ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

Outcrossing Ability of *Pythium insidiosum* Isolated From Patients and Environments

พัชรี กัมมารเจษฎากุล

จิดาภา เซคเคย์

นงนุช วณิตย์ธนาคม

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2552

ชื่อเรื่อง ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

ผู้วิจัย พัชรี กัมมารเจษฎากุล จิดาภา เซคเคย์ นงนุช วณิตย์ธนาคม

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2558

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 56 หน้า

คำสำคัญ พิเทียมอินสิดิโอซัม, การสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมเป็นเชื้อ homothallic oomycetes การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อชนิดนี้เกิดการผสมพันธุ์ในตัวเอง โดยทั่วไปแล้วในเชื้อที่เป็น homothallic จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในกลุ่มประชากรเดียวกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในกลุ่มประชากรเดียวกัน จึงตั้งสมมติฐานว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้ รายงานการวิจัยเรื่องความ สามารถในการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมนี้เป็นการวิจัยพื้นฐานมุ่งศึกษาให้ทราบศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อและศึกษาความสามารถในการสืบพันธุ์ แบบข้ามสายพันธุ์และการถ่ายทอดพันธุกรรมระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม โดยใช้การทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อชนิดต่าง ๆ และ ทดสอบความสามารถในการสร้างโอโอสปอร์แบบอาศัยเพศแบบข้ามสายพันธุ์และตรวจยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อลูกผสมที่ได้ด้วยวิธี microsatellite เทียบกับเชื้อตั้งต้น

ผลจากการวิจัย พบว่า potato dextrose agar และ cornmeal agar เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้เชื้อสร้างโอโอสปอร์ได้ เชื้อคู่ที่เหมาะสมกันและมีจีโนไทป์แตกต่างกันได้ถูกเลือกและสามารถสร้างโอโอสปอร์เมื่อผสมข้ามสายพันธุ์ได้ ซึ่งพันธุกรรมของเชื้อลูกผสมตรวจพิสูจน์จากจีโนไทป์ที่ได้จาก microsatellite 6 โลคัส จากการทดลองสนับสนุนสมมติฐานว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้

Research Title Outcrossing ability of *Pythium insidiosum* isolated from patients and environments

Researchers Patcharee Kummarnjassadakul, Jidapa Szekely, Nongnuch Vanittanakom

Institution Huachiew Chalermprakiet University

Year of Publication 2015

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Sources Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages 56 pages

Keywords *Pythium insidiosum*, Outcrossing

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

Pythium insidiosum is a homothallic oomycete, meaning that self-fertilization can occur in a single isolate. It has been commonly assumed that homothallic organisms are inbreeding, resulting in a low rate of genetic variation in their populations. A previous study has shown that *P. insidiosum* populations exhibit a high rate of genetic variation, suggesting a possible outcrossing ability of the organism. Our study, titled "Outcrossing ability of *P. insidiosum* isolated from patients and environments", is basic research focusing on optimal conditions for oospore production and the ability of outcrossing between isolates. Several crossing media have been tested for inducing oospore production, and microsatellite markers have been used to confirm that outcrossing can occur between isolates of *P. insidiosum*.

The results show that potato dextrose agar and cornmeal agar are suitable for stimulating oospore production. Two matching isolates displaying distinguished genetic patterns were co-cultured on media that allows the development of the sexual stage. Six microsatellite markers revealed genetic patterns of the selected oospore progeny, indicating potential hybridization between the two parental isolates. These results suggest that *P.insidiosum* may be capable of outcrossing.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์อิสยา จันทร์วิทยานุชิต คณบดี คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้กรุณาให้โอกาสและสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่กลุ่มจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเฉลิมพระเกียรติ และ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

พัชรี กัมมารเจษฎากุล
จิดาภา เซคเคย์
นงนุช วณิตย์ธนาคม

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญรูปภาพ		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	สมมติฐานของงานวิจัย	4
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	17
	วิธีการทดสอบ	17
	วัสดุอุปกรณ์	24
บทที่ 4	ผลการวิจัย	26
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	39
	สรุปผลการวิจัย	39
	อภิปรายผล	40
	ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม		45
ภาคผนวก		
	ประวัติย่อผู้วิจัย	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงเชื้อ Pythium insidiosum ที่ใช้ในการศึกษา	17
3.2	แสดงปริมาณน้ำมันในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร V-8 juice liquid medium	18
3.3	แสดงส่วนผสมสูตร Clarified half-strength V-8 Agar	19
3.4	ลำดับเบส ของ Primer 9 คู่ ที่จำเพาะต่อเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม microsatellite loci	23
4.1	แสดงการสร้าง Oospore ที่พบในอาหาร V-8 juice liquid medium ผสมน้ำมันชนิดต่างๆ	26
4.2	แสดงเชื้อที่เลือกนำมาทดสอบการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์	32
4.3	แสดงจีโนไทป์ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 จากวิธี microsatellite	34
4.4	การตรวจเชื้อลูกผสมจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัม CBS119452 x MMC48P21-1 ด้วย microsatellite marker	39

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม	5
2.2	แสดงพยาธิสภาพของคนที่เป็นโรค Pythiosis	11
4.1	แสดงลักษณะของเชื้อที่คล้าย Oogonia เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร V-8 juice liquid medium ที่ผสมน้ำมันมะพร้าว นาน 1 สัปดาห์	25
4.2	แสดงขนาดการเจริญของเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบน clarified half-strength V-8 agar ในน้ำมันมะพร้าว เป็นเวลา 1 สัปดาห์	27
4.3	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อบน Clarified half-strength V-8 agar ที่ผสมน้ำมันแต่ละชนิด	27
4.4	แสดงโคโลนี และ Unfertile Oogonia บน Clarified half-strength V-8 agar ที่ผสมน้ำมันงา หลังจากบ่มเชื้อนาน 4 สัปดาห์	28
4.5	แสดงระยะการสร้าง Oospore บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยใช้เวลาบ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์ ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue	29
4.6	แสดงลักษณะ oospore ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม	30
4.7	แสดงการงอกสาย hyphae ของโอโอสปอร์ (Oospore germination)	30
4.8	แสดงการเกิด self-fertilization ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 บนอาหาร cornmeal agar	31
4.9	แสดงโอโอสปอร์ที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 ที่เจริญอยู่ภายในอาหาร cornmeal agar	33
4.10	แสดงตัวอย่างลักษณะ genotype ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 (P1) และ MMC48P21-1 (P2) โดยใช้ microsatellite marker PY3, PY5, PY6 และ PY8	35
4.11	การวินิจฉัยเชื้อลูกผสมเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัมด้วย marker PY1, PY3 และ PY4	37
4.12	การวินิจฉัยเชื้อลูกผสมเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัมด้วย marker PY5, PY6 และ PY8	38

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม (*Pythium insidiosum*) จัดเป็นเชื้อจุลชีพชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา เชื้อนี้มีการสร้างสปอร์ชนิดที่มีหางสามารถว่ายน้ำได้ เชื้อชนิดนี้สามารถก่อโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ม้า, สุนัข, แมว, วัว, ควายและหมี (Mendoza. 2005 : 412-429) พบระบาดในหลายประเทศในแถบเขตร้อนและใกล้เขตร้อน สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีการติดเชื้อส่วนใหญ่ในมนุษย์ ซึ่งโรคชนิดนี้สามารถเกิดได้ทั้งในบุคคลที่มีสุขภาพแข็งแรงและผู้ป่วยที่มีโรคเกี่ยวกับระบบโลหิตอยู่ก่อน เช่น ธาลัสซีเมีย หรือลิวคีเมีย จากอุบัติการณ์ของโรคตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 พบการรายงานผู้ป่วยโรคพิทิโอสิสเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก และสามารถพบได้ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยมีการรายงานสูงสุดในภาคกลาง (ร้อยละ 46) รองลงมาคือ ภาคอีสาน (ร้อยละ 27), ภาคเหนือ (ร้อยละ 16), ภาคใต้ (ร้อยละ 8) และภาคตะวันออก (ร้อยละ 3) ตามลำดับ (Krajaejun et al. 2006 : 569-576) โดยส่วนใหญ่มักพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีประวัติสัมผัสกับหนองน้ำหรือแหล่งน้ำนิ่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติเป็นเวลานาน ๆ และส่วนใหญ่มีอาชีพเป็นเกษตรกร จึงคาดว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อจากแหล่งน้ำเหล่านั้น

จากการศึกษาแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม ได้มีการมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับแหล่งน้ำชลประทานที่ใช้ในการเกษตร โดยแหล่งน้ำที่ใช้ศึกษาอยู่ในลำแวกใกล้เคียงกับที่อยู่ของผู้ป่วย จากงานวิจัยดังกล่าวพบว่า สามารถแยกเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมได้และเชื้อมีอุบัติการณ์ในแหล่งน้ำเหล่านั้นอยู่ที่ร้อยละ 24 ซึ่งแหล่งน้ำที่สามารถพบเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ได้แก่ หนองน้ำในบ้าน, หนองน้ำในทุ่งนา, น้ำในแปลงนาข้าว และ ร่องน้ำชลประทาน จึงเป็นไปได้ว่าแหล่งน้ำเหล่านี้น่าจะเป็นที่อยู่ของเชื้อในธรรมชาติและเป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม (Supabandhu et al. 2008 : 41-52)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของ internal transcribe spacer (ITS) ของ ribosomal DNA (rDNA) (Schurko et al. 2003a : 537-544), วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Schurko et al. 2003b : 200-208), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Pannanusorn et al. 2007 : 383-391), Protein profile,

Immunoblot profile (Supabandhu. 2009) และ วิธี Microsatellite (Supabandhu et al. 2007 : 1080-1090) จากวิธีการต่าง ๆ ดังกล่าว พบว่า เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ยังพบอีกว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมีพันธุกรรมที่มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งสองกลุ่มไม่มีความสัมพันธ์กันตามภูมิประเทศของแหล่งที่พบเชื้อ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อน่าจะมีการกระจายตัวและสามารถถ่ายทอดพันธุกรรมให้แก่กันและกันในสิ่งแวดล้อมได้

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมแพร่กระจายตัวสามารถศึกษาได้จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ปัจจุบันทราบเพียงว่าเชื้อชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Supabandhu. 2009) แต่ทว่ายังไม่มีผู้พิสูจน์ถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมดังกล่าว จากหลักฐานที่พบว่าเชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเป็นไปได้ว่าอาจเกิดขึ้นขณะที่เชื้อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เนื่องจากกระบวนการเกิด crossing over ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบ mieosis เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเชื้อชนิดนี้เป็น homothallic oomycetes หมายความว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อชนิดนี้เกิดการผสมพันธุ์ในตัวเอง โดยที่เชื้อสามารถสร้างได้ทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในสายราเดียวกัน ซึ่งจะแตกต่างจากเชื้อพิเทียม สปีชีส์อื่น ๆ ที่เป็น heterothallic oomycetes ที่ต้องอาศัยเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เหมาะสมกัน โดยแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่างเพศกันเพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ต่อไป (Francis and St.Clair 1993 : 100-106) ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราโดยทั่วไปแล้วในเชื้อที่เป็น homothallic microorganism จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในกลุ่มประชากรเดียวกัน ส่วนเชื้อที่เป็น heterothallic microorganism จะมีความหลากหลายที่สูงในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Xu 2006 : 75-90) แต่ทว่าจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมที่เป็น homothallic oomycetes นี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Supabandhu. 2009) จึงตั้งสมมติฐานว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้หรือที่เรียกว่าเกิด outcrossing ซึ่งกระบวนการดังกล่าวได้มีรายงานในเชื้อพิเทียมสปีชีส์อื่นที่เป็น homothallic oomycetes เช่นกัน ได้แก่ เชื้อพิเทียม อัลติมึม (*Pythium ultimum*) ซึ่งการเกิด outcroosing ดังกล่าวทำให้เชื้อพิเทียมในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและเป็นประโยชน์กับตัวเชื้อในแง่การปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติได้ (Francis and St.Clair 1993 : 100-106) ดังนั้นข้อสมมติฐานดังกล่าวในเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัมยังคงต้องการการพิสูจน์เพิ่มเติม

จากงานวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากเขตภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทย ได้มีการวิเคราะห์แบบ

แผนการกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อม พบว่า พันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีความหลากหลายน้อย แต่กลับพบว่าในกลุ่มประชากรเดียวกันมีความหลากหลายที่สูงมากอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ความถี่ของยีนในเชื้อดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการเกิด gene flow ระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดต่าง ๆ โดยเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดลำปางมีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มาจากภาคกลางและภาคตะวันออก ส่วนเชื้อที่แยกจากจังหวัดเชียงรายมีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดน่าน (Supabandhu. 2009) จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าว ได้มีการตั้งข้อสมมติฐานว่า ความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบน่าจะเกิดจากการที่เชื้อมีความสามารถที่จะแพร่กระจายไปยังบริเวณดังกล่าวได้และเกิดการถ่ายทอดทางพันธุกรรมกันระหว่างเชื้อที่กระจายไปกับเชื้อท้องถิ่น ซึ่งจากความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชื้อตระกูลพิเทียมนั้น เชื้อตระกูลนี้มีการสร้างสปอร์อยู่ 2 แบบคือ ซูโอสปอร์ (zoospore) และ โอโอสปอร์ (oospore) โดยโอโอสปอร์ เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีลักษณะสำคัญคือผนังหนาและมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม (Mendoza et al. 1993 : 2967-2973) ดังนั้นสปอร์ชนิดนี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการแพร่กระจายของเชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมต่างๆ เพราะฉะนั้นการที่พบว่าเชื้อที่แยกได้จากต่างพื้นที่กันแต่มีพันธุกรรมที่คล้ายกันน่าจะเป็นผลมาจากการแพร่กระจายไปของโอโอสปอร์และความสามารถในการเกิด outcrossing ระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์กัน

จากข้อสมมติฐานต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการศึกษาเบื้องต้น จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการทดลองเพื่อยืนยันข้อสมมติฐานดังกล่าวโดยมุ่งเน้นการพิสูจน์ความสามารถของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมในการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อที่มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกับเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มีจีโนไทป์คล้ายคลึงกันแต่มาจากต่างพื้นที่กัน โดยทั้งนี้ทราบได้จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้รับการพิสูจน์มาก่อนด้วยวิธี microsatellite และการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ประชากร จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ได้ความรู้ใหม่ที่สำคัญต่อการศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่กระจายตัวของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมในสิ่งแวดล้อม พร้อมทั้งเปิดแนวคิดใหม่ในการศึกษาเส้นทางการแพร่กระจายตัวของเชื้อในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นการช่วยให้ข้อมูลที่สำคัญทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อดังกล่าวต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

2. เพื่อศึกษาความสามารถในการสืบพันธุ์ แบบข้ามสายพันธุ์และการถ่ายทอดพันธุกรรมระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้จะเป็นการทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม ซึ่งการทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่

1. ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

2. ทดสอบหาคู่เชื้อที่สามารถสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้

โดยจะแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กระตุ้นให้เชื้อสายพันธุ์ที่ 1 (P1) สร้างโอโอสปอร์แบบอาศัยเพศด้วยตัวเอง

กลุ่มที่ 2 กระตุ้นให้เชื้อสายพันธุ์ที่ 2 (P2) สร้างโอโอสปอร์แบบอาศัยเพศด้วยตัวเอง

กลุ่มที่ 3 ผสมเชื้อสายพันธุ์ที่ 1 กับ สายพันธุ์ที่ 2 เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างโอโอสปอร์แบบอาศัยเพศแบบข้ามสายพันธุ์ ซึ่งจะเรียกสปอร์ที่สร้างได้ว่า F1 จากนั้นโอโอสปอร์ F1 ของแต่ละกลุ่มที่ได้จะนำมาตรวจยืนยันสายพันธุ์ด้วยวิธี microsatellite เทียบกับเชื้อตั้งต้น

3. ตรวจพิสูจน์พันธุกรรมของเชื้อลูกผสมด้วยวิธี microsatellite

โอโอสปอร์ F1 ของเชื้อลูกผสมที่ได้จะนำมาตรวจยืนยันจีโนไทป์ลูกผสมด้วยวิธี microsatellite เทียบกับเชื้อตั้งต้น

สมมติฐานของงานวิจัย

เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบข้ามสายพันธุ์ และเกิดการถ่ายทอดพันธุกรรมระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัมที่แยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

2. ได้ทราบถึงอาหารที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

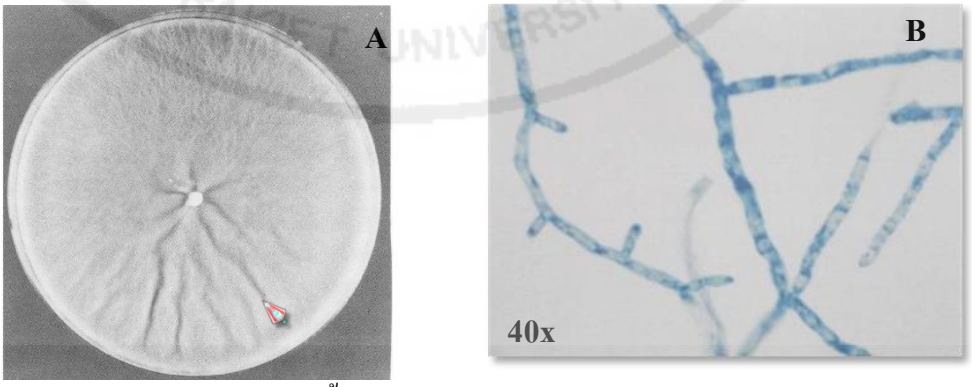
3. ได้ความรู้ใหม่ที่สำคัญต่อการศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดความหลากหลายของเชื้อ และการแพร่กระจายตัวของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะเป็นการช่วยให้ข้อมูลที่สำคัญถึงปัจจัยทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัม เป็นเชื้อสาเหตุของโรคพิทิโอสิสในมนุษย์และสัตว์ โรคชนิดนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความรุนแรงมากสามารถทำให้ผู้ป่วยพิการหรือเสียชีวิตได้ เชื้อชนิดนี้มีรายงานการก่อโรคในประเทศเขตร้อนต่าง ๆ เช่น คอสตาริกา, อินเดีย, ญี่ปุ่น, ทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา, ออสเตรเรีย, อินโดนีเซีย และประเทศไทย โดยการก่อโรคในมนุษย์พบการรายงานมากที่สุดจากประเทศไทย ซึ่งสามารถพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ (Krajaejun et al. 2006 : 569-576)

ลักษณะของเชื้อ *Pythium insidiosum*

จากรายงานการทดลองของ de Cock และคณะในปี 1987 ได้มีการศึกษาลักษณะสำคัญของเชื้อ *Pythium insidiosum* ที่เจริญบน Cornmeal agar, 2% malt extract agar, malt yeast extract agar, และ brain heart infusion agar พบว่าเชื้อเจริญเข้าไปใน agar หรือ มี Aerial mycelium ที่สั้นมาก อาจพบ Radial fold ซึ่งโคโลนีของเชื้อไม่มีสี ถึง สีขาวหรือสีครีม ซึ่ง โคโลนีของเชื้อบน Sabouraud dextrose agar มีลักษณะ undulate, radiate pattern



รูปที่ 2.1 (A) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม บน SDA นาน 2 สัปดาห์ (B) แสดงสายราจากการเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบสายราขนาดใหญ่ประมาณ 4 –10 ไมโครเมตร sparsely septate hyphae สายราแตกแขนงแบบตั้งฉากกัน

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ สายราส่วนใหญ่มีขนาด 4-6 (ในช่วง 4-10) ไมโครเมตร มีขนาดเท่า ๆกันตลอดสายไม่พบการเรียวลงของสาย และพบว่ามีปลายกลมมน ซึ่งแขนงที่แตกออกมาจะอยู่ในลักษณะตั้งฉากกับ main hyphae และบางครั้งมีขนาดที่เล็กกว่า พบผนังกั้นสายราได้บ้างใน young hyphae ที่เจริญบน cornmeal agar และใน hyphae ที่เจริญอยู่ใน water agar ซึ่งในกรณีที่ hyphae แยกจากตรงที่เป็น septum เมื่อถูกกด จะพบว่าเป็น blunt end ในการทดลองกดสาย hyphae นั้น พบว่า ได้ hyphae ที่มีความยาวแตกต่างกัน วัดได้ 50 –300 ไมโครเมตร แสดงให้เห็นว่าช่วงของ septum ในการแบ่งสาย hyphae ไม่สม่ำเสมอ (de Cock et al. 1987 : 344-349)

การสืบพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีความสามารถในการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยแบบอาศัยเพศเชื้อจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่าโอโอสปอร์ ลักษณะคือเป็นเซลล์กลม ผนังหนา ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ส่วนไม่อาศัยเพศเรียกว่าซูโอสปอร์ ลักษณะคือเป็นเซลล์ที่มีหาง ว่ายน้ำได้ ช่วยในการกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อม

1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction)

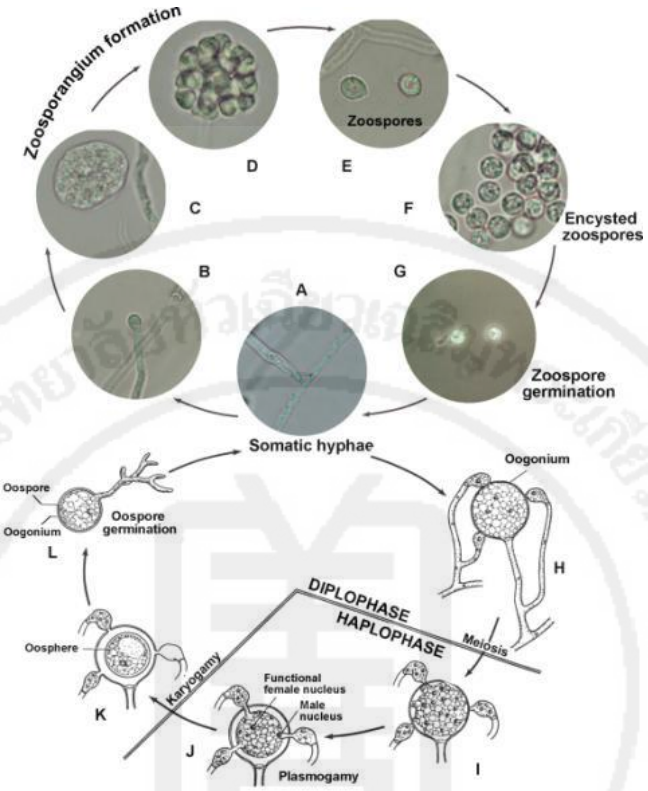
ในปี 1993 Mendoza และ คณะ ได้ทดลอง การสร้าง sporangia และ zoospore จากเชื้อที่เพาะบน cornmeal agar ที่เติมใบหญ้าและใบของต้น *Nymphae* sp. ลงไปจากนั้น ถ่ายเชื้อพร้อมใบพืชลงใน induction medium และทำการวิเคราะห์ด้วยกล้อง light microscope พบการสร้าง sporangia และ zoospore หลังจาก incubate เชื้อใน induction medium 37°C 1 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาในการเกิดตั้งแต่การสร้าง undifferentiated sporangia จนถึงการปล่อย motile zoospores ออกมาใช้เวลาประมาณ 35 นาที ซึ่งในตอนเริ่มแรก protoplasm จะไหลไปรวมกันอยู่ที่ปลายของ hyphae โดยส่วนปลายจะเห็นเป็น discharge tube จนเจริญขึ้นไปเป็น small vesicle จากนั้นก็จะขยายขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อ protoplasm หยุดไหล จะมีการสร้างผนังมาอุดที่ฐานของ vesicle นั้น ต่อมา protoplasm ใน vesicle จะเริ่มเห็นการแยกออกจากกันสร้างเป็น biflagellated secondary type zoospores จากนั้น motile zoospores จะมีการเคลื่อนที่ทำให้ ผนังของ vesicle แตกออก ทำให้มีการปล่อย zoospore ลงใน induction medium ลักษณะของ zoospore จะเป็นรูป kidney-shape มีหาง 2 เส้น จะมีการว่ายน้ำอยู่ประมาณ 10 ถึง 15 นาทีก่อนจะเกิด encystment ในการเริ่มต้นที่จะเกิด encystment นั้น zoospore จะว่ายน้ำช้าลง และหยุดไปในที่สุด เวลานี้ส่วนหางของ spore จะหลุดออก และ zoospore จะอยู่ในลักษณะกลม หลังจากนี้หลายนาที encysted zoospore จะมีการสร้าง germ tube ยาวขึ้นจนเห็นเป็น filament หลังจาก incubate ไว้ที่ 37°C 24 ชั่วโมง ซึ่งกระบวนการสร้าง encystment และ germ tube

จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเติมชิ้นเนื้อของมนุษย์, สัตว์, หรือ พืชลงไปด้วย (de Cock et al. 1987 : 344-349)

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction)

ในการศึกษาเกี่ยวกับ sexual spore หรือ oogonia นี้ พบว่าจะเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวบน cornmeal agar ที่ 24 และ 30° C ซึ่งมักจะเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม โดยจะเกิดบริเวณตำแหน่งภายในสายราหรือบริเวณค่อนทางปลายของสายรา มีลักษณะ ไม่มีสี, ผิวเรียบ, sub-globose และพบส่วนของ hyphae เล็ก ๆ โอบล้อมไปทางด้านหลัง โดย oogonia มักจะเห็นลักษณะที่ผิดปรกติเป็นผลเนื่องมาจาก rigid fertilization tube วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 23 ถึง 30 (ช่วง 19 – 36) μm สามารถพบ antheridia ได้ 1, 2 หรือ 3 อันต่อ 1 oogonium โดยมีลักษณะเป็น diclinous oogonium และ antheridium หรือ antheridia นี้มาจากต่าง hyphae กัน ซึ่ง antheridium จะมีลักษณะพองออกเป็นรูปกระบอง จนเป็นรูป tube วัดขนาดได้ประมาณ 11 – 37 x 6 – 10 μm โดย antheridium จะจับกับ oogonium ตามแนวยาว ซึ่งปลายของ antheridium จะสามารถสร้าง fertilization tube และเจาะผ่านผนังของ oogonium ได้ โดยภายหลัง fertilization แล้ว antheridia จะเริ่มเหี่ยวลง โดย oospore ที่ได้จะมีผนังหนาประมาณ 1 ถึง 3 μm และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ถึง 25 μm มีสีเหลือง และมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียด(de Cock et al. 1987 : 344-349)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นยากกว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และต้องการปัจจัยจำเพาะสูง เช่น ต้องการสารอาหาร แร่ธาตุ หรือวิตามินบางอย่างเป็นพิเศษนอกเหนือจากชนิดที่ต้องการในระยะเจริญของเส้นใย ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร และอุณหภูมิที่เหมาะสมอาจต้องอยู่ในช่วงจำกัดกว่าเดิม โดยทั่วไปแล้ว เชื้อในกลุ่มพิเทียม แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม homothallic oomycetes หมายความว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อชนิดนี้เกิดการผสมพันธุ์ในตัวเอง โดยที่เชื้อสามารถสร้างได้ทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในสายราเดียวกัน และกลุ่ม heterothallic oomycetes ที่ต้องอาศัยเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เหมาะสมกัน โดยแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่างเพศกันเพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมนี้ จะจัดอยู่ในกลุ่ม homothallic oomycetes และเราจะเรียกหน่วยสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อนี้ว่า โอโอสปอร์ (oospore) ลักษณะของโอโอสปอร์ จะมีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร รูปร่างกลม และมีผนังหนา มองเห็นนิวเคลียสได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตแบบไม่อาศัยเพศของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม (บน) และอาศัยเพศ (ล่าง) (Supabandhu. 2009)

2 โรค พิทิโอสิส (Pythiosis)

ระบาดวิทยา

ปัจจุบันโรคพิทิโอสิส ได้มีรายงานการแยกเชื้อได้ในสัตว์เลือดอุ่นหลายชนิดในประเทศแถบเขตร้อนและใกล้เขตร้อน เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา, ประเทศออสเตเรีย, ประเทศปาปัวนิวกีนี, ประเทศบราซิล, ประเทศคอสตาริกา, ประเทศอินเดีย, ประเทศญี่ปุ่น, ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศไทย เป็นต้น ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถก่อโรคได้ในสัตว์เลือดอุ่น เช่น ม้า, สุนัข, แมว, วัว, ควาย หมี และมนุษย์ (Mendoza. 2005 : 412-429)

การติดเชื้อและพยาธิสภาพ

จากรายงานการเกิดโรคพิทิโอสิส ในสัตว์และมนุษย์ บ่อยครั้งพบว่ามีประวัติสัมผัสกับหนองน้ำมาก่อนการติดเชื้อ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าซูโอสปอร์เป็นส่วนสำคัญของเชื้อที่ทำหน้าที่เป็น invasive

agent จากการรายงานวงจรชีวิตของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม โดย Mendoza แสดงให้เห็นว่าซูโอสปอร์ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นในสัตว์หรือพืช เนื่องจากสปอร์สามารถสร้าง substance บางอย่างที่ช่วยให้เชื้อเกาะกับ host ได้อย่างแน่นหนา โดยการก่อโรคของเชื้อเริ่มต้นจากการที่เชื้อเจริญอยู่บริเวณพืชน้ำและมีการสร้างสปอร์และมีการปล่อยซูโอสปอร์ที่มีหางและว่ายน้ำได้ออกมามากมาย ถ้าสปอร์นี้ว่ายไปเกาะที่พืชน้ำก็จะเจริญงอกสาย hyphae ต่อไป แต่ในกรณีที่สัตว์หรือคนเข้าไปในบริเวณที่มีซูโอสปอร์อยู่ สปอร์จะว่ายเข้าไปเกาะที่ขน หรือ บริเวณเนื้อเยื่อที่มีบาดแผล จากนั้นเชื้อจะเกิด encystment โดยการสลัดส่วน flagella ทิ้งและเกิด germinate งอกสายราเข้าไปใน tissue (Mendoza et al. 1993 : 2967-2973) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อจะมีการหลั่ง protease มาช่วยในการ invade เข้าสู่เนื้อเยื่อ เนื่องจากแรงต้านทานของเนื้อเยื่อมีมากกว่าแรงดันที่เกิดจากการงอกของสายราตามรายงานของ Ravishankar ในปี 2001 (Ravishankar and Davis. 2001 : 690-692)

อาการทางคลินิก

การก่อโรคพิทิโอสิสในคน ส่วนใหญ่มีรายงานจากประเทศไทย ลักษณะอาการมักพบอยู่ 4 แบบได้แก่ การติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นลึก (cutaneous-subcutaneous infection) การติดเชื้อที่หลอดเลือด (vascular form) การติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (disseminated infection) ซึ่งการติดเชื้อแพร่กระจายจะมีความรุนแรงและมีอัตราการตายสูงเนื่องจากเชื้อมักบุกรุกเข้าไปในหลอดเลือด และการติดเชื้อที่กระจกตา (keratitis pythiosis) ซึ่งรายละเอียดของอาการแต่ละแบบมีดังนี้ (Krajaejun et al. 2006 : 569-576)

Cutaneous และ subcutaneous form เป็น chronic granulomatous mass ซึ่งพบว่าเริ่มต้นเป็นจุดเล็ก ๆ ต่อมาใหญ่ขึ้นกลายเป็น granuloma ซึ่งแผลอาจแตกเป็น ulcer และมี fibrosis ซึ่งผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวด และการตอบสนองของร่างกายจะพบ eosinophilic inflammatory reaction ในกรณีที่การรักษาล้มเหลว ผู้ป่วยที่มีอาการแบบ cutaneous-subcutaneous infection สามารถพัฒนาไปเป็น systemic pythiosis ได้ ผู้ป่วยจะมีลักษณะอาการที่เหมือนกันคือมีการติดเชื้อเรื้อรัง และมีการบุกรุกเข้าสู่หลอดเลือด เป็นผลทำให้ผู้ป่วยเกิด gangrene, aneurysm, และ บางครั้งถึงแก่ความตาย

Vascular form และ systemic form เป็นแบบ Chronic arterial inflammation ซึ่งรอยโรคจะเกิดเป็นที่หลอดเลือดก่อน โดยเริ่มที่ small blood vessel จากนั้นจะรุกลามไปที่ artery มี arterial inflammation เกิด arteritis มี thrombus เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ผู้ป่วยจึงมีอาการเจ็บปวด และมีการบวมตามแขนขา เกิด aneurysm, เนื้อตาย, หลอดเลือดแดงอักเสบ และ gangrene ในรายที่รุนแรงจะมีการรุกลามไปถึง arterial aorta ซึ่งผู้ป่วยจะมาพบแพทย์ด้วยอาการของเส้นเลือดอุดตันที่ขา จน

เป็น gangrene จนต้องตัดขา (AK amputation) ถ้าเกิด aortic leakage ก็ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ โดยในผู้ป่วยทั้ง subcutaneous form, vascular form และ systemic form ทุกรายจะพบร่วมกับโรค thalassemia และ โรคที่เกี่ยวข้องกับโลหิตวิทยาอื่น ๆ เช่น leukemia, aplastic anemia, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) เป็นต้น

ในผู้ป่วย cutaneous-subcutaneous pythiosis และ systemic pythiosis มักมีการติดเชื้อที่บริเวณส่วนล่างของขา และผู้ป่วยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในชนบทและมีอาชีพเป็นชาวนา และจากรายงานผู้ป่วย 17 รายมีประวัติเป็น hemoglobin E trait 1 ราย, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) 1 ราย, α-thalassemia disease 4 ราย, β-thalassemia/hemoglobin E 12 ราย, โดยผู้ป่วย β-thalassemia/hemoglobin E 2 รายมีอาการ cutaneous pythiosis และ ในรายอื่น ๆ เป็น systemic pythiosis และเสียชีวิตเนื่องจากเชื้อเข้าสู่หลอดเลือด 6 ราย

รายงานผู้ป่วยที่แสดงอาการของ keratic pythiosis โดยส่วนใหญ่มีอาชีพเป็นชาวนาและอาศัยอยู่ในแถบชนบท และเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี มีเพียง 1 รายที่เป็น β-thalassemia/hemoglobin E disease ผู้ป่วยมักได้รับเชื้อจากฝุ่น, โคลน, น้ำ หรือ ใบข้าวในนา โดยผู้ที่มีรอยโรคลักษณะนี้มักมีประวัติโดนขูด หรือมีการบาดเจ็บบริเวณลูกตา ซึ่งอาการของโรคไม่แตกต่างจาก keratitis ที่มีสาเหตุจากเชื้อราในบางรายที่มีอาการรุนแรงอาจถึงต้องผ่าตัดเอาลูกตาออก ซึ่งในรายที่เป็นที่กระจกตาทำการรักษาด้วยยา เชื้อมักไม่ตอบสนองต่อยาแต่ผู้ป่วยสามารถรักษาให้หายขาดได้ด้วยการทำ corneal transplantation

โรคพิทิโอสิสเกิดได้ในสัตว์หลายชนิดช่น ม้า, สุนัข, แมว, วัว, ควาย, หมี และปลา ซึ่ง pythiosis ในม้ามีอาการที่สำคัญคือ มีการติดเชื้อเรื้อรัง และเกิดเป็นก้อนแกรนูโลมาที่บริเวณผิวหนังและผิวหนังชั้นลึก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักพบบริเวณขาส่วนล่าง, ท้อง, หน้าอก, เต้านม และ ต่อมน้ำนม รอยโรคมีลักษณะเป็นวงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ ซึ่งรอยแผลนี้มีลักษณะเฉพาะคือ ก้อน tumor จะมีสีคล้ำ และ แผลมีเนื้อตาย รอบบริเวณเนื้อตายจะพบก้อนเนื้อตายสีขาวเหลือง ลักษณะคล้ายปะการัง เรียกว่า kunker หรือ leeches สำหรับการก่อโรคในสัตว์มักไม่พบการแพร่กระจายของเชื้อไปอวัยวะอื่น ๆ แต่อาจพบการแพร่เข้าสู่หลอดน้ำเหลืองใกล้เคียงและท้ายที่สุดทำให้เกิดโรคแพร่กระจายได้ แต่จากอาการที่กล่าวมามีความคล้ายคลึงกับ equine cutaneous habronemiasis และ zygomycotic skin infection ที่มีสาเหตุจาก *Basidiobolus ranarus* และ *Conidiobolus coronatus* ซึ่งบ่อยครั้งมีการวินิจฉัยพลาดไปและทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้ยังพบรายงานการเป็นโรคกลับซ้ำในโรคพิทิโอสิสในม้า รายงานโรค canine pythiosis มักพบอาการทางระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) โดยไม่มีรอยโรคที่ผิวหนังได้บ่อยครั้งกว่า cutaneous ulcer และสุนัขที่ติดเชื้อมักมีประวัติสัมผัสกับหนองน้ำมาก่อน ซึ่งทั้ง

การติดเชื้อในผิวหนังชั้นลึกและระบบทางเดินอาหารยังพบได้ในวัวควาย (Mendoza. 2005 : 412-429)

รูปที่ 2.2 แสดงพยาธิสภาพของคนที่เป็นโรค Pythiosis ก่อนการรักษา(A) ขณะรับการรักษา(B) หลังการรักษา (C) และม้าที่ติดเชื้อ *Pythium insidiosum* บริเวณเท้า (D) (Marques et al. 2006 : 484)

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. Microscopic examination

สิ่งส่งตรวจสำหรับ subcutaneous form ได้แก่ biopsy หรือ ulcer ส่วน systemic form ได้แก่ ก้อน thrombus ที่พบบริเวณ aneurysm ในการตรวจใช้ KOH preparation ตรวจหาสายราขนาดใหญ่ ประมาณ 4 –10 μm มักมีลักษณะเป็นท่อนคดงอ พบการแตกแขนงแบบตั้งฉาก ไม่พบ septum การดูลักษณะของ hyphae อาจแยกออกจาก hyphae ของ mucormycotic agent ได้ยาก ดังรูป ซึ่งในการย้อมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา มักใช้สี Gomori methenamine silver (GMS) ซึ่งสายราจะย้อมติดสีดำ แต่การย้อมด้วย Periodic acid schiff (PAS) หรือ Hematoxylin-eosin (H&E) เชื้อมักติดสีได้ไม่ดี โดยชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมจะพบ eosinophilic granulomatous inflammation สามารถพบ Splendore Hoeppli phenomenon ได้ แต่วิธีการนี้ไม่ค่อยจำเพาะเนื่องจากการติดเชื้อ zygomycosis ที่มีสาเหตุจาก *Basidiobolus ranarum, Conidiobolus coronatus* หรือ Mucorales ก็สามารถให้ผลการย้อมชิ้นเนื้อในลักษณะเดียวกันได้ ซึ่งวิธีการวินิจฉัยโรค pythiosis ที่จำเพาะสามารถทำได้โดยการแยกเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมจากสิ่งส่งตรวจ

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เชื้อเจริญได้ดีบน Sabouraud dextrose agar ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ให้โคโลนีลักษณะ glabrous สีขาวถึงสีครีม ไม่พบการสร้างสปอร์ เมื่อนำเชื้อไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมีสายราขนาดใหญ่ประมาณ 4 –10 μm sparsely septate hyphae สายราแตกแขนงแบบตั้งฉาก ในการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทำได้โดยการใช้ SDA ที่มีหรือไม่มียาปฏิชีวนะ เช่น Penicillin และ Streptomycin sulfate ก็ได้ โดย Miller ในปี 1983 ได้รายงานการแยกเชื้อโดยการใช้ 1% vegetable extract agar (VEA) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Pythium* sp. ได้อย่างรวดเร็ว โดยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้การพิสูจน์เชื้อยังทำได้โดยการกระตุ้นให้เชื้อสร้างซูโอสสปอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อใน water agar culture หรือ induction medium ที่มีการเติม ใบหญ้าหรือขนสัตว์ลงไป นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมงในที่มืด เชื้อจะสามารถสร้าง motile zoospore เป็นจำนวนมาก

สารอาหารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม

การกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม Oomycetes ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย พบว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน โดยในปี 1993 Francis และคณะได้ทำการศึกษาการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อัลติมึม (*Pythium ultimum*) โดยทำการเพาะเชื้อบนอาหาร clarified half-strength V-8 broth ที่เติม beta-sitosterol ต่อมาในปี 1996 Mondal และคณะได้ทำการศึกษาการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อฟานิเดอมาตัม (*Pythium aphanidermatum*)โดยได้ทำการเพาะเชื้อบนอาหาร V-8 juice liquid medium ที่เติมน้ำมันจมูกข้าวสาลี อย่างก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่าในการกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม จะต้องการสารจำพวก sterol โดยเฉพาะสาร beta-sitosterol ซึ่งสารตัวนี้สกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น รำข้าว, ข้าวโพด, งา และ มันฝรั่ง เป็นต้น

จากการศึกษาปริมาณของสาร beta-sitosterol ในสารสกัดจากพืช พบว่าในอาหารปริมาณ 100 กรัม มีปริมาณความเข้มข้นของ beta-sitisterol ที่แตกต่างกัน สารสกัดจากพืชที่พบปริมาณของ beta-sitosteral ในการศึกษาทบทวนวรรณกรรมในครั้งนี้ มีดังนี้ น้ำมันข้าวโพดมี 419 mg (Food summary sitosterol (corn oil) 2009), น้ำมันงาและจมูกข้าวสาลี 231.47 mg (Food summary sitosterol (sesame) 2009) น้ำมันรำข้าว 171.8 mg (Food summary sitosterol (rice bran) 2009) น้ำมันมะพร้าว 200 mg (Phillip et al. 2002 : 123) สารสกัดจากมันฝรั่ง 6.8 mg (Nair and Kanfer 2008 : 324)

Beta-sitosterol เป็นสารในกลุ่ม sterol ที่พบในพืชเกือบทุกชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยดูดซึมคอเลสเตอรอลในซีรัม ช่วยในการรักษาปัญหาต่อมลูกหมากเช่น prostatic hypertrophy และช่วยเพิ่มการไหลของปัสสาวะ ลดการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ช่วยทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลินในผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภท II อยู่ในระดับปกติ beta-sitosterol ยังสามารถช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่มักเกิดขึ้นระหว่างการฟื้นตัวจากการออกกำลังกายอย่างหนักได้

การศึกษาแหล่งที่อยู่ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมในสิ่งแวดล้อม

การศึกษาหาแหล่งในธรรมชาติของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมเริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1983 โดย Miller ได้ทำการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำจากหนองน้ำ 10 แห่งรอบเมือง Townsville ทางตอนเหนือของรัฐ Queensland ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งผู้ทดลองสามารถจำแนกเชื้อ *Pythium* sp. ได้จากหนองน้ำ 2 แห่ง การพิสูจน์เชื้อทำโดยการศึกษาลักษณะทางกายภาพและความสามารถของซูโอสปอร์ในการเกาะกับเส้นผมของมนุษย์ (Miller. 1983 : 23-28) แต่จากรายงานขาดวิธีที่ใช้ในการยืนยันว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อ พิเทียม อินสิดิโอซัมจริง

ในปี 2006, Supabandhu และคณะได้ทำการศึกษาแหล่งที่อยู่ในธรรมชาติของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม โดยมุ่งเน้นไปยังแหล่งน้ำชลประทาน เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีประวัติเกี่ยวกับการสัมผัสกับแหล่งน้ำนิ่งเป็นเวลานาน ๆ หรือ มีอาชีพเกี่ยวข้องกับการเกษตร จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าสามารถแยกเชื้อได้จากหนองน้ำในบ้าน, หนองน้ำในทุ่งนา, น้ำในแปลงนาข้าว และ ร่องน้ำชลประทาน

การศึกษาความแตกต่างทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมได้มีการศึกษาด้วยวิธีทางโมเลกุลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของสาย internal transcribed spacer region ซึ่งทำให้สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 3 กลุ่ม (I – III) ได้แก่ กลุ่มที่ I ประกอบด้วยเชื้อที่มาจากทวีปอเมริกา, กลุ่มที่ II ประกอบด้วยเชื้อที่มาจากเอเชีย-ออสเตเรีย และ กลุ่มที่ III กลุ่มประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศไทย (Schurko et al. 2003a : 537-544) เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการทดสอบความหลากของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยด้วยวิธี RAPD จากวิธีนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความหลากหลายสูงมาก แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างที่อยู่ทางภูมิศาสตร์ของเชื้อกับอาการทางคลินิกของโรคในเชื้อ isolate ต่างๆ (Pannanusorn et al. 2007 : 383-391)

การเปรียบเทียบลำดับเบสของส่วน internal transcribed spacer region ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์ทั้งต่อทางการวินิจฉัยเชื้อและการศึกษาทางด้านphylogeny

แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากว่า DNA marker ชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ไม่สามารถที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมได้ ดังนั้น DNA marker ที่มีความหลากหลายสูงอย่างเช่น RFLP (Schurko et al. 2003b : 200-208), RAPD (Pannanusorn et al. 2007 : 383-391), ลำดับเบสของยีน CoxII (Kammarnjesadakul et al. 2011 : 289-295) และ microsatellite (Supabandhu et al. 2007 : 1080-1090) (ได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้สำหรับแยกแยะความแตกต่างของเชื้อแต่ละตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี microsatellite พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการใช้จำแนกกลุ่มของเชื้อที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันเป็นอย่างมาก และเหมาะกับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่เป็น diploid อย่างเช่นในเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมนี้

การศึกษาโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมด้วยวิธี microsatellite งานวิจัยนี้ได้ศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมที่มีแหล่งที่อยู่มาจากในภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (Supabandhu. 2009) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางจีโนไทป์ของเชื้อในกลุ่มประชากรทั้งหมดพบว่าเชื้อมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในระดับน้อยถึงปานกลาง แต่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในกลุ่มประชากรเดียวกัน และนอกจากนี้ทางผู้วิจัยก็ไม่พบความสัมพันธ์เชิงภูมิศาสตร์ระหว่างเชื้อที่มีจีโนไทป์ต่างกัน จากผลที่ได้ต่าง ๆ นี้บ่งชี้ถึงว่า เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีการกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมและมีการเกิด gene flow ในระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อในภาคเหนือและภาคกลาง จากผลดังกล่าว เป็นหลักฐานบ่งบอกที่สำคัญต่อความเป็นไปได้ที่ว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมน่าจะมีความสามารถในการเกิดการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์เกิดขึ้น เนื่องจากว่าโดยปกติเชื้อกลุ่ม oomycetes ที่มีการผสมพันธุ์ในตัวเอง หรือ homothallic oomycetes มักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในกลุ่มประชากรเดียวกัน แต่สิ่งที่พบกลับมีความขัดแย้งกับทฤษฎี ดังนั้นจากผลที่พบดังกล่าวจึงเป็นการสมควรที่จะมีการพิสูจน์ระบบสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่แน่นอนของเชื้อชนิดนี้เป็นอย่างยิ่ง

การเกิดผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ในเชื้อจีนัสพิเทียมและกลุ่ม oomycetes กับการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ

เชื้อพิเทียม สปีชีส์ต่าง ๆ สามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถในสืบพันธุ์ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ heterothallic และ homothallic เชื้อที่เป็น heterothallic เชื้อต่างสายพันธุ์กันจะมีการสร้างสายราเฉพาะที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย แต่สำหรับเชื้อพิเทียมที่เป็น homothallic นั้นหน่วยสืบพันธุ์ทั้งสองเพศจะสามารถสร้างได้จากเชื้อตัวเดียวกัน การเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ ในจีนัสพิเทียมมักพบได้ตามปกติในเชื้อที่เป็น heterothallic ส่วนหลักฐานที่พบว่าเชื้อกลุ่ม

homothallic มีความสามารถในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์นั้นพบได้ในเชื้อพิเทียม อัลติมึม (Francis and St.Clair 1993 : 100-106) ซึ่งการศึกษานี้ได้เชื้อตั้งต้นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาทำการผสมพันธุ์กัน โดยยืนยันการเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ ด้วย genetic marker 2 ชนิด ได้แก่ randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่งสามารถตรวจพบเซลล์ลูกผสมทีเกิดจากการผสมกันของเชื้อทั้งสอง นอกจากนี้ผู้ทดลองยังได้ใช้วิธีเดียวกันนี้ในการทดสอบกับเชื้อตัวหนึ่งที่ไม่สามารถสร้างโอโอสปอร์ได้ด้วยตนเอง แต่พบว่า สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและสร้างโอโอสปอร์ได้เมื่อผสมเชื้อตัวดังกล่าวกับเชื้อ homothallic อีกตัวหนึ่ง ซึ่งการทดลองนี้ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า เชื้อ homothallic oomycetes อื่น ๆ ก็อาจมีความสามารถที่จะเกิดการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้ ซึ่งการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวจะเป็นปัจจัยที่สำคัญส่งเสริมให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่ม homothallic oomycetes ได้

ในเชื้ออื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่ม Oomycetes พบว่ามีรูปแบบการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศที่มีความหลากหลายและซับซ้อน โดยเชื้อจีนัสพิเทียมส่วนใหญ่มักอยู่ในกลุ่ม homothallic species (Van der Plassts Niterink. 1981 : 1-242) แต่ทว่าเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม heterothallic species ก็พบได้เช่นกัน (Campbell and Hendrix. 1967 : 274-278 ; Hendrix and Campbell. 1968 : 802-805) ส่วนในเชื้อ พิเทียม ซิลวาติกัม (*P. sylvaticum*) มีระบบการสืบพันธุ์อยู่สองรูปแบบซึ่งต้องการคู่ที่จำเพาะกัน (Pratt and Green. 1971 : 273-279 ; Martin. 1989 : 373-374) อย่างไรก็ตาม มีเชื้ออยู่หลายตัวในสปีชีส์นี้ที่ไม่ได้จำกัดว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมียและเชื้อบางตัวก็เป็น homothallic ซึ่งรูปแบบการสืบพันธุ์ที่ซับซ้อนนี้ก็พบได้ใน heterothallic oomycetes ตัวอื่น ๆ เช่นกัน ยกตัวอย่างในจีนัส *Achlya* (Raper. 1960 : 794-808) และ *Phytophthora* (Gallindo and Gallegly 1960 : 123-128) การศึกษาในเชื้อพิเทียม อัลติมึม พบว่าเชื้อตัวที่มีการพองออกของสายรา ก็บ่งชี้ให้เห็นถึงว่าระบบสืบพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม homothallic oomycetes ก็น่าจะมีความซับซ้อนพอ ๆ กันกับเชื้ออื่น ๆ ในจีนัสพิเทียม โดยเชื้อที่พบการการพองออกของสายรานี้มักจะหน้าที่เป็นเพศผู้ในขณะที่เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Martin. 1990 : 47-56) และพฤติกรรมที่พบนี้ก็เป็นกลไกที่ช่วยทำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ (outcrossing) ซึ่งการเกิดการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อัลติมึมในสิ่งแวดล้อมก็เป็นปัจจัยที่สำคัญส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรของเชื้อพิเทียมนี้และในจีโนมของเชื้อแต่ละตัวเช่นกัน ส่วนเชื้อก่อโรคในกลุ่ม Oomycete ตัวอื่น ๆ เช่น *Phytophthora infestans* พบว่าประชากรที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและ การที่ระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อด้วย (Tooley et al. 1985 : 431-435)

การหลักฐานงานวิจัยของ Martin ในปี ค.ศ. 2006 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ในตระกูลพิเทียมเป็นเชื้อ homothallic และสามารถเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ได้เช่นกัน โดยการวิเคราะห์ด้วย Pluse-field gel electrophoresis กับเชื้อพิเทียมที่เป็น homothallic species แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสูงของพันธุกรรมของเชื้อสปีชีส์เดียวกันโดยการเปรียบเทียบ electrophoretic karyotype (EK) รวมถึงจำนวนและขนาดของ band ของโครโมโซมที่ถอดรหัสเป็น rDNA นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบเชื้อต่าง ๆ ด้วยวิธี flow cytometry พบความหลากหลายของปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสระหว่างเชื้อต่างตัวกัน และยังพบอีกว่า EK ของ ลูกหลานรุ่นที่ 1 หรือ S1 progeny ที่ได้มาจากเชื้อบางสปีชีส์ก็มีความแตกต่างไปจากเชื้อต้นกำเนิดด้วย

จากความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชื้อ พิเทียม อินสิดิโอซัม และข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ มีการพิสูจน์แล้วว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมีความหลากหลายสูงทางพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่มประชากรเดียวกัน และจากหลักฐานที่พบการเกิดการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ในเชื้อตระกูลพิเทียมสปีชีส์อื่น ๆ แล้วจึงมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมน่าจะเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ ได้ในสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกัน การพิสูจน์ข้อสมมติฐานนี้จะเป็นประโยชน์อันมากต่องานวิจัยที่จะมีขึ้นอีกต่อไปในแง่การศึกษาปัจจัยทางธรรมชาติที่ส่งเสริมให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ และการพยากรณ์อุบัติการณ์ของการเกิดโรคในภูมิภาคต่าง ๆ ในกรณีที่เชื้อสายพันธุ์ก่อโรคมีการแพร่ระบาดไป ซึ่งจะเป็นการให้ความรู้เพื่อการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมต่อไปในภายภาคหน้า

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

เชื้อที่นำมาใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *Pythium insidiosum* จำนวน 15 isolates ดังตารางที่ 3.1 ที่ได้รับการตรวจยืนยันสปีชีส์ด้วยวิธีอ่านลำดับเบสในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) และ วิธี Polymerase chain reaction ด้วย primer ที่จำเพาะ ITSpy1 และ ITSpy2 โดย ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม กลุ่มราวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Vanittanakom et al. 2004 : 3970-3974 ; Supabandhu et al. 2008 : 41-52)

ตารางที่ 3.1 เชื้อ *Pythium insidiosum* ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อเชื้อ	Microsatellite type (จากโปรแกรม Structure)	Accession number	เอกสารอ้างอิง
1. LP08	S1	EF016891	Supabandhu *et al* 2008
2. NAN05	S1	EF016900	Supabandhu *et al* 2008
3. MMC46P21-2	S1	-	Supabandhu 2009
4. LP01	S1	EF016884	Supabandhu *et al* 2008
5. MD45P21-3	S3	-	Supabandhu 2009
6. CM04	S3	EF016859	Supabandhu *et al* 2008
7. CM02	S3	EF016856	Supabandhu *et al* 2008
8. MMC48P21-1	S5	-	Supabandhu 2009
9. LPN14	S5	EF016877	Supabandhu *et al* 2008
10. CM01	S5	EF016856	Supabandhu *et al* 2008
11. LP03	S5	EF016886	Supabandhu *et al* 2008=
12. CBS119452	S6	EF016852	Vanittanakom et al 2004
13. CBS119455	S6	EF016855	Vanittanakom et al 2004
14. CR10	S6	EF016911	Supabandhu *et al* 2008
15. LP02	S6	EF016885	Supabandhu *et al* 2008

2. อาหาร crossing media ชนิดต่างๆ สำหรับสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

การหา crossing media ที่เหมาะสมต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม โดยศึกษาจากการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อตระกูล oomycetes มีปัจจัยที่จำเป็นคือ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารกลุ่ม sterol โดยมีการศึกษาการกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ในเชื้อจีนัส *Phytophthora* และ เชื้อพิเทียม สปีชีส์อื่น ๆ มาก่อน แต่ทว่าวิธีการกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม ยังไม่มีการศึกษาที่จำเพาะ ดังนั้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อชนิดนี้ การทดลองครั้งนี้จะทำการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ crossing media ที่แตกต่างกันอยู่ 4 ชนิด ได้แก่

1. V-8 juice liquid medium (Mondal. 1996 : 545-553)
2. Clarified half-strength V-8 broth (Francis and St. Clair. 1993 : 100-106)
3. Potato dextrose agar (PDA) (Turner. 1965 : 135-137)
4. Cornmeal agar (Mendoza et al. 1993 : 2967-2973)

โดย Beta-sitosterol เป็นสารกลุ่ม sterol ที่มักพบในสารสกัดที่ได้จากพืช ได้แก่ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา, น้ำมันรำข้าว, น้ำมันมะพร้าว จากการทดลองของ Mondal และคณะ ในอาหาร V-8 juice liquid medium 1 ลิตร ผู้ทดลองได้ใช้น้ำมันจมูกข้าวสาลี ปริมาตร 500 ไมโครลิตร/ลิตร ซึ่งในการทดลองในครั้งนี้ได้คำนวณปริมาณของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ ที่ต้องใช้โดยคิดเทียบกับความเข้มข้นของ Beta-sitosterol ที่พบในน้ำมันจมูกข้าวสาลี

1. สูตร V-8 juice liquid medium

อาหาร V-8 juice liquid medium เป็นการปรับสูตรจาก Mondal และคณะ (Mondal. 1996 : 545-553) อาหารประกอบด้วย 60-ml V-8 vegetable juice (Campbell soup Co., USA) ที่กรองแล้ว 60 ml กับ $CaCO_3$ 1.5 g คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 ml แบ่งใส่ 12 flask ปริมาตร flask ละ 50 ml เติมน้ำมันแต่ละชนิดใส่ปริมาตรตามตารางที่ 3.2 ลงไปใน flask อย่างละ 3 flask นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} นาน 15 นาที

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณน้ำมันในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร V-8 juice liquid medium

Flask	**V-8 juice liquid medium 50 ml/flask**	
	น้ำมันที่ใช้	**ปริมาณน้ำมันที่ใช้** (ไมโครลิตร/ลิตร)
1-3	น้ำมันมะพร้าว	500

4-6	น้ำมันงา	500
7-9	น้ำมันรำข้าว	665
10-12	น้ำมันข้าวโพด	250

2. สูตร Clarified half-strength V-8 Agar

ผสม V-8 juice ที่กรองแล้ว 250 ml กับ $CaCO_3$ 3.5 g คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 250 ml เพื่อให้ได้ปริมาตร 500 ml แบ่งใส่ flask ละ 125 ml ได้ 4 flask เติมน้ำมันแต่ละชนิดใส่ปริมาตรตามตารางที่ 3.3 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 15 นาที เทเพลตปริมาณ 20 ml

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนผสมสูตร Clarified half-strength V-8 Agar

Flask	**น้ำมันที่ใช้**	**ปริมาณน้ำมันที่ใช้** (µl) **เทียบเท่า β-sitosterol ความเข้มข้น 5 mg/ml**
1	น้ำมันมะพร้าว	31.25 µl
2	น้ำมันงา	62.5 µl
3	น้ำมันรำข้าว	83.125 µl
4	น้ำมันข้าวโพด	62.5 µl

3. สูตร Potato Dextrose Agar (PDA)

ชั่ง Potato Dextrose Agar base 7.8 g (Difco, USA) เติมน้ำกลั่น 200 ml คนให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 15 นาที เทใส่เพลตละ 20 ml

4. Cornmeal agar

ชั่ง cornmeal 50 g เติมน้ำกลั่น 500 ml นำไปต้มให้เดือด และตุ๋นด้วยไฟอ่อนต่ออีก 15 นาที กรอง cornmeal ออก เก็บ supernatant เติม agar granulate (Difco, USA) นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 15 นาที เทใส่เพลตละ 20 ml

3. การทดสอบอาหาร crossing media ที่เหมาะสมต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

เชื้อที่ใช้ทดสอบคือเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมมาตรฐาน CBS114952 ที่มีความสามารถในการสร้างโอโอสปอร์ได้ด้วยตัวเอง (selfing) ซึ่งจะทำได้โดย นำ agar plug ที่มีเชื้อเจริญบน SDA เป็นเวลา 3 วัน ทำการถ่ายเชื้อที่กำลังเจริญเป็นชิ้นเล็ก ๆ ลงในน้ำต้มดอกหญ้าเป็นเวลา 2 วัน นำชิ้นเชื้อที่บ่มในน้ำต้มดอกหญ้ามาเลเซียมาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ ถ้า crossing media เป็นอาหารแข็งมาวางไว้ที่ตรงกลางจานอาหาร crossing media กรณีเป็นอาหารเหลว ให้นำชิ้นเชื้อดังกล่าวใส่ลงไปประมาณ 5 ชิ้น ทำการตรวจสอบการสร้างโอโอสปอร์ทุก ๆ 3 วัน

กรณีที่จะทำการผสมข้ามสายพันธุ์ จะใช้เชื้อสายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 2 โดยนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ อายุ 3 วันมาเลี้ยงในน้ำต้มดอกหญ้ามาเลเซียจากนั้นนำชิ้นเชื้อมาวางไว้ในจานอาหารเดียวกัน โดยวางตรงกันข้ามกัน สังเกตการเจริญของเชื้อ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์และโอโอสปอร์ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โอโอสปอร์ที่ได้นำมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยว โดยการตัดเชื้อบริเวณที่มีการสร้างโอโอสปอร์มาทำการกระตุ้นให้เชื้อสร้างซูโอสปอร์ใน induction medium ที่ใส่ใบหญ้ามาเลเซีย (De Cock et al. 1987 : 344-349) ดูดซูโอสปอร์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงโดยวิธี spread บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่ได้บน SDA slant ต่อไป เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอสำหรับตรวจพิสูจน์จีโนไทป์โดยใช้ microsatellite marker ต่อไป

4. วิธีการกระตุ้นซูโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

นำหญ้ามาเลเซียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โรยลงบนจานเพาะเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใส่หญ้าที่มีเชื้อเจริญอยู่ลงใน induction medium (solution 1; 0.5 ml.[1.0 M K_2HPO_4, 1.0 KH_2PO_4, 3.66 M $(NH_4)_2$, distilled water 500 ml.], solution 2; 0.1 ml.[0.5 M $MgCl_2.6H_2O$, 0.5 M $CaCl.2H_2O$, distilled water 250 ml.]) ใน sterile distilled water 1000 ml. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจดูการสร้าง zoospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (De Cock et al. 1987 : 344-349)

5. การทดสอบการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัมสายพันธุ์ที่เหมาะสม

การศึกษาขั้นตอนนี้จะทำการเลือกคู่เชื้อที่เหมาะสมจากข้อมูลที่มีการศึกษามาก่อน โดยเชื้อแต่ละคู่มาจากกลุ่มที่มีจีโนไทป์คล้ายคลึงกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Supabandhu 2009) ด้วยการวิเคราะห์จากโปรแกรม STRUCTURE version 2.0 (Pritchard. 2000 : 945-959) โดย

เลือกสุ่มทำการทดสอบใน 3 กลุ่มตัวอย่าง โดยในแต่ละกลุ่มจะทำการคัดเลือกหาเชื้ออย่างน้อยกลุ่มละ 2 isolates ที่มีความสามารถในการสร้างโอโอสปอร์ในอาหารสังเคราะห์ได้

การวิเคราะห์ด้วย microsatellite marker จำนวน 6 marker เพื่อยืนยันจีโนไทป์ของเชื้อลูกผสม โดยเชื้อรุ่นลูกที่เกิดขึ้นจะมีการออกแบบชื่อ โดยชื่อจะบ่งบอกเชื้อสายพันธุ์พ่อ (P1) และแม่ (P2) ส่วนลูกผสมรุ่นลูกที่ตรวจพบจะมีคำนำหน้าคือ F_1 และตามด้วยหมายเลข isolate นั้น ๆ เช่น F_1(P1 x P2)9 คู่ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกในแต่ละกลุ่มจำนวน 3 คู่จะนำมาทดสอบการสร้างโอโอสปอร์ดังที่กล่าวรายละเอียดไปข้างต้น โดยโอโอสปอร์ จำนวน 20 สปอร์ ต่อ 1 คู่ของเชื้อจะถูกแยกเพื่อนำมาตรวจหาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมให้แก่กันและกันด้วยวิธี microsatellite ดังกล่าวเพื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์ของเซลล์ลูกและเซลล์พ่อแม่ตั้งต้นต่อไป

ในกรณีที่เชื้อมีการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้ พันธุกรรมของรุ่นลูกที่เกิดขึ้นที่มีรูปแบบที่เกิดการผสมกันระหว่างจีโนไทป์ของเชื้อคู่ตั้งต้น แต่ในกรณีที่เชื้อไม่เกิดการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ รูปแบบจีโนไทป์ของเชื้อรุ่นลูกจะมีความเหมือนเชื้อพ่อแม่ตั้งต้น

6. การตรวจสอบการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์โดยวิธี microsatellite

การทดลองเพื่อยืนยันว่าเชื้อเกิดการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์กันนั้น ต้องอาศัย DNA marker ที่มีความหลากหลายและมีความถูกต้องเพื่อที่จะแสดงแบบแผนของพันธุกรรมของเชื้อตั้งต้น และเชื้อรุ่นลูกที่เกิดขึ้น โดยวิธีที่มีความถูกต้องเพื่อวิเคราะห์เชื้อที่มีโครโมโซมแบบ diploid และมี reproducibility สูงคือวิธี microsatellite (Supabandhu et al. 2007 : 1088-1090) การหาจีโนไทป์ด้วยวิธี microsatellite จะทำการวิเคราะห์ตาม Supabandhu และคณะ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

6.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

นำเชื้อที่เพาะไว้เลี้ยงใน Sabouraud dextrose broth (SDB) อายุ 5 วัน ใส่ใน microcentrifuge tube แล้วปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเอา media ออก แล้วจึงเทน้ำส่วนใสด้านบนทิ้งไป นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยเติม Lysis buffer [2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl buffer (pH 8.0), 1 mM EDTA]ปริมาณ 500 µl ต้มใน Shaking Water Bath ที่ 55 องศาเซลเซียส โดย pulse-vortexing 2 ครั้ง ทุกๆ 10 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นด้วยเครื่อง refrigerate centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดน้ำส่วนใสด้านบนใส่ microcentrifuge tube จากนั้นกำจัดโปรตีนด้วยการเติม phenol/chloroform (อัตราส่วน 1 : 1) pulse-vortexing 10 ครั้ง นำไปปั่นด้วยเครื่องที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 350

µl เพื่อนำมาตกตะกอน DNA ด้วย Isopropanol ปริมาตร 350 µl (อัตราส่วน 1 : 1) ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วน Isopropanol ทิ้ง จากนั้นปั่นล้างตะกอน DNA 2 รอบด้วย 70% alcohol ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วน 70% alcohol ทิ้ง และปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืน ละลาย DNA ใน TE buffer ปริมาตร 50 µl

6.2 การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยวิธี multiplex PCR ตามวิธีของ Supabandhu และ คณะ (2007) โดยรายละเอียดของลำดับเบสของ primer ที่ใช้และสารเรืองแสงที่ติดฉลาก ได้ชี้แจงในตารางที่ 3.4 โดยการอ่านความยาวของลำดับเบสจะใช้เครื่อง sequencer โดยเชื้อแต่ละตัว จะนำมาหาจีโนไทป์ทั้งหมด 9 microsatellite loci ซึ่งจะต้องใช้ primer ทั้งหมด 9 คู่โดยจะแบ่งกลุ่ม primer ออกเป็น 3 กลุ่ม ในการทำ multiplex PCR จะใช้ดีเอ็นเอที่ทำการเจือจางลงที่ dilution 1:10 จากนั้นดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาใช้ 1 µl เพื่อ amplify และ primer ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 µM ซึ่ง PCR condition ที่ใช้มีรายละเอียดดังนี้ 95 ^{o}C นาน 15 นาที, ตามด้วย 35 cycles ของ 94 ^{o}C นาน 30 วินาที; 57 ^{o}C นาน 90 วินาที; 72 ^{o}C นาน 60 วินาที, และ final extension of 60 ^{o}C นาน 30 นาที จากนั้น PCR product จะถูกนำไปอ่านความยาวของลำดับเบสด้วยเครื่อง sequencer ของบริษัท Applied Biosystems (Foster City, California, United States) โดยใช้ POP-6 and a Rox-500 internal size standard (Applied Biosystems) จากนั้น allele ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง genotyper software (Applied Biosystems)

การเปรียบเทียบรูปแบบจีโนไทป์ของเชื้อลูกผสมจาก PCR product ที่ได้โดยตรงด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอของเชื้อลูกผสมที่ได้ 1 ตัวอย่าง นำมาทำ PCR กับ primer 6 คู่ คือ PY1, PY3, PY4, PY5, PY6, PY8 ใช้ดีเอ็นเอที่ทำการเจือจางลงที่ dilution 1:10 จากนั้นดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาใช้ 1 µl เพื่อ amplify กับ primer ทีละคู่ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 pmol/µl เตรียม PCR mixture ด้วย 2x Mastermix ประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ and reaction buffers (Vivantis, Malaysia) 12.5 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, DNA template 1 µl และเติมน้ำจนครบ 25 µl ในส่วนของ positive control คือ *Pythium insidiosum* CBS119452 และ negative control คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยไม่เติม DNA template ซึ่ง PCR condition ที่ใช้มีรายละเอียดดังนี้ 95 ^{o}C นาน 15 นาที, ตามด้วย 35 cycles ของ 94 ^{o}C เป็นเวลา 45 วินาที; 57 ^{o}C เป็นเวลา 30 วินาที; 72 ^{o}C เป็นเวลา 60 วินาที, และ final extension 60 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที และสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ PCR product 10 µl ผสมกับ 6x loading

dye 2 µl ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของเชื้อด้วย 3% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide solution 1 µg/ml เป็นเวลา 15-30 นาที และล้างน้ำ 15 นาทีนำไปดูแถบ DNA ภายใต้แสงยูวี

ตารางที่ 3.4 ลำดับเบส ของ Primer 9 คู่ ที่จำเพาะต่อเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม microsatellite loci

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	T_a (^oC)	Size range (bp)
Py1	L: CGATCCGATCTGATGTTTT	$(GT)_{10}$	58	112-156
	R: ACACAAACCCCAGAAACAC			
Py2	L: TGAATCATAGCAAATGAACG	$(CT)_{19}$	58	172-226
	R: AACCGACCCTATGTGTGTAG			
Py3	L: ACACACCATGCCATTCTTCT	$(CA)_9$	58	168-228
	R: CGAAAGGGAGAGAACAACAA			
Py4	L: CAACCATGCAACCATGAG	$(CG)_6cat(GC)_5gc$	58	215-227
	R: ACCCTTCCAACACATCACC	$(GT)_5gc(GT)_5$		
Py5	L: ACATTGCAGAGTGAGGTGAG	$(GT)_8$	58	150-172
	R: GCGTTCTACCGTTCTACACA			
Py6	L:GAAACACCTCGCATTTTACA	$(CA)_{15}$	58	168-214
	R: GTTGAGTGTTGGATGTGGAC			
Py8	L: GTTCGGTGTCTCGATTGGAT	$(CT)_{14}$	58	216-262
	R: CCACTGTACCAGCAAGACGA			
Py10	F: CGACTATTCGTCTTCATTGC	$(GT)_{11}$	58	186-212
	R: GCCAATTTCTGTCTTGTGTG			
Py11	F: TCTGCGATCTGCAGTGC	$(CCTTGCGGTG)_4$	58	214-244
	R: CGATATGTACATCCGAACGA			

T_a = annealing temperature

7. อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

- เครื่อง Autoclave
- กล้องจุลทรรศน์
- Beaker
- Plate 9-cm diameter
- Glass rod
- Flask 250 ml, 500 ml
- Test tube ขนาด 15 x 150 mm,
- Test tube ขนาด 25 x 150 mm
- Centrifuge tube
- Rack
- Loop
- Needle
- Auto pipette
- Auto pipette tip
- Slid
- Cover glass
- Immersion oil
- ถุงมือ
- กระดาษเช็ดเลนส์
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ผ้าขาวบาง
- กระดาษฟรอยด์

8. สารเคมี

- Induction medium

(solution 1; 0.5 ml.[1.0 M K_2HPO_4, 1.0 KH_2PO_4, 3.66 M $(NH_4)_2$, distilled water 500 ml]

solution 2; 0.1 ml.[0.5 M $MgCl_2.6H_2O$, 0.5 M $CaCl.2H_2O$, distilled water 250 ml.])

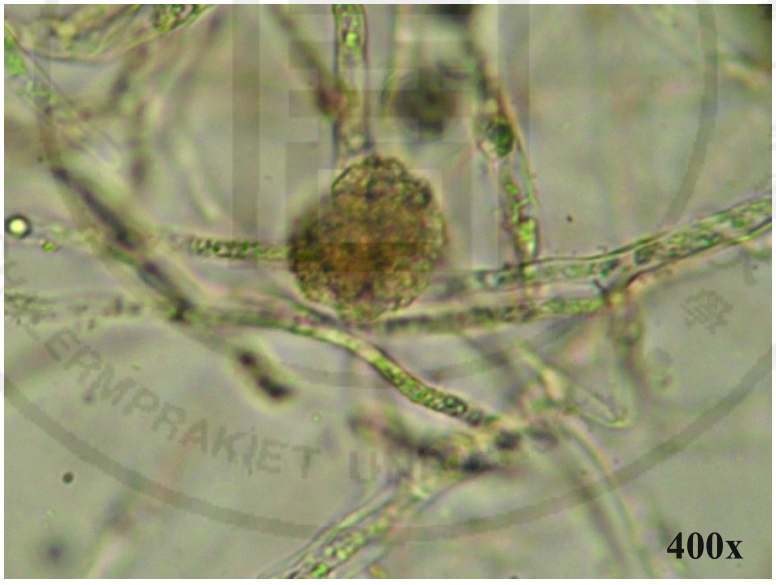
- Lysis buffer
- Distilled Water

- น้ำมันมะพร้าว
- Rice bran oil (RiZi™, บริษัท อมรไทย จำกัด, Thailand)
- Oil of Roasted Sesame Seed (Chop kheng ghee, Malaysia)
- Corn oil (Golden Drop™, Sime Darby Edible Product Limited, Singapore)
- Agar granulate (DIFCO, Dickinson, USA)
- Potato dextrose agar (DIFCO, Dickinson, USA)
- Mixed Vegetable Juice (V-8™, Campbell group company, USA)
- $CaCO_3$ (BDH™, Chemical Ltd., England
- Phenol/Chloroform solution (1:1)
- Isopropanol
- 70% alcohol
- Tris-EDTA (TE) buffer pH 8.0
- Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer
- 2x Mastermix (Vivantis, Malaysia)
- Primers
- 100 bp DNA ladder marker
- 6x Loading dye
- Agarose gel
- Ethidium bromide

บทที่ 4
ผลการวิจัย

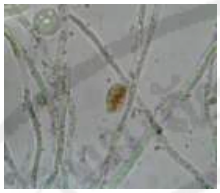
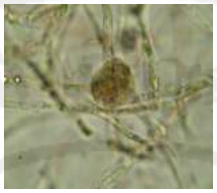
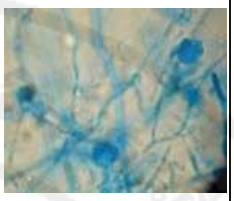
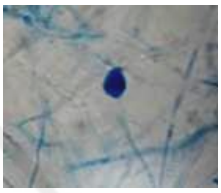
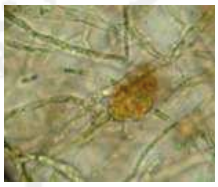
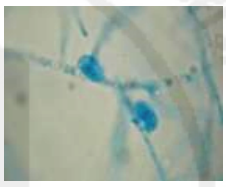
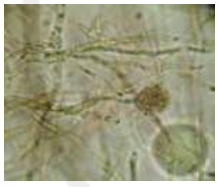
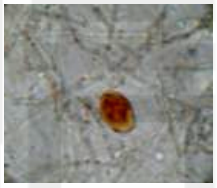
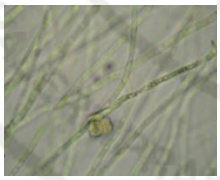
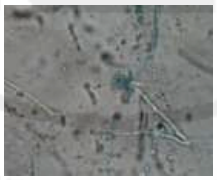
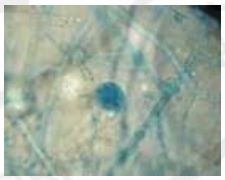
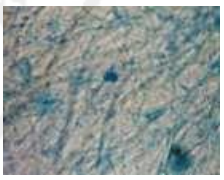
1. การสร้างโอโอสปอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 juice liquid medium

จากการตรวจดูการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม CBS119452 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 juice liquid medium นาน 5 สัปดาห์ ลักษณะส่วนใหญ่ที่ปรากฏเป็นโครงสร้างที่คาดว่าจะเป็น young Oogonia (รูปที่ 4.1) อย่างไรก็ตามไม่พบเซลล์ที่มีขอบเขตชัดเจนซึ่งเราได้พบลักษณะนี้ในอาหารที่ผสมน้ำมันมะพร้าวมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันงา, น้ำมันรำข้าว และน้ำมันข้าวโพด ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเชื้อที่คล้าย Oogonia เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร V-8 juice liquid medium ที่ผสมน้ำมันมะพร้าว นาน 1 สัปดาห์

ตารางที่ 4.1 แสดงการสร้าง young Oogonia ที่พบในอาหาร V-8 juice liquid medium ผสมน้ำมันชนิดต่างๆ

สัปดาห์ / Flask	สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4
น้ำมันมะพร้าว				
น้ำมันงา				
น้ำมันรำข้าว				
น้ำมันข้าวโพด				

2. การสร้างโอโอสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ clarified half-strength V-8 agar

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำมันมะพร้าว พบการเจริญของเชื้อมีลักษณะเป็นสายราสีขาวขุ่น ลักษณะโคโลนีเป็นลักษณะ glabrous และพบ granule เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีอยู่ที่ประมาณ 5.5 เซนติเมตร ดังรูป

Plate1 Plate2 Plate3

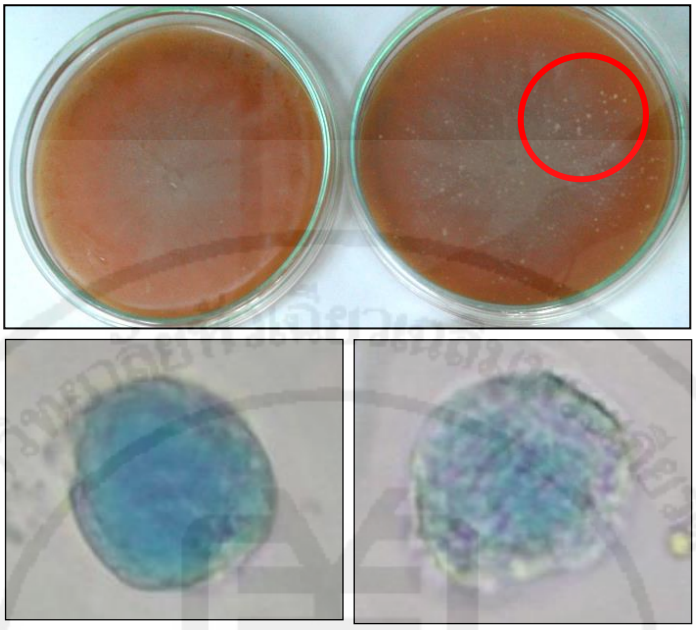
รูปที่ 4.2 แสดงขนาดการเจริญของเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบน clarified half-strength V-8 agar ในน้ำมันมะพร้าว เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำมันงา น้ำมันรำข้าวและน้ำมันข้าวโพด มีการเจริญเป็นสายราสีขาวขุ่นลักษณะโคโลนีเป็นลักษณะ glabrous และไม่พบ granule การสร้างโอโอสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ เพาะเลี้ยงเชื้อบน Clarified half-strength V-8 agar ในสัปดาห์ที่ 1-3 เราพบเพียงสาย hyphae ที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด ดังรูป

น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะพร้าว น้ำมันงา

รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อบน Clarified half-strength V-8 agar ที่ผสมน้ำมันแต่ละชนิด

แต่ที่น่าสนใจ คือ ในสัปดาห์ที่ 4 ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ clarified half-strength V-8 agar ที่ผสมน้ำมันงา เราพบว่าโคโลนีของเชื้อมีลักษณะแตกต่างไปจากโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่ผสมน้ำมันชนิดอื่นๆ ลักษณะที่พบคือโคโลนีเป็นปุ่มปมฟูขึ้นจากสาย hyphae เมื่อเราทำการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เราพบลักษณะเซลล์เดี่ยว ๆ ขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.4) ซึ่งลักษณะดังกล่าว คือ unfertile oogonia ซึ่งเราไม่พบลักษณะดังกล่าวนี้ในอาหารที่ผสมน้ำมันชนิดอื่นๆ

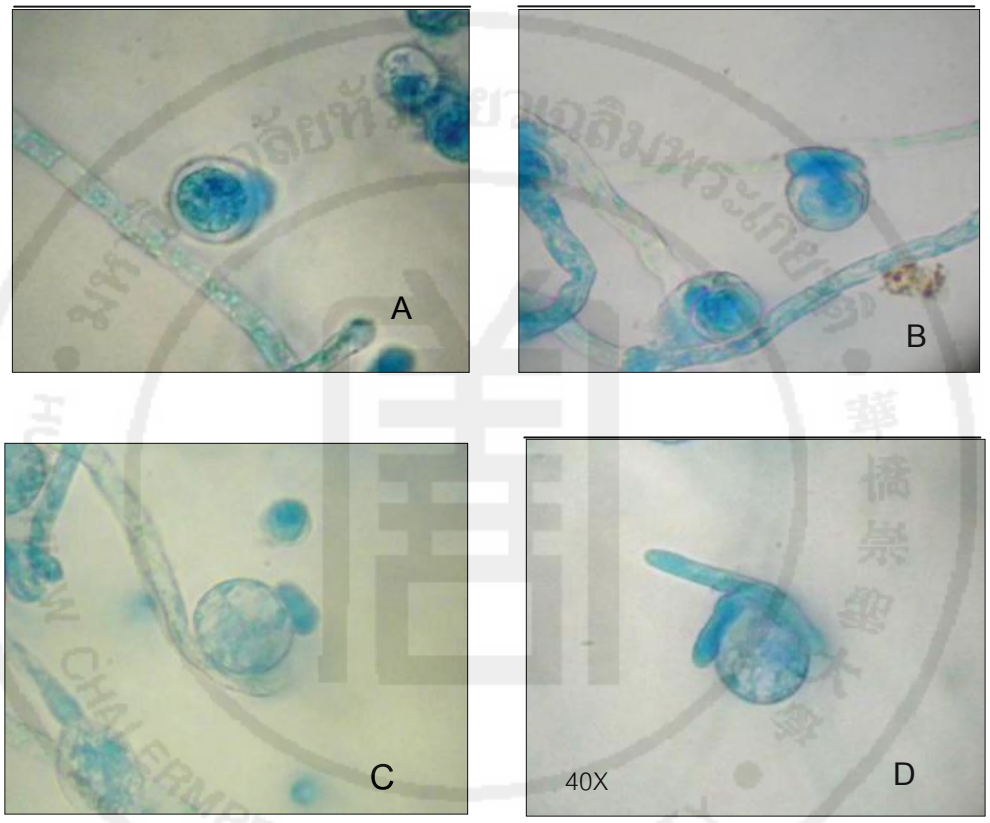


รูปที่ 4.4 แสดง โคโลนีเป็นปุ่มปมฟูขึ้นจากสาย hyphae (บน) และ Unfertile Oogonia (ล่าง) บน Clarified half-strength V-8 agar ที่ผสมน้ำมันงา หลังจากบ่มเชื้อนาน 4 สัปดาห์

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

3. การ สร้าง Oospore บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

จากการสังเกตการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อบน Potato Dextrose Agar หลังจากบ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์ พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตและมีการ fertilization ของ oogonium และ anteridium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



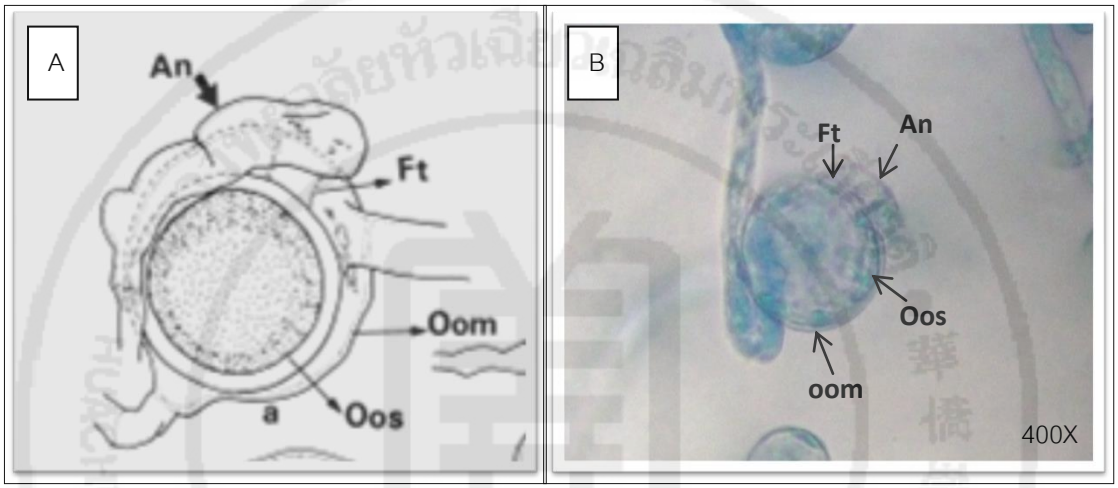
รูปที่ 4.5 แสดงระยะการสร้าง Oospore บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยใช้เวลาบ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์ ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue

A = เป็นภาพของ Oogonia ที่มีผนังหนาและเห็นนิวเคลียสชัดเจน

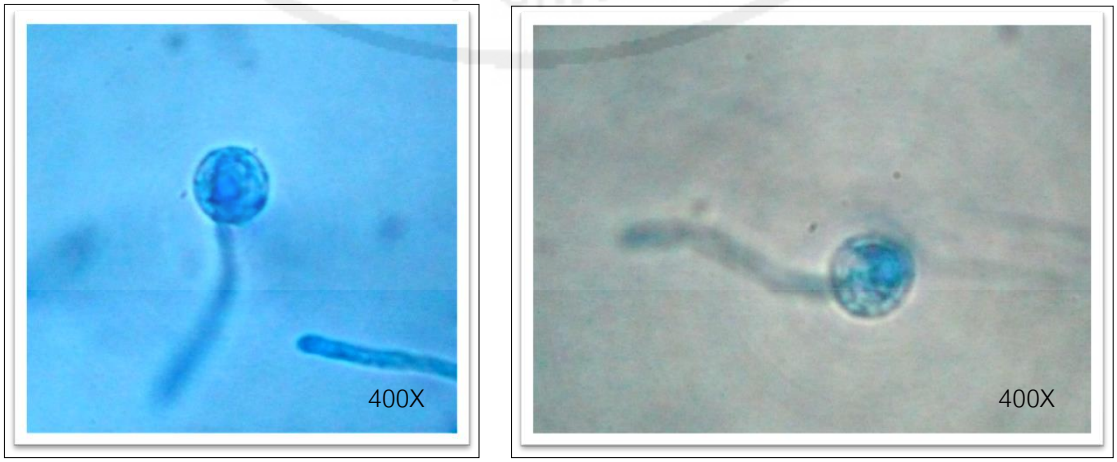
B = เป็นภาพการเกิด fertilization ระหว่าง Oogonia และ Antheridium

C, D = เป็นภาพของ young oogonia ขณะเกิด fertilization

ลักษณะดังกล่าวที่ปรากฏมีความคล้ายคลึงกับลักษณะของ Oospore ของเชื้อพิเทียม อิสิดิโอซัม ที่มีรายงานในอดีต (De Cock et al 1987: 344-349) เป็นอย่างมาก (รูปที่ 4.6) มีความเป็นไปได้ว่าจากการทดลองครั้งนี้ เชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัมสามารถสร้างโอโอสปอร์ ได้บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนถึงสัปดาห์ที่ 2 เราพบการงอกของสายราหรือที่เรียกว่า germination จาก Oospore (รูปที่ 4.7)



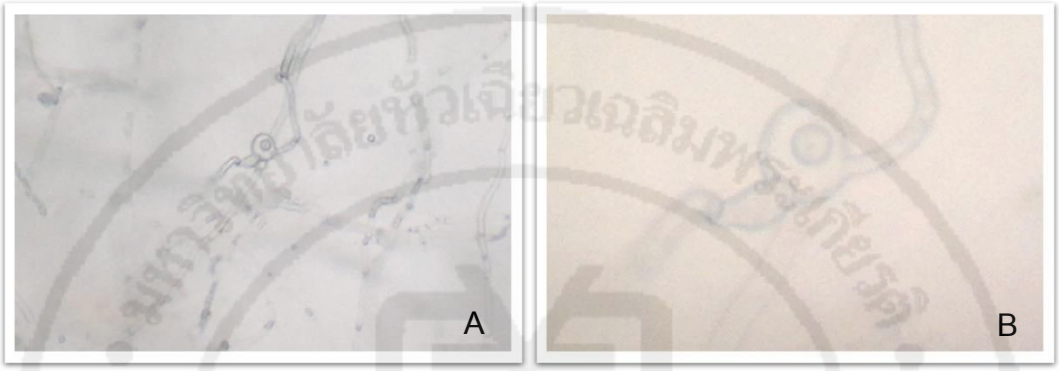
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะ oospore ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม[(1)](A) Oospore ที่พบบน Potato Dextrose Agar นาน 1 สัปดาห์ (B) *P. insidiosum* Oogonium (oom), oospore (Oos), antheridium (An), fertilization tube (Ft), และ antheridia แตะ oogonia เพื่อเกิดกระบวนการ fertilization เพื่อสร้าง oospores



รูปที่ 4.7 แสดงการงอกสาย hyphae ของโอโอสปอร์ (Oospore germination)

4. การสร้างโอโอสปอร์บนอาหาร Cornmeal Agar

จากการสังเกตการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อบน cornmeal Agar หลังจากบ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์ พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตและมีการ fertilization ของ Oogonia และ antheridium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4.8 แสดงการเกิด self-fertilization ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 บนอาหาร cornmeal agar เกิดการผสมพันธุ์ระหว่าง oogonia กับ anteridium ของตัวเชื้อ (A) กำลังขยาย 100 เท่า (B) 400 เท่า

5. การผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมสายพันธุ์ที่เหมาะสมกัน

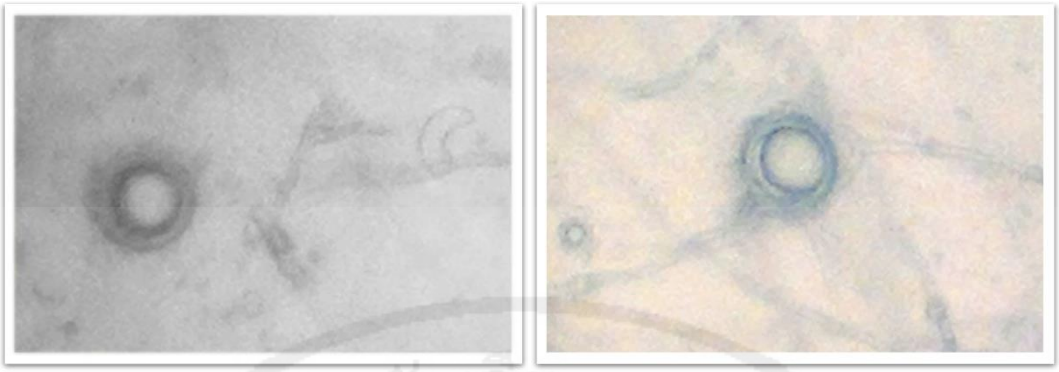
การทดสอบการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ ได้เพาะเลี้ยงเชื้อคู่ที่ต้องการทดสอบบนอาหาร cornmeal agar โดยที่ไม่เลือก potato dextrose agar เนื่องจาก พบปัญหา reproducibility ของการเกิดโอโอสปอร์ของเชื้อเนื่องจากอาหาร potato dextrose agar ที่ใช้มีการเปลี่ยน lot การผลิตของอาหารทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างโอโอสปอร์บนอาหาร lot ใหม่ได้ จึงเลือกใช้ cornmeal agar นำเชื้อที่ต้องการทดสอบแต่ละคู่โดยการเลือกจับคู่จากเชื้อที่มีจีโนไทป์ใกล้เคียงกันจากวิธี microsatellite และการจัดกลุ่มเชื้อด้วยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Structure (Supabandhu 2009) ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 แสดงเชื้อที่เลือกนำมาทดสอบการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์

คู่ที่	เชื้อ P1	เชื้อ P2	Microsatellite type (จากโปรแกรม Structure)
1	LP08	NAN05	S1
2	MD45P21-3	CM04	S3
3	MMC48P21-1	LPN14	S5

เชื้อทุกตัวได้นำมาทดสอบการเกิด self-fertilization บนอาหาร cornmeal agar โดยใช้เชื้อ CBS119452 เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวก อย่างไรก็ตามมีเพียงเชื้อ CBS119452 และ MMC48P21-1 เท่านั้นที่สามารถสร้างโอโอสปอร์ลักษณะสมบูรณ์ได้ ส่วนเชื้ออื่นที่ใช้สามารถสร้างโอโอสปอร์ระยะอ่อนๆ ได้ แต่ไม่พบการสร้างโอโอสปอร์ที่สมบูรณ์ได้ เมื่อนำเชื้อมาทดสอบการผสมข้ามสายพันธุ์โดยทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเดียวกัน พบว่าเชื้อคู่อื่นๆ สร้างเพียงสายรา ไม่พบลักษณะโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแต่อย่างใด ดังนั้น ในการทดลองการผสมข้ามสายพันธุ์จึงทดลองในคู่เชื้อระหว่าง CBS119452 และ MMC48P21-1 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองบนอาหาร cornmeal บนจานอาหารเดียวกัน แต่เลี้ยงเชื้อไว้ตรงข้ามกัน เพื่อให้เชื้อทั้งสองเจริญเพื่อมาพบกันตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตุการเกิดโอโอสปอร์ทุก ๆ 7 วัน

พบการสร้าง antheridium เป็นจำนวนมากด้านที่มีเชื้อ MMC48P21-1 และพบ young oogonia ที่ด้านของเชื้อ CBS119452 ตรงกลางพบการเกิด mating ระหว่างเชื้อทั้งสอง และมีการสร้างโอโอสปอร์กระจายอยู่ตรงกลางระหว่างเชื้อทั้งสอง ดังภาพที่ 4.9 จากการสังเกตครั้งนี้ เชื้อ CBS119452 ทำหน้าที่เสมือนเพศเมียเนื่องจากพบโอโอสปอร์กระจายอยู่ใกล้ด้านที่เป็นเชื้อ CBS1194562 ส่วนเชื้อ MMC48P21-1 น่าจะทำหน้าที่เสมือนเพศผู้เนื่องจากพบโครงสร้าง antheridium ได้บ่อยกว่า



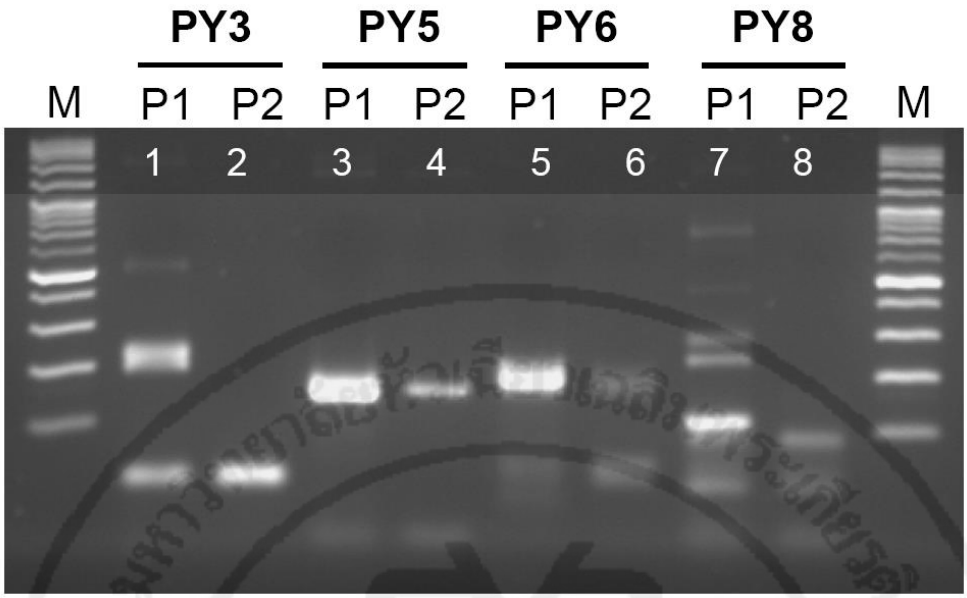
รูปที่ 4.9 แสดงโอโอสปอร์ที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 ที่เจริญอยู่ภายในอาหาร cornmeal agar กำลังขยาย 400 เท่า

6 การคัดเลือก microsatellite marker ที่จะใช้ในการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ลูกผสม

นำเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 มาตรวจ genotype ด้วย microsatellite marker 9 ชนิด ได้แก่ PY1, PY2, PY3, PY4, PY5, PY6, PY8, PY10, PY11 ด้วยเครื่อง sequencer ผลที่ได้แสดงตามตารางที่ 4.3 พบว่า microsatellite บางโลคัสไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยจีโนไทป์ได้กับเชื้อทั้งสอง หรือ ความแตกต่างของจีโนไทป์ไม่มีความชัดเจนเท่าที่ควรที่จะนำมาใช้แสดงจีโนไทป์ของเชื้อลูกผสมที่เกิดจากเชื้อพ่อแม่ดังกล่าว จึงทดสอบรูปแบบจีโนไทป์จากPCR product ที่ได้โดยตรงด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า banding pattern ของ 6 marker คือ PY1, PY3, PY4, PY5, PY6, PY8 สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้งสองได้ชัดเจน ดังรูปที่ 4.10 จึงใช้ marker ทั้ง 6 ในการตรวจพิสูจน์การผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของเชื้อจากจีโนไทป์ของเชื้อลูกผสมที่เกิดจากเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ต่อไป

ตารางที่ 4.3 แสดงจีโนไทป์ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 และ MMC48P21-1 จากวิธี microsatellite

Locus	**CBS119452**	**MMC48P21-1**
PY1	114	112
	156	124
PY2	186	182
	192	188
PY3	204	0
	212	0
PY4	215	215
	227	215
PY5	154	164
	162	166
PY6	172	176
	178	180
PY8	238	228
	238	230
PY10	189	189
	195	199
PY11	224	233
	235	233



ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างลักษณะ genotype ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัม สายพันธุ์ CBS119452 (P1) และ MMC48P21-1 (P2) โดยใช้ microsatellite marker PY3, PY5, PY6 และ PY8

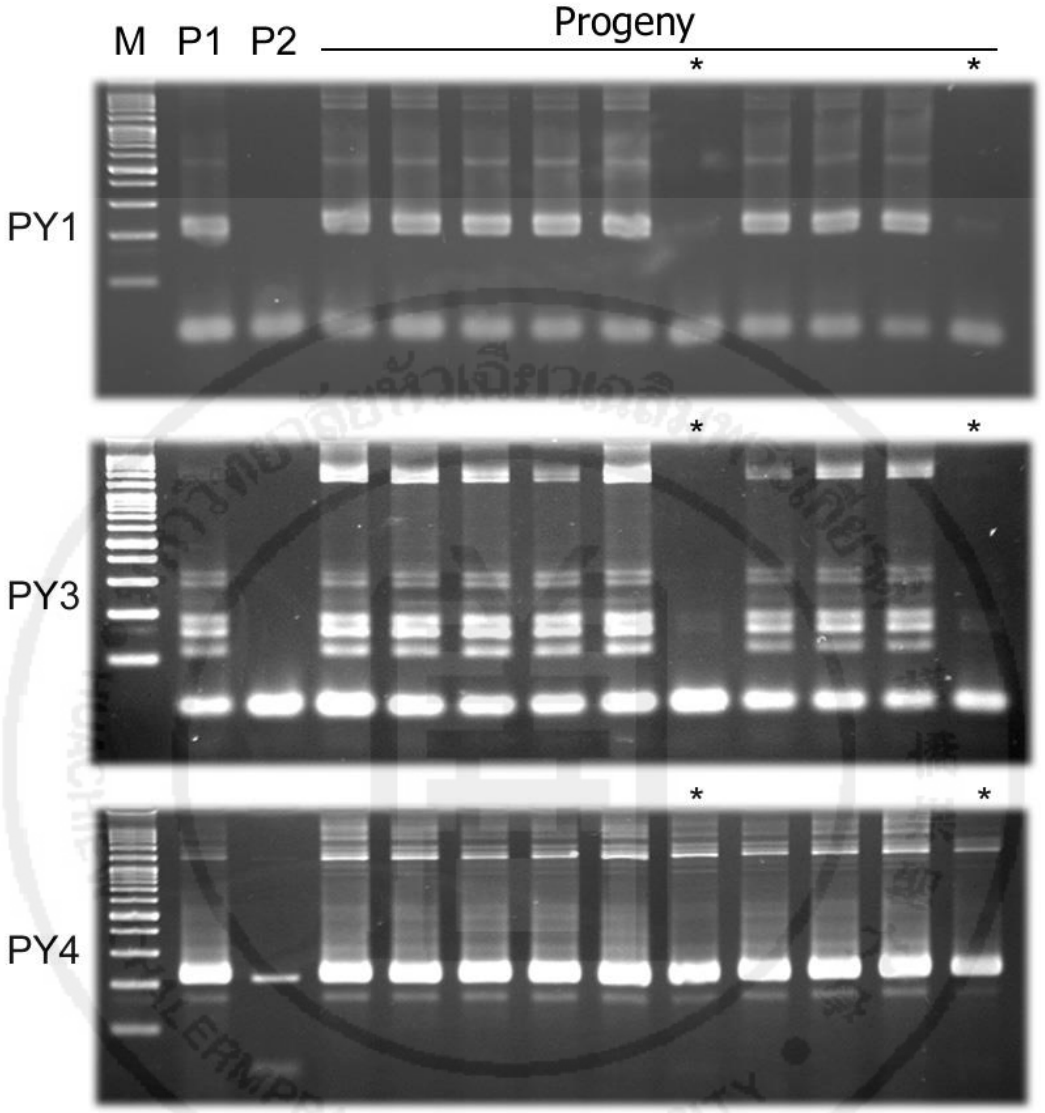
7. การตรวจพิสูจน์ลูกผสมข้ามสายพันธุ์ด้วยวิธี microsatellite typing

นำโอโอสปอร์ที่แยกได้มาทำการเลี้ยงบนอาหาร SDA จากนั้นนำเชื้อลูกผสมที่เจริญจากโอโอสปอร์ที่ได้มาทำการกระตุ้นให้ได้ซูโอสปอร์ จากนั้นนำซูโอสปอร์ที่ได้มาทำการ spread บนผิวหน้าอาหารเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวๆ ดังกล่าว เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับการตรวจพิสูจน์ genotype ของเชื้อลูกผสมโดยใช้ microsatellite marker PY1, PY3, PY4, PY5, PY6, PY8 ผลการตรวจ genotype ของเชื้อลูกผสมทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 4.11, 4.12 และตารางที่ 4.3

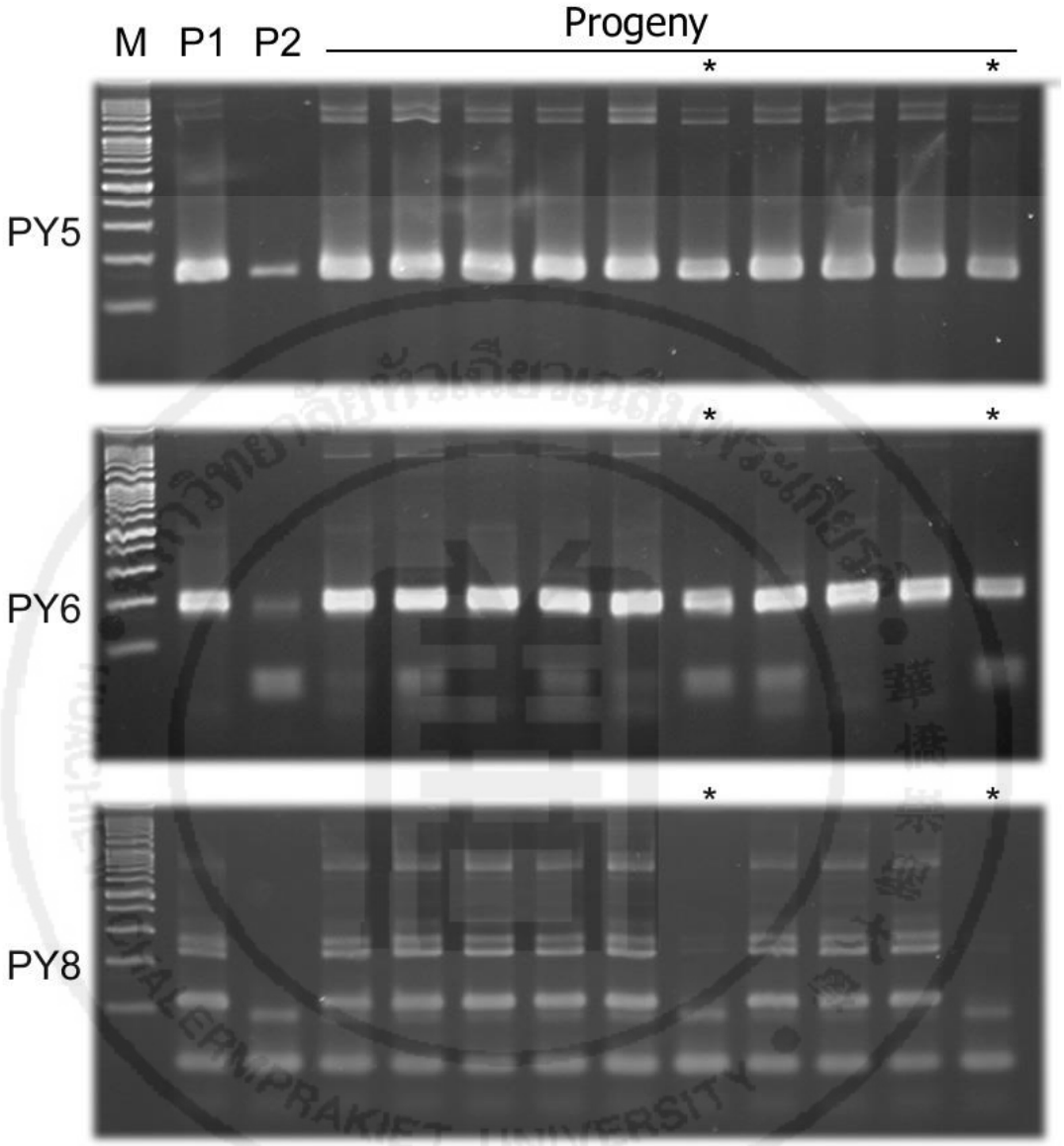
ความสามารถในการตรวจความหลากหลายระหว่างเชื้อแต่ละตัวด้วยเทคนิคทางด้าน PCR เป็นวิธีที่ช่วยในการตรวจคัดกรองหาเชื้อลูกผสมจากการเพาะเชื้อจากโอโอสปอร์ที่แยกได้จากการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ โดยการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ประโยชน์จาก band pattern ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย microsatellite marker 6 ชนิดมาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง band pattern ที่พบในเชื้อ CBS119452 (P1) ออกจาก เชื้อ MMC48P21-1 (P2) ได้ โดยการทดลองนี้ได้ตั้งชื่อ band pattern ที่ได้จากเชื้อ CBS119452 (P1) เรียกเป็น M1, M3, M4, M5, M6 และ M8 ตาม microsatellite marker ที่ใช้ PY1, PY3, PY4, PY5, PY6 และ PY8 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันกับเชื้อ CBS119452 ชื่อ band pattern ที่ได้จากเชื้อ MMC48P21-1 (P2) เรียกเป็น D1, D3, D4, D5, D6 และ D8 กรณีเป็นเชื้อลูกผสมแต่ละตัวจะสามารถวินิจฉัยจาก band pattern ของทั้งเชื้อทั้งสอง (ตารางที่ 4.4) การทดลอง

ครั้งนี้พบเชื้อรุ่นลูกที่มี band pattern คล้ายกับเชื้อ CBS119452 (P1), MMC48P21-1 (P2) และพบเชื้อลูกผสมที่มี pattern ของเชื้อทั้งสองอยู่ด้วยกันในเชื้อลูกผสมหมายเลข 2, 8 และ 12 ดังรูปที่ 4.11, 4.12 และ ตารางที่ 4.4

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



รูปที่ 4.11 การวินิจฉัยเชื้อลูกผสมเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัมด้วย marker PY1, PY3 และ PY4 PCR banding pattern ของเชื้อ homothallic 2 เชื้อ CBS119452 (lane P1), MMC48P21-1 (lane P2) และ ตัวอย่างเชื้อรุ่นลูก 10 ตัว (Progeny) ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อ (P1 x P2) โดยรูปเจลแต่ละรูปแสดง banding pattern ที่ได้จาก marker ชนิด PY1 (ด้านบน), PY3 (ด้านกลาง) และ PY4 (ด้านล่าง), lane M แสดง 100-bp ladder, band ที่อยู่ใน lane ตรงกันเป็น banding pattern ที่ได้มาจากเชื้อตัวเดียวกัน เชื้อรุ่นลูก 2 ตัวจาก 10 ตัว ที่พบ banding pattern จากทั้งของ P1 และ P2 (ระบุจากเครื่องหมาย *) เชื้อทั้งสองแสดงว่าเป็นเชื้อลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อ CBS119452 x MMC48P21-1



รูปที่ 4.12 การวินิจฉัยเชื้อลูกผสมเชื้อพิเทียม อินสิดิโอสัมด้วย marker PY5, PY6 และ PY8 PCR banding pattern ของเชื้อ homothallic 2 เชื้อ CBS119452 (lane P1), MMC48P21-1 (lane P2) และ ตัวอย่างเชื้อรุ่นลูก 10 ตัว (Progeny) ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อ (P1 x P2) โดยรูปเจลแต่ละรูปแสดง banding pattern ที่ได้จาก marker ชนิด PY5 (ด้านบน), PY6 (ด้านกลาง) และ PY8 (ด้านล่าง), lane M แสดง 100-bp ladder, band ที่อยู่ใน lane ตรงกันเป็น banding pattern ที่ได้มาจากเชื้อตัวเดียวกัน เชื้อรุ่นลูก 2 ตัวจาก 10 ตัว ที่พบ banding pattern จากทั้งของ P1 และ P2 (ระบุจากเครื่องหมาย *) เชื้อทั้งสองแสดงว่าเป็นเชื้อลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อ CBS119452 และ MMC48P21-1

ตารางที่ 4.4 การตรวจเชื้อลูกผสมจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม CBS119452 x MMC48P21-1 ด้วย microsatellite marker

Locus	PY1	PY3	PY4	PY5	PY6	PY8	Type
Parent:							
P1	M1	M3	M4	M5	M6	M8	
P2	D1	D3	D4	D5	D6	D8	
Progeny:							
F_1(P1xP2)1	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)2	M1/D1	M3	D4	M5	M6/D6	D8	hybrid
F_1 (P1xP2)3	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)4	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)5	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)6	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)7	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)8	M1/D1	M3/D3	M4	M5	M6/D6	M8/D8	hybrid
F_1 (P1xP2)9	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)10	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)11	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)12	M1/D1	M3/D3	M4	M5	M6/D6	M8/D8	hybrid
F_1 (P1xP2)13	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)14	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)15	D1	D3	D4	Neg*	D6	D8	P2
F_1 (P1xP2)16	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)17	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)18	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)19	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)20	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)21	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)22	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)23	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)24	M1	M3	M4	M5	M6/D6	M8	hybrid
F_1 (P1xP2)25	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1
F_1 (P1xP2)26	M1	M3	M4	M5	M6	M8	P1

*Neg = no PCR product amplified

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้รายงานว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในกลุ่มประชากรเดียวกัน ข้อมูลนี้ยังเป็นเพียงข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อด้วยเทคนิคทางโมเลกุล ซึ่งการที่เชื้อจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้นั้น เชื้อจะต้องมีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศต่างสายพันธุ์กัน แต่ในปัจจุบัน ยังไม่มีหลักฐานพิสูจน์ว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม มีความสามารถในการสร้างหน่วยสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือที่เรียกว่า โอโอสปอร์ การที่จะพิสูจน์ข้อมูลดังกล่าว ต้องอาศัยการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตัวเชื้อในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวสำหรับเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อที่จะใช้ในศึกษาการสืบพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้ต่อไป

จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม ในครั้งนี้ สรุปได้ว่า Potato dextrose agar เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้ เชื้อ พิเทียม อินซิดิโอซัมสร้างโอโอสปอร์ได้ดีกว่า V-8 juice liquid medium ที่ใส่น้ำมันพืชชนิดต่างๆ และอาหาร Clarified half-strength V-8 medium ที่ใส่น้ำมันชนิดต่างๆ จากการรายงานผลการทดลองเพาะเชื้อบนอาหารทั้งสามสูตร คือ V-8 juice liquid medium Clarified half-strength V-8 medium และ potato dextrose agar ในอาหาร V-8 juice liquid mediumและ Clarified half-strength V-8 medium หลังจากที่ทำการ incubate ไว้นาน 5 สัปดาห์โดยได้ทำการติดตามผลทุกๆสัปดาห์ ลักษณะที่พบมีเพียงการสร้าง สายรา และ oogonia เท่านั้นแต่ในอาหาร potato dextrose agar และ cornmeal agar หลังจากที่ทำการ incubate ไว้เพียง 1 สัปดาห์ พบการสร้าง โอโอสปอร์และเมื่อ incubate ต่อนาน 2 สัปดาห์ พบลักษณะการงอกของโอโอสปอร์ที่ได้รับการผสมแล้ว

การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ พบว่า เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเป็นเชื้อที่แยกได้จากคน แต่เชื้อที่แยกได้จากคนและสิ่งแวดล้อมอื่นๆไม่สามารถพัฒนาให้ได้โอโอสปอร์ที่สมบูรณ์ได้ จึงเลือกเชื้อ CBS119452 และ MMC48P21-1เพื่อใช้ในการทดสอบการเกิด outcrossing สรุปได้ว่า เชื้อที่สามารถจับคู่เพื่อสร้างโอโอสปอร์ได้ต้องมีความเหมาะสมกันตามธรรมชาติ จึงจะสามารถเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการผสมพันธุ์ซึ่งกันและกันได้

การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมของเชื้อรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อ CBS119452 และ MMC48P21-1 โดยใช้ microsatellite marker พบว่า จีโนไทป์ที่ได้จาก marker PY06 มีความสำคัญในการแยกเชื้อลูกผสมที่มีจีโนไทป์ทั้งของเชื้อสายพันธุ์พ่อและแม่ได้เป็นอย่างดี จากเชื้อ 26 ตัว พบเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมอยู่ 38%

อภิปรายผล

การที่ได้มีการศึกษาเชื้อในกลุ่ม Oomycetes โดยทั่วไปแล้วในเชื้อที่เป็น homothallic microorganism มักจะพบความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในกลุ่มประชากร เดียวกัน ส่วนเชื้อที่เป็น heterothallic microorganism จะมีความหลากหลายที่สูงในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Xu 2006 : 75-90) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม ที่เป็นhomothallic oomycetes นี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Supabandhu. 2009) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้หรือที่เรียกว่าเกิด outcrossing ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อเชื้อสามารถสร้างหน่วยสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ที่เรียกว่า โอโอสปอร์

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม คณะผู้วิจัยได้ใช้ V-8 juice liquid medium กระตุ้นการสร้าง โอโอสปอร์ ของเชื้อ พบว่าเชื้อไม่สามารถสร้างโอโอสปอร์ได้ แต่ที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาของ Mondal และคณะ1996 ที่ทำการศึกษาการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อฟานิเดอมาตัม ซึ่ง V-8 juice liquid medium สามารถกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ได้ในเชื้อดังกล่าว ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าถึงแม้ว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม จะเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มพิเทียมเหมือนกัน แต่เป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ V-8 juice liquid medium ไม่มีผลต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม

ในทำนองเดียวกันกับการใช้ Clarified half-strength V-8 medium ให้ผลดีในกระตุ้นการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อัลติมึม (Francis and St.Clair 1993 : 100-106) ซึ่งอย่างไรก็ตาม เชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน ดังนั้น Clarified half-strength V-8 medium จึงอาจไม่ได้มีผลกระตุ้นการสร้าง โอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมได้ดีเหมือนในพิเทียม อัลติมึม

โดยงานวิจัยในครั้งนี้เชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม สามารถสร้างโอโอสปอร์ได้บนอาหาร Potato dextrose agar และ cornmeal agar ผลการวิจัยนี้ได้ให้ผลสนับสนุน งานวิจัยของ Paul และคณะในปี 2009 และ Mendoza และคณะในปี 1993 ที่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อพิเทียม สปีชีส์และพิเทียม อินสิดิโอซัมได้ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมจึงสามารถใช้อาหาร Potato dextrose agar และ

cornmeal agar อย่างไรก็ตามกรณีใช้อาหารสำเร็จรูปควรทดสอบอาหารที่ใช้ที่ได้มาจากชุดการผลิตที่ต่างวาระกัน เนื่องจากอาหารแต่ละชุดมีผลต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อเป็นอย่างมาก จึงควรมีการทดสอบก่อนใช้เสมอ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงข้อด้อยดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้ใช้ cornmeal ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาผสมเองในห้องปฏิบัติการเพื่อลดความผันแปรของคุณภาพอาหารที่ใช้ในการทดลอง

Genetic marker ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์จีโนไทป์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม มีอยู่หลายวิธีที่ได้รับการตีพิมพ์ ได้แก่ การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Internal transcript spacer (ITS) (Supabandhu et al. 2008 : 41-52) และ cytochrome oxidase II (Kammarnjesadakul et al. 2011 : 289-295) สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น clade ต่างๆ ตามทวีปของแหล่งกำเนิดของเชื้อ นอกจากนี้วิธี RAPD และ microsatellite พบว่ามีความหลากหลายสูงเหมาะสำหรับนำมาใช้จำแนกเชื้อเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมเช่นกัน (Pannanusorn et al. 2007 : 383-391, Supabandhu. 2009) อย่างไรก็ตามการจำแนกเชื้อเพื่อตรวจพิสูจน์จีโนไทป์สำหรับเชื้อพิเทียม สปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ วิธี AFLP, RFLP และ microsatellite (Garzon. 2006 : 81-89, Francis and St. Clair. 1993 : 100-106, Vasseur et al. 2005 : 301-310) พบว่าวิธีทั้งสามสามารถจำแนกเชื้อที่มีความแตกต่างกันได้และวิธีมีความน่าเชื่อถือกว่า RAPD ซึ่งการทดลองนี้ได้เลือกใช้ microsatellite marker ในการตรวจพิสูจน์จีโนไทป์ของเชื้อพ่อแม่และเชื้อลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ ผลที่ได้แสดงอย่างชัดเจนว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมกันสามารถเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่ง microsatellite marker ที่ใช้ได้รับการพิสูจน์ในครั้งนี้ว่ามีประโยชน์ในการใช้จำแนกเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมที่เกิดขึ้นได้ จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำไปตรวจพิสูจน์เชื้อเพื่อศึกษาทางด้านประชากรศาสตร์และระบาดวิทยา

เชื้อกลุ่ม Oomycetes มีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีความหลากหลายและซับซ้อน เชื้อในจีนัสพิเทียมพบได้ทั้ง homothallic species และ heterothallic species (Van der Plaats-Niterink 1981: 1-242) ยกตัวอย่าง เชื้อที่มีกระบวนการสืบพันธุ์ที่ซับซ้อนคือ เชื้อพิเทียม ซิลวาติกัม (*P. sylvaticum*) แต่เดิมพบว่าเชื้อนี้เป็น heterothallic species แต่ทว่ามีการพบว่าเชื้อนี้บางตัวเป็น homothallic ได้เช่นกัน (Pratt and Green. 1971: 273-279) แม้ว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์มาก่อน อย่างไรก็ตาม การผสมข้ามสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่ม homothallic speices พบได้ในเชื้อ *Phytophthora sojae* (Förster et al. 1994 : 780-91), *P. ultimum* (Francis and St Clair. 1993 : 100-106) และพิเทียม เอรริกูลาเร (*P. irregulare*) ในห้องปฏิบัติการ (Barr et al. 1997 : 2073-2081) และ ในธรรมชาติ (Harvey et al. 2001 : 619-627) Francis และ St. Clair ได้รายงานว่าเชื้อพิเทียม อัลติมัม สร้างโอโอสปอร์ลูกผสมที่ 20% จากการ

ผสมพันธุ์เชื้อในห้องปฏิบัติการ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมสร้างโอโอสปอร์ลูกผสมอยู่ที่ 38% อย่างไรก็ตามเชื้อที่จะสามารถเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์จำเป็นที่จะต้องมีความจำเพาะและเหมาะสมซึ่งกันและกัน

การเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ของเชื้อพิเทียมในธรรมชาติหรือในพื้นที่การเกษตรน่าจะเกิดผลกระทบที่สำคัญต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อทั้งในแง่ประชากรศาสตร์และพันธุกรรมของเชื้อแต่ละตัว ในเชื้อก่อโรคพืชกลุ่ม Oomycete เช่น *Phytophthora infestans* ในกลุ่มประชากรที่มีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสังเกตพบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มากกว่ากลุ่มประชากรที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และ พบว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรคที่มากขึ้นของเชื้อดังกล่าว (Tooley et al. 1985 : 431-35) จากการศึกษาของ Harvey ได้ให้ข้อสังเกตที่ว่าการที่เชื้อกลุ่ม homothallic สามารถเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพิเทียมเอรริกูลาเร อย่างไรก็ตามเชื้อในธรรมชาติที่พบยังมีอัตราการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ต่ำเนื่องจากต้องอาศัยการติดเชื้อร่วมกันในรากพืชเดียวกัน โดยเชื้อต้องมีจีโนไทป์ต่างกัน (Harvey et al. 2001 : 619-627) อย่างไรก็ตาม ผลต่อเนื่องที่เกิดขึ้นจากการเกิด sexual recombination จากเชื้อที่มีจีโนไทป์ต่างกันมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการทำให้เกิดความหลากหลายของเชื้อในสปีชีส์เดียวกันและกรณีของโรคพืช การที่เชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจะส่งผลต่อการพยากรณ์ระยะเวลาที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช อาจจะทำให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคมากขึ้น หรือ ดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ในการรักษาโรคพืชได้ (Gavino et al. 2000 : 731-735)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของวงจรชีวิตของเชื้อในกลุ่ม Oomycetes ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอตที่มีความคล้ายเชื้อรา เชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้พบได้ทั้งเชื้อที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติและเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญต่างๆไม่ว่าจะเป็นทั้งโรคพืชและสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัมที่เป็นเชื้อพิเทียมสปีชีส์เดียวที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เชื้อกลุ่ม Oomycetes จะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างสปอร์ที่มีผนังหนาเรียกว่าโอโอสปอร์อาจทำหน้าที่สำคัญในการช่วยให้เชื้อสามารถก่อโรคได้ โดยโอโอสปอร์สามารถที่จะอยู่ในดินหรือเศษซากพืชได้เป็นระยะเวลาหลายปี มีความทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เช่น ความเย็น การถูกทำลายด้วยเชื้ออื่นๆ หรือ จากยารักษาโรคพืชต่างๆ ได้ โอโอสปอร์มีความสำคัญสำหรับเชื้อที่ก่อโรคพืช เนื่องจากสายราและสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศไม่สามารถที่จะมีชีวิตรอดในระยะยาวได้โดยปราศจากพืชที่เป็นที่อาศัยของเชื้อ ในระบบของพืช โอโอสปอร์จะงอกเมื่อเริ่มฤดูกาลเพาะปลูก ซึ่งเป็นการเริ่มการระบาดของเชื้อเช่นกัน (Grunwald และ Flier 2005) ซึ่งการติดเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัมในคนมักพบภายหลังช่วงฤดูกาลทำการเกษตร ผู้ป่วย

บางรายติดเชื้อจากน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ผิวหนังที่มีบาดแผล ในบางกรณีติดจากใบพืชที่ปนเปื้อนเชื้อบาดทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกาย ในสัตว์โดยเฉพาะในสุนัขบางรายไม่มีประวัติสัมผัสกับแหล่งน้ำขัง แต่มีประวัติสัมผัสกับดิน (Krajaejun et al. 2006 : 569-576 ; Krajaejun et al. 2004 : 370-372 ; Dyskstra et al. 1999 : 427-433 ; Fischer et al. 1994 : 380-382) จึงเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยสามารถติดเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะอื่นๆ เช่น โอโอสปอร์ นอกเหนือจากซูโอสปอร์ที่อาศัยอยู่ในน้ำได้ ที่ได้รับการสันนิษฐานแต่เดิมว่าเป็นระยะ infective stage ของเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัม ดังนั้น จากการที่เชื้อสามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้โดยผสมพันธุ์ภายในเชื้อตัวเดียวกัน และมีความสามารถผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ได้ ส่งผลทำให้เกิดความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของเชื้อที่เกิดจากกระบวนการ genetic recombination ทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางจีโนไทป์ของเชื้อกับความรุนแรงของการก่อโรค และการศึกษาทางด้านประชากรศาสตร์ของเชื้อดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจควรค่าแก่การศึกษาต่อไป

การทำงานวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเชื้อพิเทียมอินสิดิโอซัม และทราบสภาวะที่เหมาะสมในสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมแล้ว ข้อมูลนี้ยังสามารถเก็บไว้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป และยังช่วยสนับสนุนสมมติฐานว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบข้ามสายพันธุ์ได้

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทำงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมแล้ว จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ มีระบุไว้ว่านอกจาก อาหารและสภาวะที่เหมาะสมจะเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้างโอโอสปอร์แล้ว ยังมีปัจจัยในด้านอื่นที่มีความจำเป็นและสำคัญต่อการสร้างโอโอสปอร์ ดังนี้

1. อุณหภูมิ จากการศึกษางานวิจัยของ Kleb และคณะ ในปี 1900 ในแนวคิดที่ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อน่าจะเกิดมาจากระบบการสืบพันธุ์ของเชื้อ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงการสร้างหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อ *Saprolegnia mixta* และได้มีรายงานว่า ในการสร้าง sporangium ของเชื้อ *Saprolegnia mixta* มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 24-28 องศาเซลเซียส การสร้าง oogonia forming อุณหภูมิที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 26-27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง Sexual reproduction อยู่ในช่วง 21-23 องศาเซลเซียส

2. แสงสว่าง ในงานวิจัยของ Turner และคณะ ในปี 1965 ได้ทำการศึกษาถึงพฤติกรรมของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ในดิน เชื้อตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่ม oomycetes ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคในพืชเช่นปาล์ม มะพร้าว จากการศึกษางานวิจัยได้มีรายงานว่าแสงสว่างมีผลยับยั้ง การสร้าง

oospore ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* แต่ตรงกันข้ามกลับมีผลกระตุ้นการการงอกของ oospore ที่ได้รับการผสมแล้ว

3. ความหนาของ media จากการทำวิจัยครั้งนี้ จากการที่คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบสูตรอาหารเพื่อทำการหาอาหาร และสภาวะที่หมาะสมในการสร้างโอโอสปอร์ ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม พบว่า mediaที่ใช้ในการเพาะเชื้อ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัม จากการสังเกต พบว่าลักษณะ media ที่มีความหนามากกว่าจะใช้เวลา incubate เพื่อให้เชื้อสร้างโอโอสปอร์ นานกว่า ลักษณะ media ที่มีความหนาน้อยกว่า

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป การทดลองการผสมข้ามสายพันธุ์ในครั้งนี้มีอุปสรรคด้านการเลือกเชื้อคู่ที่เหมาะสมที่สามารถเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ ดังนั้นการตรวจเบื้องต้นสำหรับความสามารถในการสร้างโอโอสปอร์ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ควรทำให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามสภาวะในธรรมชาติกับการจำลองในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างกันโดยเฉพาะปัจจัยแวดล้อมทั้งสารอาหารและปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อยังไม่มีการศึกษาอีกมาก นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ของการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้นนี้ ส่งผลต่อความรุนแรงของการก่อโรคหรือไม่ก่อโรคของเชื้อพิเทียม อินสิดิโอซัมควรได้รับการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

Campbell WA and Hendrix FF. (1967) "A new heterothallic *Pythium* from southern United States" **Mycologia**. 59 : page 274-278.

Campbell WA and Hendrix FF. (1968) "A new heterothallic *Pythium* from southern United States and Canada" **Mycologia**. 60 : page 802-5.

de Cock AW, et al. (1987) "*Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis" **J Clin Microbiol.** 25 : page 344-349.

Dykstra MJ, et al. (1999) "A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs" **Med Mycol.** 37 : page 427-433.

Förster H, Tyler BM, and Coffey MD. (1994) "Phytophthora sojae races have arisen by clonal evolution and rare outcrosses" **Mol Plant Microbe In.** 7 : page 780-91.

Francis DM and St.Clair DA. (1993) "Outcrossing in the homothallic oomycete, *Pythium ultimum* detected with molecular markers" **Current Genetics.** 24 : page 100-6.

Gallindo J and Gallegly ME. (1960) "The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*" **Phytopathology.** 50 : page 123-28.

Gavino PD, et al. (2000) "Implications of sexual reproduction for Phytophthora infestans in the United States: generation of an aggressive lineage" **Plant Dis.** 84 : page 731–735.

Grunwald NJ and Flier WG. (2005) "The biology of Phytophthora infestans at its center of origin" **Ann. Rev. Phytopathol.** 43 : page 171–190.

Kammarnjesadakul P, et al. (2011) "Phylogenetic analysis of Pythium insidiosum Thai strains using cytochrome oxidase II (COXII) DNA coding sequences and Internal Transcribed spacer region (ITS)". **Med Mycol**. 49 : page 289-295.

Klebs G. (1899) "Zur physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze.II. Saprolegnia mixta de Bary" **Jahr. Wiss. Bot.** 33 : page 513-593.

Krajaejun T, et al. (2006) "Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand" **Clin Infect Dis**. 43 : page 569-576.

Krajaejun T, et al. (2004) "Ocular pythiosis: is it under-diagnosed?" **Am J Ophthalmol.** 137 : page 370-372.

Marques SA, et al. (2006) "*Pythium insidiosum*: report of the first case of human infection in Brazil" **An. Bras. Dermatol.** 81(5) : page 484.

Martin F. (2006) "Importance of selfing and outcrossing in the population biology of Pythium" **Phytopathology.** 96 : page S146.

Martin FN. (1989) "Maternal inheritance of mitochondrial DNA in sexual crosses of *Pythium sylvaticum*" **Curr Gent.** 16 : page 373-74.

Martin FN. (1990) "Taxonomic classification of asexual isolates of *Pythium ultimum* based on cultural characteristics and mitochondrial DNA restriction patterns" **Exp Mycol.** 14 : page 47-56.

Mendoza L. (2005) "Pythiosis" in **Medical mycology, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. W.G. Merz, R.J. Hay, eds. p.412-29. 10th ed. London : Arnold.

Mendoza L, Hernandez F and Ajello L. (1993) "Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*" **J Clin Microbiol.** 31 : page 2967-2973.

Miller RI. (1983) "Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia" **Mycopathologia.** 81 : page 23-28.

Mondal SN, Kageyama K and Hyakumachi M. (1996) "Decreased germinability and virulence of oospores of *Pythium aphanidermatum* in relation to loss of endogenous carbon during incubation on soil" **Soil Biol Biochem.** 28 : page 545-53.

Nair VDP and Kanfer I. (2008) "Sterols and sterolins in *Hypoxis hemerocallidea* (African potato)" **S Afr J Sci.** 104 : page 324.

NutritionData.com. (September 2009) FOOD SUMMARY Sitosterol (Corn oil). [Online] Available : http://nutritiondata.self.com/facts/fats-and-oils/7577/2

NutritionData.com. (September 2009) FOOD SUMMARY Sitosterol (Sesame). [Online] Available : http://nutritiondata.self.com/facts/fats-and-oils/511/2

NutritionData.com. (September 2009) FOOD SUMMARY Sitosterol (Rice bran). [Online] Available : http://nutritiondata.self.com/facts/fats-and-oils/504/2

Pannanusorn S, et al. (2007) "Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand" **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** page 383-91.

Paul B. (1999) "Some species of Pythium isolated from cultivated soils in northern France" **Cryptogam.-Mycol.** 15 : page 263–271.

Phillips KM, et al. (2002) "Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats" **J. Food Compos. Anal.** 15 : page 123.

Prakob W and Judelson HS. (2007) "Gene expression during oosporogenesis in heterothallic and homothallic *Phytophthora*" **Fungal Genet Biol.** 44 : page 726-739.

Pratt RG and Green RJ. (1971) "The taxonomy and heterothallism of *Pythium sylvaticum*" **Can J Bot.** 49 : page 273-79.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P. (2000) "Inference of population structure using multilocus genotype data" **Genetics.** 155 : page 945-959.

Raper JA. (1960) "The control of sex in fungi" **Am J Bot.** 47 : page 794-808.

Ravishankar JP and Davis CM. (2001) "Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*" **Fungal Genet Biol.** 34 : page 690-692.

Schurko AM, et al. (2003) "A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*" **Mycol Res.** 107 : page 537-44.

Schurko AM, et al. (2003) "Evidence for geographic clusters : molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored" **Mycologia.** 95 : page 200-08.

Supabandhu J, et al. (2008) "Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas" **Med Mycol.** 46 : page 41-52.

Supabandhu J, Fisher MC and Vanittanakom N. (2007) "Polymorphic microsatellite markers for the human oomycete pathogen *Pythium insidiosum*" **Mol Ecol Notes.** 7 : page 1088-90.

Supabandhu Jidapa. (2009) **Genotypic and phenotypic relationships of *Pythium insidiosum* isolated from patients and environments.** Ph.D. Thesis. (Department of Microbiology) Chiang Mai : Chiang Mai University.

Tooley PW, Fry WE and Villarreal Gonzalez MJ. (1985) "Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations" **J Hered.** 76 : page 431-35.

Turner, PD. (1965) "Behavior of *Phytophthora palmivora* in soil" **Plant Dis.** 49 : page 135-137.

Van der Plassts-Niterink AJ. (1981) "Monograph of the genus *Pythium*" **Studies in Mycol.** 21 : page 1-242.

Xu J. (2006) "Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses" **Curr Issues Mol Biol**. 8 : page 75-90

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร. พัชรี กัมมารเจษฎากุล

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ด. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร. จิดาภา เซคเคย์

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)

วท.ด. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

Dr.rer.nat. (Microbiology) Eberhard-Karls-University, Tuebingen, Germany

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-945339