บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้

จากการสำรวจและสุ่มเก็บใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในแปลงเพาะปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรใน 2 จังหวัดของภาคเหนือ ได้แก่ จ.เชียงใหม่ และตาก ในช่วงปี พ.ศ. 2549-2552 ทั้งหมด 8 แปลงปลูก ซึ่งเก็บจาก จ.เชียงใหม่ ในเขต อ.สันทราย และ อ.พร้าว ส่วนใน จ.ตาก เก็บจาก อ.พบพระ โดยพบว่าใบมันฝรั่งมีลักษณะอาการไหม้คล้ายกับถูกน้ำร้อนลวกและแผลมีสีน้ำตาล (ภาพ 4ก.) เมื่อพลิกดูใต้ท้องใบ พบ sporangia และเส้นใยสีขาวของเชื้อสาเหตุ (ภาพ 4ข.) จากนั้นได้ทำการสุ่มเก็บแปลงละ 10 จุด แต่ละจุดห่างอย่างน้อย 8-10 เมตร และนำใบมันฝรั่งที่เป็นโรคที่เก็บได้ในแต่ละจุดจัดเก็บในถุงพลาสติกเพื่อนำไปทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการต่อไป

ภาพ 4 ลักษณะอาการของโรคใบไหม้ในมันฝรั่ง

ก. ลักษณะอาการของโรคใบไหม้บริเวณหน้าใบ

ข. sporangia และเส้นใยของเชื้อสาเหตุบริเวณใต้ใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การแยกเชื้อและการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์จากมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้

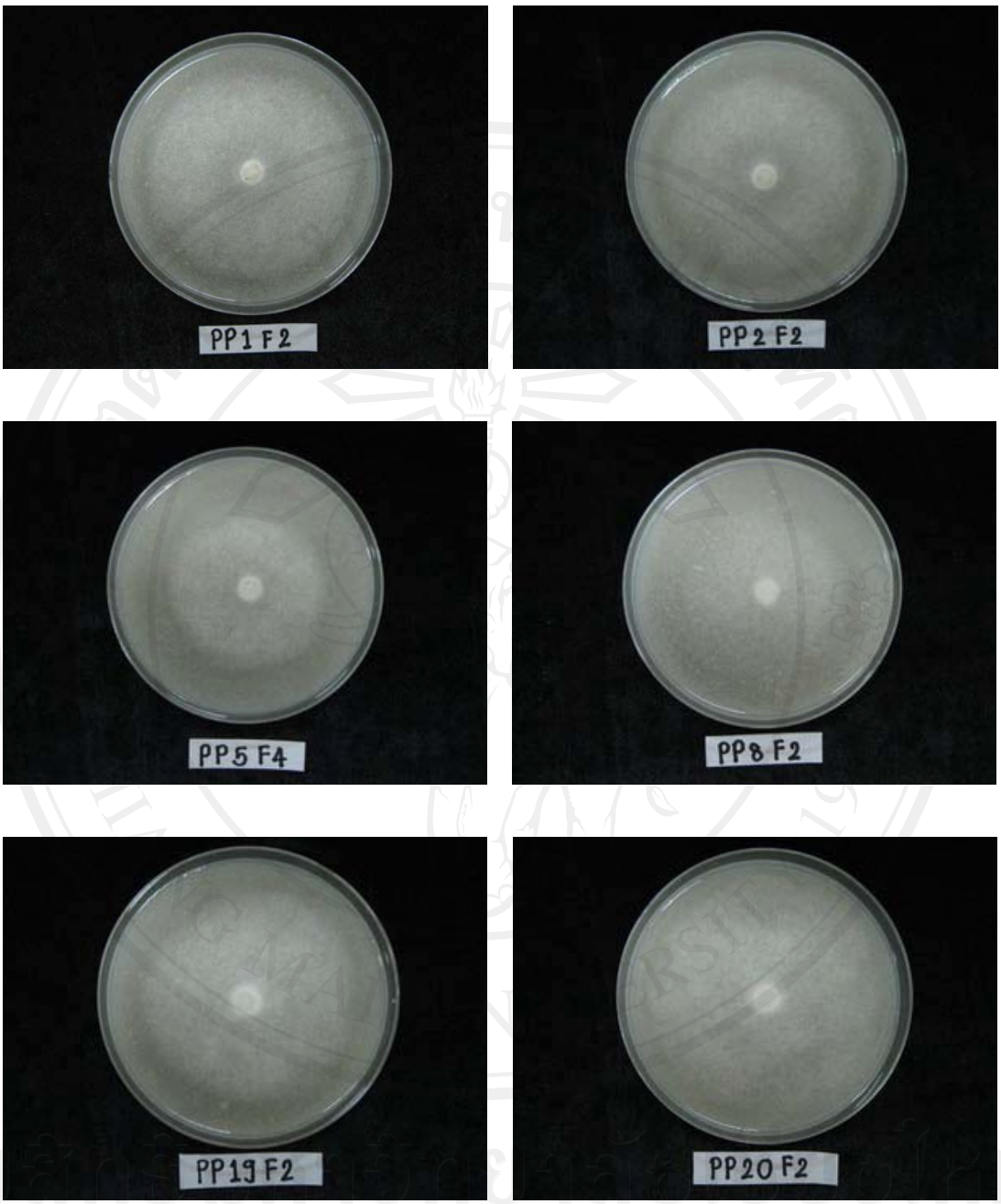
จากการแยกเชื้อ *P. infestans* จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้โดยการย้าย sporangia จากใบพืชลงบนอาหาร Rye A ที่ผสมสารปฏิชีวนะ สามารถแยกเชื้อ *P. infestans* ที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 117 ไอโซเลท ดังนี้ แยกได้จาก อ.พบพระ จ.ตาก จำนวน 21 ไอโซเลท ในเขต จ.เชียงใหม่ แยกได้จาก อ.สันทราย จำนวน 76 ไอโซเลท และ อ.พร้าว จำนวน 20 ไอโซเลท (ตาราง 1)

