 แผนภูมิวิวัฒนาการของ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียง โดยใช้อัลกอริทึม Neighbour-joining, maximum-likelihood และ maximum-parsimony แต่จะแสดงผลเฉพาะแผนภูมิที่ได้จาก Neighbour-joining กิ่งก้านที่พบจากแผนภูมิอื่นๆ จะถูกระบุด้วยเครื่องหมาย (\*) ตัวเลขที่แสดงบน node บ่งบอกถึงค่า bootstrap support (การทำซ้ำ 1000 ครั้ง) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aphanomyces salsuginosus* เป็น outgroup แถบ scale bar แสดงให้เห็นถึงการแทนที่เบสที่ 0.05 เบสต่อนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ปริมาณและชนิดของเบต้ากลูแคน

### 4.2.1 การศึกษาปริมาณเบต้ากลูแคน

นำเชื้อ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. กลุ่ม hypo-virulent จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ *P. catenulatum* (CHS-10), *P. acanthicum* (RYS-7), *P. torulosum* (RYS-10 และ KS-15), *P. diclinum* (RYS-16), *Ph. cucurbitacearum* (RYS-20 และ KS-11), *Phytophythium* spp. (KS-5), *Ph. vexans* (NS-3, NS-9 และ NL-19) มาวัดปริมาณกลูแคนเปรียบเทียบกับยีสต์ *S. cerevisiae* (ชุดควบคุม) พบว่าในน้ำหนักแห้ง 100 g ยีสต์มีปริมาณกลูแคนรวม อัลฟากลูแคน และเบต้ากลูแคนมากที่สุด อยู่ที่ 35.38 g, 1.57 g และ 33.82 g ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียง พบว่า *Pythium torulosum* ไอโซเลท KS-15 มีปริมาณกลูแคนมากที่สุด คือ กลูแคนรวม 33.78 g อัลฟากลูแคน 1.07 g และเบต้ากลูแคน 32.70 g ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเบต้ากลูแคนระหว่างชุดควบคุม *S. cerevisiae* กับเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Phytophythium* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่า *Phytophythium* spp. มีปริมาณเบต้ากลูแคนต่ำกว่าชุดควบคุมแต่ในปริมาณไม่มากนัก นอกจากนี้ปริมาณอัลฟากลูแคนที่วัดได้จะพบว่า *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. มีปริมาณที่ต่ำกว่า ยกเว้นใน *P. diclinum* ไอโซเลท RYS-16 ที่พบว่ามีปริมาณอัลฟากลูแคนสูงกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 4.5)

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่วัดด้วยชุดทดสอบเดียวกัน จากรายงานของ Tondolo et al. (2017) ที่ศึกษาปริมาณกลูแคนใน *Pythium insidiosum* พบปริมาณกลูแคนที่วัดได้เฉลี่ยคือ กลูแคนรวม 23.06 g อัลฟากลูแคน 3.82 g และเบต้ากลูแคนที่ 19.24 g รายงานของ Kyanko et al. (2013) ที่วัดปริมาณเบต้ากลูแคนจากเชื้อราในสปีชีส์ต่างๆ พบว่าใน *Paecilomyces lilacinus* และ *Paecilomyces variotii* วัดได้ 23.80 g รองลงมาคือ *Penicillium nalgiovense* วัดได้ 17.00 g และเชื้อราส่วนใหญ่มักประกอบไปด้วยโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากกว่ากลูแคน ซึ่งการสกัดที่ไม่บริสุทธิ์อาจเกิดการเจือปนของโปรตีนที่ตกค้าง และทำให้เกิดอาการแพ้ในผู้บริโภคได้ (สมศักดิ์, 2553) รายงานของ McCleary and Draga (2016) วัดปริมาณกลูแคนในเห็ด *Ganoderma lucidum* (เห็ดหลินจือ) มีปริมาณสูงสุดคือกลูแคนรวม 74.3 g อัลฟากลูแคน 29.2 g เบต้ากลูแคน 45.1 g และใน *Cordyceps sinensis* (เห็ดถั่งเช่า) มีปริมาณสูงสุดคือกลูแคนรวม 29.3 g อัลฟากลูแคน 24.1 g และเบต้ากลูแคนที่ 5.2 g จากการศึกษาปริมาณกลูแคนในเห็ดกินได้หลายชนิด พบว่ากลูแคนที่มีปริมาณมากส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบอัลฟากลูแคนมากกว่าเบต้ากลูแคน เมื่อเปรียบเทียบกับเบต้ากลูแคนจาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. พบว่ากลูแคนที่สกัดได้มีปริมาณอัลฟากลูแคนต่ำและมีเบต้ากลูแคนสูง รวมถึงผนังเซลล์ของ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. มีส่วนประกอบของกลูแคนเป็นหลัก ซึ่งสามารถช่วยลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการเจือปนโปรตีนได้มากกว่าเชื้อรา

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์

ไอโซเลท	ปริมาณกลูแคน (g/น้ำหนักเส้นใยแห้ง 100 g) <sup>1</sup>		
	กลูแคนรวม (%w/w)	อัลฟา-glucan (%w/w)	เบต้า-glucan (%w/w)
ชุดควบคุม <i>S. cerevisiae</i> ®*	35.3858	1.5702	33.82
<i>P. catenulatum</i> CHS-10	33.4187	1.1097	32.31
<i>P. acanthicum</i> RYS-7	32.7908	1.1517	31.64
<i>P. torulosum</i> RYS-10	29.3756	1.1256	28.25
<i>P. diclinum</i> RYS-16	29.6628	1.6383	28.02
<i>P. torulosum</i> KS-15	33.7823	1.0774	32.70
<i>Ph. cucurbitacearum</i> RYS-20	33.5729	1.1580	32.41
<i>Phytophythium</i> spp. KS-5	29.7172	1.1744	28.54
<i>Ph. cucurbitacearum</i> KS-11	30.7141	1.1971	29.52
<i>Ph. vexans</i> NS-3	28.8854	1.1336	27.75
<i>Ph. vexans</i> NS-9	25.5364	1.2323	24.30
<i>Ph. vexans</i> NL-19	27.3871	1.2346	26.15

<sup>1</sup> ปริมาณกลูแคนวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบ Megazyme®

\*ยีสต์แห่งการค้า Perfect®

#### 4.2.2 การศึกษาชนิดและองค์ประกอบของเบต้า-glucan

เมื่อนำเบต้า-glucan สกัดบริสุทธิ์ และทำให้เป็นผงแห้ง (ภาพที่ 4.27) มาตรวจสอบชนิดของสารสกัดบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy) พบว่าโครงสร้างสารที่ได้คือ (1,3)(1,6) beta-glucan ซึ่งกราฟที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Parthasarathy et al. (2021) โดยพิกัดเด่นชัดที่ถูกระบุในกราฟ ได้แก่ 3284.18, 2916.59, 1637.16, 1364.57, 1154.64, 1024.46 และ 435.85 cm<sup>-1</sup> โดยจำแนกได้ดังนี้คือ ช่วงพิกัดกว้างคลื่นความถี่ที่ 3284 cm<sup>-1</sup> และช่วงพิกัดแคบคลื่นความถี่ที่ 2916 cm<sup>-1</sup> ซึ่งถูกระบุว่าเป็นหมู่ฟังก์ชัน O-H จากการเกิดขึ้นของกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระและ C-H จากการปรากฏตัวของ C-Haliphatic ในวงแหวน pyranoid ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการสั่นในรูปแบบการยืด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Parthasarathy et al. (2021) พบว่าที่คลื่นความถี่ที่ 2916 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการเชื่อมโยงของ 1,6 beta-glucan ช่วงพิกัดแคบคลื่นความถี่ที่ 1637 cm<sup>-1</sup> และ 1364 cm<sup>-1</sup> เป็นกลุ่มของ amide I และ amide III ตามลำดับซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชัน C=O เกิดจากคาร์บอนิลที่เกิดจากการบิดตัวโครงสร้าง NH ซึ่งบ่งชี้ถึงแถบไคตินหรือโปรตีนที่ตกค้าง (Sandula et al., 1999; Liu et al., 2022) ในช่วงพิกัดคลื่นความถี่ที่ 1024-1037 cm<sup>-1</sup> ทั้งหมดถูกระบุเป็นหมู่ฟังก์ชัน C-O ของกลุ่มโพลีแซ็กคาไรด์ เปรียบเทียบกับ Zlatković et al., เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2003) พบว่าตำแหน่งพีคใกล้เคียงกับ  $1040\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งตรงกับโครงสร้าง 1,3 betaglucan และที่คลื่นความถี่  $1154.64\text{ cm}^{-1}$  ถูกระบุเป็นอัลฟาแลคทูแคนที่ตกค้างอยู่เล็กน้อย (Sandula et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบคลื่นความถี่พีคแคบที่  $435\text{ cm}^{-1}$  จากโมเลกุลคาร์บอนไดออกไซด์ที่เสื่อมสภาพ (ภาพที่ 4.25)

การวิเคราะห์โครงสร้างโดยดูการแตกตัวของพันธะเคมีด้วยเครื่อง Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) ยืนยันได้ว่าโครงสร้างสารที่ได้คือ (1,3)(1,6) betaglucan ใกล้เคียงกับโครงสร้าง NMR ของลามินาลินซึ่งเป็นเบต้าแลคทูแคนที่สกัดได้จากสาหร่าย โดยการแตกตัวของอะตอมโปรตรอน ( $H^1$ ) พบพีคที่คลื่นความถี่ 5.2, 4.9-4.7, 4.6, 4.1-3.1 และ 2.6 ppm โดยพีคสูงสุดที่ตำแหน่ง 4.8 ppm ถูกระบุเป็นพีคของตัวทำละลาย  $D_2O$  (Gottlie et al., 1997) และการศึกษานี้พีคที่ 5.2 และ 4.6 ppm ถูกระบุให้เป็นตำแหน่งโปรตรอนอะตอมตัวแรก  $H_1$  ซึ่งเป็นพีคของอัลฟาและเบต้าแลคทูแคนตามลำดับ ซึ่งตำแหน่งที่ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kim et al. (2000) และตำแหน่งที่เหลืออื่นๆ ที่ 4.1-3.1 ppm ถูกระบุเป็นตำแหน่งโปรตรอน  $H_2-H_6$  ของ (1,3)(1,6) betaglucan (Kono et al., 2017) โดยตำแหน่ง  $H_2$  อยู่ที่ 3.2 ppm ตำแหน่ง  $H_3$  และ 4 อยู่ที่ 3.3-3.5 ppm ตำแหน่ง  $H_5$  และ 6 อยู่ที่ 3.6-3.8 ppm (ภาพที่ 4.26A)

