ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก
Study on *Phytophthora* Species of Taro

อมรรัชฏ์ คิดใจเดียว[1/] พชร ธิตานนท์[1/] ดารณี เจริญผล[1/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/]
สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/] ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ พบว่าเป็น *Phytophthora colocasiae* ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก เลือกมา 10 ไอโซเลท ทำการสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง translation elongation factor โดยใช้ไพรเมอร์คู่ ELONGF1/ELONGF2 ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence และวิเคราะห์ชนิดเบื้องต้นพบว่าเชื้อราดังกล่าว คือ *Phytophthora colocasiae* การศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของราบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA), V8 juice agar (V8 A), Oat meal agar (OMA), Carrot agar (CA) และ Corn meal agar (CMA) พบว่า บนอาหาร CMA เส้นใยราเจริญได้รวดเร็ว แต่ให้เส้นใยบาง และไม่มีการสร้างสปอร์แรงเจียม ส่วนบนอาหาร PDA, V8A, OMA และ CA เส้นใยราเจริญได้ดีและมีการสร้างสปอร์แรงเจียม

คำหลัก : *Phytophthora* taro Taro leaf blight เผือก ใบจุดตาเสือ

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-01-60

คำนำ

เผือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) ประชากรของประเทศในเขตร้อนเกือบทั่วโลก รู้จักเผือกเป็นอย่างดี บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารหลัก บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารรอง ประเทศเหล่านั้นจึงปลูกเผือกเป็นพืชเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศ (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, ม.ป.ท.) สำหรับประเทศไทย เผือกถือเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญอีกพืชหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคเผือกเพราะมีกลิ่นหอมและรสชาติดี เป็นพืชหัวที่เป็นพืชอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง (มาลินี และคณะ, ม.ป.ท.) การปลูกเผือกมีทุกภาคของประเทศ ปี 2559/60 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 16,148 ไร่ ผลผลิตประมาณ 26,830 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2,836 กิโลกรัมต่อไร่ จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดสระบุรี นครปฐม เพชรบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2560)

โรคใบจุดตาเสือ (โรคใบไหม้; Taro leaf blight) อาการเริ่มแรกบนใบ เป็นจุดขี้แมลงวันเล็ก ๆ สีน้ำตาลเข้ม หรือจุดสีน้ำตาลอ่อน ปรากฏเห็นชัดบนผิวใบ (Brooks, 2005) จากแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวง ๆ ต่อกัน ลักษณะพิเศษ คือ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองข้น ซึ่งต่อมาแห้งเป็นเม็ด ๆ เกาะอยู่เป็นวง ๆ เมื่อบีบจะแตกเป็นผงละเอียด สีสนิม ในระยะที่รุนแรงแผลขยายติดต่อกัน และทำให้ใบม้วนพับเข้าและแห้งเหี่ยว หรืออาจเน่าเละถ้าอากาศชื้นมีฝนพรำ อาการบนก้านใบ จะเกิดแผลฉ่ำน้ำยาวรี สีน้ำตาลอ่อน แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวง ๆ เช่นกัน ต่อมาจะเน่า แห้ง เป็นสีน้ำตาล มีหยดสีเหลืองข้นด้วย ทำให้ก้านต้านทานน้ำหนักใบไม่ได้จึงหักพับ มีผลทำให้ใบแห้ง พบมากในระยะโรครุนแรง และมีลมพัด อาการเป็นระยะนี้ทำให้ผลผลิตลดลง และเชื้อนี้อาจเข้าทำลายหัวเผือกด้วยทำให้หัวเผือกเน่าเสียหายได้ โรคนี้เป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของเผือกที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ โรคนี้เริ่มระบาดเมื่อมีฝนตกและอากาศชุ่มชื้น ถ้ามีฝนตกหนักและติดต่อกันหลาย ๆ วัน โรคจะระบาดอย่างรวดเร็ว ในแปลงที่เป็นรุนแรง เผือกจะมีใบเหลืองประมาณต้นละ 3-4 ใบ เท่านั้น เผือกที่เป็นโรคนี้ถ้ายังไม่เริ่มลงหัวหรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดขึ้น ในช่วงที่หมอกลงจัดเผือกจะเป็นโรคนี้ได้ง่ายเช่นเดียวกัน (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555)

โรคแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีเมฆมากและฝนตกไม่สม่ำเสมอ อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และจะเกิดการระบาด เมื่อเวลากลางคืนมีอุณหภูมิต่ำต่อเนื่องกัน ประมาณ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซนต์ (Nath, *et al*., 2013)

P. colocasiae จัดอยู่ใน class Oomycetes family Pythiaceae ลักษณะของรานี้ เป็นราน้ำ เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น แตกกิ่งก้าน สร้างสปอร์ 4 ชนิด ได้แก่ sporangia เกิดบนก้าน sporangiophores มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่ใช้เพศให้กำเนิด zoospores ภายใน sporangium ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศให้กำเนิด oospores ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเพศผู้ (antheridium) และเพศเมีย (oogonium) และ chlamydospores เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospore และเส้นใยในพืชที่เป็นโรค เมื่อความชื้นเหมาะสมจะเกิด sporangia ให้กำเนิด zoospore ที่มีหางว่ายน้ำได้ เข้าทำลายพืชต่อไป (Erwin and Ribeiro, 1996)

P. colocasiae มีพืชอาศัยส่วนมากเป็นพืชพวก aroids (Araceae) รวมทั้ง พืชตระกูลเผือก [*Colocasia esculenta* (taro, kalo, dasheen) และ *Alocasia macrorrhiza* (giant taro)] (Brooks, F.E. 2005) มีรายงานในประเทศอินเดีย ว่า *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบไหม้และหัวเน่าที่ร้ายแรงที่สุดของเผือก

(Raj *et al*., 2011) พบได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกเผือกในฮาวายและยังพบได้ในพื้นที่อื่นอีก ได้แก่ ปาปัวนิวกินี, เกาะโซโลมอน, ฟิลิปปินส์, เกาะกวม,ซามัวตะวันตก, อินเดีย, ไต้หวัน และทรินิแดด เป็นต้น (Anonymous, n.p.) ทำให้ผลผลิตลดลง 25-50% (Gollifer and Brown, 1974; Jackson *et al*., 1980)

อมรรัตน์ (2552; 2556) รายงานว่ารา *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบแห้ง ใบไหม้ ใบจุดตาเสือกับ เผือก บอนน้ำ บอนเขียว และคูณ

ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เผือกให้ต้านทานโรคใบจุดตาเสือของบางประเทศ มีการนำวิธีการ Isozyme analysis and DNA markers (RAPD) มาระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *P. colocasiae* ไอโซเลทต่าง ๆ ทั้งภายในและนอกประเทศ ซึ่งเผือกจากการปรับปรุงพันธุ์ควรมีการทดสอบการต่อต้านเชื้อนี้ ก่อนที่จะออกเป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brooks, 2005)

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko (2008) ทำการสำรวจและเก็บใบเผือกที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อได้ 7 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวินิจฉัยว่าเป็น *P. colocasiae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาลำดับของ ITS (Internal Transcribed Spacer) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเผือก

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวกับรา *Phythopthora* หลายสปีชี ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ หลายชนิด แต่การศึกษาเกี่ยวรา *Phythopthora* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดตาเสทอของเผือก ยังมีน้อย จึงควรมีการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ ของรานี้ เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกำจัดได้รวดเร็วทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และเพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ ปากกาเคมี, ดินสอ, กระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงพลาสติก, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทับตัวอย่าง, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง และ GPS ฯลฯ

