โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ทรานสเฟคชันของไมคอไวรัสใน *Phytophthora botryosa*

ชื่อนิสิต นายธนากร เดชโชติ รหัสประจำตัว 6032323723

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ Mycovirus transfection in *Phytophthora botryosa*
ทรานสเฟคชันของไมคอไวรัสใน *Phytophthora botryosa*

ชื่อนิสิต นายธนากร เดชโชติ **เลขประจำตัว** 6032323723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	Mycovirus transfection in *Phytophthora botryosa*
	ทรานสเฟคชันของไมคอไวรัสใน *Phytophthora botryosa*
โดย	นายธนากร เดชโชติ เลขประจำตัว 6032323723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ทรานสเฟคชันของไมคอไวรัสใน *Phytophthora botryosa*

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

นิสิตในโครงการ
นายธนากร เดชโชติ เลขประจำตัว 6032323723

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ชื่อโครงการ ทรานสเฟคชันของไมคอไวรัสใน *Phytophthora botryosa*
นิสิตในโครงการ นายธนากร เดชโชติ เลขประจำตัว 6032323723
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

บทคัดย่อ

ไมคอไวรัส (Mycovirus) คือไวรัสที่ติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในรา โดยพบได้อย่างแพร่หลายในราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา ไมคอไวรัสส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นสายคู่ โดยทั่วไปเมื่อราติดไวรัสมักจะไม่มีการแสดงอาการ แต่ไวรัสบางชนิดมีความสามารถในการลดความรุนแรงของราในการก่อโรค ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ควบคุมราก่อโรคพืช โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 ซึ่งก่อโรคใบร่วงในต้นยางพาราที่เคยมีรายงานมาในงานวิจัยก่อนหน้านี้ จากการทดลองการทำราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแยกสปอร์เดี่ยวพบว่าราน้ำไอโซเลท R152 มีไฟทอฟธอราและพิเทียมอยู่ร่วมกัน แต่ไฟทอฟธอราไม่สร้างสปอร์แรงเจียมจึงไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ต่อมาผู้วิจัยได้สกัดสารพันธุกรรมจากสายใยของราและพบสารพันธุกรรมที่คาดว่าเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ในไฟทอฟธอราจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 1.0 และ 0.8 กิโลเบส ซึ่งมีจำนวนและขนาดแตกต่างกับที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการทดลองส่งผ่านสารพันธุกรรมที่คาดว่าเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ไปยัง *Phytophthora botryosa* เพื่อสร้างสายพันธุ์ไอโซเจนิกทั้งที่มีและไม่มีไวรัส โดยพบว่าสามารถส่งผ่านสารพันธุกรรมที่คาดว่าจะเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 1.0 และ 0.8 กิโลเบส และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสพบการสร้างสปอร์แรงเจียมที่เพิ่มมากขึ้นกว่าในสายพันธุ์ปกติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสปอร์แรงเจียมนั้นมีความหมายว่าโอกาสในการก่อโรคที่เพิ่มขึ้นมากอีกด้วย แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการสร้างสปอร์แรงเจียมที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากไวรัสจริงหรือไม่

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title Mycovirus transfection in *Phytophthora botryosa*

Investigator Mister Thanakorn Detechote ID 6032323723

Advisor Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.

Abstract

Mycovirus is a virus that infects and replicates in fungi. It can be found widely in fungi and fungal-like organisms. Most mycoviruses genome contain double-stranded RNA. When fungi were infected, they typically showed no signs. But some viruses were capable of decreasing (Hypovirulence) the severity of the phytopathogenic fungi which presently received a lot of interest in using mycovirus as an application for plant disease control. In this research, researcher studied the double-stranded RNA virus in an isolate R152, which cause leaf fall in para rubber tree *(Hevea brasiliensis),* which has been reported in the previous study. Isolation of fungi by single sporing technique was found that an isolate R152 was a co-culture of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. Surprisingly, *Phytophthora* sp. was incapable of producing sporangia. Therefore, they cannot be separated. Screening for double-stranded RNA virus was conducted. An isolate R152 was found to carry elements those expected to be double-stranded RNA elements with estimated size of approximately 1.0 and 0.8 kb by agarose gel electrophoresis. The attempt to transmit the expected viral elements to *Phytophthora botryosa* virus-free strain was succeed. Therefore, the isogenic strains of *P. botryosa* both virus-containing and virus-free were generated. The morphology study of its isogenic strains showed the transmitted *P. botryosa* was increasing in sporangia production, which means a higher chance of phytopathogenic fungi to cause diseases. However, it cannot be concluded whether the increasing in sporangia production is an effect of mycovirus.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณายิ่งของ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำโครงการตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้มอบความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์และตัวผู้วิจัยเอง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำปรึกษาที่ทำให้โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยารุ่นที่ 44 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบกำลังใจ ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะในการทำโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาว วิรัชนันท์ วุฒา (พี่อ๋อมแอ๋ม) นิสิตระดับปริญญามหาบัณฑิตในห้องปฏิบัติการ 2019 ที่ให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำและประสบการณ์ต่าง ๆ ในการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ และนักวิจัย ในชั้น 20 ทุกคนที่ให้คำแนะนำ และการช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์

ขอขอบคุณคลื่นวิทยุ Easy FM 105.5 ที่มอบเสียงเพลงเป็นกำลังใจในการเขียนเล่มโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ให้มีความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

และสุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่ให้การสนับสนุน ดูแล อำนวยความสะดวก รวมถึงการขับรถไปรับส่งตลอดระยะเวลาการทำโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ธนากร เดชโชติ

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
รายการอ้างอิง	35
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	39

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดง *Phytophthora* spp. ที่มีรายงานก่อโรคใบร่วงในต้นยางพารา	3
ตารางที่ 2	ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	9
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	10
ตารางที่ 4	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	10
ตารางที่ 5	ข้อมูลไพรเมอร์ A2 และ I2	11
ตารางที่ 6	ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2	11
ตารางที่ 7	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2	11
ตารางที่ 8	แสดงความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่วัดค่าได้จากเครื่อง Eppendorf BioPhotometer D30	26

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1	แสดงการใช้ไมคอไวรัสลดความรุนแรงในการก่อโรคของราก่อโรค	2
ภาพที่ 2	แสดง Cellulose column chromatography	14
ภาพที่ 3	แสดงภาพจำลองการเพาะเลี้ยงราแบบ Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8	16
ภาพที่ 4.1	แสดงลักษณะโคโลนีของราน้ำไอโซเลท R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8	20
ภาพที่ 4.2	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงด้วยเทคนิคการใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique)	21
ภาพที่ 4.3	แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2 จากราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยว	21
ภาพที่ 4.4	แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ที่มีความจำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา	22
ภาพที่ 4.5	แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อ *Phytophthora* sp.	23
ภาพที่ 4.6	แสดงการเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8	24
ภาพที่ 4.7	แสดงขั้นการสกัดสารพันธุกรรม	25
ภาพที่ 4.8	แสดงผลการตรวจหาอาร์เอ็นสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 จากการสกัดรอบแรก	27
ภาพที่ 4.9	แสดงผลการตรวจหาอาร์เอ็นสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 และ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสจากการสกัดรอบสอง	27
ภาพที่ 4.10	แสดงการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธี Anastomosis	29
ภาพที่ 4.11	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราน้ำไอโซเลท R152	30
ภาพที่ 4.12	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa*	31
ภาพที่ 4.13	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส	32

บทที่ 1
บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) หรือ para rubber tree เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่ง พบว่ามีเกษตรกรตลอดจนผู้ที่ทำธุรกิจเกี่ยวข้องกับยางพาราประมาณ 1 ล้านครอบครัว จำนวนไม่น้อยกว่า 6 ล้านคน (กลุ่มสารสนเทศการเกษตร สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดยะลา, 2019) โดยประเทศผู้ผลิตยางพารารายใหญ่ของโลก 3 ประเทศ ได้แก่ ไทย อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ในปีพ.ศ. 2561 มีเนื้อที่ปลูกยางพารารวม 49.87 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 56.03 ของเนื้อที่ปลูกยางพาราของโลก และมีผลผลิตรวม 8.94 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 61.27 ของผลผลิตโลก ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ความต้องการการใช้ยางพาราของโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.78 ต่อปี จาก 12.18 ล้านตันในปีพ.ศ. 2557 เพิ่มขึ้นเป็น 14.05 ล้านตันในปีพ.ศ. 2561 (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2018) ดังนั้นยางพาราจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของโลก

ยางพาราในประเทศไทยนิยมปลูกในภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามการรายงานของกรมวิชาการเกษตรในปีพ.ศ. 2555 ที่รายงานถึงพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งหมด 65 จังหวัดในประเทศไทย ประมาณ 19 ล้านไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2012) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการปลูกยางพาราคือ มีปริมาณน้ำฝนไม่น้อยกว่า 1,350 มิลลิเมตรต่อปี มีฝนตกไม่น้อยกว่า 120 วันต่อปี และมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 24-27 องศาเซลเซียส (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2003) ซึ่งสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น และมีฝนตกในปริมาณมากและเป็นเวลานานนี้เอง ที่เป็นปัจจัยในการสนับสนุนให้ต้นยางพาราเกิดโรค

ในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกหนักในพื้นที่ปลูกยางพาราทางภาคใต้ เกษตรกรชาวสวนยางพบผลกระทบอย่างหนัก ไม่ว่าจะเป็นการเก็บผลผลิตที่ทำได้อย่างไม่เต็มที่นัก และโรคระบาดที่มักเกิดขึ้นในช่วงฤดูฝนคือโรคใบร่วงของยางพารา ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรชาวสวนยาง (ศรีนรา แมเร๊าะ, 2003) โรคใบร่วงในยางพารา (Abnormal leaf fall) มีสาเหตุในการเกิดโรคมาจากเชื้อราไฟทอฟธอรา ซึ่งเป็นโรคที่มีความรุนแรงและมีการเกิดซ้ำทุก ๆ ปี โรคนี้จะระบาดบริเวณพื้นที่ปลูกยางที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง เชื้อราแพร่กระจายได้โดยลมและฝน ความรุนแรงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันที่ฝนตก โดยปกติโรคจะเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลาย ๆ วัน ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายนของทุก ๆ ปี (ครองทรัพย์ สิงหราช, 2019) ซึ่งเชื้อราไฟทอฟธอราจะเข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของต้นยางพาราได้แก่ ฝัก ใบ กิ่งก้าน และหน้ากรีดยาง ฝักที่ถูกทำลายจะเน่าดำแต่ไม่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ จนกลายเป็นแหล่งพักตัวของเชื้อราไฟทอฟธอรา ใบจะเกิดการร่วงหล่นทั้ง ๆ ที่ใบยังมีสีเขียวสดหรือสีเหลืองอยู่ โดยใบที่ร่วงจะสามารถพบรอยช้ำสีดำตรงบริเวณก้านใบ และในรอยช้ำสีดำนั้นจะพบหยดน้ำยางสีเทาเกาะอยู่ ต้นยางพาราที่เกิดใบร่วงจะไม่สามารถผลิใบใหม่ออกมาได้ในปีนั้น ต้องรอให้ใบร่วงหมดทั้งต้นก่อนจึงจะสามารถงอกใบใหม่ได้ ซึ่งใบที่

งอกมาใหม่จะมีประมาณ 5% ของปริมาณพุ่มใบในต้นยางพาราที่ไม่เกิดโรค และที่สำคัญผลผลิตยางจะเริ่มลดลงถ้ายังมีการระบาดของเชื้อราไฟทอฟธอราอยู่ และหากปล่อยให้เกิดโรคระบาดต่อไปโดยไม่มีการควบคุมโรค ใบจะร่วงถึง 75% และส่งผลให้ผลผลิตของต้นยางพาราลดลง 30-50% (ครองทรัพย์ สิงหราช, 2019)

Phytophthora spp. เป็นราน้ำที่จัดอยู่ใน Phylum Oomycota, Class Peronosporomycetes, Order Peronosporales, Family Peronosporaceae โดยราใน Family Peronosporaceae นั้นถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิตคล้ายรา (Fungal-like-organisms) หรือ Pseudofungi เนื่องจากมีการสร้าง Oogonia ทรงกลมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงจัดมันอยู่ใน Phylum Oomycota ถึงแม้ว่าราใน Phylum Oomycota นั้นจะมีความคล้ายกับราสายใยแต่ก็ไม่ถูกจัดอยู่ใน Kingdom Fungi แต่กลับจัดอยู่ใน Kingdom Chromista เฉกเช่นเดียวกับสาหร่ายสังเคราะห์แสง เช่น สาหร่ายสีน้ำตาลและไดอะตอม เป็นต้น (Ho, H. H., 2018) มี *Phytophthora* spp. หลากหลายสปีชีส์ด้วยกันที่พบว่าก่อโรคในพืชได้ โดยสามารถก่อโรคได้ในพืชที่หลากหลาย และทำลายพืชผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลก เช่น *Phytophthora palmivora* ที่ก่อโรครากเน่าโคนเน่าในทุเรียน (Vawdrey และคณะ, 2005) *Phytophthora infestans* ที่ก่อโรคใบไหม้ในมันฝรั่งและมะเขือเทศ (Cai, G., 2019) รวมถึงโรคใบร่วงในต้นยางพาราที่มี *Phytophthora* spp. หลากลายสปีชีส์ที่สามารถก่อโรคได้ (ตารางที่ 1)