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะโคโลนี ของเชื้อทั้งหมด 117 ไอโซเลท ที่เลี้ยงบนอาหาร Rye A ในที่มืด อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อ *P. infestans* ทั้งหมดมีโคโลนีมีสีขาว และมีลักษณะคล้ายปุยฝ้าย (fluffy) (ภาพ 5 และ 6) และจากการตรวจวิเคราะห์รูปร่างสัณฐานของ sporangia และเส้นใยของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยของเชื้อไม่มีผนังกั้น (non-septate hyphae) และ sporangia สร้างอยู่บนฐานของ sporangiophore โดยลักษณะของ sprangia มีรูปร่างคล้ายผลมะนาว (lemoniform) หรือรูปไข่ (ovoid) (ภาพ 7) มีความยาวเฉลี่ย 45.6 ไมโครเมตร และความกว้างเฉลี่ย 27.2 ไมโครเมตร (ตาราง 2) โดยอัตราส่วนระหว่างความยาวและความกว้างอยู่ที่ 1.66

ตาราง 1 สถานที่และจำนวนพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างโรคใบไหม้ในมันฝรั่งในช่วงปี พ.ศ. 2549-2550

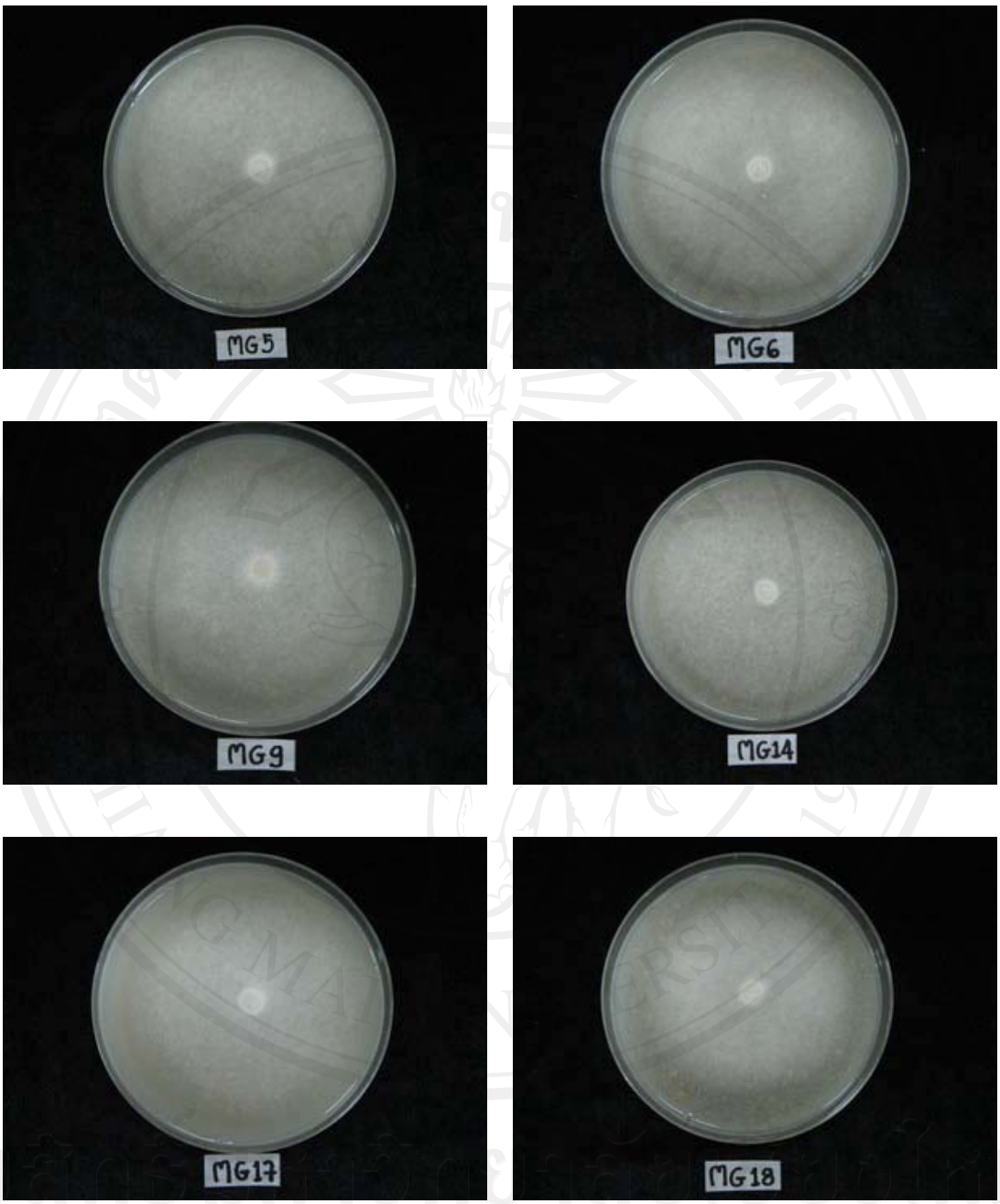
สถานที่เก็บ	ปีที่เก็บ	จำนวนพื้นที่ที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท
ต.แม่แฝก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2549	1	11
ต.สันนาเม็ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2549	4	50
ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	2550	1	20
ต.หนองจ๊อม อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2552	1	15
ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก	2552	1	21

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



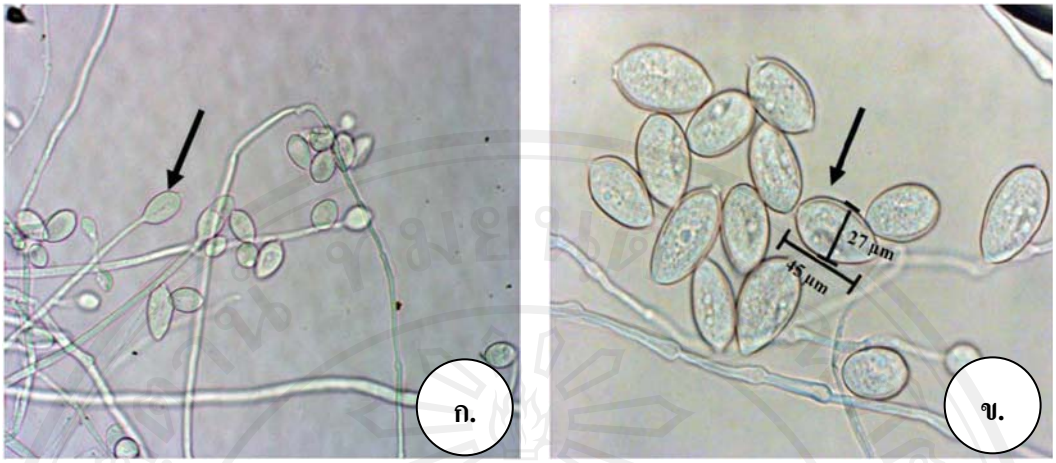
ภาพ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora infestans* ไอโซเลทต่างๆที่เลี้ยงบนอาหาร Rye A อายุ 10 วัน แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ ในเขต จ.ตาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora infestans* ไอโซเลทต่างๆที่เลี้ยงบนอาหาร Rye A อายุ 10 วัน แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ ใน จ.เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phythphthora infestans*