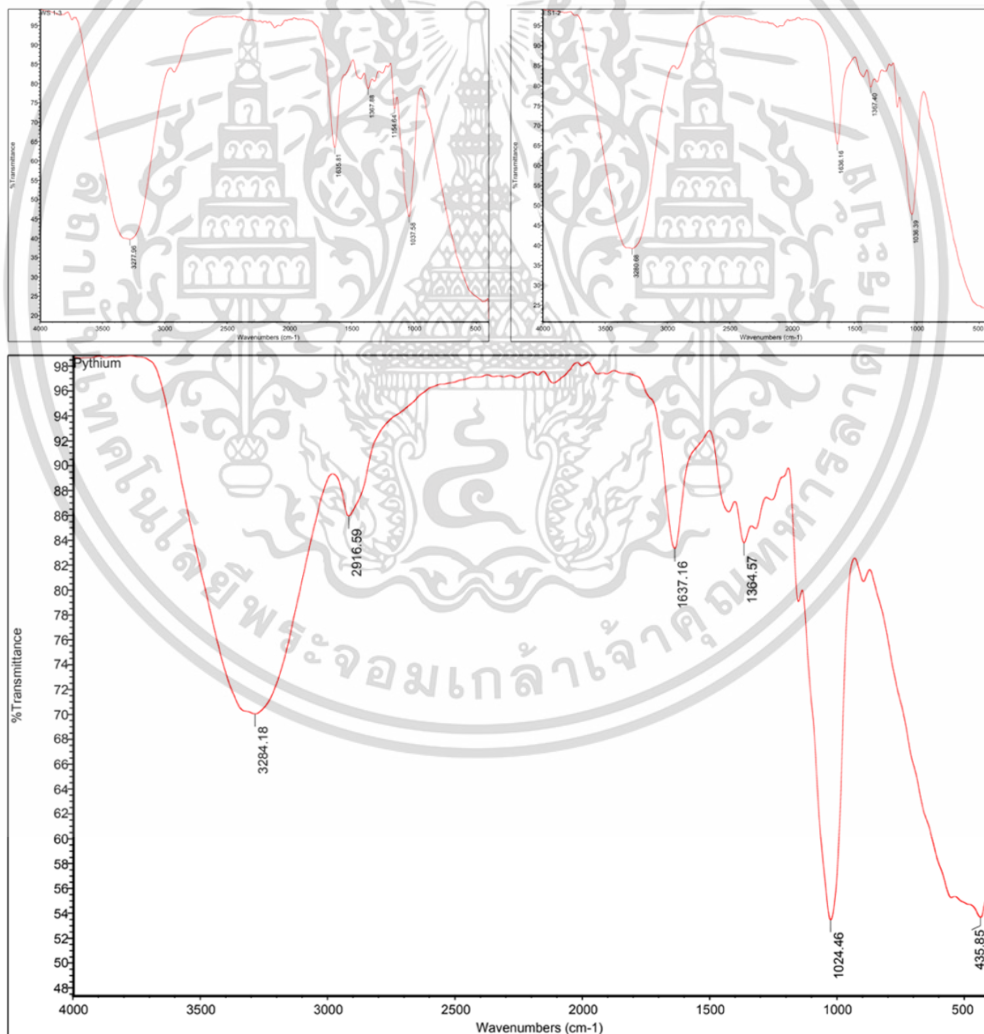
การแตกตัวของอะตอมคาร์บอน ( $C^{13}$ ) พบพีคที่คลื่นความถี่ 162-163, 112-119, 92, 95, 60-75 และ 38 ppm โดยตำแหน่งอะตอมตัวแรกอยู่ที่ตำแหน่ง 163 ppm ซึ่งถูกระบุเป็นพีคของตัวทำละลาย และลักษณะของกราฟคล้ายคลึงกับเบต้าแลคทูแคนในงานวิจัยเบต้าแลคทูแคนอื่นๆ (Kono et al., 2017; Tondolo et al., 2017) แต่เนื่องจากพีคตำแหน่งหลัก  $C_1$  มีความคลาดเคลื่อนโดยคาร์บอนตำแหน่ง  $C_1$  มีพีคเท่ากับ 119-112 ppm ทำให้การแตกตัวของอะตอมคาร์บอน ( $C^{13}$ ) ไม่สามารถยืนยันตำแหน่งหลัก (main chain) ของเบต้าแลคทูแคนได้ อย่างไรก็ตามคาร์บอนตำแหน่งที่  $C_2-C_6$  มีพีคเท่ากับ 95-92 และ 72-60 ppm พบว่าใกล้เคียงกับตำแหน่งโซ่ข้าง (side chain) หรือแขนของเบต้าแลคทูแคนที่ตำแหน่ง (1,6) betaglucan โดย ตำแหน่ง  $C_2$  อยู่ที่ 75 ppm ตำแหน่ง  $C_3$  อยู่ที่ 92-95 ppm ตำแหน่ง  $C_4$  อยู่ที่ 71 ppm ตำแหน่ง  $C_5$  อยู่ที่ 73 ppm และตำแหน่ง  $C_6$  อยู่ที่ 60 ppm (ภาพที่ 4.26B) ซึ่งความคลาดเคลื่อนของเบต้าแลคทูแคนที่ตำแหน่งหลัก 1,3 betaglucan (main chain) อาจเป็นผลมาจากการใช้ trifluoroacetic acid (TFA) ที่มีความเข้มข้นสูงในการช่วยละลายเบต้าแลคทูแคนไม่ละลายน้ำ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนโปรตรอนด้วยกันเองระหว่างตัวทำละลายและตัวอย่าง 5-16 ppm ส่งผลให้พีคที่ได้เกิดเร็วขึ้นและมีผลคลาดเคลื่อน (Glenn, 2014)

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย FT-IR มีข้อจำกัดในการกำหนดองค์ประกอบที่แน่นอนของโมเลกุลเชิงซ้อน เช่น เบต้า-แลคทูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีสถานะเป็นของแข็ง ดังนั้นเพื่อให้ได้รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครงสร้างเบต้าแลคทูแคนจึงจำเป็นต้องมีการใช้ร่วมกับ NMR (Bikmurzin et al., 2022) การวิเคราะห์โครงสร้างทั้ง 2 วิธีประกอบกันยืนยันได้ว่าโครงสร้างของเบต้าแลคทูแคนที่ได้ คือ (1,3)(1,6) betaglucan ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับเบต้าแลคทูแคนของ laminarin ซึ่งเป็นเบต้าแลคทูแคนที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล เช่น สาหร่ายสีแดง สีเขียว และสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

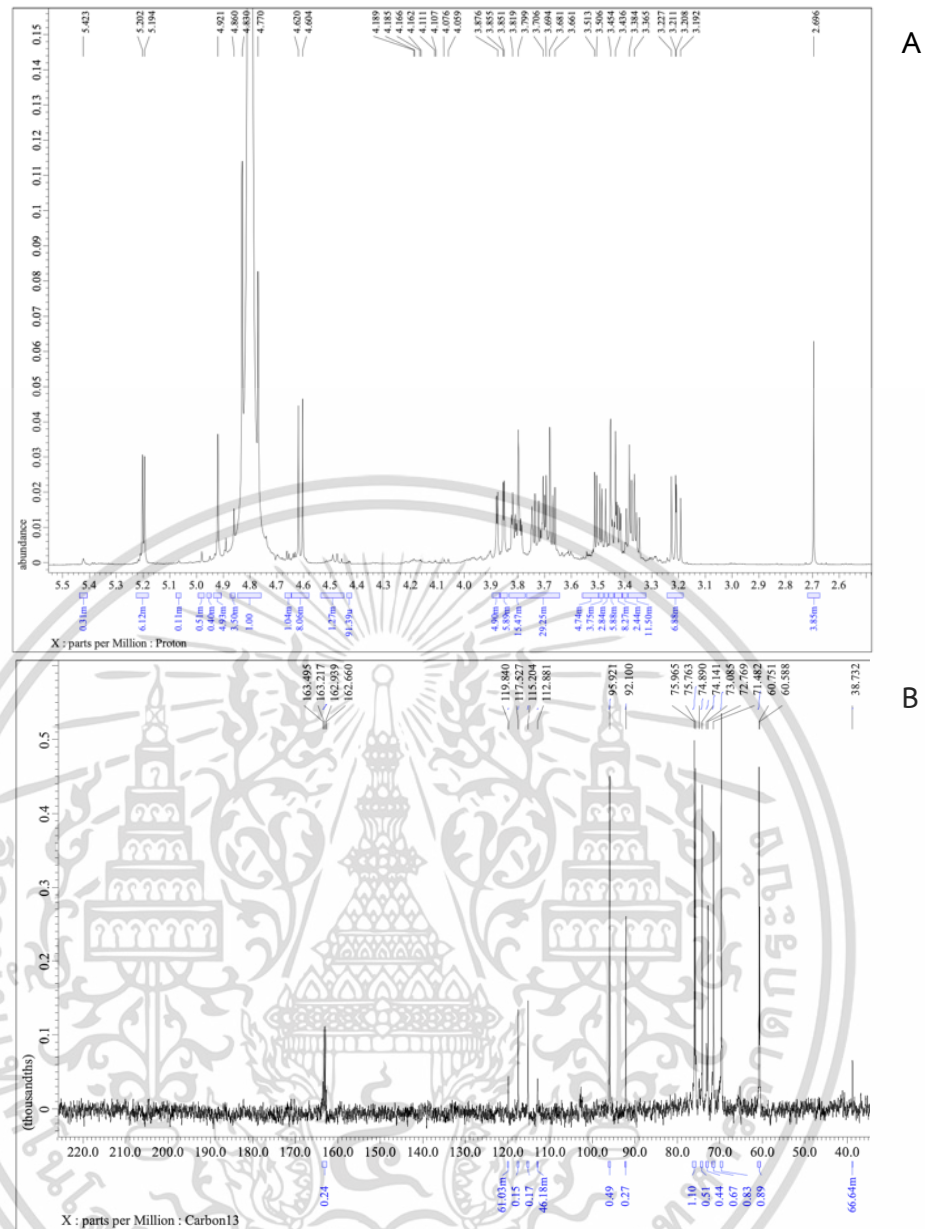
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Parthasarathy et al., 2021; Ji and Meng., 2013) เนื่องจาก *Pythium* spp. และ *Phytophthium* spp. เป็นสกุลของสิ่งมีชีวิตคล้ายราที่อยู่ในคลาส oomycetes โดยมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกลูแคนเป็นหลักคิดเป็น 85% ของโครงสร้างผนังเซลล์และเซลลูโลส โดยในจำนวนกลูแคน 85% พบว่าเป็น (1,3)(1,6) betaglucan 18.4% (1,3) betaglucan 19.7% และ (1,4) betaglucan 33.6% ซึ่งทำให้กลูแคนที่ได้ มีความแตกต่างจากของยีสต์ ซึ่งเป็นเชื้อรา ที่ผนังเซลล์ประกอบด้วยไคตินเป็นหลัก (Rzeszutek, 2019) ดังนั้นโครงสร้างที่ได้จึงน่าจะมีความใกล้เคียงกับสาหร่ายมากกว่า ส่วนเบต้ากลูแคนที่ได้มีเฉพาะเบต้ากลูแคนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ (1,3)(1,6) betaglucan เนื่องจากการสกัดตามวิธีของ Tondolo et al. (2017) เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากการสกัดยีสต์เพื่อให้ได้เบต้ากลูแคนที่บริสุทธิ์ ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดจึงมีการสกัดโปรตีนและส่วนของเบต้ากลูแคนที่ละลายน้ำได้ออกไปด้วย