ตามคำแนะนำในการป้องกันการเกิดโรคจากสำนักงานเกษตรจังหวัดตราด แนะนำให้เกษตรกรชาวสวนยางใช้สารเคมี Fosetly-Aluminium ฉีดพ่นพุ่มใบทุก 7 วัน เมื่อเริ่มพบการระบาดของโรคหรือทาที่หน้ากรีดยางอย่างสม่ำเสมอเพื่อป้องกันการเกิดโรค แต่ทั้งนี้การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีอาจไม่มีประสิทธิภาพสำหรับราก่อโรคที่ดื้อสารฆ่าราและมีความจำกัดในแง่ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (D. L. Nuss, 2005) จึงมีทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันคือ การใช้กลไกการควบคุมโรคทางชีวภาพ โดยการลดความรุนแรงในการก่อโรคของเจ้าบ้านด้วยไมคอไวรัส (Mycovirus-mediated attenuation of fungal virulence) ซึ่งมีรายงานการใช้ไมคอไวรัสลดความรุนแรงในการก่อโรคของราก่อโรคดังนี้ (ภาพที่ 1)

Mycovirus-mediated hypovirulence of plant pathogenic fungi

Disease	Fungus	Mycovirus family
Chestnut blight	*Cryphonectria parasitica* (Ascomycete)	*Reoviridae*, *Narnaviridae* (genus *Mitovirus*), *Hypoviridae*
Diaporthe diseases of stone fruits	*Diaporthe perjuncta* (Ascomycete)	Unclassified ssRNA virus related to tombusviruses
Dollar spot disease of turfgrass	*Sclerotinia homoeocarpa* (Ascomycete)	*Narnaviridae* (genus *Mitovirus*)
Dutch elm disease	*Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi* (Ascomycete)	*Narnaviridae* (genus *Mitovirus*)
Rhizoctonia disease of potato	*Rhizoctonia solani* (Basidiomycete)	Unclassified
Scab disease of small grain	*Fusarium graminearum* (Ascomycete)	Unclassified
Victoria blight of oats	*Helminthosporium victoriae* (Ascomycete)	*Totiviridae*, *Chrysoviridae*
White root rot	*Rosellinia necatrix* (Ascomycete)	*Reoviridae*

ภาพที่ 1 แสดงการใช้ไมคอไวรัสลดความรุนแรงในการก่อโรคของราก่อโรค

(Donald L. Nuss, 2005)

ตารางที่ 1 แสดง *Phytophthora* spp. ที่มีรายงานก่อโรคใบร่วงในต้นยางพารา (Krishnan และคณะ, 2019)

Species	Country	Disease Caused
P. meadii	India, Sri Lanka, Malaysia, Thailand, Myanmar, China, Nigeria	Abnormal leaf fall, Pod rot, Stripe canker, Black stripe
P. palmivora	Malaysia, Indonesia, Brazil, China, Sri Lanka, Thailand, Vietnam, Philippines, Nigeria, Liberia, Costa Rica	Abnormal leaf fall, Stripe canker
P. botryosa	Thailand, Vietnam, Malaysia, Nigeria	Abnormal leaf fall, Stripe canker
P. citrophthora	Ivory Coast, Brazil, Indonesia, China, Nigeria, Thailand	Abnormal leaf fall
P. capsici	Brazil, China, Nigeria	Black stripe, Stem canker
P. nicotianae	China, Nigeria	Abnormal leaf fall, Pod rot, Stripe canker, Black stripe
P. phaseoli	Philippines	Seedling blight
P. hevea	Malaysia	Pod rot, Black stripe

ไมคอไวรัส (Mycovirus) คือไวรัสที่ติดเชื้อและมีการเพิ่มจำนวนในรา โดยมีรายงานว่าไวรัสที่ติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูแคริโอตชั้นต่ำจะไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการน้อยมากในเจ้าบ้าน (Cai, G., 2019) และที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่าไมคอไวรัสในราที่ก่อโรคพืชมีความสามารถในการลดการก่อโรคของเจ้าบ้านหรือที่เรียกว่า Hypovirulence เช่น ไมคอไวรัสในราที่ก่อโรคใบไหม้ของเกาลัด (Chestnut blight) ที่มีความสามารถในการลดความรุนแรงในการเกิดโรค (Romon-Ochoa และคณะ, 2019) โดยความสามารถนี้เองทำให้ได้รับความสนใจและนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดการโรคพืช (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2019) การส่งผ่านของไมคอไวรัส (Mycovirus transmission) ตามธรรมชาติสามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ การแพร่ในแนวราบ (Horizontal transmission) ด้วยการรวมกันของสายใยระหว่างราที่มีไวรัสและไม่มีไวรัส (Anastomosis) แต่มีข้อจำกัดในด้านความเข้ากันได้ของสายใยราที่อาจทำให้การส่งผ่านไมคอไวรัสเกิดความยากลำบาก (Brusini และคณะ, 2013) และการแพร่ในแนวดิ่ง (Vertical transmission) ด้วยการสร้างสปอร์จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ไมคอไวรัสส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ แต่ก็มีอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวและดีเอ็นเออยู่บ้าง (Chun และคณะ, 2018)

โดยมีรายงานในโครงการก่อนหน้านี้ที่ได้คัดแยกราน้ำจากก้านใบยางพารา และพบว่ามีไมคอไวรัสซึ่งมีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่อยู่ (กุลนันท์ รุ่งนาไร่, 2016) ดังนั้นโครงการนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการมีอยู่ของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 และส่งผ่านไวรัสอาร์เอสายคู่ไปให้ *Phytophthora botryosa* เพื่อสร้างสายพันธุ์ไอโซเจนิกทั้งที่มีและไม่มีไวรัส หากในอนาคตสามารถนำผลของการศึกษานี้ไปใช้ในการควบคุมการเกิดโรคใบร่วงในยางพาราได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 และส่งผ่านไวรัสอาร์เอสายคู่ไปให้ *Phytophthora botryosa* เพื่อสร้างสายพันธุ์ไอโซเจนิกทั้งที่มีและไม่มีไวรัส

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2.5, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
2. เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (Hook)
3. เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (Needle)
4. แท่งแก้วกระจายเชื้อ (Spreader)
5. ตะเกียงแอลกฮอล์ (Alcohol lamp)
6. ถุงมือยาง ขนาด L บริษัท Sri Trang Glove, Thailand
7. ทิป (Tip) ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร บริษัท Bio Science, Inc., USA
8. พาราฟิล์ม เอ็ม (Parafilm) บริษัท M&P IMPEX, Thailand
9. กรรไกร (Scissor)
10. คัตเตอร์ (Cutter)
11. คีมคีบ (Forcep)
12. กระบอกตวงแก้ว (Cylinder) ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร
13. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial)
14. กรวยแก้ว (Funnel)
15. ขวดมีเดียดูแรน (Duran® bottle) บริษัท Duran®, Germany
16. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 250, 600 ml บริษัท Pyrex®, Germany
17. ขวดรูปชมพู่ (KIMAX® flask) ขนาด 50, 125, 300 มิลลิลิตร บริษัท Kimble®, USA
18. เครื่องชั่งสารไฟฟ้ารุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledon, Switzerland
19. เครื่องชั่งสารไฟฟ้ารุ่น PG2002-S บริษัท Mettler Toledon, Switzerland
20. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) รุ่น SZ-PT บริษัท Olympus, Japan
21. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) รุ่น BX51 บริษัท Olympus, Japan
22. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว (Petri dish)
23. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic petri dish) บริษัท Greiner bio-one, Thailand
24. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท QSP, USA
25. หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร บริษัท Accumax, India
26. พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)
27. แผ่นปิดสไลด์ (Coverslip) ขนาด 22x22 มิลลิเมตร บริษัท Menzel-Glaser

28. สไลด์แก้ว (Microscope slide) บริษัท Sail brand, China
29. ขวดฉีดน้ำกลั่น
30. ขวดรีเอเจ้นท์ (Reagent bottle)
31. ช้อนตักสาร
32. แท่นตั้งหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube stand)
33. แท่นตั้งหลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube stand)
34. แท่นตั้งหลอดทดลอง (Tube stand)
35. ถุงพลาสติก (Plastic bag) ขนาด 30”- 40” บริษัท Lotus, Thailand
36. เครื่องเพาะเชื้อเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) บริษัท Eppendorf, Germany
37. ตู้อบความร้อน (Drying oven) บริษัท Memmert, Germany
38. เครื่องเขย่าสาร (Vortex) บริษัท Scientific industries, Inc., USA
39. เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate stirrer) บริษัท IKA, Germany
40. เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (Heat blocks) บริษัท Merck, Germany
41. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Mettler Toledo, USA
42. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิขนาดใหญ่ (Centrifuge) บริษัท Beckman Coulter, USA
43. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) บริษัท Eppendorf, Germany
44. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) บริษัท Kubota, Japan
45. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Mini centrifuge) บริษัท Nippon genetics, Japan
46. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy, Japan
47. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermocycler) บริษัท Bio rad, USA
48. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Eppendorf, Germany
49. ตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (Bio safety cabinet class II) บริษัท Lab micro, Thailand
50. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
51. เทป (Tape)
52. ป้ายสติ๊กเกอร์ (Label sticker)
53. ผ้าขาวบาง (Cloth)
54. ผ้าวีราเน่ (Virone)
55. โกร่งและสาก (Mortar and pestle)
56. กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 3 มิลลิลิตร บริษัท Merck, Germany
57. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (freezer) อุณหภูมิ -20 °C บริษัท Panasonic, Japan

58. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (Ultra-low temperature freezer) อุณหภูมิ -86 °C บริษัท Thermo fisher scientific, USA
59. ตู้แช่เย็น (Refrigerator) อุณหภูมิ 4 °C บริษัท Mitsubishi, Japan
60. อุปกรณ์เตรียมเจล บริษัท Major science, USA
61. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (Gel electrophoresis) บริษัท Major science, USA
62. เครื่องอ่านผลเจล (Gel documentation) บริษัท Uvitech, UK
63. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ (Ultra-pure water) บริษัท Alga, UK
64. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) บริษัท Samsung, Korea

2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ผงวุ้น (Agar) บริษัท Sigma, USA
2. ผงอะกาโรส (Agarose) บริษัท Sigma, USA
3. ผงเซลลูโลส (Cellulose) C6288 บริษัท Sigma, USA
4. ไดเอทิล ไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) บริษัท Amresco, USA
5. แอมพิซิลิน (Ampicillin) บริษัท Kos introtech, Thailand
6. ไฮเมซาโซล (Hymexazol) บริษัท Thepwatana, Thailand
7. ฟีนอล (Phenol) บริษัท Amresco, USA
8. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท Merck, Germany
9. เอทานอล (Ethanol) บริษัท RCI labscan, Thailand
10. เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) บริษัท Amresco, USA
11. ไอโซเอมิลแอลกฮอล์ (Isoamyl alcohol) บริษัท RCI labscan, Thailand
12. โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) บริษัท Merck, Germany
13. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท Sigma, USA
14. เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) บริษัท Sigma, USA
15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) บริษัท VWR chemical, USA
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) บริษัท Merck, Germany
17. ทริส (Tris) บริษัท Research organic, USA
18. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) บริษัท Merck, Germany
19. อีดีทีเอ (EDTA) บริษัท Bio Basic Canada Inc., Canada

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงราไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 และการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

3.1.1 การเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 ที่คาดว่าเป็น *Phytophthora botryosa* ที่แยกได้จากก้านใบยางพาราที่หล่นบริเวณรอบต้น จากสวนยางพาราในจังหวัดระยองและจังหวัดจันทบุรีในประเทศไทย ที่มาจากโครงการวิจัยในหัวข้อ “ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้นยางพารา” ของนางสาวกุลนันทน์ รุ่งนาไร่ ซึ่งมีรายงานถึงการพบไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 ทำได้โดยนำชิ้นวุ้นของราน้ำไอโซเลท R152 จาก Stock culture มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีสายใยของราเจริญด้วยพาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน และนำไปตรวจสอบสกุลของราว่าเป็นสกุลเดิมตามที่มีรายงานไปแล้วหรือไม่ด้วยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore isolation) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 ด้วยเทคนิคการใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique) โดยตัดชิ้นวุ้นของราน้ำไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ประมาณ 2-3 มาใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมล็ดงาและน้ำ P3 ปลอดเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C ในที่มีแสง เป็นเวลา 5 วันหรือจนกว่าจะสังเกตเห็นการเจริญของสายใยราบนเมล็ดงา จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้มีการปล่อยของซูโอสปอร์ ทำได้โดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาเปลี่ยนน้ำจากน้ำ P3 ปลอดเชื้อ เป็นน้ำ DI ปลอดเชื้อ และนำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 30 นาที และตรวจสอบการปล่อยของซูโอสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หากพบการปล่อยของซูโอสปอร์ ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 จากนั้นใช้แท่งแก้วกระจายเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะการเจริญของราแต่ละโคโลนีและนำไปตรวจสอบสกุลราด้วยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.2 การระบุสกุลของราโดยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.2.1 การเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ตัดชิ้นวุ้นของราน้ำไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้มีการสร้างสายใยที่ใหม่สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