ก. ลักษณะ sporangia ของเชื้อ *P. infestans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า
ข. ลักษณะ sporangia ของเชื้อ *P. infestans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ตาราง 2 ขนาด sporangium โดยเฉลี่ยของเชื้อ *Phythphthora infestans* ที่แยกได้ในแต่ละพื้นที่เพาะปลูก

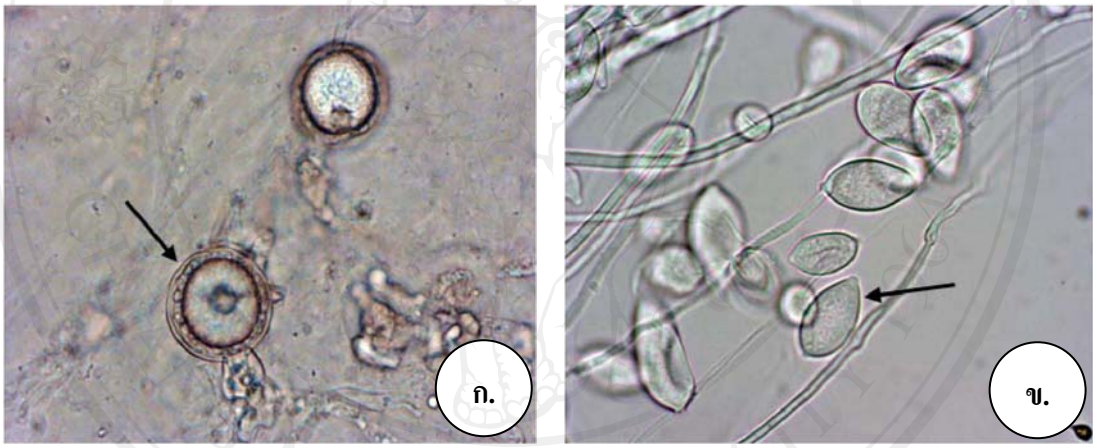
สถานที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท	ความยาวเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ความกว้างเฉลี่ย (ไมโครเมตร)
ต.แม่แฝก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	11	45.5	27.1
ต.สันนาเม็ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	50	43.4	25.9
ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	20	46.9	28.5
ต.หนองจ๊อม อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	15	45.7	27.4
ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก	21	46.5	27.2
		45.6[1]	27.2[1]

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 5 สถานที่เก็บข้างต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การวิเคราะห์ mating type

จากการนำเชื้อ *P. infestans* ทั้ง 117 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ mating type บนอาหาร Rye A แล้วนำไปบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบ mating type เพียงชนิดเดียว คือ mating type A1 เนื่องจากตรวจพบ oospores ตรงกลางระหว่างเชื้อ *P. infestans* แต่ละไอโซเลทกับเชื้อ *P. infestans* มาตรฐานที่มี mating type A2 (E13) และพบ sporangia ตรงกลางระหว่างเชื้อแต่ไอโซเลทกับเชื้อ *P. infestans* มาตรฐานที่มี mating type A1 (NM16F2) โดยลักษณะของ oospores ที่พบจากการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะรูปร่างกลม ใส และมีผนังหนา (ภาพ 8ก.) และ sporangia ใส มีลักษณะคล้ายผลมะนาว (ภาพ 8ข.)



ภาพ 8 ผลการวิเคราะห์ mating type ของเชื้อ *Phytophthora infestans*

ก. ลักษณะของ sporangia ภายใต้กล้องจุลทรรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ข. ลักษณะของ oospores ภายใต้กล้องจุลทรรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