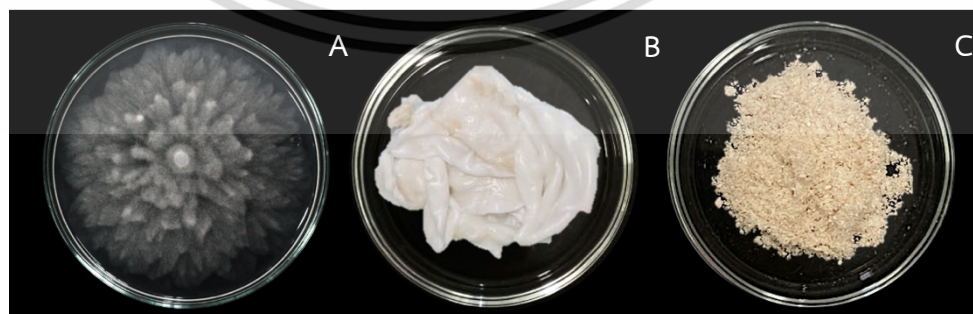


ภาพที่ 4.25 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ATR-FTIR spectra of the 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.26 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) โดย A: การแตกตัวของอะตอมโปรตอน ( $H^1$ ); B: การแตกตัวของอะตอมคาร์บอน ( $C^{13}$ )



ภาพที่ 4.27 ลักษณะของเส้นใยริสพอร์ทีและเบต้ากลูแคนริสพอร์ทีจาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. A: โคลนีนบนอาหาร PDA; B: โคลนีนบนอาหาร V8B และ C: เบต้ากลูแคนที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเส้นใยที่มีเบต้ากลูแคน

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเบต้ากลูแคน หลังจากการทดสอบการเจริญเติบโตเพื่อคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยการวัดน้ำหนักแห้งและปริมาณเบต้ากลูแคนหลังจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร 3 ชนิดคือ V8B, PDB และ CMB และความเข้มข้นน้ำตาลระดับต่างกันคือ 0%, 2%, 4% และ 8% พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8% เชื้อมีการผลิตเส้นใยมากที่สุดคือ 1.6 g รองลงมาคืออาหาร PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8% ผลิตเส้นใยได้ 1.4 g และพบว่าที่อาหาร CMB ในทุกความเข้มข้นของน้ำเชื้อมีการผลิตเส้นใยต่ำที่สุด ในการวัดปริมาณเบต้ากลูแคนเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CMB มีการเจริญเติบโตต่ำ การวัดปริมาณกลูแคนจึงวัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ V8B และ PDB ในการนำมาวัดปริมาณเบต้ากลูแคนเท่านั้น โดย พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8% และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 0% ส่งผลต่อการสร้างเบต้ากลูแคนมากที่สุดไม่แตกต่างกัน รองลงมาคือ PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 2%, PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8%, V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 2%, PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 4%, V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8% และ V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ทำให้เส้นใยเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณเบต้ากลูแคนนั้นไม่เป็นไปในทางเดียวกัน โดยอาหารที่ทำให้เส้นใยที่มีปริมาณมากอาจไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเบต้ากลูแคน ดังนั้นการผลิตเบต้ากลูแคนจึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณของน้ำตาลและอาหารที่เหมาะสม จากการทดสอบพบว่าอาหารที่ดีที่สุดที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเบต้ากลูแคน คือ PDB ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 0% และ V8B ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 4% ซึ่งความแตกต่างของอาหารทั้ง 2 ชนิดที่สังเกตได้ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เชื้อจะเจริญได้เฉพาะส่วนของเส้นใย ในทางกลับกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8B เชื้อสามารถเจริญได้ทั้งเส้นใยและมีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ด้วย โดยการศึกษาของ Melida et al. (2018) พบว่าเบต้ากลูแคนเป็นส่วนประกอบหลักทั้งเส้นใยและส่วนขยายพันธุ์ โดยพบการผลิตกลูแคนได้ที่บริเวณเส้นใยมากถึง 60% และพบในส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ที่ 40% ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ V8B เส้นใยบางส่วนมีการหยุดเจริญเพื่อพัฒนาตัวเองเป็นส่วนขยายพันธุ์จึงทำให้ปริมาณเบต้ากลูแคนที่วัดได้มีปริมาณลดลง โดยผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอาจมีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของเส้นใย และองค์ประกอบภายในของเชื้อรา รวมไปถึงมีส่วนสำคัญในการช่วยลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อราลงได้ (Jayasekara et al., 2022) นอกจากนี้การคัดเลือกอาหารที่ทำให้ได้เส้นใยและปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์สูง อาจมีส่วนช่วยให้มีเบต้ากลูแคนสูงขึ้นและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย (Esmalifar et al., 2021)

ตารางที่ 4.6 ชนิดของอาหารและการเพิ่มปริมาณน้ำตาลต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณเบต้ากลูแคน

ชนิดอาหาร	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (g)	ปริมาณเบต้ากลูแคน (%w/w) (g/100 g น้ำหนักแห้ง)
V8B		0.7 g	31.5 f
PDB	0%	0.3 h	51.5 a
CMB		0.2 i	No
V8B		1.1 f	39.4 c-d
PDB	2%	1.2 e	42.0 b
CMB		0.1 k	No
V8B		1.3 d	51.2 a
PDB	4%	1.4 c	39.1 d
CMB		0.2 j	No
V8B		1.6 a	37.6 e
PDB	8%	1.4 b	39.8 c
CMB		0.0 l	No
Mean		0.8	41.5
F-test		***	***
C.V.		1.6	2.9

No= Not determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การศึกษาคุณสมบัติของเบต้ากลูแคน

##### 4.4.1 คุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

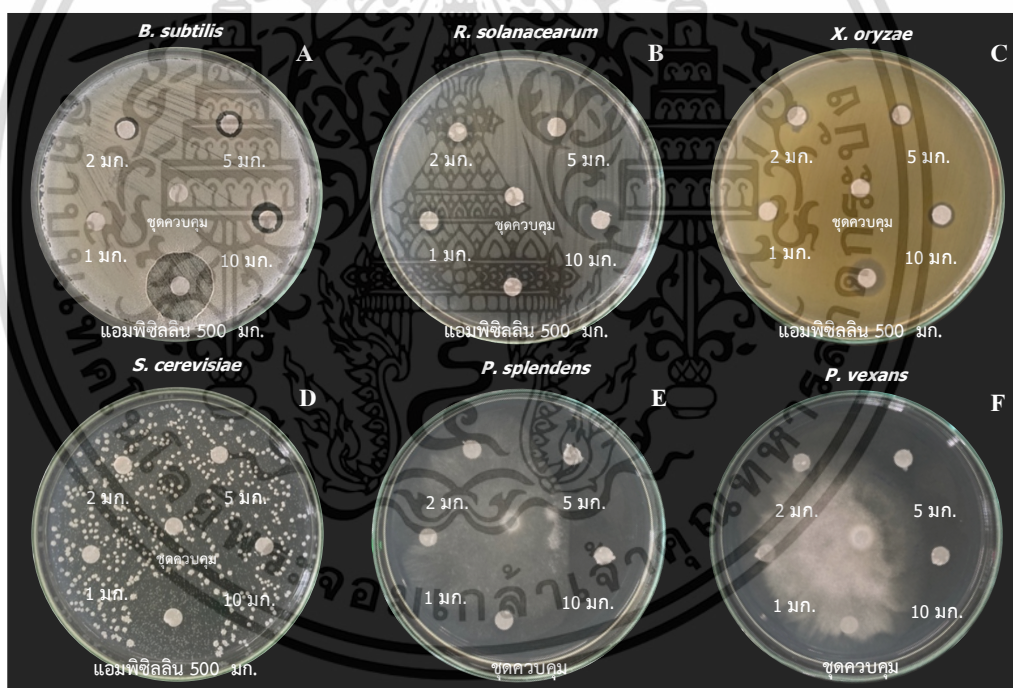
จากการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะของสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ความเข้มข้น 1-10 mg/ml เปรียบเทียบกับกระดาษกรองชุบสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 500 mg/ml (positive control) และกระดาษกรองไม่ชุบสาร (negative control) ในการส่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโดยวัดการเกิดวงใส (clear zone) รอบกระดาษกรองหลังจากบ่มเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่าเบต้ากลูแคนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearu* ได้ดีที่สุด โดยความเข้มข้น 1-10 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญและทำให้เกิดโซนยับยั้ง (inhibition zone) ได้สูงสุดที่ 11-17 mm รองลงมาคือ *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญได้ 9-12 mm และ *Xanthomonas oryzae* สามารถยับยั้งการเจริญได้ 9-11 mm. อย่างไรก็ตามการทดสอบใน *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเบต้ากลูแคนไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ในทุกความเข้มข้น การทดสอบในเชื้อ *Pythium splendens* และ *Pythium vexans* หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเบต้ากลูแคนที่ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/ml สามารถชะลอการเจริญของเชื้อราได้หลังการบ่ม 20 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามหลังบ่มเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงพบว่าเส้นใยของเชื้อ *Pythium splendens* และ *Pythium vexans* ยังเจริญเติบโตได้แต่มีลักษณะเส้นใยที่บางลงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.27 ตารางที่ 4.8)

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเบต้ากลูแคนที่สกัดจาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ กลไกที่เป็นไปได้ของฤทธิ์ต้านจุลชีพอาจเกิดจากการเกาะติดของอนุภาคกับพื้นผิวของแบคทีเรีย ซึ่งรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มแบคทีเรียอย่างถาวร และแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ต่อไปก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์จึงยับยั้งการทำงานของโปรตีน ซึ่งท้ายที่สุดจะนำไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ของแบคทีเรีย Ul Ashraf et al. (2021) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Parthasarathy et al. (2021) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria corticata*) ในรูปแบบเบต้ากลูแคนปกติและอนุภาคนาโน (B-GluNPs) พบว่าเบต้ากลูแคนแสดงการยับยั้งการเจริญสูงสุดใน *B. subtilis* (15 mm) ตามด้วย *S. aureus* (12 mm) *P. aeruginosa* (12 mm) และ *P. vulgaris* (10 mm) ตามลำดับผลลัพธ์ที่ได้แสดงถึงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียได้อย่างดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และยังสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (human mammary carcinoma: MCF-7) ได้ โดยผลการตายของเซลล์เนื่องมาจากเบต้ากลูแคนช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็งและลดการเกิดเนื้องอก โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) ในเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารต้านมะเร็งหลายชนิด Ul Ashraf et al. (2021) ศึกษาเบต้ากลูแคนจากแหล่งธัญพืชและเชื้อราในรูปแบบปกติและแบบอนุภาคนาโน พบว่าทั้งสองแหล่งมีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกตามลำดับ โดยพบว่าการพัฒนาเป็นรูปแบบอนุภาคนาโนสามารถยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพขึ้น ซึ่งงานวิจัยหลายฉบับจะนำเสนอเบต้ากลูแคนในรูปแบบอนุภาคนาโนเนื่องจากความสามารถในการแทรกซึมและทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ง่ายกว่า ส่งผลให้เกิดเขตการยับยั้งเป็นวงใส (clear zone) ที่ใหญ่ขึ้น การทดลองทางคลินิกเบต้ากลูแคนที่ได้จากเชื้อราในผู้ป่วยมะเร็ง รายงานว่าการให้ 1,6 betaglucan กับผู้ป่วยทั้งหมด 1,650 คนมีความปลอดภัยและทนต่อยาได้ดีและการให้ยาร่วมกับคีโมหรือรังสีบำบัดพบว่าช่วยลดภาวะซึมเศร้าทางภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการรักษาดังกล่าวและเร่งการฟื้นตัวของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว อย่างไรก็ตามแม้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่ที่ได้ผลดีจะมุ่งเน้นไปที่การต้านแบคทีเรียและยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง แต่ข้อสรุปดังกล่าวยังไม่เป็นที่เด่นชัด เนื่องจากผลการวิจัยบางอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความหลากหลายอย่างมากระหว่างวิธีการทดลองหรือการขาดข้อมูลที่ชัดเจน (Cerletti and Iacoviello, 2021) นอกจากงานวิจัยทางด้านแบคทีเรียและภูมิคุ้มกันยังมีหลายงานวิจัยที่ยังคงพยายามพัฒนาเบต้ากลูแคนเพื่อใช้เป็นยาฆ่าเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน (Kaminski, 2021; Hector and Bierer, 2011)