นำเข็มเขี่ยเชื้อปลายงอปลอดเชื้อขีดสายใยบริเวณขอบโคโลนีของราน้ำไอโซเลท R152 ประมาณ 3 ครั้ง ให้มีการแตกหักของสายใยรา จากนั้นนำมาผสมกับสารทั้งหมดในปริมาตรตามตารางที่ 3 และนำเข้าเครื่อง PCR thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะที่เหมาะสมตามตารางที่ 4 ทั้งหมด 30 รอบ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกนี้จะใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ที่มีความจำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา เพื่อเป็นการยืนยันว่าราน้ำไอโซเลท R152 เป็นราหรือสิ่งมีชีวิตคล้ายราจริง โดยตัวแปรควบคุมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และใช้ *Phytophthora* species ในห้องปฏิบัติการเป็นตัวควบคุมบวกในการทดลองนี้

ตารางที่ 2 ข้อมูลไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ไพรเมอร์	**ฟังก์ชัน**	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’⟶ 3’)**	**T_m (°C)**	**ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)**
ITS 1[a]	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	61	870-900
ITS 4[a]	Reward	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56	

(White และคณะ, 1990)[a]

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
10X PCR buffer	2.5	1X
50 mM $MgCl_2$	0.75	1.5 mM
10 mM dNTPs mix	0.5	0.2 mM
10 μM ITS1 (Forward primer)	1.25	0.5 μM
10 μM ITS4 (Reward primer)	1.25	0.5 μM
Taq polymerase	0.125	0.05 mM
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	18.625	
ปริมาตรรวม	25.0	

ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (°C)**	**เวลา (นาที)**
Initial denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	55	0.30
Initial extension	72	1.00
Final extension	72	5.00

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

หลังจากการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอรอบแรกเสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอรอบแรกมาเจือจาง 100 เท่า และนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง ITS1-5.8s-ITS2 ของราในสกุลไฟทอฟธอราเพื่อยืนยันว่าราน้ำไอโซเลท R152 เป็นราในสกุลไฟทอฟธอราจริง โดยนำดีเอ็นเอแม่แบบมาผสมกับสารทั้งหมดในปริมาตรตามตารางที่ 6 และนำเข้าเครื่อง PCR thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะที่เหมาะสมตามตารางที่ 7 ทั้งหมด 30 รอบ ตัวแปรควบคุมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 จะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และใช้ *Phytophthora botryosa* เป็นตัวควบคุมบวก

ตารางที่ 5 ข้อมูลไพรเมอร์ A2 และ I2

ไพรเมอร์	ฟังก์ชัน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→ 3')	T_m (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
A2[b]	Forward	ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA	61	782
I2[b]	Reward	GATATCAGGTCCAATTGAGATGC	61	

(Drenth และคณะ, 2006) [b]

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	2.5	1X
50 mM $MgCl_2$	0.75	1.5 mM
10 mM dNTPs mix	0.5	0.2 mM
10 μM A2 (Forward primer)	1.25	0.5 μM
10 μM I2 (Reward primer)	1.25	0.5 μM
Taq polymerase	0.125	0.05 mM
DNA template	1	
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	17.625	
ปริมาตรรวม	25.0	

ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	56	0.30
Initial extension	72	1.00
Final extension	72	5.00

3.2.4 วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

เตรียม 1% อะกาโรสเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.3 มิลลิกรัม ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อเจลแข็งตัวนำไปใส่ในเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสที่มี 1X TAE buffer จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2 มาหยอดลงแต่ละหลุมโดยผสมกับ 6X Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และใช้ 1kb plus DNA ladder เป็นตัวระบุขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาแช่ในเอทิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 10 นาที และ แช่ในน้ำเปล่าเป็นเวลาอีก 10 นาที ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Gel documentation ที่จะทำให้เห็นแถบของดีเอ็นเอและขนาดจากนั้นบันทึกผลการวิเคราะห์และถ่ายภาพ

3.3 การตรวจหาไวรัสอาร์เอนเอสายคู่

3.3.1 การเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 เพื่อสร้างสายใยและการเก็บสายใยเพื่อสกัดสารพันธุกรรม

ตัดชิ้นวุ้นของราน้ำไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ประมาณ 8-10 ชิ้นวุ้น ด้วยพาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 (ภาคผนวก ก) ที่มี Ampicillin ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วันหรือจนกว่าสายใยจะมีปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นเก็บสายใยโดยการกรองผ่านผ้าขาวบางปลอดเชื้อ และล้างทำความสะอาดด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้แห้งและนำมาเก็บรักษาที่ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาสกัดสารพันธุกรรมในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพันธุกรรม (Total nucleic acid extraction)

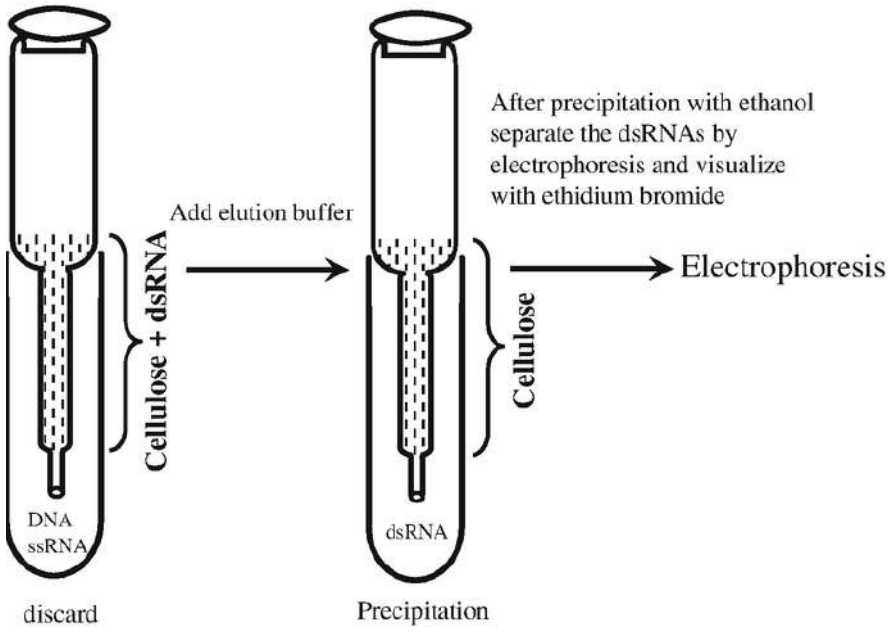
ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมในโครงการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Okada และคณะ (2015) และวิธีของกุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) ทำโดยนำสายใยราที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C น้ำหนัก 500 มิลลิกรัม มาบดในโกร่งที่เก็บรักษาในตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80°C เมื่อบดจนละเอียดแล้ว เติม Extraction buffer ที่ประกอบด้วย 2X STE buffer ที่มี 1% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร ลงในโกร่งและผสมให้เข้ากัน ก่อนที่จะดูดสารแขวนลอยที่ได้ใส่ลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ตามด้วย Saturated phenol ปริมาตร 625 ไมโครลิตร และ chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 625 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอดเท่าๆกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C จะได้

เป็นส่วนตะกอนและส่วนใสแยกชั้นกัน ดูดส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปสกัดอาร์เอ็นสายคู่ต่อไป

3.3.3 การสกัดอาร์เอ็นสายคู่ (dsRNA extraction by cellulose column chromatography)

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย Cellulose column chromatography ดัดแปลงจากวิธีของ Das และคณะ (2014), บุณยฤทธิ์ จันทวิมล (2011) และกุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) ทำโดยผสมผงเซลลูโลส (Sigma C6288) 0.5 กรัมกับ 1X STE buffer ที่มี 15% ethanol (v/v) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการสกัดสารพันธุกรรมในข้อ 3.3.2 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาผสมกับสารแขวนลอยเซลลูโลสที่เตรียมไว้ และเติม Ethanol เพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้น 17% (v/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมคอลัมน์โดยใช้กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 3 มิลลิลิตร ดึงส่วนที่เป็นลูกสูบ (Plugger) ออกจากกระบอกฉีดยา จากนั้นนำผ้าวีราเน่ (Interlining) ปลอดเชื้อที่แช่อยู่ใน 1% DEPC (ภาคผนวก ข) มาใส่ลงไปในกระบอกฉีดยาเปรียบเสมือนเป็นแผ่นกรอง จากนั้นนำคอลัมน์ไปตั้งในที่ตั้งหลอดทดลองในลักษณะเอาส่วนปลายลง และค่อยๆเทสารแขวนลอยเซลลูโลสกับส่วนใสที่เตรียมไว้ลงไปในคอลัมน์ รองด้านล่างของคอลัมน์ด้วยฝาของหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อ สารแขวนลอยที่ใส่ลงไปจะค่อยๆไหลผ่านคอลัมน์และชั้นของผ้าวีราเน่ตามแรงโน้มถ่วงของโลก เซลลูโลสจะถูกบรรจุอยู่บริเวณก้นของคอลัมน์ไม่ไหลผ่านชั้นผ้าวีราเน่ออกมา จากนั้นนำส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมน์มาผ่านคอลัมน์อีก 2 ครั้ง จนสารแขวนลอยในคอลัมน์เกือบหมด จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย Washing buffer ซึ่งประกอบด้วย 1X STE buffer ที่มี 15% ethanol (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทิ้งน้ำที่ไหลผ่านจากคอลัมน์ซึ่งจะประกอบไปด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวและดีเอ็นเอ ส่วนอาร์เอ็นเอสายคู่จะจับอยู่กับเซลลูโลสในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอล 15% (v/v) ในคอลัมน์ จากนั้นเมื่อ Washing buffer ไหลผ่านคอลัมน์เกือบหมด จึงเติม Elute buffer ซึ่งก็คือ 1X STE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บน้ำที่ไหลผ่านจากคอลัมน์ทั้งหมดซึ่งคาดว่าน่าจะมีอาร์เอ็นเอสายคู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 3M Sodium acetate (pH5.2) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายที่ไหนผ่านจากคอลัมน์ จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยวิธี Invert mix และนำไปบ่มในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C ข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายที่อยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรมาแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C จนครบปริมาตรทั้งหมด โดยทิ้งส่วนใสและเก็บส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วย 80% ethanol (v/v) และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ทั้งหมด 2 รอบ ทิ้งส่วนใสทั้งหมด นำตะกอนที่ได้มา Air dry ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C ในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ค่อนข้างแห้งมาทำละลายด้วย 1% DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่มาตรวจสอบการมีอยู่ของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

บน 1% อะกาโรสเจล และตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้



ภาพที่ 2 แสดง Cellulose column chromatography
(Peyambari และคณะ, 2018)

3.4 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์

3.4.1 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ RNase 3

หลังจากการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop) ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ในขั้นตอนที่ 3.3.3 แล้วจึงปิเปตอาร์เอ็นเอสายคู่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตรด้วยสารละลาย 1X STE buffer (ภาคผนวก ข) จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย 3M Sodium acetate (pH5.2) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 เท่าของของสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ -20°C ข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายมาแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ในปริมาตรที่เท่ากัน 2 หลอดได้แก่ ชุดควบคุม และชุดทดลอง จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 หลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างส่วนตะกอนด้วย 80% ethanol (v/v) และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ทั้งหมด 2 รอบ ทิ้งส่วนใสทั้งหมด และเก็บส่วนตะกอนมาทำละลายใน 1% DEPC จากนั้นเติม RNase A (Bio Basic, Canada ให้ได้ความเข้มข้น

สุดท้ายเป็น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10X EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ก่อนนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

3.4.2 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ DNase I

หลังจากการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop) ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ในขั้นตอนที่ 3.3.3 แล้วจึงปิเปตอาร์เอ็นเอสายคู่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม มาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 หลอดได้แก่ หลอดควบคุม และหลอดทดลอง จากนั้นนำมาตกตะกอนอีกรอบด้วย 3M Sodium acetate (pH5.2) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยวิธี Invert mix และนำไปบ่มในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C ข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C ทิ้งส่วนใสและเก็บส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วย 80% ethanol (v/v) และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ทั้งหมด 2 รอบ ทิ้งส่วนใสทั้งหมด นำตะกอนที่ได้มา Air dry จนแห้งแล้วมาทำละลายตามชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ละลายในน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสปริมาตร 18 ไมโครลิตร และ 10X DNase I buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ชุดทดลอง ละลายในน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสปริมาตร 18 ไมโครลิตร ตามด้วย 10X DNase I buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ DNase I (Bio Basic, Canada) 1 หน่วย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองเป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 5X EDTA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ก่อนนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

3.4.3 การทดสอบย่อยสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ S1 nuclease

หลังจากการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop) ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ในขั้นตอนที่ 3.3.3 แล้วจึงปิเปตอาร์เอ็นเอสายคู่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม มาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 หลอดได้แก่ หลอดควบคุม และหลอดทดลอง จากนั้นนำมาตกตะกอนอีกรอบด้วย 3M Sodium acetate (pH5.2) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยวิธี Invert mix และนำไปบ่มในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C ข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C ทิ้งส่วนใสและเก็บส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วย 80% ethanol (v/v) และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ทั้งหมด 2 รอบ ทิ้งส่วนใสทั้งหมด นำตะกอนที่ได้มา Air dry จนแห้งแล้วมาทำละลายตามชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ละลายในน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดทดลอง ละลายในน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสปริมาตร 16 ไมโครลิตร ตามด้วย 10X S1 buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ S1 (Promega, USA) 0.1 หน่วย/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C

ในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลองเป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ก่อนนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

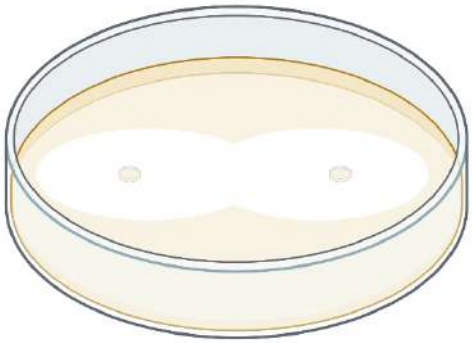
3.5 การส่งผ่านไวรัส

3.5.1 สายพันธุ์ราที่ใช้ในการส่งผ่านไวรัส

ในการทดลองการส่งผ่านไวรัสนี้ได้ใช้ราน้ำไอโซเลท R152 ที่คาดว่าจะมีไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่มาเป็นผู้ให้ (Donor) ในการส่งผ่านไวรัส และได้เลือกใช้รา *Phytophthora botryosa* สายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัสที่เก็บรักษาอยู่ใน Stock culture ในห้องปฏิบัติการมาเป็นผู้รับ (Recipient) โดยเพาะเลี้ยงราทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วันหรือจนกว่าจะสร้างสายใยประมาณ 3/4 ของจานเพาะเลี้ยงเชื้อจึงนำไปทดลอง

3.5.2 การส่งผ่านไวรัสด้วยวิธีตามธรรมชาติ

ขั้นตอนการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธีตามธรรมชาติในโครงการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ (Cai, G., 2019) ที่ได้ทำโครงการวิจัยในหัวข้อ “PiRV-2 stimulates sporulation in *Phytophthora infestans”* ซึ่งประสบความสำเร็จจากการใช้วิธีการส่งผ่านไวรัสแบบ Anastomosis ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีการส่งผ่านไวรัสตามธรรมชาติของราคือ การส่งผ่านในแนวราบ (Horizontal transmission) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงราตัวที่มีไวรัส (Donor) ร่วมกับราตัวที่ไม่มีไวรัส (Recipient) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วันหรือจนกว่าจะเห็นการรวมกันของสายใยดังภาพที่



ภาพที่ 3 แสดงภาพจำลองการเพาะเลี้ยงราแบบ Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8

ซึ่งคาดว่าจะเกิดการส่งผ่านสารพันธุกรรมและไซโตพลาสมิก (Pearson, 2009) ซึ่งอัตราการประสบความสำเร็จในการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธี Anastomosis ขึ้นอยู่กับความเข้ากันได้ของสายใยแต่ละสายพันธุ์ เช่น อยู่ในกลุ่ม Vegetative compatibility group (VCG) เดียวกันหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานถึงการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธี Anastomosis จากราที่อยู่คนละสปีชีส์กัน (Lui, 2003) จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นฝั่งราตัวที่เป็นผู้รับ (Recipient) ด้วยพาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ เพื่อทำให้แน่ใจว่าชิ้นวุ้นที่ตัดมาจะมีแค่สายใยของราตัวที่เป็นผู้รับเท่านั้น (Recipient) จากนั้นนำชิ้นวุ้นนี้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ใหม่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยการนำมาสกัดสารพันธุกรรม

3.5.3 การส่งผ่านไวรัสด้วยวิธีในห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธีในห้องปฏิบัติการใช้วิธี Mechanical transmission คือการทำให้เส้นใยของราตัวที่ไม่มีไวรัส (Recipient) เกิดการความเสียหายจากแรงกลโดยมนุษย์ โดยทำให้สายใยขาดออกจากกันหรือเกิดการแตกของสายใย ทำได้โดยการใช้พาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อเจาะวุ้นบริเวณที่มีสายใยเจริญอยู่ของรา *Phytophthora botryosa* สายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัสที่เลี้ยงอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) จากนั้นหยดบริเวณที่เจาะด้วยสารละลายอาร์เอสายคู่ที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 3.3.3 เพื่อให้สารพันธุกรรมจากรานำ้ไอโซเลท R152 ส่งผ่านเข้าไปในสายของราตัวที่เป็นผู้รับ (Recipient) จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยการนำมาสกัดสารพันธุกรรม

3.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่า

ขั้นตอนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่าทำได้โดยเพาะเลี้ยงราสายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วันหรือจนกว่าจะสร้างสายใยประมาณ 3/4 ของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นตรวจสอบรูปแบบการเจริญของโคโลนี ลักษณะโคโลนี สีโคโลนี บันทึกลักษณะที่พบและถ่ายภาพ

3.6.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำได้โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงโดยใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique) โดยนำชิ้นวุ้นของราสายพันธุ์ต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมล็ดงาและน้ำ P3 ปลอดเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 28°C ในที่มีแสง เป็นเวลา 7 วันหรือจนกว่าจะสังเกตเห็นการเจริญของสายใยราบนเมล็ดงา เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างของสปอร์แรงเจียม จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หรือทำ Slide culture ย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์แรงเจียม ขนาดของสปอร์แรงเจียม การหลุดของสปอร์แรงเจียมจากก้านชูสปอร์ การสร้างผนังกั้นสายใย นอกจากนี้ยังสามารถศึกษารูปแบบการปล่อยของซูโอสปอร์ได้ โดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำ P3 มาเปลี่ยนเป็นน้ำ DI ปลอดเชื้อ และนำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 30 นาที และดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สังเกตการปล่อยของซูโอสปอร์จากสปอร์แรงเจียม จากนั้นบันทึกลักษณะที่พบและถ่ายภาพ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 และการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

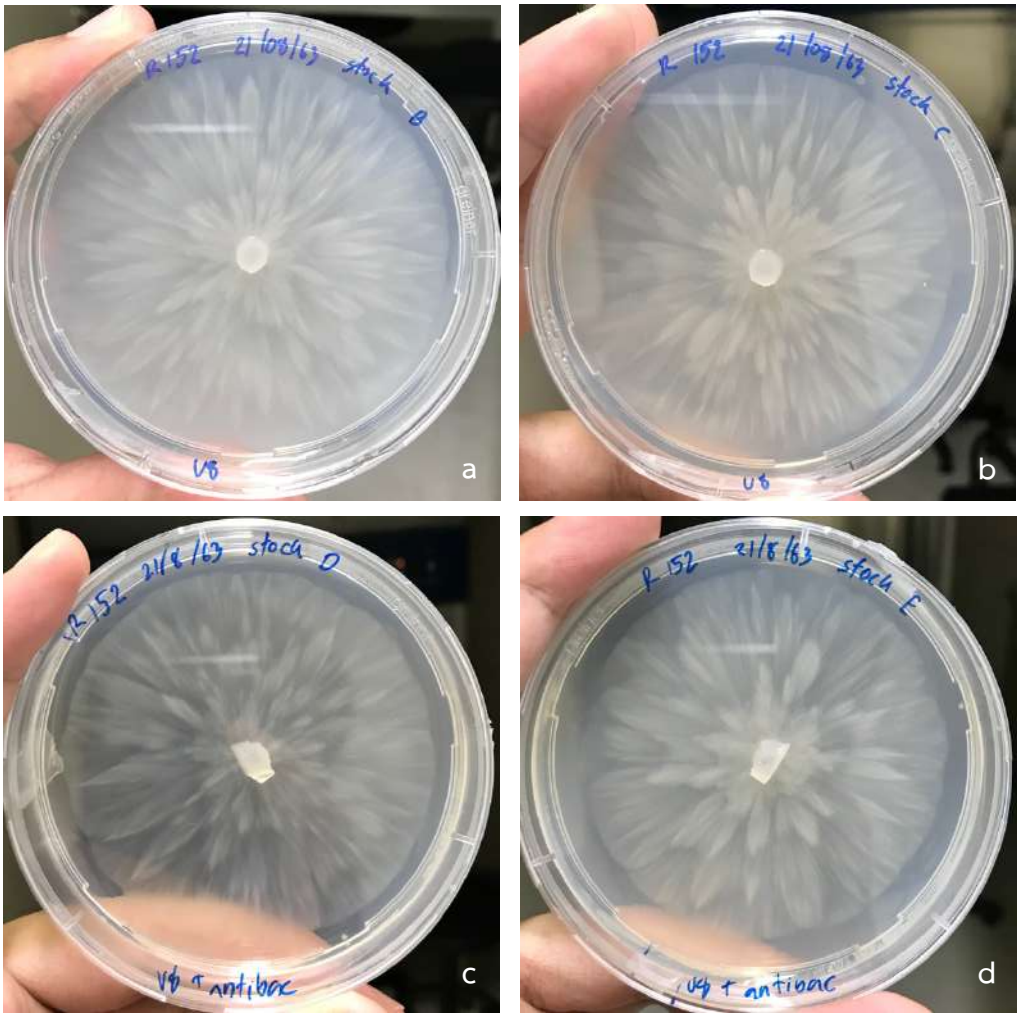
4.1.1 การเพาะเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152

ราน้ำไอโซเลท R152 จากโครงการวิจัยเรื่อง “ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้นยางพารา” ของนางสาวกุลนันทน์ รุ่งนาไร่ ซึ่งราน้ำไอโซเลท R152 แยกได้จากปากทางเข้าวัดเขาตาอิ๋น ม.5 ต.ชุมแสง อ.วังจันทร์ จ.ระยอง พิกัด 12°54'55.0"N 101°28'52.4"E (กุลนันท์ รุ่งนาไร่, 2016) ได้ถูกเก็บรักษาใน P3 water stock culture ในห้องปฏิบัติการ 2019 มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 และถูกต่อเชื้อในทุกๆปี จนถูกนำมาทำการทดลองในปี พ.ศ. 2563 ซึ่งจากการนำชิ้นวุ้นของราไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 จาก Stock culture มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C พบการเจริญของราไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 เจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 วัน ลักษณะการเจริญของโคโลนีเป็นรูปแบบ Radiate คือมีเส้นใยเจริญออกเป็นแฉกจากจุดศูนย์กลางในแนวรัศมี นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของราไฟทอฟธอราไอโซเลท R152 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin มีการเจริญลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ภาพที่ 4.1)

4.1.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

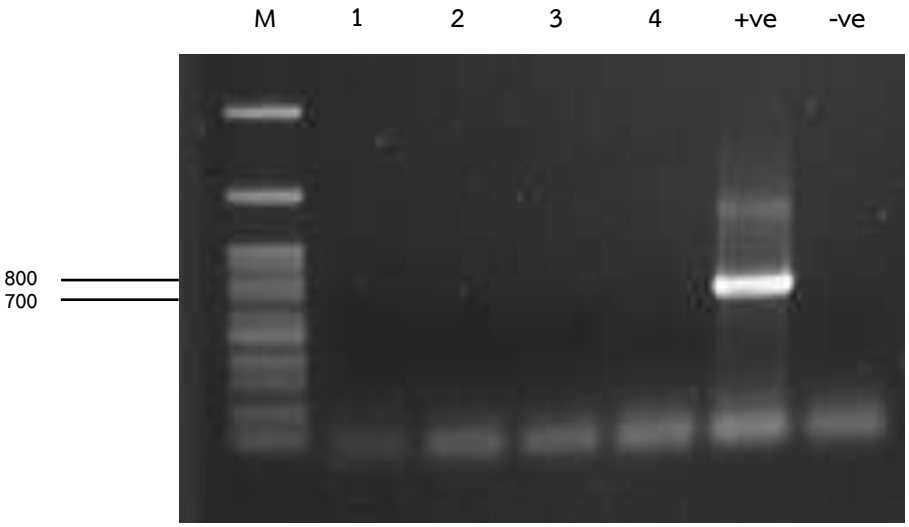
จากการทดลองแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore isolation) โดยนำราน้ำไอโซเลท R152 มาเลี้ยงด้วยเทคนิคการใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique) และเหนี่ยวนำราให้มีการปล่อยซูโอสปอร์ด้วยการเปลี่ยนสารอาหารจากน้ำ P3 ปลอดเชื้อเป็นน้ำ DI ปลอดเชื้อ จากนั้นตรวจสอบการปล่อยซูโอสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่ามีสปอร์แรงเจียมจำนวนมากที่มีลักษณะกลมแบบ Globose มีขนาดประมาณ 20 ไมโครเมตร และพบซูโอสปอร์ถูกปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมโดยมีการสร้างโครงสร้างพิเศษที่งอกและยื่นออกมาเป็น Outgrowing papilla เพื่อบรรจุซูโอสปอร์แล้วจึงแตกออกเพื่อปล่อยซูโอสปอร์ (ภาพที่ 4.2) ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถพบได้ในพิเทียม แต่ไม่พบในไฟทอฟธอรา และจากรายงานของนางสาวกุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) พบสปอร์แรงเจียมขนาดประมาณ 15.2 ไมโครเมตร ที่มีลักษณะกลมแบบ Globose คล้ายสปอร์แรงเจียมของพิเทียม แสดงให้เห็นว่าราน้ำไอโซเลท R152 มีรา 2 ชนิดปนกันอยู่ จึงทำให้สรุปได้ว่าสปอร์แรงเจียมและซูโอสปอร์ที่พบเป็นของราพิเทียม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำสารแขวนลอยสปอร์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน พบการเจริญของราหลายโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกัน จึงได้นำมาต่อเชื้อลงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ใหม่ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3 วัน พบการเจริญของสายใยราประมาณ 3/4 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้นำสายใยรามาดูลักษณะโคโลนีและนำไปตรวจสอบสกุลราด้วยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวมีลักษณะโคโลนีเหมือนกับราไฟทอฟธอรา R152 และจากการทำ Nested–PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2 ที่มีความจำเพาะต่อราไฟทอฟธอรา พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งตรงกับรายงานของกุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) ว่าไฟทอฟธอราที่มีไวรัสไม่สร้างสปอร์แรงเจียมและไม่สามารถแยกออกจากพิเทียมได้ ดังนั้นราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวไม่ใช่ไฟทอฟธอรา