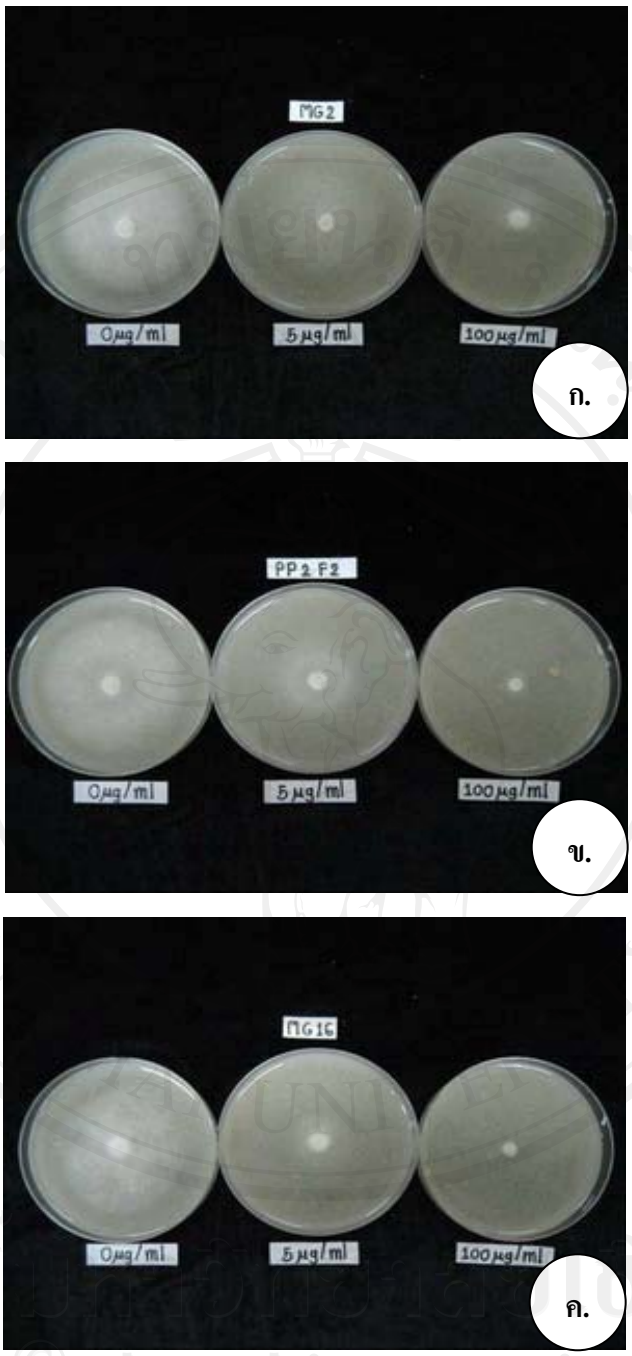
4. ทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl

จากการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ของเชื้อ *P. infestans* ทั้งหมด 117 ไอโซเลท โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลท บนอาหาร Rye A ที่ผสมสารเคมี metalaxyl ในความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ความเข้มข้นคือ 0 5 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *P. infestans* มีความสามารถในการต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ทั้ง 3 ระดับ (ภาพ 9) ได้แก่ ต้านทาน จำนวน 11 ไอโซเลท ต้านทานในระดับปานกลาง จำนวน 27 ไอโซเลท และ อ่อนแอ จำนวน 79 ไอโซเลท นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากแต่ละแหล่งปลูกในแต่ละปีมีความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ในระดับที่แตกต่างกัน กล่าวคือ

เชื้อ *P. infestans* ทั้งหมด 81 ไอโซเลท ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2549-2550 จาก 3 แหล่งปลูกใน จ.เชียงใหม่ ได้แก่ ต.แม่แฝก และ ต.สันนาเม็ง อ.สันทราย และ ต.โหล่งขอด อ.พร้าว พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ 90.9 96 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละพื้นที่จะ อ่อนแอต่อสารเคมี metalaxyl ตามลำดับ (ตาราง 3) แต่ไม่พบเชื้อที่ต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ในพื้นที่ดังกล่าว

เชื้อ *P. infestans* ทั้งหมด 36 ไอโซเลท ที่แยกได้ในปี 2552 จาก 2 แหล่งปลูก ได้แก่ ต.หนองจ๊อม อ.สันทราย จ .เชียงใหม่ จำนวน 15 ไอโซเลท พบว่าเชื้ออยู่ในระดับต้านทานและอ่อนแอต่อสารเคมี metalaxyl ในจำนวนที่เท่ากันคือ 2 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 13.4 เปอร์เซ็นต์ และพบเชื้อที่ต้านทานในระดับปานกลาง 11 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 73.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเขต ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก นั้นพบว่าเชื้อทั้งหมด 21 ไอโซเลท ส่วนใหญ่ 57.1 เปอร์เซ็นต์ จะต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ในระดับปานกลาง (ตาราง 3) นอกเหนือจากนั้นจะอยู่ในระดับที่ต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl คิดเป็น 42.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อที่อยู่ในระดับอ่อนแอ นั้นไม่พบในเขตพื้นที่ปลูกใน จ.ตาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 ผลการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ของเชื้อ *Phytophthora infestans* เลี้ยงบนอาหาร Rye A ที่มีความเข้มข้นของสารเคมี metalaxyl 0, 5 และ 100 µg/ml