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์, ปากคีบ, เข็มเขี่ยปลายแหลม, ใบมีดโกน, ใบมีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ยาทาเล็บ (แบบใส), cork borer, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge), เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine), เครื่องเขย่า (vortex), เครื่อง tissue lyser, gel tank, เครื่องกำเนิดกระแสไฟ, gel plate, comb, PCR tube, เครื่องอ่านผล PCR (gel doc), microwave, micropipette ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, tips ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo, water bath หรือ incubation chamber ฯลฯ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์, ขวดดูแรน, กระบอกตวง, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ

4. สารเคมี ได้แก่ lactophenol, lactic acid, oil immersion, sodium hypochlorite, ethyl alcohol ฯลฯ

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA), Potato Carrot Agar (PCA), V-8 juice agar, และ Carrot Agar (CA) ฯลฯ

6. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกรา *Phytophthora* (Phytophthora Diseases Worldwide, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints)

วิธีการ

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora* (ปี 2560)

เก็บและรวบรวม และเก็บตัวอย่างโรคใบจุดตาเสือของเผือก จากแหล่งปลูก ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ พิษณุโลก สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี ปราจีนบุรี อยุธยา นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ปี 2560)

- การแยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting โดยตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10% เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar ผสม BRNAP (PDA+BRNAP) (Masago *et al*., 1972) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นตัวอย่างพืชมาเลี้ยงบนอาหาร PDA+BRNAP อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นวุ้น มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแครอท (อมรรัตน์ และคณะ, 2556) แล้วทำให้เป็นราบริสุทธิ์จากสปอร์เดี่ยว โดยนำราที่เจริญบนอาหารวุ้นแครอท ไปเก็บไว้ในที่มืด 72 ชั่วโมง แล้วนำออกไปไว้ใต้แสงนีออน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ มาแตะกลุ่มสปอร์ แล้วนำไปเขี่ยให้สปอร์กระจายบนอาหารวุ้น (water agar: WA) แล้วตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกสปอร์เดี่ยว นำไปวางบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง ให้สปอร์เจริญสร้างกลุ่มสปอร์ แล้วตัดขอบโคโลนี ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (อมรรัตน์, 2556) ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al.* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996))

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

เลี้ยงรา *Phytophthora* บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง หรืออาหารวุ้นแครอท เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้เครื่องเจาะรู (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารวุ้นแครอท จานวน 15 มิลลิเมตร ที่บ่มในตู้บ่มมืดนาน 72 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (White cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 เซนติเมตรที่ให้แสง 200 แรงเทียน (Foot candle ftc) ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง สปอร์แรงเจีย (Sporangia) ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (Sporangiophores) วัดความยาว (Length) และความกว้าง (Breadth) ของ สปอร์แรงเจีย เพื่อหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง วัดความยาวของก้านสปอร์ (Pedicel หรือ Stalk) ความยาวของปาปิลา (Papilla) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ คลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

3. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวันจนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

4. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (ปี 2561)

สกัดดีเอ็น

โดยเลี้ยงรา *Phytophthora* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของรายายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หากยังไม่ทำ PCR ทันที จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ CO1 OomCoxI-Levup/OomCoxI-Levlo (Robideau *et al*., 2011) CO2 FM75/FM78 (Martin and Tooley, 2003) translation elongation factor 1-alpha (Tef1) ELONGF1/ELONGR1 (Kroon *et al*., 2004) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) DC6 (Cooke *et al*., 2000)/ITS4 (White *et al*., 1990) และ เอนไซม์ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาสำหรับการวิจัยนี้ คือ Taq DNA Polymerase หากพบว่ามีตัวอย่างที่มีปัญหาหรือยากต่อการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมาย เช่น ดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดใหญ่ หรืออาจเกิดจากตัวดีเอ็นเอต้นแบบเอง จะพิจารณาใช้ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้สามารถเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาได้สูง ทำให้การจับของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบมีความจำเพาะมากขึ้น

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำเส้นดีเอ็นเอสองเส้นที่ได้จาก forward และ reverse primer มาเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมที่ Genious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al*., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* (ปี 2561-2562)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำ โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)
กรรมวิธีที่ 2 V8 juice agar (V8 A)
กรรมวิธีที่ 3 Oat meal agar (OMA)
กรรมวิธีที่ 4 Carrot agar (CA)
กรรมวิธีที่ 5 Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบชนิดต่าง ๆ ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารสูตรต่าง ๆ

6. ศึกษาการเก็บรักษารา *P. colocasiae* (ปี 2562)

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในหลอดทดลอง จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มนำไปเก็บในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ 17 ^{O}C และ ที่อุณหภูมิห้อง 27 ^{O}C เมื่อได้ระยะเวลาตามแผนนำหลอดเชื้อมาแยกเชื้อเพื่อดูการมีชีวิตของเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

การเจริญและการสร้างสปอร์ หลังการเก็บรักษา 2 4 6 8 และ10 เดือน

7. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ของอาหารต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* (ปี 2562)

วางแผนการทดลองแบบ Split plot โดย

Main plot คือ อุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 25°C 30 °C 35 °C

Sub plot คือ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ pH 6 7 8 9 และ 10

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารV8A ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริคแอซิค) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเผือกของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

จากการเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Phytophthora colocasiae* ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากพิกัดภูมิศาสตร์และวิธีการปลูก สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม เลือกมากลุ่มละ 2 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท (Figure 1) จากนั้นทำการสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง translation elongation factor โดยใช้ไพรเมอร์คู่ ELONGF1/ELONGF2 ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence และวิเคราะห์ชนิดเบื้องต้นพบว่าเชื้อราดังกล่าว คือ *Phytophthora colocasiae* ซึ่งทั้ง 10 ไอโซเลท ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ จึงต้องมีการเปรียบเทียบด้วยตำแหน่งอื่น ต่อไป

ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* (ครั้งที่ 1)

ชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา P. colocasiae ที่ 7 วัน พบว่า รา *P. colocasiae* เจริญบนอาหาร CMA ได้เร็วที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 78.0 มม. รองมา ได้แก่ V8, CA, OMA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 69.30, 64.30, 58.70 และ 52.20 มม. ตามลำดับ (Table 1, Figure 2)

ที่ 14 วัน พบว่า บนอาหาร PDA รา *P. colocasiae* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 85.10 มม. ส่วนบนอาหารชนิดอื่น รา *P. colocasiae* เจริญเต็มจานอาหารแล้ว โดย บนอาหาร CMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 8 วัน แต่ให้เส้นใยที่น้อยและบางติดอาหาร ส่วนอาหาร V8, CA และ OMA เจริญ

เต็มจานอาหารที่ 10 วัน แต่ถึงแม้การเจริญของ รา *P. colocasiae* บนอาหาร PDA จะเจริญได้ช้ากว่า แต่เส้นใยหนาแน่นกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนบนอาหาร OMA ถึงจะมีการเจริญของเส้นใยดีและราสามารถสร้างสปอร์แรงเจียมได้ แต่ยากต่อการสังเกตเนื่องจากสีของอาหารมีสีขาวขุ่น

ชนิดอาหารที่เหมาะสมการสร้างสปอร์ของรา P. colocasiae พบว่า รา *P. colocasiae* ไม่สร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหาร CMA ส่วนบนอาหารอื่น ๆ สามารถสร้างสปอร์ได้เรียงลำดับ ดังนี้ CA, PDA, OMA และ V8A (Table 2, Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับ Jeffers (2006) ที่ใช้อาหาร CA และ V8A ในการศึกษาการระบุชนิดของรา *Phytophthora*