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของราไฟทอฟธอรา R152 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (a,b) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin (c,d)

ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท R152 ที่เลี้ยงด้วยเทคนิคการใช้เมล็ดงาเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique) (a) สปอร์แรงเจียม (b) Outgrowing papilla (ลูกศร)



ภาพที่ 4.3 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ A2/I2 จากราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยว

Lane M : 100 bp DNA ladder

Lane 1, 2, 3, 4 : ราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวสปอร์ที่ 1, 2, 3, 4 ตามลำดับ

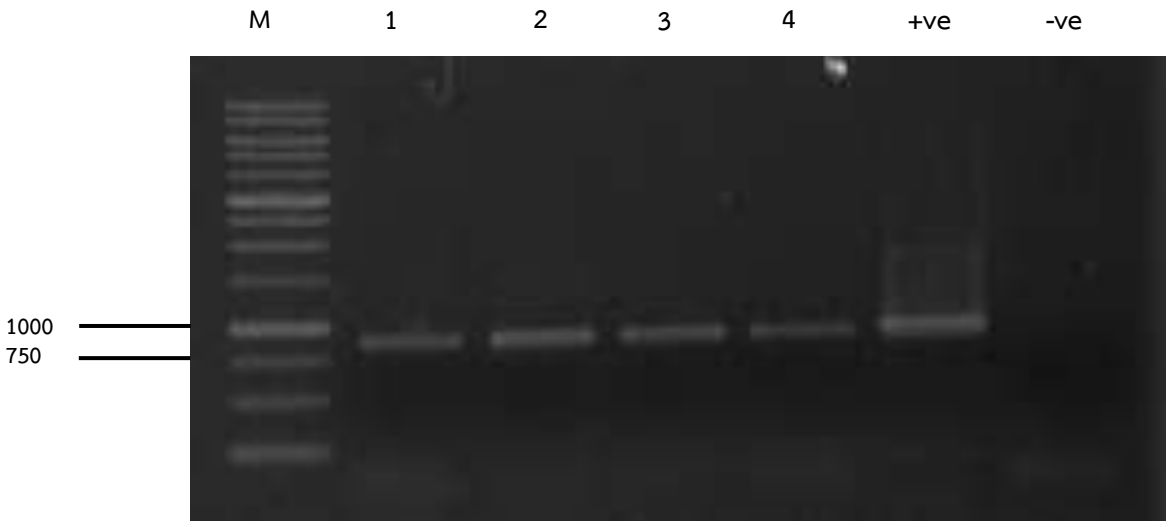
Lane +ve : ชุดควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* sp.

Lane -ve : ชุดควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น

4.2 การระบุสกุลของราโดยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% และความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที พบว่าราน้ำไอโซเลท R152 ทุกตัวอย่างแสดงแถบของดีเอ็นเอตรงกับแถบในชุดควบคุมบวกซึ่งก็คือ *Phytophthora* sp. ที่จะมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 870-900 คู่เบส (ภาพที่ 4.4) และในชุดควบคุมลบไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงสามารถสรุปผลจากการทดลองนี้ได้ว่าราน้ำไอโซเลท R152 ทุกตัวอย่างเป็นราหรือสิ่งมีชีวิตคล้ายรา



ภาพที่ 4.4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ที่มีความจำเพาะต่อราและสิ่งมีชีวิตคล้ายรา

Lane M : 1 kb DNA ladder

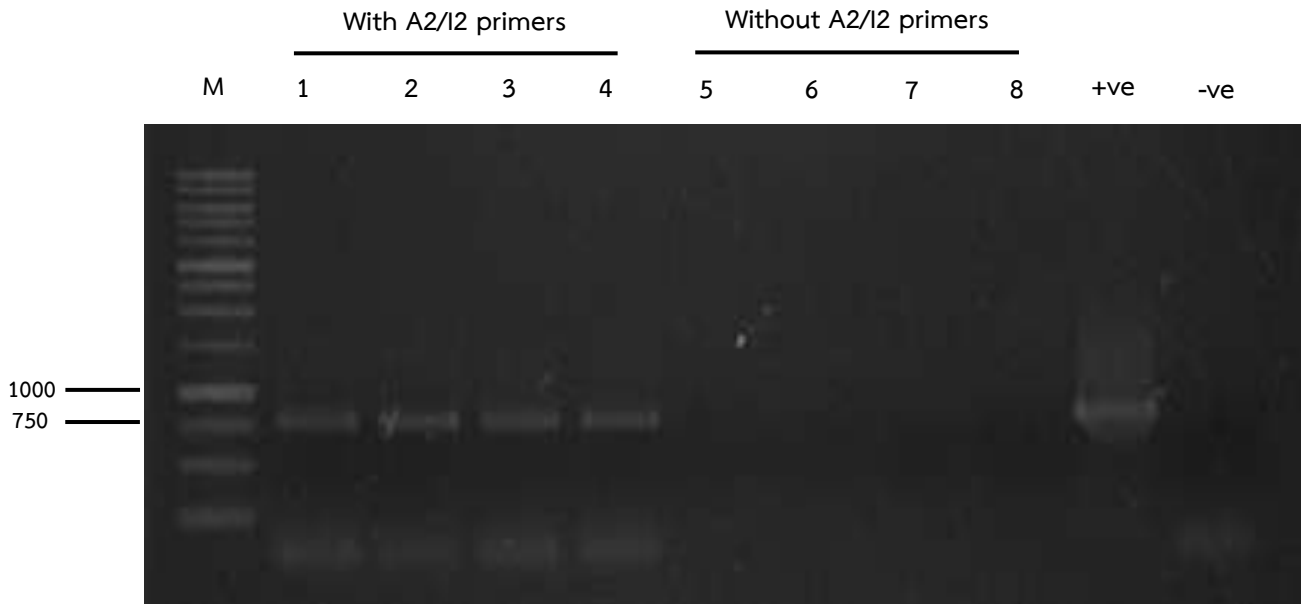
Lane 1, 2, 3, 4 : ราน้ำไอโซเลท R152 ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 ตามลำดับ

Lane +ve : ชุดควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* sp.

Lane -ve : ชุดควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น

4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *Phytophthora* sp. โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบแรกด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มาเจือจาง 100 เท่า และใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ A2 และ I2 แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% และความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที พบว่าราน้ำไอโซเลท R152 ทุกตัวอย่างแสดงแถบของดีเอ็นเอตรงกับแถบในชุดควบคุมบวกซึ่งก็คือ *Phytophthora* sp. ที่จะมีขนาดของผลิตภัณฑ์ 782 คู่เบส (ภาพที่ 4.5) และในชุดควบคุมลบไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงสามารถสรุปผลจากการทดลองนี้ได้ว่าราน้ำไอโซเลท R152 ทุกตัวอย่างมี *Phytophthora* sp. อยู่ร่วมกับ *Pythium* sp.



ภาพที่ 4.5 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก Polymerase Chain Reaction (PCR)
โดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ I2 ที่มีความจำเพาะต่อ *Phytophthora* sp.

Lane M : 1 kb DNA ladder

Lane 1, 2, 3, 4 : ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เจือจาง 100 เท่า ใส่ไพรเมอร์ A2/I2

Lane 5, 6, 7, 8 : ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เจือจาง 100 เท่า ไม่ใส่ไพรเมอร์ A2/I2

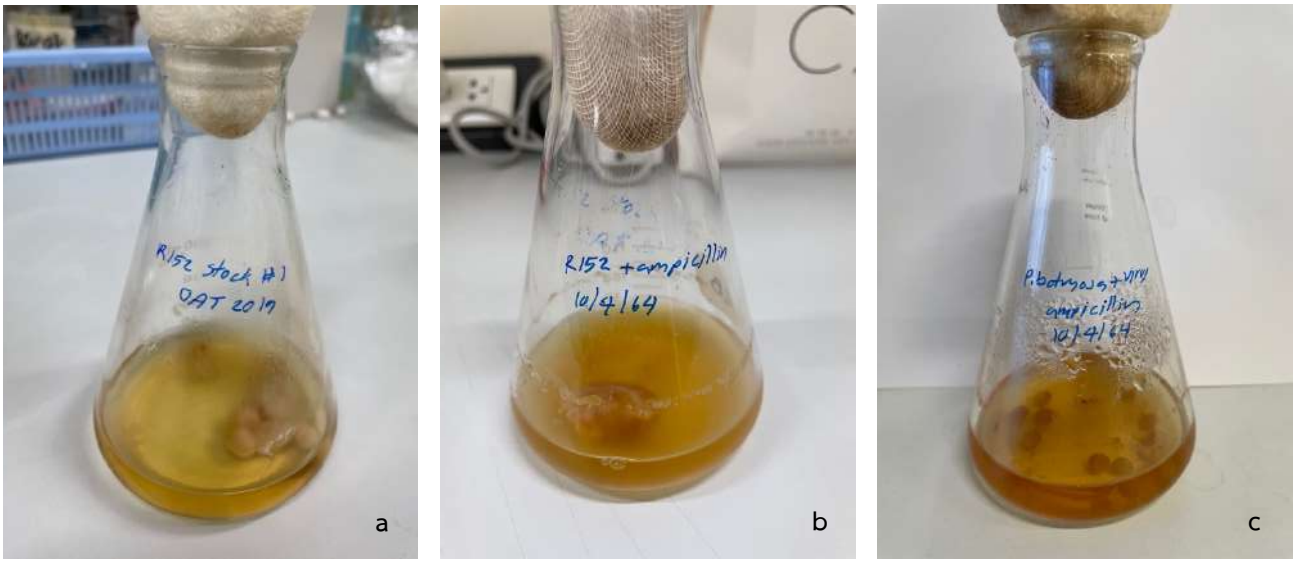
Lane +ve : ชุดควบคุมบวกเป็น *Phytophthora* sp.

Lane -ve : ชุดควบคุมลบเป็นน้ำกลั่น

4.3 การตรวจหาไวรัสอาร์เอนเอสายคู่

4.3.1 การเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 เพื่อสร้างสายใยและการเก็บสายใยเพื่อสกัดสารพันธุกรรม

จากการเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 เพื่อสร้างสายใยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 ที่มี Ampicillin บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสายใยของราน้ำไอโซเลท R152 มีจำนวนมากและอัดแน่นจนเป็นก้อนลักษณะกลม ไม่พบชิ้นวุ้นราเหลืออยู่ ในขณะที่สายใยของรา *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสมีสายใยในปริมาณที่ค่อนข้างน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยสายใยยังไม่อัดแน่นกันเป็นก้อนและยังพบชิ้นวุ้นของราอยู่บ้าง (ภาพที่ 4.6) จึงได้บ่ม *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสต่อเป็นเวลาอีก 7 วัน เพื่อให้สร้างสายใยในจำนวนที่มากขึ้น จากนั้นเก็บสายใยราเพื่อสกัดสารพันธุกรรมที่ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80°C โดยเมื่อนำราแต่ละสายพันธุ์มาชั่งน้ำหนักหลังจากถูกแช่แข็งแล้ว พบว่าราน้ำไอโซเลท R152 มีปริมาณสายใยมากกว่า *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสถึง 3 เท่า (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้)



ภาพที่ 4.6 แสดงการเลี้ยง (a) ราน้ำไอโซเลท R12 รอบแรก (b) ราน้ำไอโซเลท R152 รอบสอง (c) *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสร้างสายใยสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

4.3.2 การสกัดสารพันธุกรรม (Total nucleic acid extraction)

จากการสกัดสารพันธุกรรมที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Okada และคณะ (2015) และวิธีของ กุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) พบว่าเมื่อบดสายใยแข่แข็งจนละเอียดด้วยโกร่งเป็นเวลา 30 นาที จะได้เป็นสารแขวนลอยสายใยรา (ภาพที่ 4.7 a, b) จากนั้นเติม Extraction buffer เพื่อทำให้เซลล์แตกและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อที่จะตกตะกอนเศษซากเซลล์หรือออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ที่มีน้ำหนัก ส่วนใสที่ได้คือสารพันธุกรรมทั้งหมด (Total nucleic acid) (ภาพที่ 4.7 c) ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส และนำไปสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อ

4.3.3 การสกัดอาร์เอ็นสายคู่ (dsRNA extraction by cellulose column chromatography)

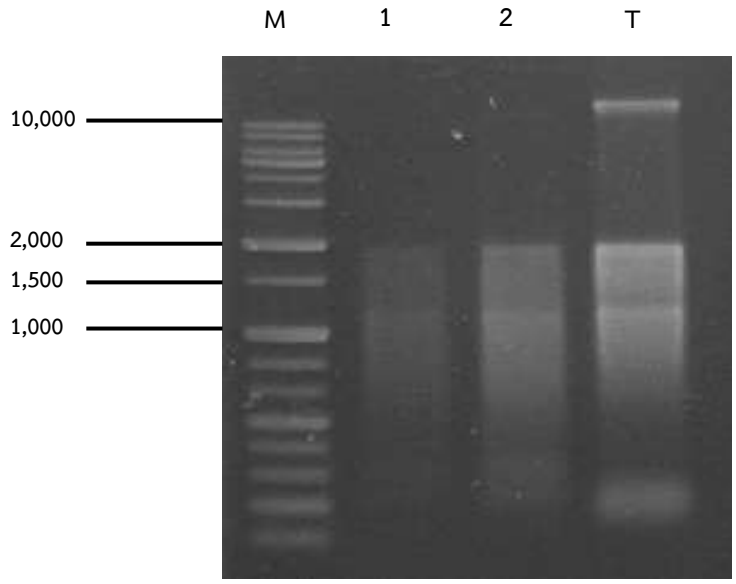
การสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย Cellulose column chromatography ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ กุลนันท์ รุ่งนาไร่ (2016) โดยจะตั้งคอลัมน์ดังที่แสดงอยู่ใน (ภาพที่ 4.7 d)

ภาพที่ 4.7 แสดงขั้นการสกัดสารพันธุกรรม

หลังจากการสกัดพบว่าส่วนตะกอนอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ได้ มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดที่สกัดได้ โดยจะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมและทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสเพื่อดูขนาดของอาร์เอ็นเอสายคู่ จากการทดลองการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรม พบว่าสารพันธุกรรมจากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบแรก (R152-1) มีความเข้มข้นสูงที่สุดอยู่ที 542.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สารพันธุกรรมจากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบสอง (R152-2) มีความเข้มข้น 161.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสารพันธุกรรมจากการสกัด *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส (P+V) มีความเข้มข้น 212.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 8) และผลจากการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟลิซิส พบว่าจากการสกัดสารพันธุกรรมราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบแรก (R152-1) พบแถบของอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 2 แถบบน 1% อะกาโรสเจล ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 1.3 และ 1.9 กิโลเบส (ภาพที่ 4.8) ส่วนจากการสกัดสารพันธุกรรมรอบที่สอง พบว่าราน้ำไอโซเลท R152 (R152-2) พบแถบของอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 2 แถบบน 1% อะกาโรสเจล ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 1.0 และ 0.8 กิโลเบส และ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส (P+V) พบแถบของอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 2 แถบบน 1% อะกาโรสเจลเช่นเดียวกัน ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 1.0 และ 0.8 กิโลเบส เท่ากับที่พบในราน้ำไอโซเลท R152 (R152-2) แต่มีคุณภาพที่แย่กว่า (ภาพที่ 4.9) จากผลการทดลองนี้จึงทำให้สรุปได้ว่า ราน้ำไอโซเลท R152 สามารถส่งผ่านสารพันธุกรรมที่คาดว่าจะเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ไปให้ *P. botryosa* ได้ แต่ทั้งนี้ควรที่จะศึกษาผลการตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ก่อนว่าใช่อาร์เอ็นเอสายคู่จริงหรือไม่ และการสกัดสารพันธุกรรมในแต่ละครั้งจะพบแถบอาร์เอ็นเอในขนาดที่แตกต่างกันซึ่งจะวิจารณ์ผลการทดลองในบทที่ 5

ตารางที่ 8 แสดงความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่วัดค่าได้จากเครื่อง Eppendorf BioPhotometer D30

Sample	Concentration (ng/µL)	A260	A260/A280
R152-1	542.5	1.356	1.12
R152-2	161.4	0.403	1.32
P+V	212.7	0.532	1.23

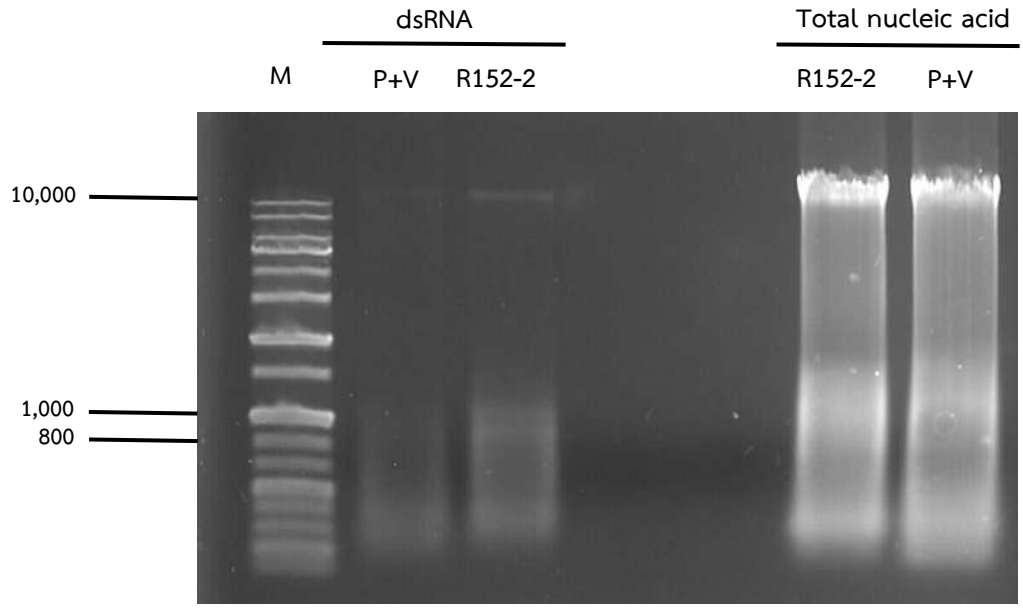


ภาพที่ 4.8 แสดงผลการตรวจหาอาร์เอ็นสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 จากการสกัดรอบแรก

Lane M : 1 kb plus DNA ladder

Lane 1, 2 : อาร์เอ็นเอสายคู่จากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบแรก ความเข้มข้น 0.5X และ 1X ตามลำดับ

Lane T : สารพันธุกรรมทั้งหมด (Total nucleic acid) จากการสกัดรอบแรก



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการตรวจหาอาร์เอ็นสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 และ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสจากการสกัดรอบสอง

Lane M : 1 kb plus DNA ladder

Lane R152-2 : สารพันธุกรรมจากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบสอง

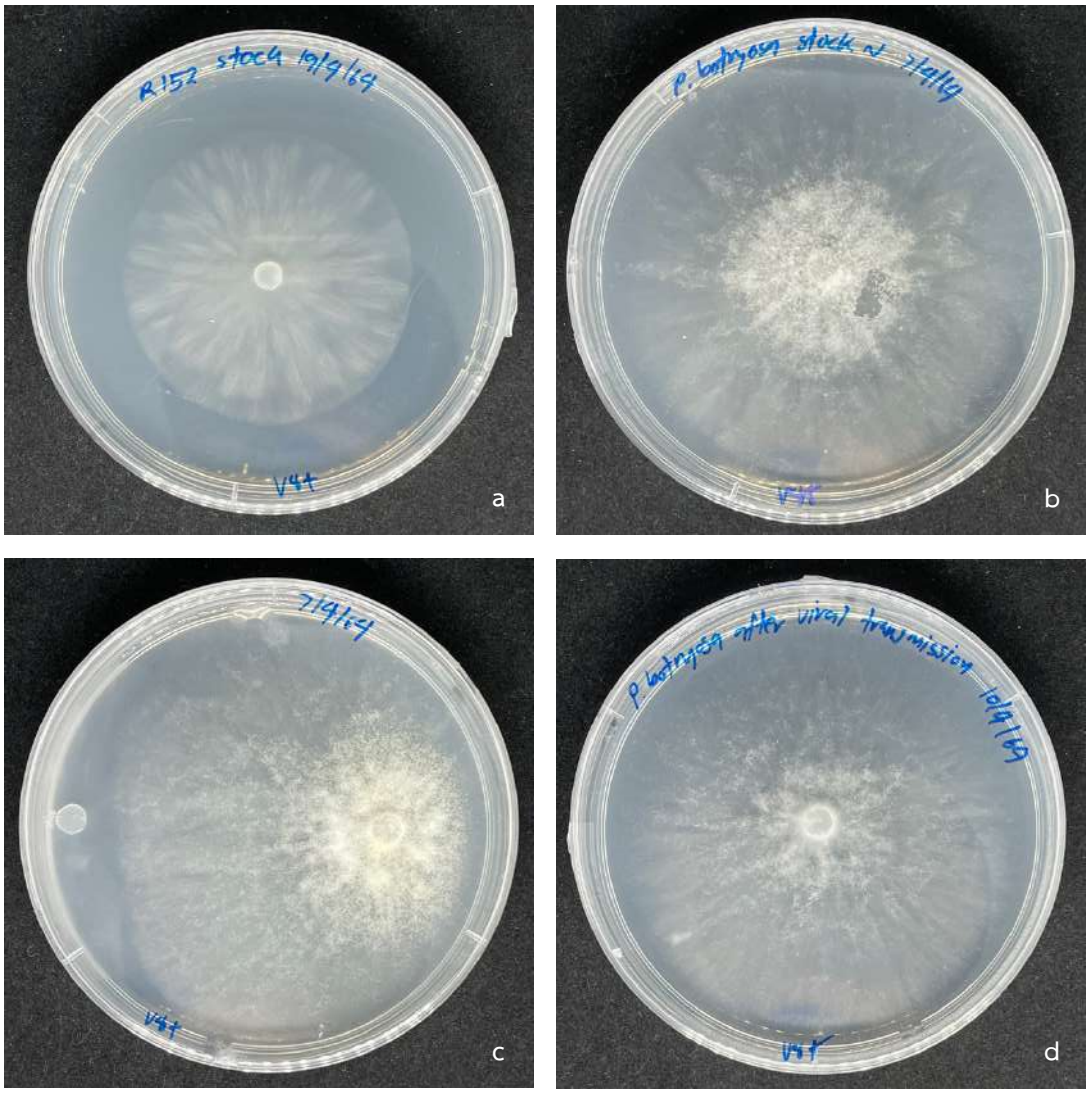
Lane P+V : สารพันธุกรรมจากการสกัดรา *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส

4.4 การตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์

จากการตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเอนไซม์ DNase I ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยว RNase III ที่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยว และ S1 nuclease ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว จากผลการทดลองพบว่าสารพันธุกรรมราน้ำไอโซเลท R152 จากการสกัดในรอบแรก (R152-1) ใน Lane ชุดควบคุมพบแถบสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็น Smear บน 1% อะกาโรสเจล (รูปผลการทดลองไม่ได้แสดงไว้) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสารพันธุกรรมจากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบแรก (R152-1) มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายคู่ ดังนั้นควรทำการทดลองซ้ำหรือปรับปรุงขั้นตอนการทดลองเพื่อให้ได้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ส่วนการตรวจสอบสารพันธุกรรมของราน้ำไอโซเลท R152 และ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส (P+V) ในการสกัดรอบที่สอง ไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากสารพันธุกรรมมีความเข้มข้นที่ค่อนข้างน้อยกว่าสารพันธุกรรมจากการสกัดราน้ำไอโซเลท R152 ในรอบแรก (R152-1) ถึง 2 เท่า ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลจากเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสได้เลย ซึ่งจากผลจากการทดลองดังกล่าวจะถูกวิจารณ์ต่อในบทที่ 5

4.5 การส่งผ่านไวรัส

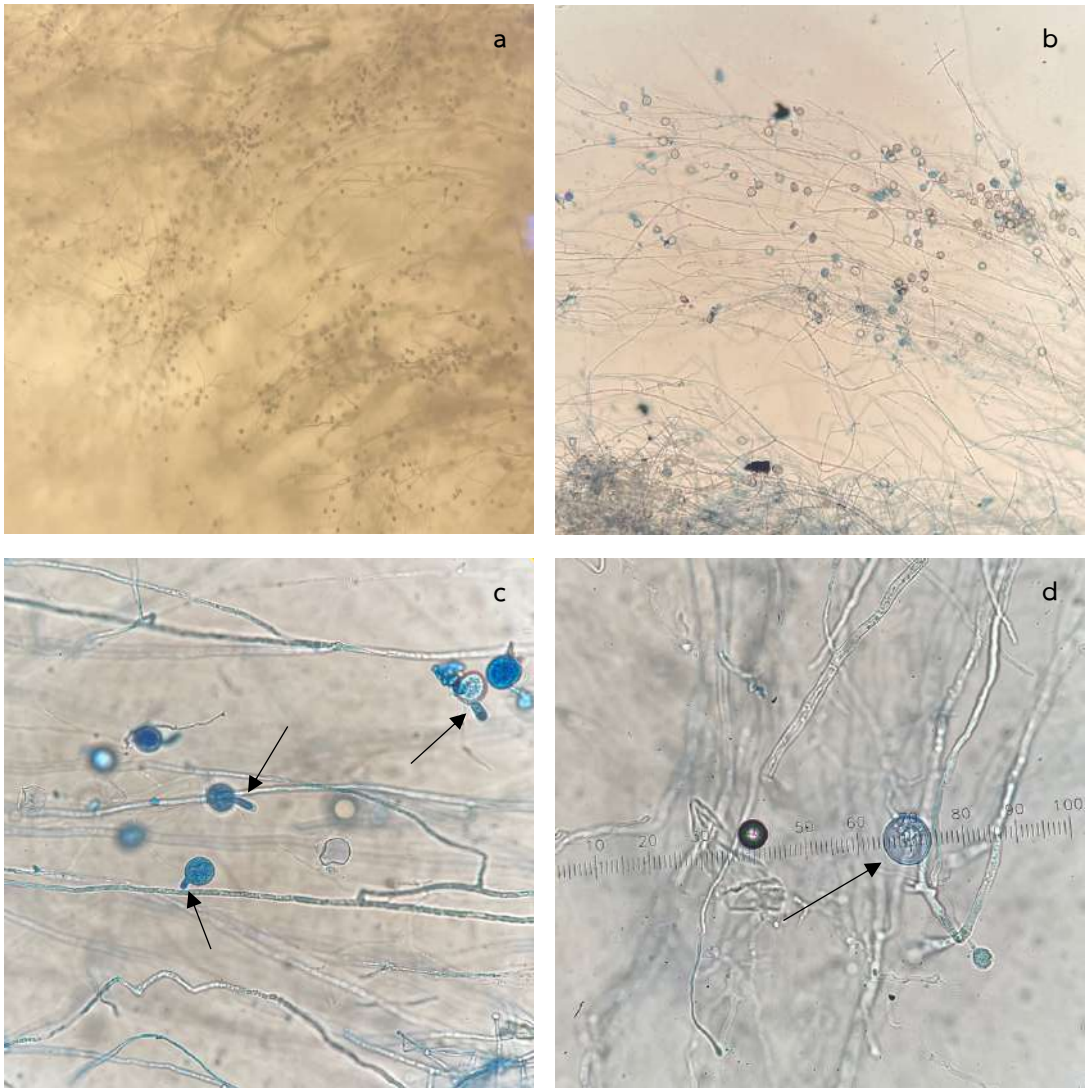
จากการทดลองส่งผ่านไวรัสด้วยวิธีตามธรรมชาติในโครงการนี้ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ (Cai, G., 2019) พบว่าจากการเลี้ยงราน้ำไอโซเลท R152 ร่วมกับ *P. botryosa* เป็นระยะเวลา 7 วัน สายใยราน้ำไอโซเลท R152 มีการเจริญที่เร็วกว่า *P. botryosa* ทำให้ทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อเต็มไปด้วยสายใยของราน้ำไอโซเลท R152 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลี้ยง *P. botryosa* อย่างเดียวก่อนเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำราน้ำไอโซเลท R152 มาเลี้ยงร่วมด้วยเป็นเวลาอีก 3 วัน (ภาพที่ 4.10 c) ให้มีการเจริญของสายใยรวมกันจึงนำสายใยฝั่งผู้รับ ซึ่งก็คือ *P. botryosa* มาตรวจสอบสารพันธุกรรมต่อ ซึ่งผลการตรวจสอบสารพันธุกรรมแสดงใน (ภาพที่ 4.10) ส่วนรูปแบบโคโลนีพบว่าราน้ำไอโซเลท R152 มีโคโลนีรูปแบบ Radiate ส่วน *P. botryosa* มีโคโลนีรูปแบบ Radiate ที่มีการสร้าง Aerial mycelium และ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสมีโคโลนีรูปแบบ Radiate ที่มีการสร้าง Aerial mycelium (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 แสดงการส่งผ่านไวรัสด้วยวิธี Anastomosis (a) รานำ้ไอโซเลท R152 (b) *P. botryosa* (c) รานำ้ไอโซเลท R152 (ซ้าย) ร่วมกับ *P. botryosa* (ขวา) (d) *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส

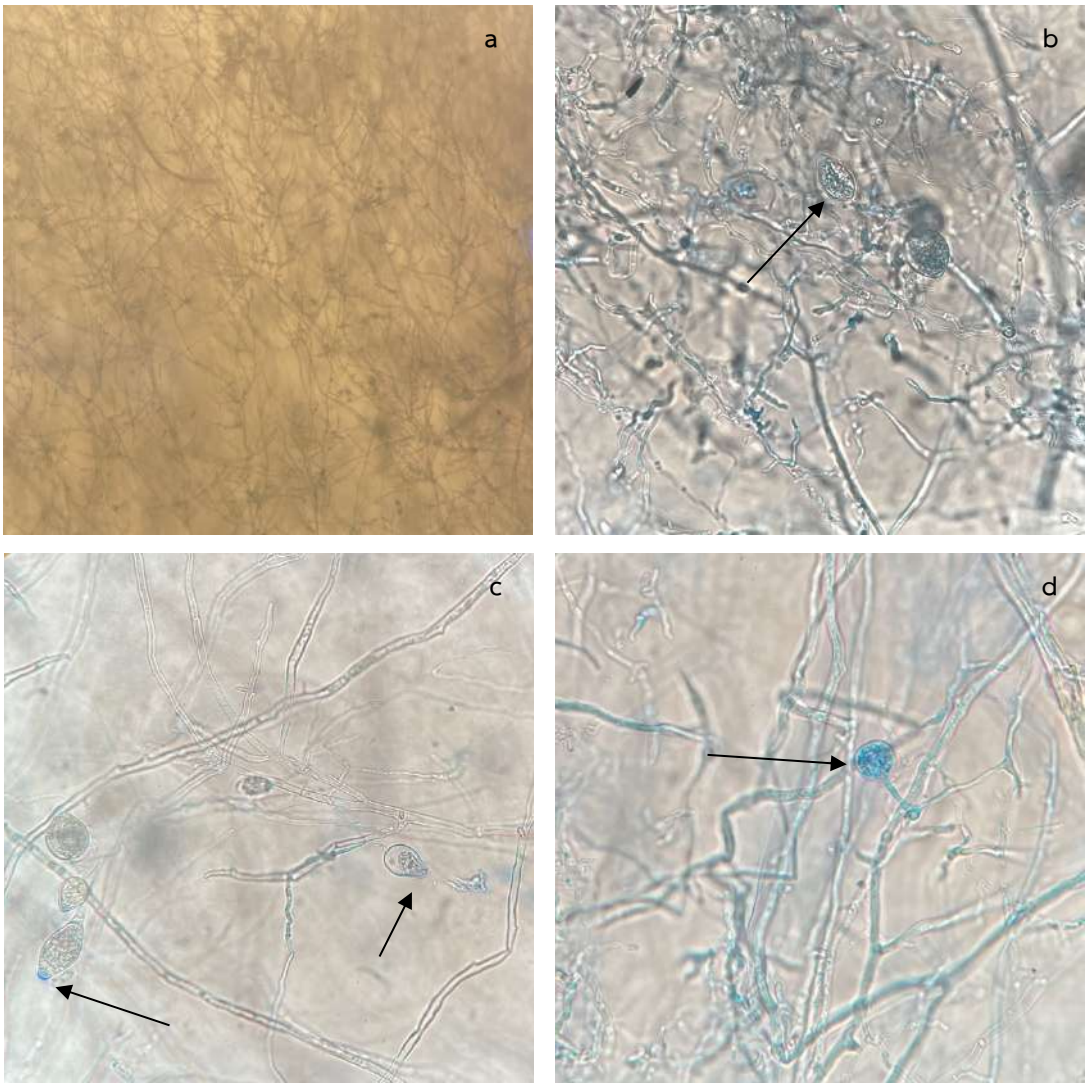
4.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราน้ำไอโซเลท R152 ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100 เท่า พบสปอร์แรงเจียมทรง Globose จำนวนมาก และที่กำลังขยาย 400 เท่า พบสปอร์แรงเจียมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ไมโครเมตร และพบการสร้างโครงสร้างพิเศษบนสปอร์แรงเจียมที่เรียกว่า Outgrowing papilla ที่ทำหน้าที่เป็น Discharge tube ให้ซูโอสปอร์ไหลตามไซโทพลาสซึมมาสร้างเป็น Vesicle เพื่อปล่อยซูโอสปอร์ (Chen และคณะ, 2016) (ภาพที่ 4.11) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบนี้ ไม่สามารถพบได้ในราไฟทอฟธอรา แต่พบในราพิเทียมจึงสามารถสรุปได้ว่าราน้ำไอโซเลท R152 มีพิเทียมอยู่ร่วมกับไฟทอฟธอราแต่ไฟทอฟธอราไม่สร้างสปอร์แรงเจียม



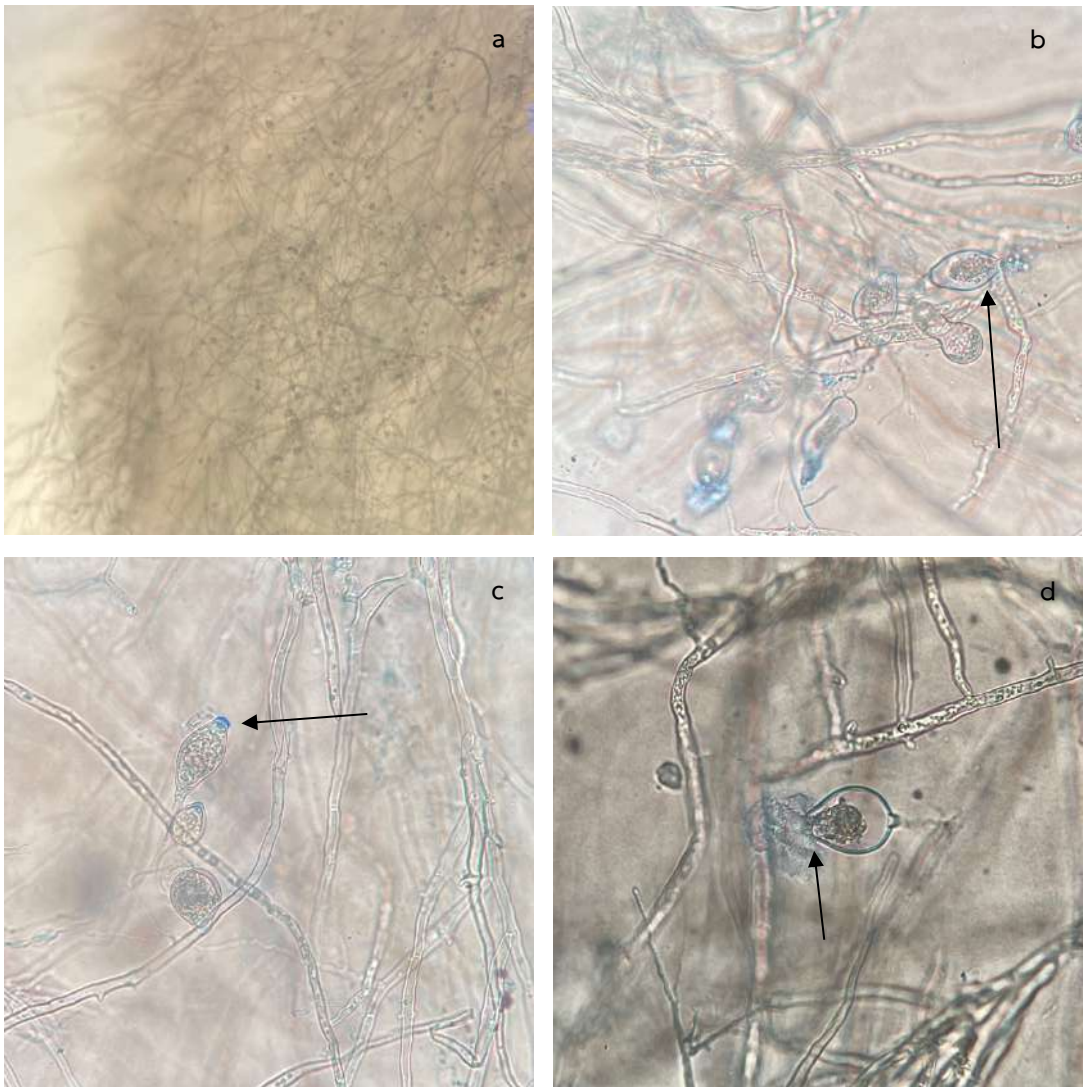
ภาพที่ 4.11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราน้ำไอโซเลท R152 (a) ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (b) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100 เท่า (c,d) และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (c) Outgrowing papilla (ลูกศร) (d) สปอร์แรงเจียม (ลูกศร)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอพบสายใยและสปอร์แรงเจียมจำนวนน้อยมาก และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าพบสายใยแบบไม่มีผนังกั้น และพบสปอร์แรงเจียมเป็นทรง Ovoid คล้ายผลเลมอนมีขนาดประมาณ 20x28 ไมโครเมตร มี Papilla และพบการปล่อยซูโอสปอร์โดยตรงจากสปอร์แรงเจียม ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในราไฟทอฟธอรา นอกจากนี้ยังพบ Hyphal swelling ที่จะพัฒนาไปเป็น Chlamydospore ที่เป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* (a) ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (b,c,d) และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (b) สปอร์แรงเจียม (ลูกศร) (c) Papilla (ลูกศรซ้าย) และการปล่อยซูโอสปอร์ (ลูกศรขวา) (d) Hyphal swelling (ลูกศร)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัสใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอพบสายใยและสปอร์แรงเจียมจำนวนมากกว่าใน *P. botryosa* และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าพบสายใยแบบไม่มีผนังกั้น และพบสปอร์แรงเจียมเป็นทรง Ovoid คล้ายผลเลมอนมีขนาดประมาณ 20x27.5 ไมโครเมตร มี Papilla และพบการปล่อยซูโอสปอร์โดยตรงจากสปอร์แรงเจียม ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในราไฟทอฟธอรา (ภาพที่ 4.13)



ภาพที่ 4.13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* ที่ถูกส่งผ่านไวรัส (a) ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (b,c,d) และจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า
(b) สปอร์แรงเจียมทรง Ovoid (ลูกศร) (c) Papilla (ลูกศร) (d) การปล่อยซูโอสปอร์ (ลูกศร)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการนี้ได้ศึกษาการมีอยู่ของไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ในราน้ำไอโซเลท R152 ที่มีรายงานในโครงการวิจัยเรื่อง “ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้นยางพารา” ของนางสาวกุลนันทน์ รุ่งนาไร่ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบสกุลของราน้ำด้วยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) ระหว่างการนำราน้ำไอโซเลท R152 มาทดลองแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแยกสปอร์เดี่ยว และการไม่แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำให้ทราบว่าในราน้ำไอโซเลท R152 มีพิเทียมและไฟทอฟธอราอยู่ร่วมกัน แต่ไฟทอฟธารานั้นไม่สร้างสปอร์แรงเจียม โดยเมื่อแยกสปอร์เดี่ยวจะทำให้ได้แต่พิเทียมเท่านั้น ต่อมาผู้วิจัยจึงได้นำราน้ำไอโซเลท R152 ทั้งที่แยกเชื้อให้บริสุทธิ์และไม่ได้แยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาสกัดสารพันธุกรรม พบว่าราน้ำไอโซเลท R152 ที่แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ไม่พบสารพันธุกรรมเลย แต่ราน้ำไอโซเลท R152 ที่ไม่ได้แยกเชื้อให้บริสุทธิ์พบสารพันธุกรรมที่คาดว่าเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ จึงทำให้ได้ข้อสรุปที่ว่าไวรัสอาร์เอสายคู่มีเจ้าบ้านเป็นไฟทอฟธอรา จึงทำให้การแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่จะได้แต่พิเทียมไม่พบสารพันธุกรรมเลยนั่นเอง ซึ่งผลการเปรียบเทียบดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้มีรายงานไปแล้วในโครงการวิจัยของ นางสาวกุลนันทน์ รุ่งนาไร่ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการส่งผ่านไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่จากราน้ำไอโซเลท R152 ไปยัง *P. botryosa* ด้วยวิธี Anastomosis ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยการสกัดสารพันธุกรรมมีการพบแถบของอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 2 แถบบน 1% อะกาโรสเจล ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 1.0 และ 0.8 กิโลเบส ซึ่งมีจำนวนและขนาดแตกต่างกับที่เคยมีรายงานไว้ในโครงการของนางสาวกุลนันทน์ รุ่งนาไร่ ที่พบแถบของอาร์เอ็นเอสายคู่จำนวน 4 แถบบน 1% อะกาโรสเจล ซึ่งมีขนาดโดยประมาณ 3.4, 2.9, 2.5 และ 1.3 กิโลเบส จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการส่งผ่านไวรัสนั้นประสบความสำเร็จหรือไม่ และขณะนั้นผู้วิจัยก็ได้ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. botryosa* สายพันธุ์ที่ไม่มีไวรัสและสายพันธุ์ที่นำมาทดลองส่งผ่านไวรัส พบว่า *P. botryosa* ในสายพันธุ์ที่นำมาทดลองส่งผ่านไวรัส มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป คือพบการสร้างสปอร์แรงเจียมที่มีรูปทรง Ovoid จำนวนที่มากขึ้นกว่าเดิม ซึ่งการมีสปอร์แรงเจียมที่มากหมายถึงโอกาสในการก่อโรคของราที่มากขึ้นตามไปด้วย แต่ทั้งนี้ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการสร้างสปอร์แรงเจียมที่เพิ่มขึ้นใน *P. botryosa* เป็นผลมาจากการส่งผ่านไวรัสจริงหรือไม่ จึงมีข้อเสนอแนะว่าควรทำการทดลองซ้ำเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือ

การทดลองการสกัดสารพันธุกรรมในแต่ละครั้งที่ได้ปริมาณสารพันธุกรรมไม่เท่ากัน รวมถึงการได้สารพันธุกรรมที่มีขนาดและจำนวนแถบไม่เท่ากัน อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม จากความชำนาญในการสกัดสารพันธุกรรมของผู้วิจัยเองที่มีโอกาสในการสกัดเพียง 3 ครั้ง เนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ที่ทำให้ต้องหยุดการทดลองไป โดยการทดลองในแต่ละครั้งต้องมีการเตรียมการและเลี้ยงราที่ต้องการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์จึงสามารถนำมาสกัดสารพันธุกรรมได้ ส่วนการตรวจสอบชนิดสารพันธุกรรมของไวรัส

ด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสชนิดต่าง ๆ เนื่องจากการสกัดสารพันธุกรรมได้ผลลัพธ์ในปริมาณที่น้อยมากจึงทำให้การทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่เห็นผลที่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่าหากมีการศึกษาต่อในอนาคตควรทำการทดลองซ้ำเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่ได้

รายการอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2003). การปลูกยางพารา. https://esc.doae.go.th/โรคใบร่วงยางพารา/.

กุลนันท์ รุ่งนาไร่. (2016). ไวรัสอาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Phytophthora botryosa* และ *Pythium cucurbitacearum* จากต้นยางพารา. Chulalongkorn university

กลุ่มสารสนเทศการเกษตร สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดยะลา. (2019). ข้อมูลรายสินค้าของจังหวัด ยะลา ประจำปีงบประมาณ 2562 “ยางพารา”. https://www.opsmoac.go.th/yala-dwl-files-412791791834.

ครองทรัพย์ สิงหราช. (2019). ข่าวพยากรณ์และเตือนภัยการระบาดศัตรูพืช !!! . https://esc.doae.go.th/wp-content/uploads/2019/08/warn286.pdf, กลุ่มอารักขาพืชสำนักงานเกษตรจังหวัดตราด.

ศรีนรา แมเร๊าะ. (2000). โรคระบาดยาง. บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2018). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2562.

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์. (2019). Mycovirus: agricultural, industrial and medical applications. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, *5*(2).

Brusini, J., & Robin, C. (2013). Mycovirus transmission revisited by in situ pairings of vegetatively incompatible isolates of *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virological Methods*, *187*(2), 435-442.

Cai, G. (2019). PiRV-2 stimulates sporulation in *Phytophthora infestans*. *Virus Research*, 271, 197674.

Cai, G., & Hillman, B. I. (2013). Chapter twelve - Phytophthora Viruses. *Advances in virus research 86*, 327-350.

Chee, K. H. (1969). Variability of *Phytophthora* species from *Hevea brasiliensis*. *Transactions of the British Mycological Society,* 52(3).

Chun, J., Yang, H.-E., Kim, D.-H. (2018). Identification of a Novel Partitivirus of *Trichoderma harzianum* NFCF319 and Evidence for the related antifungal activity. *Frontiers in Plant Science*, *9*(1699).

Ghabrial. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, *16*(1), 119-131.

Hattapanichaporn, C. (2016). Isolation of *Pythiaceae* from para rubber *Hevea brasiliensis* in western Thailand for identification of *Pythiaceae* virus. Microbiology.

http://cuir.car.chula.ac.th/bitstream/123456789/63477/1/5671935423.pdf.

Ho, H. H. (2018). The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of Bacteriology & Mycology, 6*(2), 40-45.

Krishnan, A. (2019). An insight into *Hevea - Phytophthora* interaction: The story of *Hevea* defense and *Phytophthora* counter defense mediated through molecular signalling. *Current Plant Biology*, 17, 33-41.

Lui. (2003). Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus Cryphonectria. *Molecular Ecology*, *12*(6), 1619-1628.

Liu, C., Li, M., Redda, E.T., Mei, J., Zhang, J., Wu, B., Jiang, X. (2019). A novel double-stranded RNA mycovirus isolated from *Trichoderma harzianum*. *Virology journal 16*(113).

Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nat Rev Microbiol 3*, 632–642

Pearson, M. N. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular plant pathology 10*(1), 115-128.

Peyambari, M., & Roossinck, M. J. (2018). Characterizing Mycoviruses. *Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes: Methods and Protocols* (pp. 13-24). Springer New York.

Romon‐Ochoa P., Gorton C., Lewis A., Linde S., Webber J., Pérez‐Sierra A. (2020). Hypovirulent effect of the *Cryphonectria hypovirus* 1 in British isolates of *Cryphonectria parasitica*. *Pest Management Science*, *76*(4), 1333-1343.

Sopee, J. (2012). Modified agar-based media for culturing *Phytophthora infestans*. *Phytoparasitica*, 40, 260-278.

Vawdrey, L. L., Langdon, P. & Martin, T. (2005). Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. *Australasian Plant Pathology*, *34*, 127-128.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y. (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(18), 8387-8392.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Clarified V8

น้ำผักและผลไม้รวม V8 รสดั้งเดิม	340	มิลลิลิตร
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	3.4	กรัม

นำน้ำผักและผลไม้รวม V8 รสดั้งเดิม บริษัท Campbell Soup Company, USA ปริมาตร 340 มิลลิลิตร มาเติม $CaCO_3$ 3.4 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 °C

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5% V8 (ปริมาตร 300 มิลลิลิตร)

Clarified V8	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	285	มิลลิลิตร
Agar	4.5	กรัม

นำ Clarified V8 ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C มาทำให้ละลายจากนั้นนำมาปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมกับผงวุ้น 4.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 285 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร)

Clarified V8	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

นำ Clarified V8 ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C มาทำให้ละลายจากนั้นนำมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแข็ง 5% V8 หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 20% V8 ตามสูตรด้านบน หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงจึงเติมสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะที่ใช้ในโครงการนี้คือ Ampicillin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติม Ampicillin ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำ P3 (ปริมาตร 1 ลิตร)

น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ	250	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	750	มิลลิลิตร

นำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติปริมาตร 250 มิลลิลิตรมากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นผสมน้ำปลอดประจุปริมาตร 750 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

DEPC-treated (RNase-free) water (ปริมาตร 1 ลิตร)

Double deionized water	1	ลิตร
Diethyl pyrocarbonate	1	มิลลิลิตร

นำ Diethyl pyrocarbonate ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาผสมกับ Double deionized water ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนที่จะนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3 M Sodium Acetate (pH 5.2) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Sodium acetate	24.61	กรัม
Double deionized water	1	ลิตร (final volume)

นำ Sodium acetate 24.61 กรัมมาละลายใน Double deionized water ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซิติกและเติม Double deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

0.5 M EDTA (pH 8.0) (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

EDTA	9.3	กรัม
Double deionized water	50	มิลลิลิตร (final volume)

นำ EDTA 9.3 กรัมมาละลายใน Double deionized water ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และเติม Double deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 50 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

10X TAE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

Tris	48.4	กรัม
Acetic acid glacial	11.4	มิลลิลิตร
EDTA	3.7	กรัม
DEPC-treated water	1	ลิตร

นำมาผสมกันทั้งหมดนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ℃ เป็นเวลา 15 นาที

1X TAE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

10X TAE buffer	100	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	900	มิลลิลิตร

2X STE buffer containing 1% SDS (ปริมาตร 1 ลิตร)

เตรียม 4X STE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

Tris	24.23	กรัม
NaCl	23.38	กรัม
EDTA	1.49	กรัม

ละลาย Tris และ NaCl ก่อนใน DEPC-treated water ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย Concentrated HCl จากนั้นจึงใส่ EDTA และผสมให้เข้ากัน และปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย Concentrated HCl และเติม DEPC-treated water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ℃ เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นจากนั้นนำ 4X STE buffer มาเจือจางเป็น 2X STE buffer ด้วยการผสม 4X STE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตรกับ Deionized water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 กรัม ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ℃ เป็นเวลา 15 นาที

1X STE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

4X STE buffer	250	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	750	มิลลิลิตร

1X STE buffer containing 15% (v/v) ethanol (ปริมาตร 1 ลิตร)

4X STE buffer	250	มิลลิลิตร
DEPC-treated water	600	มิลลิลิตร
Ethanol	150	มิลลิลิตร

Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

1% agarose gel (W/V)

Agarose	0.5	กรัม
1X TAE	50	มิลลิลิตร

Ethidium bromide solution (0.5 μl/ml)

Ethidium bromide	10	มิลลิลิตร
Sterile deionized water	190	มิลลิลิตร