ก. เชื้อ *P. infestans* ไอโซเลท MG2 ที่ต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl

ข. เชื้อ *P. infestans* ไอโซเลท PP2F2 ที่ต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ในระดับปานกลาง

ค. เชื้อ *P. infestans* ไอโซเลท MG16 ที่อ่อนแอต่อสารเคมี metalaxyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ผลการวิเคราะห์ความต้านทานต่อสารเคมี ของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่แยกได้ระหว่างปี 2549 - 2552 จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในแต่ละพื้นที่

สถานที่เก็บ	ปีที่เก็บ	จำนวนพื้นที่ที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท	ความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl[1]		
				S	I	R
ต.แม่แฝก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2549	1	11	10 (90.9%)[2]	1 (9.1%)	0 (0 %)
ต.สันนาเม็ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2549	4	50	48 (96%)	2 (4%)	0 (0 %)
ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	2550	1	20	19 (95%)	1 (5%)	0 (0 %)
ต.หนองจ๊อม อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	2552	1	15	2 (13.4%)	11 (73.2%)	2 (13.4%)
ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก	2552	1	21	0 (0 %)	12 (57.1%)	9 (42.9%)

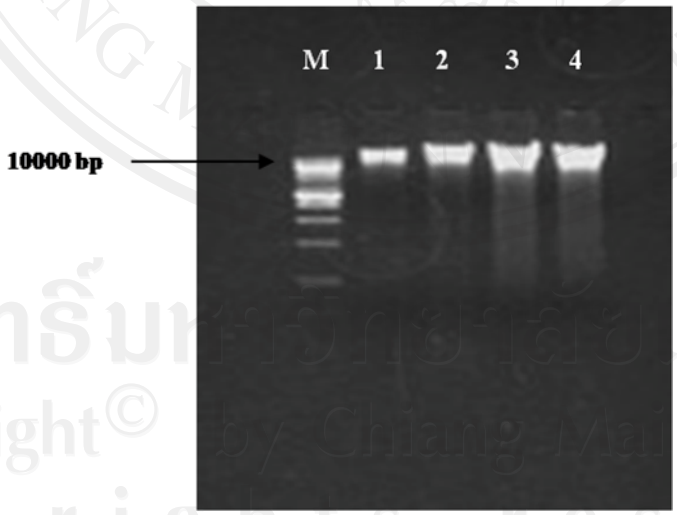
[1] ความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ; S (Sensitive) = อ่อนแอ, I (Intermidiate) = ต้านทานปานกลาง และ R (Resistant) = ต้านทาน

[2] เปอร์เซ็นต์ ของประชากรของเชื้อ *P. infestans* ที่ต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl ในแต่ละระดับเทียบกับจำนวนประชากรเชื้อที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละพื้นที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การวิเคราะห์ mitochondrial DNA (mtDNA) haphotypes