ลักษณะเส้นใยบนอาหารต่าง ๆ ดังนี้

- PDA เส้นใยสีขาว แน่น ค่อนข้างหยิก เจริญเป็นวงถี่ ๆ เห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารเล็กน้อย
- CA เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวง เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหาร
- V8 เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวงเห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารมาก
- OMA เส้นใยสีขาว หยาบ หยิกเล็กน้อย เจริญแบนราบติดผิวอาหาร แต่เห็นการเจริญยาก เนื่องจากอาหารมีสีขาวขุ่น สีเดียวกับเส้นใย
- CMA เส้นใยสีขาว บางมาก ค่อนข้างตรง เจริญแบนราบติดผิวอาหาร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจำแนกรา *Phytopthora* สาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือกทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า เป็นรา *Phytophthora colocasiae* สามารถเจริญได้เร็วบนอาหาร CMA แต่ให้เส้นใยบาง และไม่สร้างสปอร์แรงเจียม ส่วนบนอาหาร PDA และ CA สามารถเจริญได้ดีและสร้างสปอร์แรงเจียมได้มาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือทำให้การทดลองนี้ มีความก้าวหน้าตามเป้าหมายที่ตั้งไว้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2555. *คู่มือโรคผัก*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 153 หน้า.

มาลินี พิทักษ์ สมศรี บุญเรือง และรังสิมันตุ์ สัมฤทธิ์. ม.ป.ท. *การปลูกเผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/pukperk.pdf (7 มีนาคม 2562).

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2560. *ข้อมูลภาวะการผลิตพืช ปี 2559/60*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/page1.pdf (7 มีนาคม 2562).

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. ม.ป.ท. *พืชหัว/เผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=5&chap=5&page=t5-5-infodetail04.html (7 มีนาคม 2562).

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนาวิภาส. 2556. การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici.* หน้า 2281-2292. *ใน : ผลงานวิจัยประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. *รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 189 หน้า.

Anonymous. n.p. *Phytophthora colocasiae*. (Online). Available: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/p_coloc.htm. (June 22, 2014)

Brooks, F.E. 2005. *Taro leaf blight*. (Online). Available: https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/ lession/fungi/Oomycetes/Pages/TaroLeafBlight.aspx. (June 22, 2014)

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

Gollifer, D.E. and J.F. Brown. 1974. Phytophthora leaf blight of *Colocasia esculenta* in the British Solomon Islands. *Papua New Guinea Agricultural Journal*. 25: 6-11.

Jackson, G.V.H., D.E. Gollifer and F.J. Newhook. 1980. Studies on the taro leaf blight fungus Phytophthora colocasiae in Solomon Islands: Control by fungicides and spacing. *Annals of Applied Biology*. 96 (1): 1-10.

Jeffers, S.N. 2006. Identifying species of Phytophthora. (Online). Available: https://fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing_species_phytophthora.pdf. (November 20, 2017)

Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kroon L., Bakker FT, Bosch GBM van den, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 766 – 782.

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko. 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothaiiic behavior and its significance. *Mycologia*. 100(5) : 727-734.

Nath, V.S., M. Senthil, V.M. Hegde, M.L. Jeeva, R.S. Misra, S.S. Veena and M. Raj. 2013. Genetic diversity of *Phytophthora colocasiae* isolates in India based on AFLP analysis. *Biotech*. 3: 297–305.

Raj, S.M., A.K. Mishraa, K.S., M.L. Jeevaa and V. Hegdea. 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Phytopathology and Plant Protection*. 44(6) : 581-591.

Robideau, G.P., A.W.A.M. de Cock, M.D. Coffey, H. Voglmayr, H. Brouwer, K. BALA, D.W. Chitty, N. Désaulniers, Q.A. Eggertson, C.M.M. Gachon, C. Hu, F.C. Küpper, T.L. Rintoul, E. Sarhan, E.C.P. Verstappen, Y. Zhang, P.J.M. Bonants, J.B. Ristaino and C.A. Lévesque. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources.* 11:1002-1011.

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

Tsopmbeng Noumbo Gaston R., Lienou Jules Appolinaire, Megatche ChristienJean P. and Fontem Dominic Ajong. 2014. Effect of different pH and temperature levels on in vitro growth and sporulation of *Phytophthora colocasiae*, taro leaf blight pathogen. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4(4) : 202-206.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In* : M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.

Table 1 Effect of different media on radial growths of *Phytophthora colocasiae* at 7 and 14 day

Media	Day 7 (mm.)	Day 14 (mm.)
PDA	52.2 e[1/]	85.1 b
CA	64.3 c	90.0 a
OMA	58.7 d	90.0 a
CMA	78.0 a	90.0 a
V8	69.3 b	90.0 a
CV	15	4

[1/] Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level

Table 2 Effect of different media on sporangium production of *Phytophthora colocasiae* at 7 day

Media	Day 7
PDA	5.01 b
CA	7.48 a
OMA	2.54 c
CMA	0.00 d
V8	1.69 c
CV	84

[1/] Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level

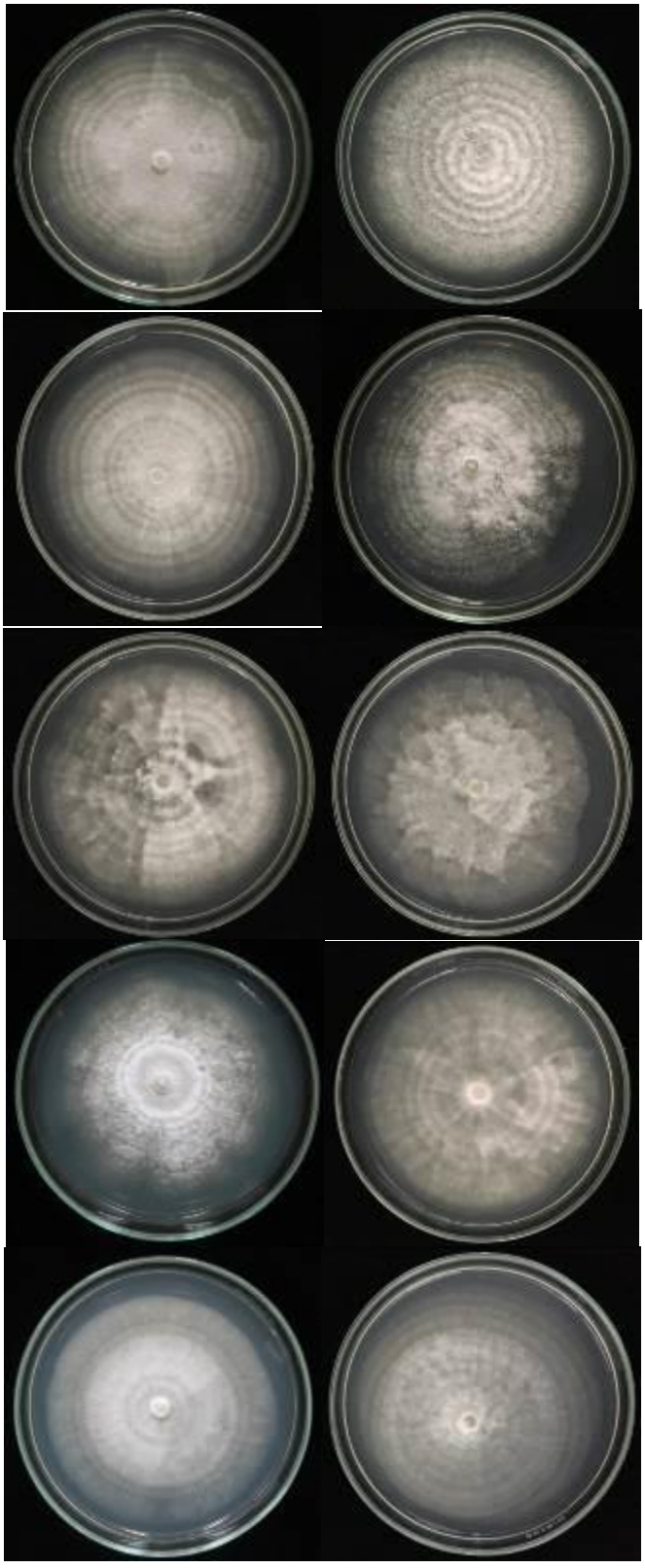