ภาพที่ 4.28 ประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนจาก non-pathogenic *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ A; *Bacillus subtilis*, B; *Ralstonia solanacearum*, C; *Xanthomonas oryzae*, D; *Saccharomyces cerevisiae*, E; *Pythium splendens*, F; *Pythium vexans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* sp. ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี paper disc diffusion

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (clear zone) ของเบต้ากลูแคนที่สกัดได้แต่ละไอโซเลท (mm)

		<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Phyto</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	
ความเข้มข้น (mg/ml)		<i>catenulatum</i>	<i>acanthicum</i>	<i>torulosum</i>	<i>diclinum</i>	<i>torulosum</i>	<i>cucurbitac</i>	<i>pythium</i>	<i>cucurbita</i>	<i>vexans</i>	<i>vexans</i>	<i>vexans</i>
		(CHS-10)	(RYS-7)	(RYS-10)	(RYS-16)	(KS-15)	<i>earum</i>	spp. (KS-5)	<i>cearum</i>	(NS-3)	(NS-9)	(NL-19)
							(RYS-20)		(KS-11)			
กระดาศกรองไม่ซุบสาร		6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
1	<i>Bacillus subtilis</i>	6.3 c	7.3 b	7.1 b	9.0 a	7.0 b	7.3 b	7.1 b	7.0 b	7.0 b	7.1 b	7.2 b
2		8.0 b	9.0 a	7.2 c	9.1 a	7.3 c	9.2 a	8.2 b	8.0 b	8.0 b	8.1 b	7.4 c
5		8.3 d	11.1 a	9.1 c	9.3 b-c	8.0 d	9.7 b	9.0 c	9.7 b	9.1 c	9.1 c	8.0 d
10		9.1 e	12.1 a	11.0 c	10.0 d	9.1 e	11.0 c	10.1 d	11.9 b	10.0 d	10.9 c	10.0 d
แอมพลีซิกลิน 500		21.1 c	22.1 b	19.1 e	19.2 e	22.1 b	18.1 f	20.0 d	20.2 d	20.3 d	23.3 a	13.1 g
กระดาศกรองไม่ซุบสาร			6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	10.0 b	11.1 a	11.2 a	10.1 b	9.0 c	11.0 a	11.2 a	9.0 c	11.0 a	9.2 c	9.2 c
2		11.1 b	11.1 b	11.0 b	12.1 a	10.1 c	11.2 b	11.2 b	10.2 c	11.1 b	9.4 d	10.0 c
5		12.2 c	11.1 d	11.2 d	14.2 a	13.1 b	11.2 d	11.1 d	11.0 d	11.1 d	9.5 e	11.1 d
10		14.1 c	11.0 e	11.1 e	17.1 a	14.1 c	11.3 e	11.2 e	13.3 d	11.1 e	9.6 f	15.1 b
แอมพลีซิกลิน 500		25.3 f	27.2 e	10.3 h	30.0 c	31.2 b	29.1 d	30.2 c	30.1 c	32.2 a	24.2 g	32.1 a

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (clear zone) ของเบต้ากลูแคนที่สกัดได้แต่ละไอโซเลท (mm)										
		<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Phyto</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	
ความเข้มข้น (mg/ml)		<i>catenulatum</i>	<i>acanthicum</i>	<i>torulosum</i>	<i>diclinum</i>	<i>torulosum</i>	<i>cucurbitac</i>	<i>pythium</i>	<i>cucurbitac</i>	<i>vexans</i>	<i>vexans</i>	<i>vexans</i>
		(CHS-10)	(RYS-7)	(RYS-10)	(RYS-16)	(KS-15)	<i>earum</i>	spp. (KS-5)	<i>earum</i>	(NS-3)	(NS-9)	(NL-19)
							(RYS-20)		(KS-11)			
กระดาศกรองไม่ซุบสาร	<i>Xanthomonas oryzae</i>	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
1		9.0 a	8.0 b	8.1 b	8.1 b	9.0 a	8.8 a	9.0 a	8.1 b	9.1 a	8.0 b	8.0 b
2		10.1 a	8.1 c	8.1 c	9.2 b	9.1 b	9.0 b	9.1 b	9.0 b	9.4 b	9.2 b	9.1 b
5		10.2 a	9.0 b	9.1 b	9.3 b	10.0 a	9.1 b	10.0 a	9.1 b	10.0 a	10.0 a	9.3 b
10		10.4 c	9.2 d	10.2 c	10.1 c	11.1 b	9.3 d	11.3 b	11.0 b	12.1 a	11.2 b	11.1 b
แอมพลิซิลิน 500		15.1 b	14.1 c	16.0 a	15.1 b	14.0 c	13.2 d	13.0 d	15.0 b	14.1 c	14.1 c	13.0 d
กระดาศกรองไม่ซุบสาร	<i>saccharomyces cerevisiae</i>	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
1		6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
2		6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
5		6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
10		6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a	6.0 a
แอมพลิซิลิน 500		32.1 c	29.3 e	33.0 b	34.0 a	30.0 d	32.0 c	30.0 d	34.0 a	32.1 c	30.0 d	30.1 d

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

		ขนาดรัศมีของเส้นใยที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) จากเบต้ากลูแคนที่สกัดได้แต่ละไอโซเลท (mm)										
		<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Phyto</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	<i>Ph.</i>	
ความเข้มข้น (mg/ml)		<i>catenulatum</i> (CHS-10)	<i>acanthicum</i> (RYS-7)	<i>torulosum</i> (RYS-10)	<i>diclinum</i> (RYS-16)	<i>torulosum</i> (KS-15)	<i>cucurbitac</i> <i>earum</i> (RYS-20)	<i>pythium</i> spp. (KS-5)	<i>cucurbitac</i> <i>earum</i> (KS-11)	<i>vexan</i> (NS-3)	<i>vexans</i> (NS-9)	<i>vexan</i> (NL-19)
กระดาศกรองไม่ชุบสาร	<i>Pythium splendens</i>	3.5 c	3.7 a	3.1 d	3.6 b	3.8 a	3.6 b	3.6 b	3.6 b	3.4 c	3.6 b	3.5 c
1		3.3 f	3.4 d-e	3.1 g	3.4 d-e	3.7 a	3.4 d-e	3.5 b-c	3.5 c-d	3.4 d-e	3.6 b	3.3 e-f
2		3.3 e	3.3 e	3.0 f	3.0 g	3.5 b	2.9 h	3.5 a	3.3 d	3.4 c	3.3 d	2.6 i
5		3.2 b	3.2 b	3.0 c	2.1 f	2.0 g	2.2 e	3.2 b	2.5 d	1.5 h	3.2 a	1.2 i
10		1.2 i	3.2 a	2.9 b	2.8 c-d	1.8 f	2.8 b-c	2.8 d	2.6 e	1.7 g	1.4 h	2.5 e
กระดาศกรองไม่ชุบสาร	<i>Phytophythium vexans</i>	2.9 b	2.9 c	2.9 c	2.9 a	2.9 c	2.9 b	2.9 b	2.9 c	2.8 d	2.8 e	2.9 c
1		2.8 c	2.3 i	2.7 d-e	2.9 a	2.7 f-g	2.8 b-c	2.8 b	2.7 e-f	2.6 g-h	2.6 h	2.7 d
2		2.8 a	2.2 e	2.2 e	2.6 b	2.4 d	2.8 a	2.8 a	2.6 b	2.6 b	2.5 c	2.6 b
5		2.5 b	2.1 f	1.9 g	2.5 b	1.8 h	2.3 d	2.1 f	2.4 c	2.4 c	2.6 a	2.2 e
10		1. h	2.0 d	2.1 b	1.6 f	1.7 e	1.5 h	1.6 g	2.2 a	1.7 e-f	2.1 c	1.7 e

#### 4.4.2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

จากการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดเบต้ากลูแคนทั้ง 11 ไอโซเลทด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (%) และวิธี ABTS radical scavenging activity assay (%) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารมาตรฐาน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ที่เป็นสารอนุพันธ์ของวิตามินอี (vitamin E derivative) พบว่า เบต้ากลูแคนสามารถสลายอนุมูลอิสระได้สูงทั้ง 2 วิธี โดยสารสกัดเบต้ากลูแคนสามารถปล่อยอะตอมไฮโดรเจนเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระในการทดสอบด้วยวิธี DPPH ได้ดีในทุกความเข้มข้นใน *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. ทุกไอโซเลทตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1, 2, 5 จนถึง 10 mg/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยผลที่ได้ไม่แตกต่างกันและการทดสอบด้วยวิธี ABTS ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกไซด์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เบต้ากลูแคนมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และที่ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/ml เบต้ากลูแคนฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง โดยทุกไอโซเลทมี %RSV ใกล้เคียงกัน และที่มีผลใกล้เคียงกับการสลายด้วยสารมาตรฐาน Trolox (ตารางที่ 4.9 และ 4.10 ภาพที่ 4.28-4.29) โดยอนุมูลอิสระ (Free Radical) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรที่เราพบเจอได้ทั่วไปในชีวิตประจำวัน จากภายนอก เช่น มลพิษในอากาศ ฝุ่น ควัน แสงแดด ความร้อน หรือแม้แต่อาหารที่เราบริโภคเข้าไป จากภายใน เช่น อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ซึ่งหากเราได้รับมากเกินไปอาจก่อให้เกิดโรคร้ายแรงต่างๆ ได้และอาจก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีสารต้านอนุมูลอิสระช่วยในการกำจัด โดยสารต้านมีทั้งร่างกายสร้างเองและได้รับจากภายนอก (Pham-Huy and Pham-Huy, 2008) ผลการทดสอบพบว่าเบต้ากลูแคนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (%) และวิธี ABTS radical scavenging activity assay (%) คล้ายคลึงกับหลายงานวิจัย เช่น งานวิจัยของ Shah et al. (2017) ที่ทำการศึกษาในข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ พบว่าเบต้ากลูแคนมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ส่งผลต่อความเสียหายของ DNA รวมไปถึงป้องกันความเสียหายของ DNA และลดเซลล์การเจริญของมะเร็งหลายชนิดรวมถึงต้านการเกิดเนื้องอก การศึกษาของ Upadhyay et al. (2022) ที่ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระจากเบต้ากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) พบว่าเบต้ากลูแคนมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและจะมีฤทธิ์สูงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณมากขึ้นและนอกจากนี้ยังพบว่ามีศักยภาพในการชะลอการเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกอีกด้วย โดยงานวิจัยของ Manabe and Yamaguchi, (2021) ได้อธิบายถึงความสัมพันธ์ของเบต้ากลูแคนและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เบต้ากลูแคนมีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน Dectin-1 ที่มีในสัตว์มีกระดูกสันหลังมากที่สุดถูกพิจารณาว่าเป็น beta-glucan receptor ที่มีส่วนร่วมในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของร่างกายที่จับกับเบต้ากลูแคนและช่วยให้เซลล์ภูมิคุ้มกันทำงานดีขึ้น BGRP/GNBP3 ที่จับกับ 1,3 beta-glucan กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดโดยการเปิดใช้งานเส้นทาง Toll (Toll-like Receptor:

TLR) ซึ่งเป็นหนึ่งใน pattern-recognition receptor (PRR) ที่สำคัญของร่างกาย เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Kofuji et al. (2012) ที่ทำการศึกษาเบต้ากลูแคนในข้าวบาเลย์ พบว่าแหล่งของเบต้ากลูแคน วิธีสกัดรวมถึงขนาดของโมเลกุล ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเบต้ากลูแคน ความสามารถในการกำจัด ROS เป็นคุณสมบัติที่ดีในการป้องกันโรคต่างๆ และป้องกันความชรา ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่า คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเบต้ากลูแคน สามารถใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณโพลีเมอร์สำหรับอาหารเสริม และสารเติมแต่งอาหารที่และคุณประโยชน์อื่นๆ ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในการเสริมสร้างสุขภาพ และความงาม จากงานวิจัยหลายฉบับชี้ให้เห็นว่าเบต้ากลูแคนนอกจากมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่น่าสนใจสามารถพัฒนาในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

**ตารางที่ 4.8** การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity assay)

ตัวอย่าง	DPPH Radical Scavenging (%) และ IC50				IC50*
	ความเข้มข้น (mg/ml)				
	%RSA (1)	%RSA (2)	%RSA (5)	%RSA (10)	
สารมาตรฐาน Trolox	72.6 a	80.5 a	86.5 a	88.7 a	<1
<i>Ph. vexans</i> NS-9	59.5 a-c	62.1 a-b	73.8 a-b	75.0 a-b	<1
<i>P. torulosum</i> KS-15	32.6 d	43.9 b-c	56.5 b	64.1 b	47.1
<i>Ph. cucurbitacearum</i> KS-11	45.3 b-d	51.5 b-c	64.0 b	72.7 a-b	16.5
<i>Ph. vexans</i> NS-3	57.9 a-c	65.8 a-b	74.4 a-b	74.7 a-b	<1
<i>Ph. vexans</i> NL-19	40.1 b-d	56.6 a-c	59.4 b	66.7 a-b	20.4
<i>Phytopythium</i> spp. KS-5	61.5 ab	64.0 a-b	76.9 a-b	78.0 a-b	<1
<i>P. acanthicum</i> RYS-7	58.7 a-c	60.8 a-b	70.9 a-b	71.8 a-b	<1
<i>P. torulosum</i> RYS-10	37.0 c-d	57.9 a-b	65.2 a-b	71.5 a-b	19.3
<i>P. diclinum</i> RYS-16	26.5 d	32.0 c	57.8 b	62.8 b	57.5
<i>Ph. cucurbitacearum</i> RYS-20	61.4 ab	68.7 a-b	77.0 a-b	77.3 a-b	<1
<i>P. catenulatum</i> CHS-10	47.0 b-d	61.7 a-b	64.5 b	69.3 a-b	<1
C.V.	24.1	23.2	16.5	16.0	

\*Inhibitory concentration (IC50)

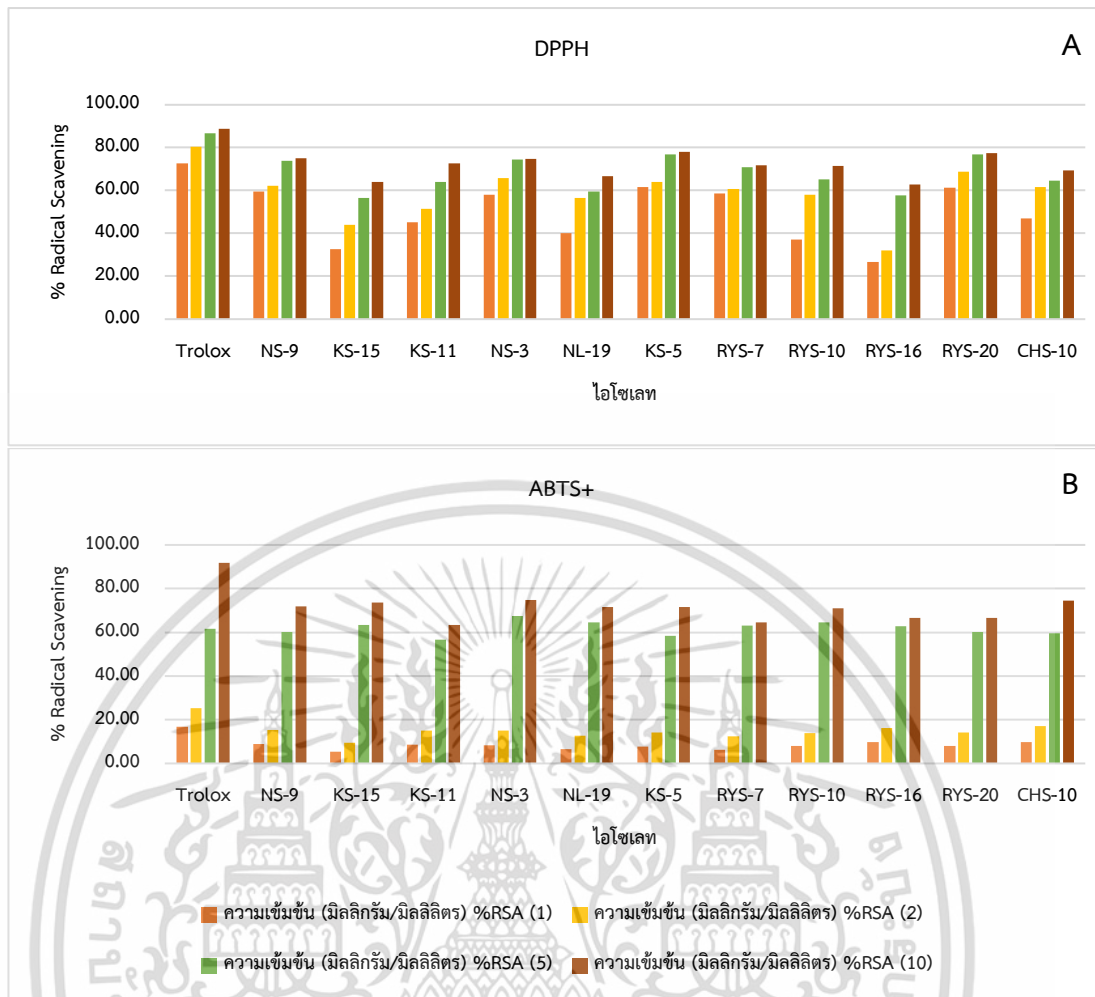
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging activity assay)

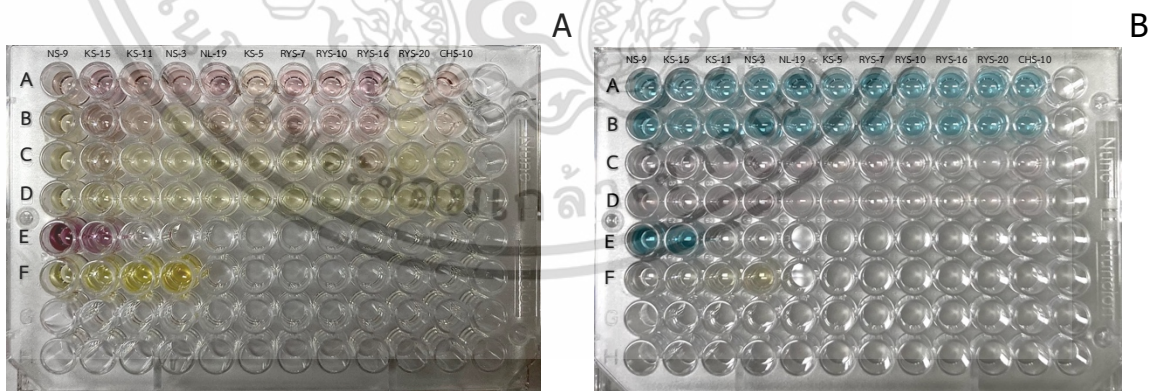
ตัวอย่าง	ABTS Radical Scavenging (%) และ IC50				IC50*
	ความเข้มข้น (mg/ml)				
	%RSA (1)	%RSA (2)	%RSA (5)	%RSA (10)	
สารมาตรฐาน Trolox	85.2 a	89.7 a	90.9 a	93.5 a	<1
<i>Ph. vexans</i> NS-9	10.0 b	18.1 b	60.2 e	74.9 b	57.4
<i>P. torulosum</i> KS-15	7.8 b	14.4 b	64.5 c-e	77.6 a-b	56.0
<i>Ph. cucurbitacearum</i> KS-11	9.1 b	18.0 b	61.6 d-e	71.8 b	58.7
<i>Ph. vexans</i> NS-3	9.4 b	16.9 b	68.0 b-c	78.3 a-b	53.5
<i>Ph. vexans</i> NL-19	8.9 b	15.5 b	64.4 c-e	77.0 a-b	55.7
<i>Phytophthium</i> spp. KS-5	11.1 b	19.6 b	68.3 b-c	78.4 a-b	52.2
<i>P. acanthicum</i> RYS-7	9.3 b	15.8 b	64.0 c-e	71.5 b	58.6
<i>P. torulosum</i> RYS-10	9.4 b	16.4 b	65.5 b-d	74.9 b	56.1
<i>P. diclinum</i> RYS-16	10.0 b	17.5 b	63.7 d-e	74.0 b	56.8
<i>Ph. cucurbitacearum</i> RYS-20	11.6 b	20.2 b	69.1 b	80.1 a-b	51.0
<i>P. catenulatum</i> CHS-10	10.8 b	17.1 b	64.6 c-d	74.3 b	56.2
C.V.	14.2	21.1	3.9	12.3	

\*Inhibitory concentration (IC50)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 แผนภูมิการต้านอนุมูลอิสระ A: DPPH Radical Scavening (%) B: ABTS Radical Scavening (%)



ภาพที่ 4.30 ไมโครเพลตแสดงความเข้มข้นของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ A: DPPH Radical Scavening (%) B: ABTS Radical Scavening (%) แถว A-D เบต้ากลูแคนความเข้มข้น 1 2 5 และ 10 mg/ml ตามลำดับ แถว E1-2 positive control แถว E3-4 negative control แถว F1-4 Trolox ความเข้มข้น 1 2 5 และ 10 mg/ml ตามลำดับ

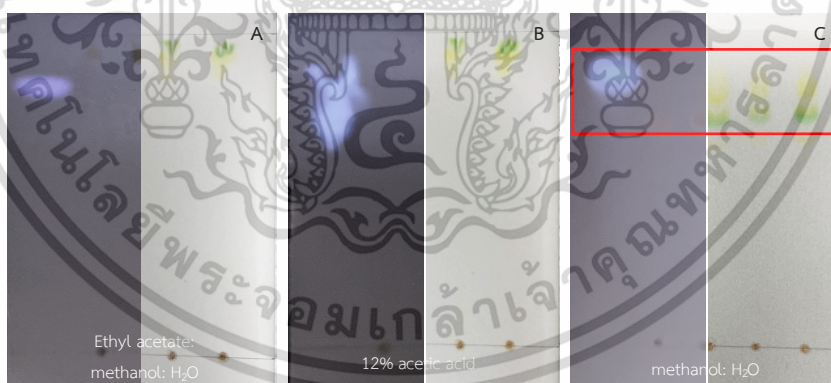
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.3 คุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitor)

การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพจากการเรืองแสงของสโคโปเลติน (Scopoletin) โดยทดสอบบนต้นกล้าทุเรียน พบว่าเบต้ากลูแคนสามารถกระตุ้นความต้านทานของพืชได้ และไม่ทำให้พืชเกิดความเสียหาย เมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นความต้านทานจากเชื้อก่อโรคนอกจากนี้การเปรียบเทียบระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) บนแผ่น TLC พบว่าตัวทำละลายเคลื่อนที่อย่างง่าย methanol: H<sub>2</sub>O สามารถแยกความแตกต่างของรงควัตถุสีเขียว สีเหลือง และสีน้ำเงินในพืชได้ดี ทำให้มองเห็นแบนการเรืองแสงได้ชัดเจนที่สุด ร่องลงมาคือ Ethyl acetate (EA): methanol: H<sub>2</sub>O ซึ่งสามารถมองเห็นการเรืองแสงสโคโปเลตินชัดเจน แต่มีความสามารถในการแยกสีรงควัตถุในพืชต่ำและที่ 12% acetic acid พบว่าการเรืองแสงที่ได้มีการกระจายตัว และความสามารถในการแยกสีรงควัตถุในพืชต่ำ (ภาพที่ 4.30) อย่างไรก็ตามหลังการทดสอบที่ 7 วันพบการเรืองแสงบนแผ่น TLC 4 เลน คือ สารมาตรฐานสโคโปเลติน ต้นควบคุมที่ทำแผลและไม่ปลูกเชื้อ (negative control) ต้นควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora* (positive control) และต้นที่ทำการทดสอบด้วยเบต้ากลูแคน โดยมีค่า Rf ที่ได้เท่ากับ 0.81 ซึ่งพบว่าต้นควบคุมที่ทำแผลและไม่ปลูกเชื้อเกิดการเรืองแสงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.31A) อาจเป็นไปได้ว่าการปลูกเชื้อโดยการทำแผลเชิงกลอาจส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการแสดงกลไกการป้องกันตัวเองของพืชด้วย เนื่องจากยีนที่ควบคุมการกระตุ้นการป้องกันในพืชบางตัวอาจมีการทับซ้อนกัน (Leonardo et al., 2011; Cheong et al., 2002) ซึ่งการแสดงออกของกลไกการป้องกันจะลดลงในช่วงหลัง และหลังจากการทดสอบที่ 14 วันพบการเรืองแสงบนแผ่น TLC 3 เลน คือ สารมาตรฐานสโคโปเลติน ต้นควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora* (positive control) และต้นที่ทำการทดสอบด้วยเบต้ากลูแคน โดยมีค่า Rf ที่ได้เท่ากับ 0.81 และต้นควบคุมที่ทำแผลและไม่ปลูกเชื้อ (negative control) ไม่ปรากฏการเรืองแสงบนแผ่น TLC (ภาพที่ 4.31B) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tongon and Soyong (2012) ที่กระตุ้นการสร้างสโคโปเลตินโดยทำการทดสอบบนต้นกล้าทุเรียนได้ค่า Rf เท่ากับ 0.75 เนื่องจากสโคโปเลตินที่เป็นสารไฟโตเอเล็กซินที่พืชผลิตขึ้น เนื่องจากถูกกระตุ้นเพื่อป้องกันตัวจากการถูกเข้าทำลายต่างๆ เป็นสารประกอบคูมารินอย่างง่ายที่ได้มาจาก 1,2-benzopyrones ซึ่งมีพันธะคู่ที่เชื่อมกัน สามารถต้านรังสีอัลตราไวโอเล็ต และดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งแสดงการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเล็ต 365 nm. ทำให้เห็นเป็นจุดเรืองแสงบนแผ่น TLC (Firmansyah et al., 2021) โดยจากการทดลองการปลูกเชื้อด้วย *Pythium splendens* และ *Phytophthora palmivora* แม้จะกระตุ้นการแสดงออกการป้องกันของพืช แต่ก็ยังคงทำให้พืชเป็นโรคและเกิดการลุกลามของแผลเมื่อเปรียบเทียบกับเบต้ากลูแคน ซึ่งพบว่ารอยแผลเกิดการสมานกันและยังคงทำให้พืชสุขภาพดี จากการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของพืชเกิดจากยีนหลายชนิดพบว่าหนึ่งในการกระตุ้นการแสดงออกอาจเกิดจากยีน PR-2 เช่น b-1,3-endoglucanases ซึ่งมีอยู่ในพืชช่วยในการไฮโดรไลซ์ โดย 1,3 beta-glucans ที่ทำการสกัดออกมาซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของ oomycetes ซึ่งอาจออกฤทธิ์โดยตรงโดยการยับยั้งการ

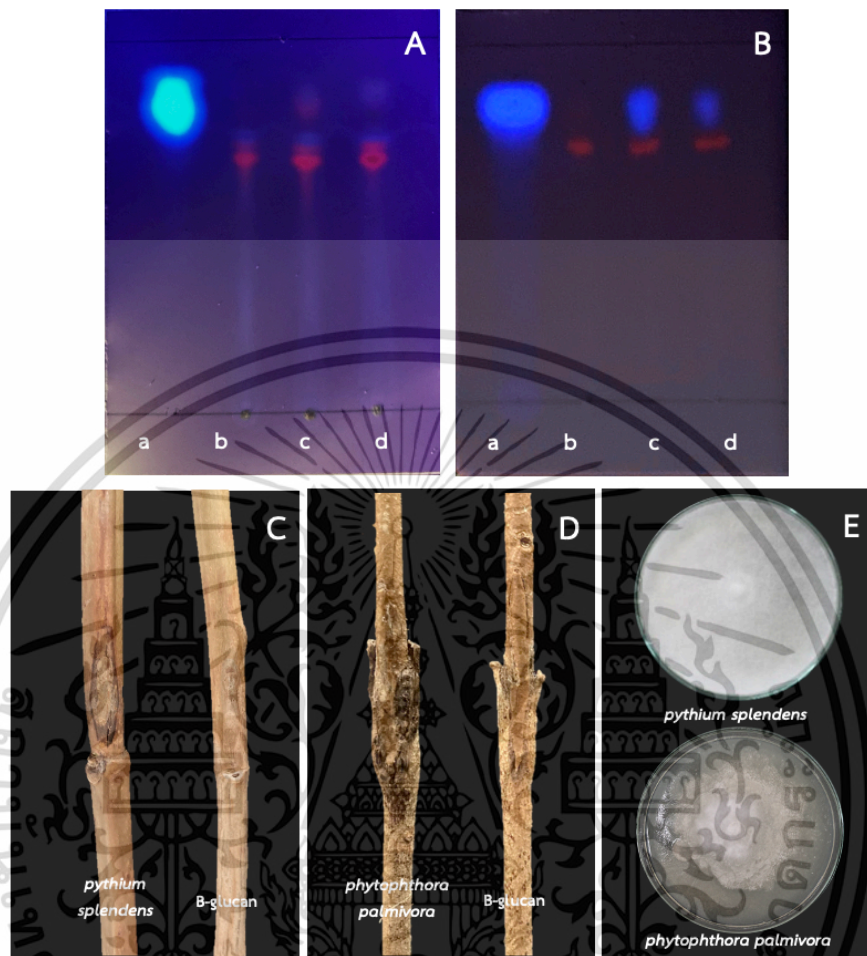
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือโดยอ้อมโดยช่วยในการสร้างโมเลกุลสัญญาณที่อาจทำหน้าที่เป็น ตัวกระตุ้นกลไกการป้องกันเพิ่ม (Chakraborty, 2008) นอกจากนี้การศึกษาคุณสมบัติการเป็น ตัวกระตุ้นทางชีวภาพของเบต้ากลูแคนยังสอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับ เช่น Klarzynski et al. (2000) ที่ศึกษาการใช้ 1,3 betaglucans ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Laminaria digitata* เป็น ตัวกระตุ้นทางชีวภาพในการตอบสนองการป้องกันในเซลล์ยาสูบอย่างรวดเร็วต่อเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ส่งผลให้การติดเชื้อลดลง Shinya et al. (2006) รายงานว่า (1,3)(1,6) betaglucans ที่แยกได้จาก *Alternaria alternata* ช่วยในการกระตุ้นการป้องกันใน ยาสูบ Sun et al. (2019) พบว่า 1,3 betaglucan ควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่เกี่ยวข้องกับ การป้องกันตนเองได้แก่ *PR1*, *GLU*, *endoGLU9*, *CHI4*, *endoCHI*, *PR4*, *PR5*, *CHI3* และ *PAL* ได้อย่างชัดเจนซึ่งช่วยทำให้เกิดความต้านทานโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวและ Anusuya and Sathiyabam (2015a; 2015b) พบว่าเบต้ากลูแคนที่ในรูปแบบนาโนช่วยกระตุ้นการป้องกัน การแสดงออกของยีนและลดอัตราการเน่าของขมิ้นที่เกิดจาก *Pythium aphanidermatum* ลงอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เกิดการแสดงออกทางสรีระวิทยาโดยการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ป้องกันตนเอง เช่น peroxidases (E.C.1.11.1.7), polyphenol oxidases (E.C.1.14.18.1), protease inhibitors (E.C.3.4.21.1) และ beta 1,3 glucanases (E.C.3.2.1.39) เป็นต้น แม้ว่าเบต้ากลูแคนไม่ได้มีบทบาทโดยตรงต่อการเข้าทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค แต่มันสามารถเป็นตัวกระตุ้นความต้านทาน และกระตุ้นการตอบสนองการป้องกันต่อจุลินทรีย์โรคพืชได้



ภาพที่ 4.31 แผ่น TLC ที่แสดงการเรียงแสงของสตีโกสเตอรอลและสควาลีนในใบพืชที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่างกัน A: Ethyl acetate: methanol: H<sub>2</sub>O , B: 12% acetic acid, C: methanol: H<sub>2</sub>O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.32 ผลการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ โดย A-B: แผ่น TLC ที่แสดงการเรืองแสงของสโคโฟเลติน ในต้นกล้าทุเรียนที่ 7 และ 14 วัน ตามลำดับ (a: สารมาตรฐานโคโฟเลติน b: ต้นควบคุมที่ไม่ทำการกระตุ้น c: ต้นควบคุมที่ทำการทดสอบด้วยเชื้อ *Pythium* spp. d: ต้นที่ทำการทดสอบด้วยเบต้ากลูแคน); C: หลังการปลูกเชื้อบนต้นกล้าทุเรียน 30 วัน; D: หลังการปลูกเชื้อบนต้นกล้าทุเรียน 30 วัน; E: โคลนเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

แยกเชื้อ *Pythium* spp. และสกุลใกล้เคียงจากแหล่งน้ำทะเล น้ำจืด และพื้นที่ป่าไม้ ในจังหวัด นครนายก และกาญจนบุรี ได้เชื้อทั้งหมด 39 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานและจัด จำแนกเบื้องต้นโดยดูจากโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive organs) พบว่าทั้ง 39 ไอโซ เลทมีลักษณะสัณฐานตรงกับเชื้อ *Pythium* spp. หรือสกุลใกล้เคียง การทดสอบความสามารถในการ ทำให้เกิดโรคเพื่อแยกสปีชีส์ที่ก่อโรค (pathogenic strain) กับสปีชีส์ที่ก่อโรครด้า (hypo-virulent strain) หรือไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) ได้ hypo-virulent strain จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อนำ hypo-virulent strain มาจัดจำแนกโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา พบว่าเชื้อที่ได้มีความใกล้เคียงกับ *Phytophythium vexans* 3 ไอโซเลท *Pythium torulosum* 2 ไอโซเลท *Phytophythium cucurbitacearum* 2 ไอโซเลท *Pythium declinum* 1 ไอโซเลท *Pythium acanthicum* 1 ไอโซเลท *Pythium catenulatum* 1 ไอโซเลท และ *Phytophythium* sp. unknow ไอโซเลท D37 1 ไอโซเลท จาก การวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนพบว่าเชื้อ *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. มีปริมาณ เบต้ากลูแคนอยู่ที่ 24-32 (%w/w) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) มี ปริมาณเบต้ากลูแคนอยู่ที่ 33 (%w/w) การวิเคราะห์โครงสร้างของเบต้ากลูแคนด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่าโครงสร้างที่ได้คือ (1,3)(1,6) beta-glucan ซึ่งใกล้เคียงกับ laminarin ซึ่งเป็นเบต้ากลูแคนที่พบ ในสาหร่ายสีแดงและสีน้ำตาล

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเบต้ากลูแคนโดยทำการทดสอบกับอาหาร เลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 juice broth (V8B), potato dextrose broth (PDB) และ cornmeal broth (CMB) ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลแตกต่างกัน คือที่ความเข้มข้น 0%, 2%, 4% และ 8% พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ V8B ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลเป็น 8% โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุด อย่างไรก็ตามการวัดปริมาณเบต้ากลูแคนที่ผลิตได้พบว่าอาหารที่ดี ที่สุดที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเบต้ากลูแคน คือ PDB ความเข้มข้นน้ำตาล 0% และ V8B ความเข้มข้น น้ำ4% โดยพบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเบต้ากลูแคนได้มากถึง 51.5 และ 51.2 (%w/w) ตามลำดับ การ ทดสอบประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. ในการ เป็นสารปฏิชีวนะพบว่าเบต้ากลูแคนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas oryzae* ได้ ส่วนเชื้อในกลุ่ม oomycetes สามารถยับยั้งเชื้อ *Pythium splendens* และ *Pythium vexans* อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญ ของ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

DPPH radical scavenging activity assay (%) และวิธี ABTS radical scavenging activity assay เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(%) พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1 mg/ml จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ 10 mg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเบต้ากลูแคนที่ได้จากเชื้อ *Pythium* และสกุลใกล้เคียง ยังมีคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (elicitor) การวัดด้วย Thin-layer chromatography (TLC) ยังแสดงให้เห็นว่าเบต้ากลูแคนสามารถชักนำให้เกิดการสร้างสารสโคโปเลติน ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินในต้นกล้าทุเรียนที่ต่อต้านการเกิดโรค (defensive compound) ได้ การศึกษานี้เผยให้เห็นว่าเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Pythium* spp. หรือสกุลใกล้เคียง อาจเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมเบต้ากลูแคนที่มีประสิทธิภาพทั้งในแง่ปริมาณผลผลิต คุณภาพ และศักยภาพที่ดีในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาพบว่าเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จาก *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. สารที่ได้มีปริมาณใกล้เคียงหรือมากกว่าหลายงานวิจัยที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ รวมถึงมีความบริสุทธิ์เนื่องจากผนังเซลล์มีส่วนประกอบของกลูแคนสูงและมีคาร์โบไฮเดรตต่ำ นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในพืชได้ คุณสมบัติต่างๆ ที่ได้กล่าวถึงนี้สามารถนำไปศึกษาและใช้ต่อยอดในด้านอื่นๆ ได้อีก เช่น การนำไปลดขนาดอนุภาคให้อยู่ในรูปแบบอนุภาคนาโนเพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์และง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ การนำไปผสมกับสารชนิดอื่นหรือการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคนหรือสารชนิดนั้นๆ เป็นต้น ดังนั้นเบต้ากลูแคนแหล่งใหม่ที่ได้จาก hypo-virulent *Pythium* spp. และ *Phytophythium* spp. อาจเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีได้ในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- วิจัย รักรัทธิวิทยาศาสตร์. 2551. **ราวิทยาเบื้องต้น**. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรมหาวิทาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 182-234.
- สมศักดิ์ วรคามิน. 2553. **เบต้ากลูแคน Beta Glucan ดีที่สุดในโลกที่มนุษย์เคยค้นพบ**. 1. สามเจริญพาณิชย์, ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 314 หน้า.
- วิทยา กตุมาภะ. 2559. **เบต้ากลูแคน เสริมภูมิคุ้มกัน**. 1. เพชรประกาย, กรุงเทพฯ. 176 หน้า
- Ahmad, A., Munir, B., Abrar, M., Bashir, S., Adnan, M., and Tabassum, T. 2012. Perspective of B-glucan as functional ingredient for food industry. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. 2(2).
- akenaka, S., and Tamagake, H. 2009. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. **Journal of General Plant Pathology**. 75: 340-348.
- 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(3): 365-370.
- Ali-Shtayeh, M. S., and Saleh, A. S. 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(3): 143-153.
- Anusuya, S., and Sathiyabama, M. 2014. Preparation of B-d-glucan nanoparticles and its antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. 70: 440-443.
- Anusuya, S., and Sathiyabama, M. 2015. Foliar application of B-D-glucan nanoparticles to control rhizome rot disease of turmeric. **International journal of biological macromolecules**. 72: 1205-1212.
- Anusuya, S., and Sathiyabama, M. 2015. Protection of turmeric plants from rhizome rot disease under field conditions by B-D-glucan nanoparticle. **International Journal of Biological Macromolecules**. 77: 9-14.
- Aronson, J. M., Cooper, B. A., and Fuller, M. S. 1967. Glucans of oomycete cell walls. **Science**. 155(3760): 332-335.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., Wua, G., Zhanga, H., Qia, X., Xue, M., and Rao, Z. 2019. Physiological functionalities and mechanisms of B-glucans. **Trends in Food Science & Technology**. 88: 57-66.
- Baten, M., Mingzhu, L., Motohashi, K., Ishiguro, Y., Rahman, M. Z., Suga, H. and Kageyama, K. 2015. Two new species, *Phytopythium iriomotense* spp. nov. and *P. aichiense* spp. nov., isolated from river water and water purification sludge in Japan. **Mycological progress**. 14(2): 1-12.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., and Sekimoto, S. 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete "fungi". **Protoplasma**. 249(1): 3-19.
- Better Way Health. 2018. **How Much Beta Glucan Should I Take**. Retrieved November 4, 2020. from <https://blog.betterwayhealth.com/faq/beta-glucan-dosage/>.
- Protection. 50(5-6): 286-302.
- Bikmurzin, R., Bandzevičiute, R., Maršalka, A., Maneikis, A., & Kalediene, L. 2022. FT-IR method limitations for B-glucan analysis. **Molecules**. 27(14): 4616.
- Brožová, J. A. N. A. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. **Plant Protection Science**. 38(1): 29-35.
- Cerletti, C., Esposito, S., and Iacoviello, L. 2021. Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health. **Nutrients**. 13(7). 2195.
- Chakraborty, B. N. 2008. Plant defense proteins. **NBU Journal of Plant Sciences**. 2: 1-12
- Cojocar, S. I., Anton, M., Stan, M., Ciomea, E., GHIORGHITA, G., Dinischiotu, A., and Stoian, G. 2010. Studies regarding the analysis of different extraction conditions for the separation of *Chelidonium majus* L. alkaloids. *Analele Stiintifice ale Universitatii" Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara*. 11(4).
- 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.
- Deacon, J. W. 1979. Cellulose decomposition by *Pythium* and its relevance to substrate-groups of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. 72(3): 469-477.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. 1994. **Basic Plant Pathology Methods**. 2nd ed. CRC Press: Baton Rouge, FL, USA.
- Du, B., Bian, Z., and Xu, B. 2014. Skin health promotion effects of natural B-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. **Phytotherapy Research**. 28(2): 159-166.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Du, B., Meenu, M., Liu, H., and Xu, B. 2019. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of B-Glucan. **International Journal of Molecular Sciences**. 20(16): 4032.
- Esmaelifar, M., Hatamian-Zarmi, A., Alvandi, H., Azizi, M., Mokhtari-Hosseini, Z. B., and Ebrahimi-Hoseinzadeh, B. 2021. Optimization of Antioxidant Activities and Intracellular Polysaccharide. **Applied Food Biotechnology**. 8(4): 297-306
- European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. **European Food Safety Authority Journal**. 7(10): 1254.
- 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. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**. 125(1): 1-15.
- Fesel, P. H., and Zuccaro, A. 2016. B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**. 90: 53-60.
- Firmansyah, A., Winingsih, W. and Manobi, J. D. Y. 2021. Review of scopoletin: Isolation, analysis process, and pharmacological activity. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. 11: 12006-12019.
- Food and Drug Administration, HHS. 2008. Food labeling: health claims; soluble fiber from certain foods and risk of coronary heart disease. Interim final rule. **Federal Register**. 73(37): 9938.
- Gayoung Seo., Changlim Hyun., Seungin Choi., Young Mee Kim., and Moonjae Cho. 2019. The wound healing effect of four types of beta-glucan. **Applied Biological Chemistry**. 62(1): 20.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., and Rey, P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. **Environmental Science and Pollution Research**. 21: 4847-4860.

- Giesemann, A., Biehl, B., and Lieberei, R. 1986. Identification of Scopoletin as a Phytoalexin of the Rubber Tree *Hevea brasiliensis*. **Journal of Phytopathology**. 117(4): 373-376.
- Glenn Facey. 2014. **Chemical Exchange Agents to Simplify NMR Spectra**. University of Ottawa NMR Facility Blog. A blog for the NMR users at the University of Ottawa and all others interested in NMR spectroscopy.
- Gnonlonfin, G. B., Sanni, A., and Brimer, L. 2012. Review scopoletin—a coumarin phytoalexin with medicinal properties. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 31(1): 47-56.
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. 1997. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of organic chemistry**. 62(21): 7512-7515.
- Hector, R. F., and Bierer, D. E. 2011. **New B-glucan inhibitors as antifungal drugs**. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 21(10): 1597-1610.
- Ho, H. H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. **Journal Bacteriology and Mycology**. 6: 00174.
- Jayasekara, L. C. B., Poonsawad, A., Watchaputi, K., Wattanachaisaereekul, S., and Soontorngun, N. 2022. Media optimization of antimicrobial activity production and beta-glucan content of endophytic fungi *Xylaria* spp. BCC 1067. **Biotechnology Reports**. 35: e00742.
- Ji, C. F., Ji, Y. B., and Meng, D. Y. 2013. Sulfated modification and anti-tumor activity of laminarin. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 6(5): 1259-1264.
- Jukes, T. H., and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. **Mammalian protein metabolism**. 3: 21-132.
- Kaminski, K., Skora, M., Krzysciak, P., Staczek, S., Zdybicka-Barabas, A., and Cytrynska, M. 2021. Synthesis and Study of Antifungal Properties of New Cationic Beta-Glucan Derivatives. **Pharmaceuticals**. 14(9): 838.
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Mushtaq, U., and Naik, A. S. 2017. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of B-glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus attrimentarius*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. 11: 67-74.
- Kim, Y. T., Kim, E. H., Cheong, C., Williams, D. L., Kim, C. W., and Lim, S. T. 2000. Structural characterization of B-D-(1→3, 1→6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate research**. 328(3): 331-341.

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., and Stalpers, J. A. 2008. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi**. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 318.
- Kirmaz, C., Bayrak, P., Yilmaz, O., and Yuksel, H. 2005. Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study. **European Cytokine Network**. 16(2): 128-134.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B. 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant physiology**. 124(3): 1027-1038.
- Kluge, A. G., and Farris, J. S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. **Systematic Biology**. 18(1): 1-32.
- Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., and Murata, Y. 2012. Antioxidant Activity of B-Glucan. **ISRN pharmaceuticals**. 2012: 125864.
- Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., and Osada, M. 2017. NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble B-1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate polymers**. 174: 876-886.
- Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann, V., Pose, G., and Wagner, J. R. 2013. B-Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. **Applied biochemistry and microbiology**. 49: 41-45.
- Leonardo P. Boava., Mariângela Cristofani-Yaly., Rodrigo M. Stuart., and Marcos A. Machado. 2011. Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*. **Physiological and molecular plant pathology**. 76(2): 0-125.
- Lerch-Olson, E. R., Dorrance, A. E., and Robertson, A. E. 2020. Resistance of the SoyNAM parents to seed and root rot caused by four *Pythium* species. **Plant Disease**. 104(9): 2489-2497.
- Levesque, C. A., and De Cock, A. W. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological research**. 108(12): 1363-1383.
- Liu, J., Zhang, X., Zhang, J., Yan, M., Li, D., Zhou, S., and Liu, Y. 2022. Research on extraction, structure characterization and immunostimulatory activity of cell wall polysaccharides from *Sparassis latifolia*. **Polymers**. 14(3): 549.
- Manabe, N., and Yamaguchi, Y. 2021. 3D structural insights into B-glucans and their binding proteins. **International Journal of Molecular Sciences**. 22(4): 1578.

- Masago, H. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. **Phytopathology**. 67: 425-428.
- McCleary, B. V., and Codd, R. 1991. Measurement of (1→3), (1→4)-B-D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 55(2): 303-312.
- McCleary, B. V., and Draga, A. 2016. Measurement of B-glucan in mushrooms and mycelial products. **Journal of AOAC International**. 99(2): 364-373.
- Melida, H., Sopeña-Torres, S., Bacete, L., Garrido-Arandia, M., Jordá, L., Lopez, G., and Molina, A. 2018. Non-branched B-1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. 93(1): 34-49.
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., and Laffey, J. G. 2020. B-glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. **Journal of Fungi**. 6(4): 356.
- Nam, B. and Choi, Y. J. 2019. *Phytopythium* and *Pythium* species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. **Mycobiology**. 47(3): 261-272.
- Nicolosi, R., Bell, S. J., Bistrrian, B. R., Greenberg, I., Forse, R. A., and Blackburn, G. L. 1999. Plasma lipid changes after supplementation with B-glucan fiber from yeast. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 70(2): 208-212.
- Novak, M., and Vetvicka, V. 2008. B-Glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**. 5(1): 47-57.
- Parthasarathy, R., Kumar, S. P., Rao, H. Y., and Chelliah, J. 2021. Synthesis of B-Glucan Nanoparticles from Red Algae-Derived B-Glucan for Potential Biomedical Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 193: 3983-3995.
- Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**. 4(2): 89.
- Plaats-Niterink, A. J. van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**. 21: 1-244.
- Rzeszutek, E. 2019. **Cell wall biosynthesis in the pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica***. Doctoral dissertation, KTH Royal Institute of Technology.
- Saelee, R., Busarakam, K., and Koohakan, P. 2022. Morphological and phylogenetic diversity of *Pythium* and related genera (Pythiaceae, Pythiales) from some areas in eastern Thailand. **Agriculture and Natural Resources**. 56(5): 945-956.

- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**. 4(4): 406-425.
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., & Machová, E. 1999. Microbial (1→3)-B-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate polymers**. 38(3): 247-253.
- 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.
- Senda, M., Kageyama, K., Suga, H., and Lévesque, C. A. 2009. Two new species of *Pythium*, *P. senticosum* and *P. takayamanum*, isolated from cool-temperate forest soil in Japan. **Mycologia**. 101(4): 439-448.
- Shah, A., Gani, A., Masoodi, F. A., Wani, S. M., and Ashwar, B. A. 2017. Structural, rheological and nutraceutical potential of B-glucan from barley and oat. **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**. 10: 10-16.
- Shinya, T., Ménard, R., Kozone, I., Matsuoka, H., Shibuya, N., Kauffmann, S., and Saito, M. 2006. Novel B-1, -3- 1,6oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. **The FEBS journal**. 273(11): 2421-2431.
- Slavov, S., Lyubenova, A., Kostov, K., and Christova, P. 2018. Oomycetes from genus *Pythium* found in water and soil samples in Bulgaria. **Journal of Mountain Agriculture on the Balkans**. 21(2): 161-171.
- Stier, H., Ebbeskotte, V., and Gruenwald, J. 2014. Immune-modulatory effects of dietary yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutrition Journal**. 13: 38.
- Stringlis, I. A., De Jonge, R., and Pieterse, C. M. 2019. The age of coumarins in plant-microbe interactions. **Plant and Cell Physiology**. 60(7): 1405-1419.
- Sun, C., Jin, L., Cai, Y., Zheng, X., and Yu, T. 2019. (1→3)-B-D-glucan from yeast cell wall: Characteristic and potential application in controlling postharvest disease of pear. **Postharvest Biology and Technology**. 154: 105-114.
- Temelli, F. 1997. Extraction and functional properties of barley B-glucan as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science**. 62(6): 1194-1201.
- Tkaczyk, M. 2020. Origin, differences and meaning in modern plant pathology. **Folia Forestalia Polonica**. 62(3): 227-232.

- Tongon R, K Soyong. 2022. Nanoparticles derived from active metabolites of *Chaetomium cupreum* CC3003 against *Phytophthora* rot of durian. **International Journal of Agriculture and Biology**. 27: 19-27.
- Tondolo, J. S. M., Ledur, P. C., Loreto, É. S., Verdi, C. M., Bitencourt, P. E. R., de Jesus, F. P. K., and Santurio, J. M. 2017. Extraction, characterization and biological activity of a (1,3) (1,6)- B-d-glucan from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Carbohydrate Polymers**. 157: 719–727.
- Ul Ashraf, Z., Shah, A., Gani, A., Gani, A., Masoodi, F. A., and Noor, N. 2021. Nanoreduction as a technology to exploit B-Glucan from cereal and fungal sources for enhancing its nutraceutical potential. **Carbohydrate Polymers**. 258: 117664.
- Upadhyay, T. K., Trivedi, R., Khan, F., Al-Keridis, L. A., Pandey, P., Sharangi, A. B., and Saeed, M. 2022. In vitro elucidation of antioxidant, antiproliferative, and apoptotic potential of yeast-derived B-1, 3-glucan particles against cervical cancer cells. **Frontiers in Oncology**. 12.
- Uzhashi, S., Tojo, M. and Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience**. 51: 337–365.
- Uzhashi, S., Okada, G., and Ohkuma, M. 2015. Four new *Pythium* species from aquatic environments in Japan. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 107: 375-391.
- Vannucci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F., Rajsiglova, L., and Saieh, M. 2013. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans. **International Journal of Oncology**. 43(2): 357-364.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. 2008. Dietary modulation of immune function by B-glucans. **Physiology and Behavior**. 94(2): 276–284.
- Zhu, F., Du, B., and Xu, B. 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**. 52: 275-288.
- Zlatković, D., Jakovljević, D., Zeković, Đ., and Vrvic, M. 2003. A glucan from active dry baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A chemical and enzymatic investigation of the structure. **Journal of the Serbian Chemical Society**. 68(11): 805-809.
- Zonneveld, B. J. M. 1974.  $\alpha$ -1, 3 glucan synthesis correlated with  $\alpha$ -1, 3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**. 81(2): 445-451.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว หนึ่งฤทัย ไหมพรหม
วัน เดือน ปีเกิด	25 กรกฎาคม พ.ศ. 2539
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/132 ซอยแจ้งวัฒนะ 10 ถนนแจ้งวัฒนะ แขวงทุ่งสองห้อง เขต หลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210
ประวัติการศึกษา	(2562) จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี ปริญญาหลักสูตรวิทยาศา ศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเกษตรศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง เกรดเฉลี่ย 3.74  (2564) จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี ปริญญาหลักสูตรนิติศาสตร บัณฑิต (น.บ.) สาขานิติศาสตร์ คณะนิติศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เกรดเฉลี่ย 2.81  (2566) จบการศึกษาในระดับปริญญาโท ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต หลักสูตรเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เกรดเฉลี่ย 3.93
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุนต่อเนื่องจนจบการศึกษาปริญญาตรี - ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาบัณฑิตเกียรตินิยม - ทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร(สวก.) ปีงบประมาณ 2564
ประสบการณ์การทำงานและ ผลงานวิจัย	- นำเสนอผลงานการประชุมวิชาการนานาชาติและตีพิมพ์วารสาร International Journal of Agricultural Technology หัวข้อเรื่อง "Characterization of <i>Phytophthium</i> and <i>Pythium</i> species from freshwater area based on morphological traits and ITS sequence"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้