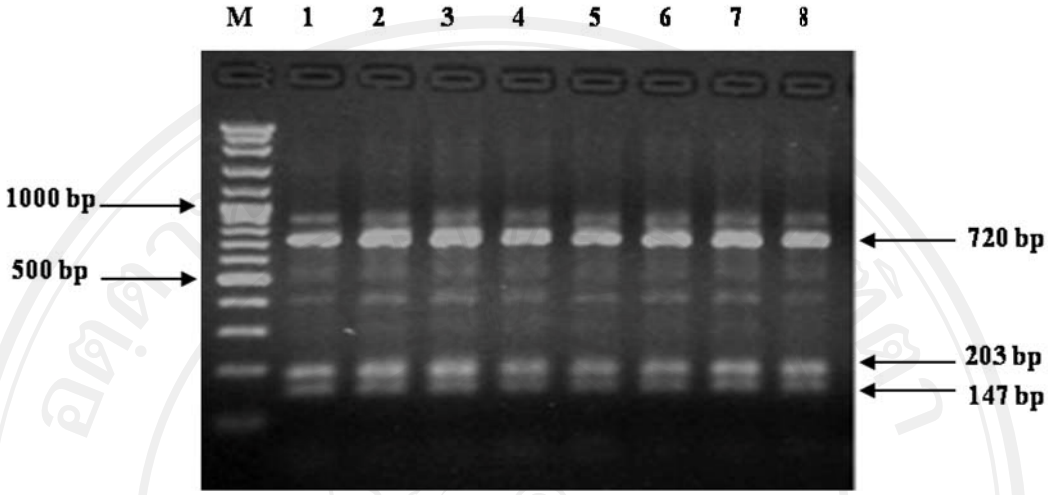
จากการนำเชื้อ *P. infestans* ทั้งหมด 117 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ ในแหล่งปลูกเขต อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ และ อ.พบพระ จ. ตาก ใน ปี พ.ศ. 2552 จำนวน 36 ไอโซเลท และในปี พ.ศ. 2549-2550 เก็บรวบรวมได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในเขต อ.สันทราย อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ จำนวน 81 ไอโซเลท มา ทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel electrophoresis พบว่าได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์และไม่พบการเสื่อมสลายของดีเอ็นเอ (ภาพ 10) จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในไมโตครอนเดรียล (mtDNA) ที่บริเวณส่วน P2 และ P4 โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ primer 2 คู่ คือ คู่ primer P2 และ คู่ primer P4 หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ใช้คู่ primer P2 มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hpa*II และผลผลิต PCR ที่ใช้คู่ primer P4 ย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI แล้วตรวจหาผลผลิตที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าหลังจากการย่อย PCR product P2 ของเชื้อทุกไอโซเลท ด้วยเอ็นไซม์ *Hpa*II พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 720 203 และ 147 bp (ภาพ 11 และ 12) ซึ่งจัดได้ว่าเชื้อทั้ง 117 ไอโซเลท มี mtDNA haphotype จัดอยู่ในกลุ่ม a และเมื่อนำ PCR product P4 ของเชื้อทุกไอโซเลท มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 603 และ 361 bp (ภาพ 13 และ 14) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม II ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อที่พบทั้งหมดนั้นมี mtDNA haphotype แบบ IIa



ภาพ 10 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora infestans* ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder (Vivantis Ltd.)
ช่องที่ 1-4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ *P. infestans*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

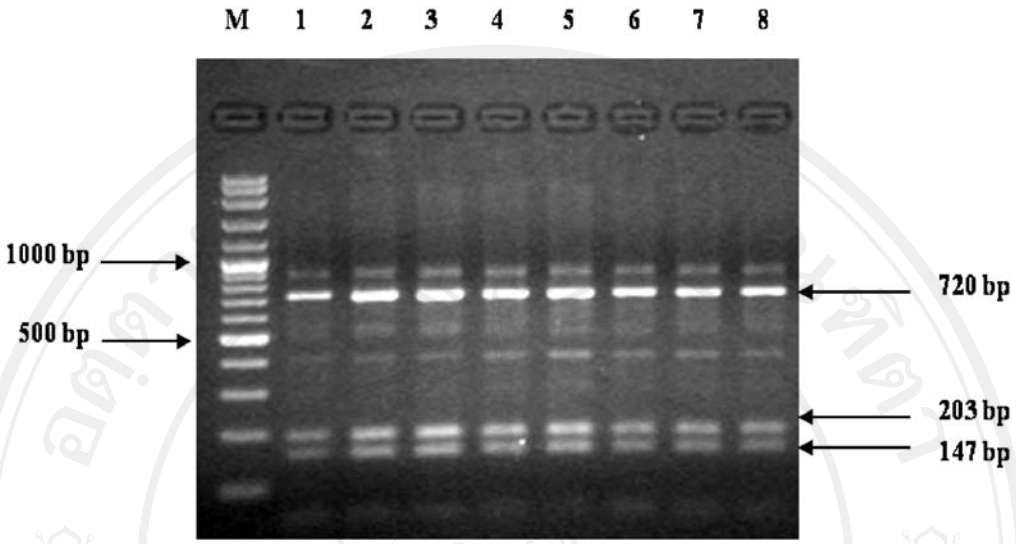


ภาพ 11 ผลผลิตที่ได้จากการตัดผลผลิต PCR บริเวณ P2 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II ของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในเขต จ.เชียงใหม่ ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Vivantis Ltd.)