Figure 1 *Phytophthora colocasiae* isolates used for genetic characteristics

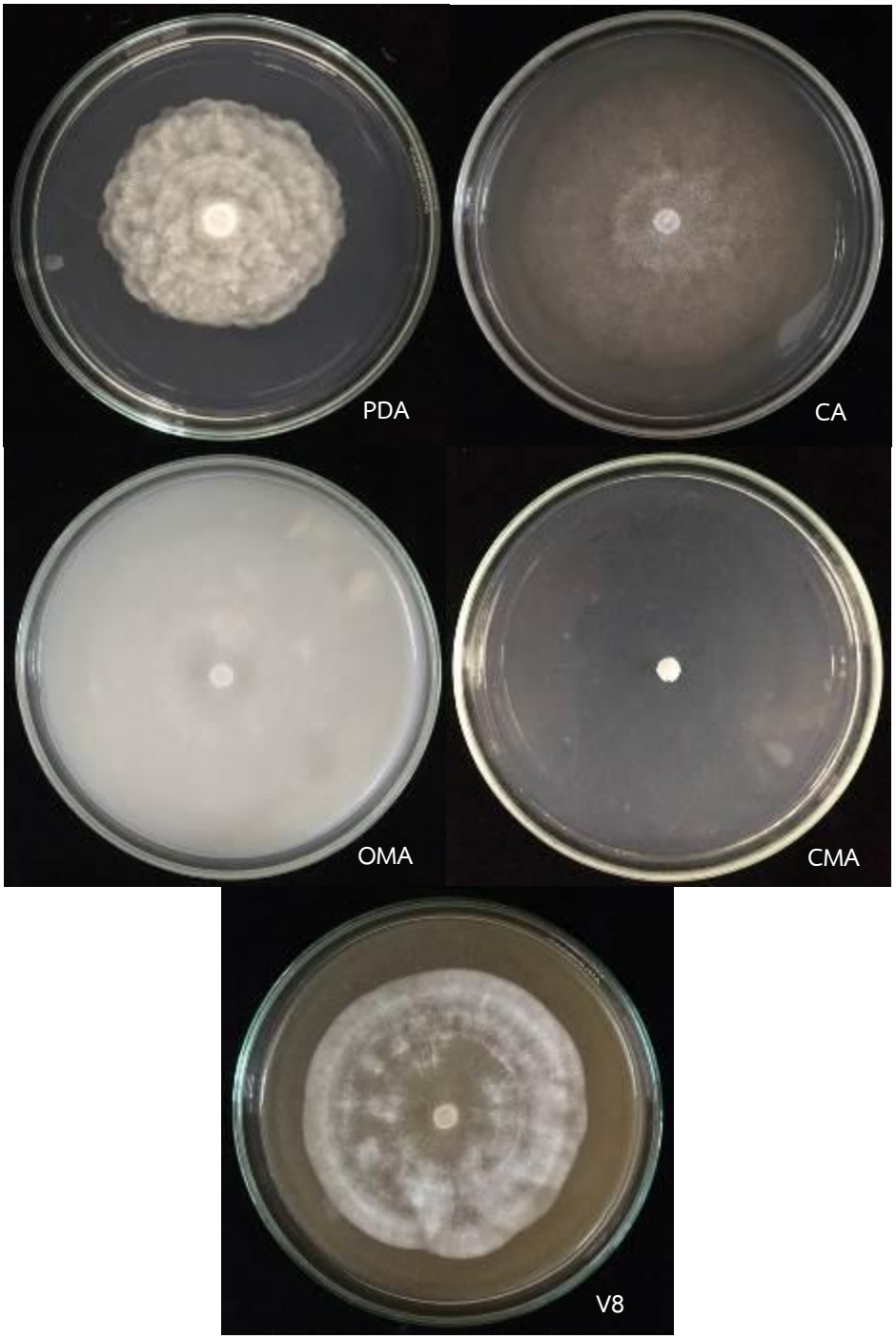

Figure 2 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 7 day

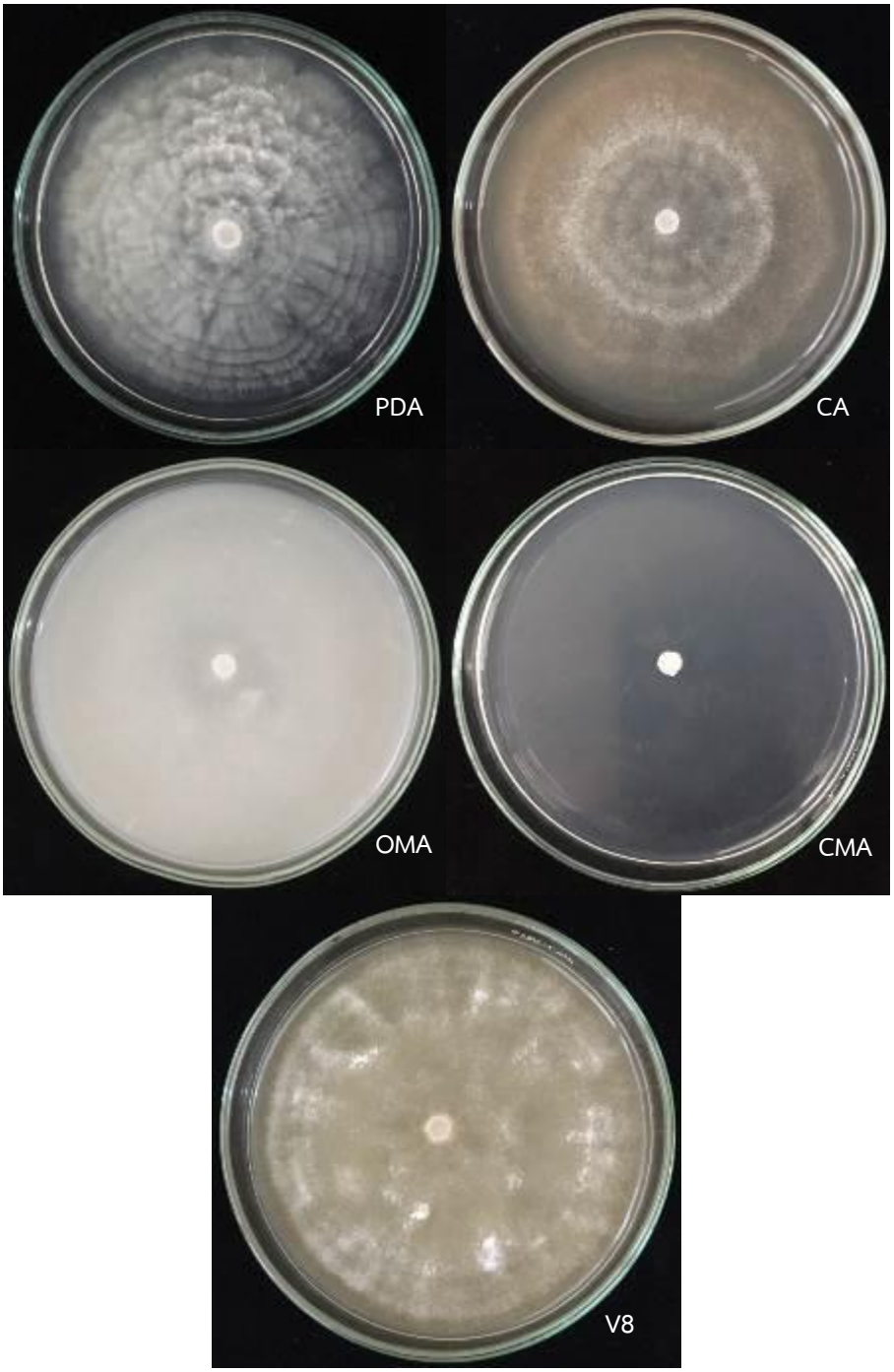

Figure 3 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 14 day