ช่องที่ 1-8 = ตัวอย่าง restriction products ของเชื้อ *P. infestans*

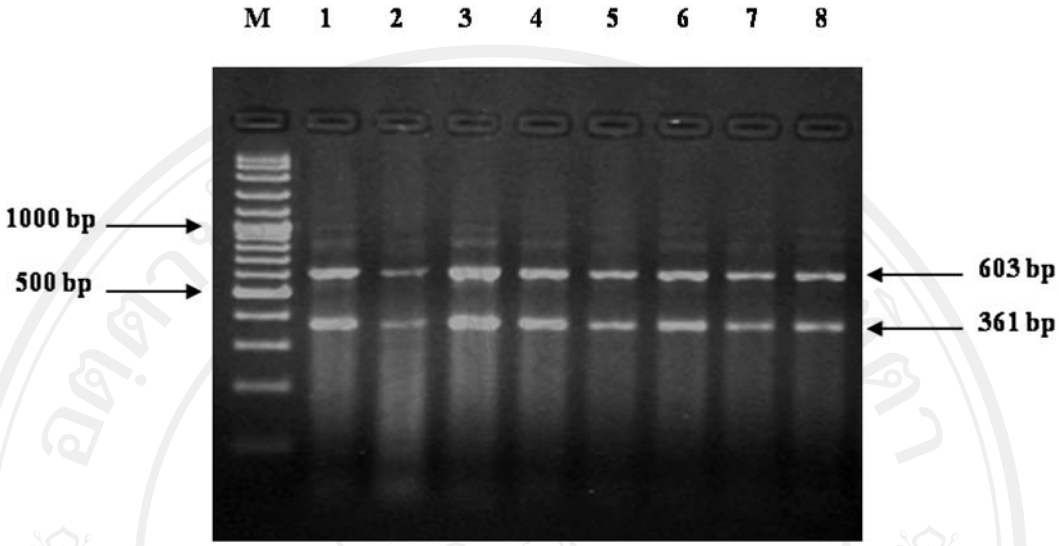
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 ผลผลิตที่ได้จากการตัดผลผลิต PCR บริเวณ P2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II ของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในเขต จ.ตาก ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Vivantis Ltd)
ช่องที่ 1-8 = ตัวอย่าง restriction products ของเชื้อ *P. infestans*

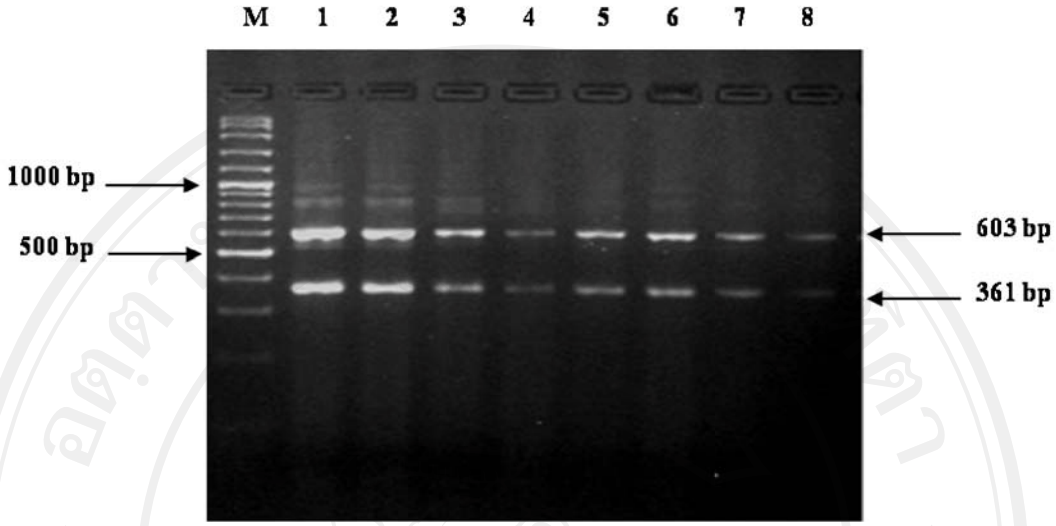
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 ผลผลิตที่ได้จากการตัดผลผลิต PCR บริเวณ P4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในเขต จ.เชียงใหม่ ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Vivantis Ltd)
ช่องที่ 1-8 = ตัวอย่าง restriction products ของเชื้อ *P. infestans*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 4 ผลผลิตที่ได้จากการตัดผลผลิต PCR บริเวณ P4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่แยกได้จากใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในเขต จ.ตาก ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Vivantis Ltd)

ช่องที่ 1-8 = ตัวอย่าง restriction products ของเชื้อ *P. infestans*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved