

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดโรคกับพืชอาศัย และ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง
ของแตงกวาในภาคเหนือของประเทศไทย

A STUDY ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS,
PATHOGENICITY AND GENETIC DIVERSITY OF
CUCUMBER DOWNY MILDEW (*Pseudoperonospora cubensis*)
IN NORTHERN THAILAND



สุชีรา ชานีคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการบริหารศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดโรคกับพืชอาศัย และ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างของ
แตงกวาในภาคเหนือของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) A Study on Morphological Characteristics, Pathogenicity and
Genetic Diversity of Cucumber Downy Mildew
(*Pseudoperonospora cubensis*) in Northern Thailand

ชื่อ - นามสกุล

นางสาวสุชีรา ธานีคำ

สาขาวิชา

การบริหารศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวดี เจริญวัฒนะ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์

ปีการศึกษา

2554

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. जानุรักษ์ ขนบดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวดี เจริญวัฒนะ)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

..... คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำนวย ศิลวัตร)

วันที่ 9 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดโรคกับพืชอาศัย และ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง
ของแตงกวาในภาคเหนือของประเทศไทย



สุชีรา ธานีคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการบริหารศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดโรคกับพืชอาศัย และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างของแตงกวาในภาคเหนือของประเทศไทย
ชื่อ – นามสกุล	นางสาว สุชีรา ธานีคำ
สาขาวิชา	การบริหารศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวดี เจริญวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

โรคราน้ำค้างในแตงกวามีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) Rostovzev. เป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในแหล่งผลิตแตงกวาในทุกภาคของประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (2) จำแนกเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง (3) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ

เชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้างที่ใช้ในการวิจัยได้จากการเก็บรวบรวมจากแปลงปลูกแตงกวาที่พบมีการเข้าทำลายของเชื้อตามธรรมชาติในจังหวัดลำปาง ลำพูน และ เชียงใหม่ ช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2551-2552 จำนวน 11 ไอโซเลท เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากรูปร่าง และวัดขนาดของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จำแนกเชื้อจากการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคในชุดพืชอาศัย จำนวน 10 ชนิด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ผลการวิจัยพบว่าก้านชูสปอร์แรงเจียมของเชื้อมีความยาวระหว่าง 255.3 -323.9 μm และมีฐานโป่งออก ขนาดเฉลี่ยของสปอร์แรงเจียมคือ 25.8-31.9 x 16.9-20.1 μm รูปร่างแบบรูปรี รูปไข่ หัวกลับ และรูปไข่ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม การทดสอบเชื้อราบนชุดพืชอาศัยพบว่าเชื้อทั้งหมดถูกจำแนกเป็นพาโทไทป์ที่ 3 และสามารถเข้าทำลายแตงกวา แตงกวาดอง และแตงไทยได้ แต่ไม่สามารถเข้าทำลายฟักทอง น้ำเต้า และบวบ ผลวิจัยยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่ม 1 และกลุ่ม 3

คำสำคัญ: เชื้อราน้ำค้าง โรคราน้ำค้างแตงกวา การจำแนกเชื้อ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Thesis Title: A Study on Morphological Characteristics, Pathogenicity and Genetic Diversity of Cucumber Downy Mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in Northern Thailand

Name – Surname: Miss Sucheera Thaneekam

Program: Sustainable Pest Management

Thesis Advisor: Assistant Professor Dr. Piyavadee Charoenwattana

Thesis Co-advisor: Associate Professor Dr. Prasert Wongwathanarat

Academic Year: 2011

ABSTRACT

Cucumber downy mildew, caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) Rostovzev., is one of the most economically important cucumber diseases in the cultivated regions in Thailand. The objectives of this research included: (1) to study the morphology of cucumber downy mildew, (2) to identify the pathotype of fungal isolates, and (3) to categorise the genetic diversity of the isolates.

Eleven isolates of *P. cubensis* from natural infection in cucumber were collected from three northern provinces (Lampang, Lamphun and Chiangmai) during 2008-2009 and examined as follows. Through a light microscope, the morphology of fungal isolates were examined and measured. Interactions between the ten differential hosts to downy mildew were examined to identify pathotypes of the isolates. Finally, DNA markers were used to determine their genetic diversity.

The study found that the length of sporangiophore ranged between 255.3 and 323.9 μm with bulbous base and the average size of a sporangium was 25.8-31.9 x 16.9-20.1 μm . Their colors ranged from pale brown to dark brown with ellipsoidal, obovoid and ovoid shapes. The isolates were pathogenically tested and classified as Pathotype 3. Further, the isolates could infect cucumber muskmelon, oriental pickling melon and pickling melon (*Cucumis sativus*, *C. melo* var. *reticulatus*, *C. melo* var. *conomon* and *C. melo* var. *acidulus*) but not watermelon (*Citrullus lanatus*), squash and pumpkin (*Cucurbita* spp.). Finally, the isolates' genetic diversity clustered in two groups: 1 and 3.

Keywords: *Pseudoperonospora cubensis*, cucumber downy mildew, pathotype, genetic diversity

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตากรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำนวย ศิลวัตร คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวดี เจริญวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และให้คำแนะนำในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จานุลักษณ์ ขนบดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพพง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนการศึกษาระดับปริญญาโท และทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาว กาญจนา เกตุอินทร์ ผู้ช่วยนักวิจัย และ นางสาว ธนียา เอกธรรมกุล นักศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณพี่และเพื่อนนักศึกษาระดับปริญญาโท บุคลากรบัณฑิตวิทยาลัย และทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือตลอดช่วงเวลาของการศึกษาและการทำวิจัย

คุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเพื่อบูชาพระคุณบิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุชีรา ธานีคำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โรคราน้ำค้างของแตงกวา	4
2.2 การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างของแตงกวา	10
2.3 ปฏิกริยาระหว่างเชื้อ <i>Pseudoperonospora cubensis</i> กับพืชอาศัย	13
2.4 ความต้านทานของพืช	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 การเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างของแตงกวา	16
3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> สาเหตุของโรคราน้ำค้างของแตงกวา	16
3.3 การจำแนกสายพันธุ์ของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> โดยการทดสอบกับ พืชอาศัย	17
3.4 การศึกษาความหลากหลายของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> โดยการ เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>COX2</i> และการใช้เครื่องหมายไมโครแซท- เทลไลท์	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	24
	4.1 การเก็บตัวอย่างและการศึกษาลักษณะอาการ โรคราน้ำค้างของแตงกวา	24
	4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของวิทยาของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	31
	4.3 การจำแนกรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> โดยความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย	37
	4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	43
5	สรุปผลการวิจัย	51
	บรรณานุกรม	52
	ภาคผนวก	57
	ประวัติผู้เขียน	79



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชอาศัยวงศ์แตงกับพาโทไทป์ของรา <i>P. cubensis</i>	11
2	ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนของพืชและเชื้อ และแบบการตอบสนองของโรคในระบบพืชอาศัย-เชื้อสาเหตุตามสมมุติฐานยีน-ต่อ-ยีน สำหรับหนึ่งยีน	14
3	ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>COX2</i> และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์	22
4	รอบการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน cytochrome c oxidase subunit II (<i>COX2</i>)	22
5	ไพรเมอร์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของรา <i>Fusarium</i> จำนวน 9 คู่	23
6	เชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างในพืชวงศ์แตงที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดในภาคเหนือ ...	26
7	ลักษณะและขนาดของก้านสปอร์แรงเจียมของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> ไอโซเลตต่างๆ	35
8	ข้อมูลขนาด รูปร่าง และสีของสปอร์แรงเจียมของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> ไอโซเลตต่างๆ	36
9	ปฏิกิริยาการเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชอาศัย เมื่อทดสอบกับเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตจากภาคเหนือ	38
ตารางผนวกที่		
1	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตที่ 1	68
2	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตที่ 3	69
3	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตที่ 4	70
4	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตที่ 5	71
5	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลตที่ 8	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
6	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 9	73
7	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 10	74
8	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 11	75
9	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 12	76
10	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 13	77
11	การเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้าง ไอโซเลทที่ 14	78



สารบัญภาพ

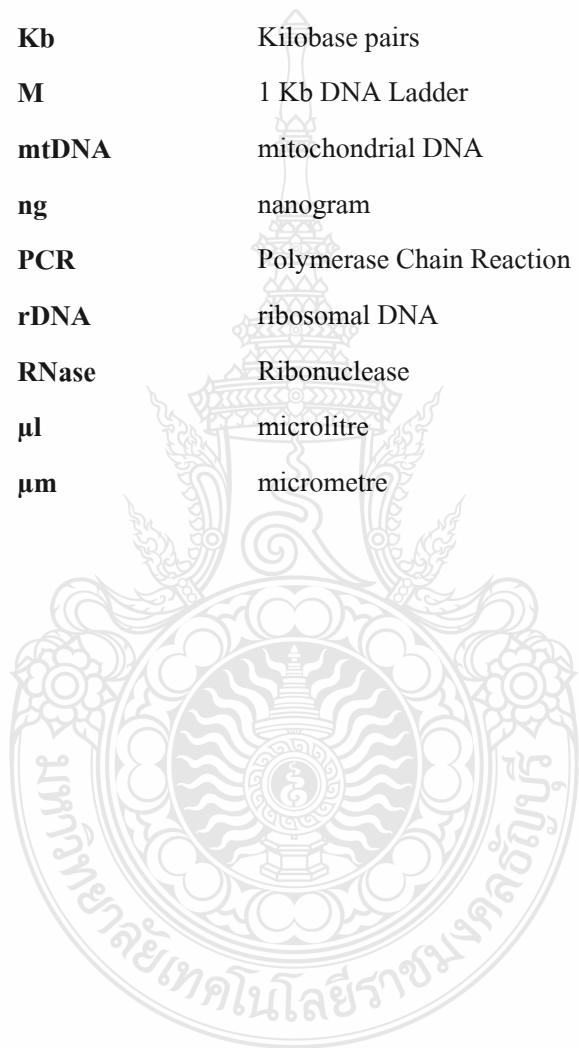
ภาพที่		หน้า
1	ระดับการเกิดโรคราน้ำค้างบนใบเลี้ยงของแตงกวา	18
2	ระดับการสร้างสปอร์ของราน้ำค้าง	19
3	ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างบนใบแตงกวา	27
4	ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทลำปาง	28
5	ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทลำพูน	29
6	ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทเชียงใหม่	30
7	ลักษณะรูปร่างของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	33
8	ลักษณะสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียมของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	34
9	ลักษณะการเกิดโรคในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้างไอโซเลทจากจังหวัดลำพูน เป็นเวลา 7 วัน	39
10	แถบดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน <i>COX2</i>	45
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB2	45
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB5	46
13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB9	46
14	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB10	47
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB11	47

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB13	48
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB14	48
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB17	49
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB18	49
20	แผนภูมิประชากรพันธุศาสตร์ของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i> จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 48 ตัวอย่าง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MB2-MB18 รวม 9 คู่	50
ภาพผนวกที่		
1	โครงสร้างของก้านชูสปอร์แรงเจียมแบบต่างๆ ของรา <i>Pseudoperonospora</i> spp.	59
2	รูปแบบการแตกแขนงของก้านชูสปอร์	60
3	รูปร่างสปอร์แรงเจียมของรา <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

COX2	Cytochrome c oxidase subunit II
iso	isolate
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilobase pairs
M	1 Kb DNA Ladder
mtDNA	mitochondrial DNA
ng	nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	ribosomal DNA
RNase	Ribonuclease
μl	microlitre
μm	micrometre



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แตงกวาเป็นพืชที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในทุกภาคของประเทศไทย แตงกวาเป็นพืชหนึ่งที่สามารถทำรายได้ได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น มีอายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น โดยใช้เวลาเพียง 30-45 วันสำหรับ ในแง่ของผู้บริโภคแล้ว แตงกวาสามารถนำไปปรุงอาหารได้มากมายหลายชนิด เช่น การนำไปแกงจืด ผัด จิ้ม น้ำพริก หรืออาจแปรรูปเป็นแตงกวาดอง (วิโรจน์ และ โสภภาพัฒน์, 2548) แตงกวายังสามารถนำไปใช้ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับความงามได้ เช่น ครีมล้างหน้า ครีมทาผิว เพื่อช่วยให้ผิวไม่หยาบกร้าน และช่วยสมานผิว เพราะแตงกวามีสารอาหารที่มีประโยชน์ ได้แก่ วิตามินซี กรดคาเฟอิก ซิลิกา โพแทสเซียม โมลิบดีนัม แมงกานีส และแมกนีเซียม (สุชาติพ, 2551)

ธุรกิจเมล็ดพันธุ์พืชถือเป็นปัจจัยการผลิตสำคัญที่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิต แม้ว่าในปัจจุบันไทยจะไม่ติดอันดับ 1 ใน 10 ของประเทศผู้ส่งออกเมล็ดพันธุ์ของโลก เนื่องจากมูลค่าเมล็ดพันธุ์ในตลาดโลกร้อยละ 68 นั้นครอบครองโดยเนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา เยอรมนี ฝรั่งเศส และแคนาดา แต่การส่งออกเมล็ดพันธุ์ของไทยนั้นอยู่ในอันดับที่ 18 ของโลก ซึ่งยังคงเป็นรองจีนที่อยู่ในอันดับที่ 14 เมื่อพิจารณาแยกประเภทของเมล็ดพันธุ์พบว่า ในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ผักซึ่งเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีมูลค่าการค้ามากที่สุดนั้น จีนอยู่ลำดับที่ 9 และไทยอยู่ลำดับที่ 11 (พีอาร์เนตเวิร์ค, 2553) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรได้รายงานปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ในปี 2547-2552 พบว่าปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวา มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกๆปี แตงกวามีมูลค่าการส่งออกในปี 2552 จำนวน 234.33 ล้านบาท ฉะนั้นการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาจึงเป็นธุรกิจที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของประเทศไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

แตงกวามีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศอินเดีย แตงกวาเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ศตวรรษที่ 6 ซึ่งไทยเป็นทางผ่านที่จะไปสู่ภาคใต้ของประเทศจีน (วิโรจน์ และ โสภภาพัฒน์, 2548) แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae สกุล *Cucumis* ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แตงกวาอยู่ในกลุ่มไม้เนื้ออ่อน อวบน้ำ เป็นพืชฤดูเดียว มีจำนวนโครโมโซม $2n=14$ ลำต้นแตกกิ่ง โดยแต่ละกิ่งจะมีตาข้างซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญสำหรับกิ่งและผลใหม่ แต่ละข้อจะมีใบเดี่ยวสลับกัน ขอบใบหยักมีห้าเหลี่ยม แตงกวาจะมีดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกัน แต่อยู่บนต้นเดียวกัน ผลมีรูปร่างกลมยาวหรือเป็น

เหลี่ยม ขนาด รูปร่าง สี ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (นิพนธ์, 2550) การปลูกแตงกวามี 2 แบบ คือ ปลูกโดยใช้ค้ำหรือปลูกโดยไม่ใช้ค้ำก็ได้ ตามแต่สภาพพื้นที่และความสะดวกของผู้ปลูก การปลูกโดยใช้ค้ำจะช่วยพยุงลำต้น ทำให้การดูแลรักษาง่ายขึ้น แต่จะเสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย แตงกวาสามารถขึ้นได้ดีในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนปนทราย มีความชื้นพอเหมาะ มีการระบายน้ำได้ดี เพราะถ้าน้ำขังและจะทำให้เกิดโรคทางดินได้ง่าย แตงกวาเป็นพืชที่ชอบน้ำและความชื้นพอประมาณ ระยะแรกควรให้น้ำอย่างสม่ำเสมอและเพียงพอ เมื่อแตงกวามีอายุ 30-40 วัน หลังจากหยอดเมล็ดก็สามารถเก็บเกี่ยวได้ (วรารักษ์, 2548) โรคที่สำคัญของแตงกวา ได้แก่ โรคราน้ำค้ำ โรคใบด่าง โรคผลเน่า และโรคราแป้ง เป็นต้น การป้องกันกำจัดขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดของโรค โรคราน้ำค้ำป้องกันกำจัดโดยคลุกเมล็ดแตงกวาด้วยสารเคมีเอพرونหรืออริโดมิลเอ็มแซดก่อนปลูก หรือจะนำเมล็ดมาแช่สารเคมีที่ละลายน้ำเจือจางเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โรคใบด่างป้องกันโดยเลือกแหล่งปลูกที่ปลอดจากเชื้อไวรัส อาจทำได้โดยเลือกแหล่งปลูกที่ไม่เคยปลูกผักตระกูลแตงมาก่อนและทำความสะอาดแปลงปลูกพร้อมทั้งบริเวณใกล้เคียงให้สะอาดไม่ให้เป็นที่อาศัยของเชื้อและแมลงพาหะ โรคผลเน่าป้องกันกำจัดโดยทำลายผลที่เป็นโรค อย่าให้ผลสัมผัสดิน ป้องกันไม่ให้ผลเกิดบาดแผล โรคราแป้งป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี เช่น เบนเลท เดอโรซาล Diametan หรือ Sumilex ฉีดพ่นเมื่อพบการระบาด (วิโรจน์ และ โสกาพันธ์, 2548)

โรคราน้ำค้ำมีสาเหตุมาจากรา *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A.Curtis) Rostovzev. เป็นโรคที่มีความสำคัญมากในแตงกวาและพืชวงศ์แตง มีการระบาดในทั่วทุกภาคของประเทศไทย การระบาดของโรคจะรุนแรงทั้งในฤดูฝนและฤดูหนาว ในกรณีที่ระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตของแตงกวาลดลง แตงติดผลน้อย และมีคุณภาพต่ำ ดังนั้นโรคราน้ำค้ำจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาเพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกแตงกวาในรูปของเมล็ดพันธุ์เป็นส่วนใหญ่ หากไม่มีการป้องกันและควบคุมโรคที่ดีและมีประสิทธิภาพแล้ว ก็จะก่อให้เกิดความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการส่งออกเมล็ดพันธุ์เป็นอย่างมาก

เนื่องจากราน้ำค้ำสามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้หลายชนิด จึงเป็นผลให้พืชวงศ์แตงบางชนิดแสดงอาการด้านทานหรืออาการอ่อนแอต่อเชื้อได้แตกต่างกันไป ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้ำที่ปรากฏออกมาแตกต่างกันบนพืชวงศ์แตงชนิดต่างกัน จึงทำให้สันนิษฐานได้ว่าราน้ำค้ำน่าจะมีความแตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ ดังนั้นในการจำแนกราน้ำค้ำจำเป็นต้องอาศัยทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดโรคกับพืชอาศัยที่เป็นพืชทดสอบ และข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ ตลอดจนการแยกเชื้อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เพื่อเก็บรวบรวมเป็นแหล่งพันธุกรรมของราสาเหตุของโรคราน้ำค้ำ

จากพื้นที่ปลูกแตงกวาในภาคเหนือต่อไป จากการศึกษาครั้งนี้เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการควบคุมโรคที่ดีที่สุด การที่จะสร้างพันธุ์ต้านทานนั้น ข้อมูลของโรคราน้ำค้าง และสายพันธุ์ของเชื้อราน้ำค้างเป็นข้อมูลที่สำคัญ สำหรับใช้ในการทดสอบระดับความต้านทานของพันธุ์แตงกวาในโครงการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงและการคัดเลือกพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างในแตงกวา
2. จำแนกสาเหตุโรคราน้ำค้างของแตงกวาตามความจำเพาะกับพืชอาศัย
3. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคราน้ำค้างของแตงกวา

โรคราน้ำค้างของแตงกวา (Cucumber Downy Mildew) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A.Curtis) Rostovzev. พบการระบาดรุนแรงทั้งในฤดูฝนและฤดูหนาว โรคนี้จะเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้ดีในสภาพแปลงเปิดหรือแปลงที่ถูกคลุมด้วยพลาสติกหรือในโรงเรือนและที่สำคัญในการเข้าทำลายแต่ละพื้นที่คือจะต้องมีสภาพอากาศอบอุ่นชื้น (Colucci, 2008) ในกรณีระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตแตงกวาลดลงมากกว่าร้อยละ 50 หากไม่มีการป้องกันและควบคุมโรคที่ดีและมีประสิทธิภาพแล้ว จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้ปลูกแตงกวาได้ (ดวงจันทร์, 2548) โรคนี้ยังทำให้แตงติดผลน้อย ผลมีขนาดเล็ก มีคุณภาพต่ำ และทำให้ความหวานลดลง (วิโรจน์และ โสภภาพิณณ์, 2548)

2.1.1 ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้าง

ลักษณะอาการของโรคจะขึ้นอยู่กับพืชอาศัยและสภาพแวดล้อมในการเกิดโรค อาการของโรคนี้จะเกิดขึ้นบนใบ ลักษณะอาการที่เด่นชัดของโรคจะเกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อเข้าไปแล้ว 4-12 วัน ลักษณะอาการที่พบคือเริ่มแรกจะพบเป็นจุดสีเขียวซีดด้านบนใบ บริเวณใต้ใบเป็นจุดจ้ำน้ำ (water-soaked) ระยะนี้อาการของโรคจะคล้ายกับอาการต่าง บริเวณที่เป็นสีเขียวซีดจะเริ่มเหลือง (Babadoost, 2001) ลักษณะเป็นแผลสีเหลืองเล็กๆ บนผิวใบ แผลแรกจะปรากฏที่ใบแก่ และค่อยปรากฏบนใบอ่อน เมื่อแผลขยายขนาดแผลจะมีสีเหลืองมากขึ้น แผลมีรูปร่างเป็นเหลี่ยมซึ่งถูกจำกัดด้วยเส้นใบ ต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเนื้อเยื่อตาย (Colucci, 2008) ขนาดของแผลเริ่มแรก จะมีขนาดประมาณ 3-10 มิลลิเมตร เมื่อโรคพัฒนาขึ้นแผลจะรวมตัวกันเป็นแผลขนาดใหญ่ขึ้นจนครอบคลุมทั้งใบ ในช่วงที่มีความชื้นสูง จะพบได้ใบตรงตำแหน่งของแผลมีเส้นใยสีขาวเกาะเป็นกลุ่ม และมีสปอร์เป็นผงสีดำ ผงสีดำที่พบคือก้านชูสปอร์และสปอร์แรงงิยิมของราสาเหตุ (Palti และ Cohen, 1980; Gunter, 2006; Lebeda และ Cohen, 2010)

ในแคนตาอูปจะพบก้านชูสปอร์บนลำต้น ก้านใบ กิ่งเลื้อย และก้านดอก เมื่อนำลำต้นมาตัดและตรวจดูจะพบเส้นใยและฮอสทอเรียม (haustorium) บริเวณคอร์เทกซ์ (cortex) ในเมล่อนและ

แดงโมแผลของโรคราน้ำค้างซึ่งเกิดบนใบ จะไม่เป็นเหลี่ยมและไม่เหลืองมากเหมือนในแดงกวาง ส่วนสควอจะพบแผลลักษณะกลมไปจนถึงแผลเหลี่ยมสีน้ำตาล เมื่อเป็นรุนแรงแผลจะถูกจำกัดด้วย เส้นใบ รอบแผลจะเป็นสีเหลืองอ่อนๆ (halo) ได้แผลมีสีน้ำตาลอ่อน ไปจนถึงสีน้ำตาลและถูกคลุมด้วย เชื้อราสาเหตุของโรค (Palti และ Cohen, 1980)

พืชที่เป็นโรคนี้จะทำให้การสังเคราะห์แสงของพืชลดลง ใบมีสีเหลืองซีด (Chlorosis) และ เซลล์แห้งตาย (necrosis) ซึ่งเกิดจากการที่คลอโรพลาสต์และคลอโรพิลล์ถูกทำลาย (ชัยวัฒน์, 2546) จากการวัดอัตราการคายน้ำของใบที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อในแดงกวางด้วยเครื่องดิจิตอลอินฟราเรดเทอร์โมกราฟฟีร่วมกับการวัดการแลกเปลี่ยนแก๊ส การเจริญเติบโตของเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเปิดปิดของปากใบในระหว่างการเกิดโรคราน้ำค้างในแดงกวางของ Lindenthal และคณะ (2005) พบว่าการเปลี่ยนแปลงการคายน้ำของใบที่ติดเชื้อขึ้นอยู่กับระยะของการเกิดโรค ใบแดงที่ถูกเชื้อ *P. cubensis* เข้าทำลายในระยะแรกมีอัตราการคายน้ำเพิ่มขึ้นมากกว่าใบปกติ ในขณะที่อุณหภูมิลดลงต่ำกว่าใบปกติ เนื่องมาจากการเปิดปิดของปากใบผิดปกติ เมื่อใบมีอาการเหลืองและเกิดแผลเซลล์แห้งตาย ใบมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งรูปแบบความแตกต่างสูงสุดของอุณหภูมิใบแดงกวางสามารถนำมาใช้ในการแยกใบที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ก่อนที่อาการโรคจะแสดงออกมาให้เห็นได้

2.1.2 เชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างของแดงกวาง

รา *Pseudoperonospora cubensis* ถูกพบครั้งแรกในตัวอย่างใบไม้แห้ง (herbarium) ของแดงกวางในประเทศคิวบา ประมาณปี ค.ศ. 1868 โดย Berkeley และในปี 1903 ถูกพบจากตัวอย่างของใบแดงกวางสดโดย Rostovzev (Palti และ Cohen, 1980; Lebeda และ Cohen, 2010) *P. cubensis* ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในอาณาจักร Straminipila (Kingdom Straminipila) ฟีลัม Oomycota (Phylum Oomycota) ชั้น Oomycetes (Class Oomycetes) อันดับ Peronosporales (Order Peronosporales) และวงศ์ Peronosporaceae (Family Peronosporaceae) (Savory และคณะ, 2011)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Pseudoperonospora cubensis จัดเป็นราที่เป็นปรสิตถาวร (obligate parasite) คือต้องอาศัยอยู่บนพืชอาศัยที่มีชีวิตเท่านั้น (Donald, 1914) ราจะสร้างเส้นใยไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกั้นตามขวาง (nonseptate) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.4 – 7.2 ไมโครเมตร (μm) เจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของใบพืชในชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) และอาจพบได้ในชั้นพาลิเสด (palisade) (Palti และ Cohen, 1980; Colucci, 2008) ราจะส่งสอสหทอเรียม (haustorium) ที่มีรูปร่างกลม (knob-like) จนถึงยาวคล้ายนิ้วมือ

(digitate) เข้าไปดูดอาหารจากเซลล์ (วิจัย, 2551) และสร้างก้านชูสปอร์แรงเจียมที่มีลักษณะคล้ายกับรา *Peronospora* sp. มาก แต่ก้านชูสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. cubensis* มีลักษณะบอบบางกว่า แดกกิ่งก้านได้น้อยกว่าและไม่แตกแบบแยกเป็นสองแฉก (dichotomous) แขนงที่แตกมีลักษณะตรง มีขนาดประมาณ 230-500 x 5-7.5 ไมโครเมตร มีสีใส ปลายของกิ่งเป็นแบบแหลม (Colucci, 2008) และก้านชูสปอร์แรงเจียมจะแตกกิ่งแบบไม่สมมาตรกันสำหรับแขนงแรกจะเป็น 1 หรือ 2 กิ่ง ตั้งแต่กิ่งที่สามขึ้นไปจะแตกกิ่งแบบแยกเป็นสองแฉก ก้านชูสปอร์แรงเจียมจะแทงออกมาจากปากใบเป็นกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 1-5 ก้าน (Palti และ Cohen, 1980) อับสปอร์หรือสปอร์แรงเจียมจะปรากฏที่ปลายสุดของ sterigma (Choi และ Shin, 2008) สปอร์แรงเจียมของรา *P. cubensis* มีลักษณะแตกต่างจากรา *Peronospora* sp. คือ มีรูปร่างรี (elliptical) หรือมีรูปร่างเหมือนมะนาว มีรูเปิด (poroid) บริเวณส่วนปลายของสปอร์แรงเจียม (papilla) มีสีอ่อนมากออกสีน้ำตาลหรือสีเทา มีขนาด (ยาวxกว้าง) ประมาณ 20-35.8 x 15-23.8 ไมโครเมตร (Colucci, 2008; Choi และ Shin, 2008) เมื่อสปอร์แรงเจียมแก่เต็มที่ จะปล่อยซุโอสปอร์ (zoospore) ออกมา สปอร์แรงเจียม 1 สปอร์ จะผลิตซุโอสปอร์ประมาณ 2-15 ซุโอสปอร์ ซุโอสปอร์มีขนาด 10-13 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็นรูปไข่และมีหาง 2 เส้น (biflagellate) โดยจะมี 1 เส้นอยู่ด้านหน้าเป็นแบบ tinsel และอีก 1 เส้นอยู่ด้านหลังเป็นแบบ whiplash (Palti และ Cohen, 1980)

2.1.3 วงจรการเกิดโรค

โรคราน้ำค้างจะเกิดในช่วงที่ใบพืชเปียกและมีความชื้นสูง การติดเชื้อครั้งแรกจะมาจากสปอร์ของรา ที่ผลิตมาจากได้ใบในสภาพที่มีอากาศชื้น สปอร์จะแพร่กระจายจากพืชสู่พืชและจากแปลงสู่แปลง (Gunter, 2006) โดยการกระเด็นของน้ำฝนหรือปลิวไปตามลม ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร แมลง หรือติดไปกับการจับหรือสัมผัสกับพืชที่เป็นโรค ในสภาพที่มีความชื้นสูงการเข้าทำลายของโรคจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อใบเปียกชื้นสปอร์แรงเจียมจะปล่อยซุโอสปอร์ออกมาแล้ว ซุโอสปอร์จะลอดหางออกและงอกเป็นเส้นใย (germ tube) แทะเข้าไปที่ใบแดง การติดเชื้อบนใบแดงจะเกิดในช่วงที่ใบเปียกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หรือ 6 ชั่วโมง 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส, 12 ชั่วโมง 10 ถึง 15 องศาเซลเซียส, และ 24 ชั่วโมง 5 ถึง 10 องศาเซลเซียส สปอร์แรงเจียมจะสร้างได้ดีในช่วงกลางวันอุณหภูมิ 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส และเวลากลางคืนอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เวลาน้อยที่สุดที่สปอร์แรงเจียมจะสร้างบนแผลประมาณ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสูงสุด 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส ในเวลา 12 ชั่วโมง จะผลิตสปอร์ได้ร้อยละ 70 เมื่อสปอร์แรงเจียมแก่ สปอร์แรงเจียมจะถูกปล่อยสู่บรรยากาศระหว่าง 6.00 น. จนถึงเที่ยงวันและจะปล่อยมากที่สุดเวลา 8.00 น. การ

เข้าทำลายของสปอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง หลังจากการกระจายสปอร์จะอยู่รอดได้นานที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสถึง 17 องศาเซลเซียส มากกว่าที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ถึง 30 องศาเซลเซียส สปอร์จะต้องได้รับความชื้นก่อนที่มันจะงอก การอยู่ข้ามฤดูของราอยู่ในรูปของโอโอสปอร์ (oospore) (Babadoost, 2001) โอโอสปอร์สร้างมาจากการรวมกันระหว่างนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเรียกว่าโอโอโกเนียม (oogonium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เรียกว่า แอนเทอริเดียม (antheridium) โอโอโกเนียมภายในมีโอโอสเฟียร์ (oosphere) หลังจากสร้างโอโอสเฟียร์แล้ว จะมีส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ปรากฏให้เห็นเป็นเพอริพลาสซึม (periplasm) อยู่รอบๆ โอโอสเฟียร์ เพอริพลาสซึม อาจจะมีส่วนช่วยเสริมสร้างผนังโอโอสปอร์ (วิจัย, 2551) โอโอโกเนียมมีรูปร่างเป็นแบบไข่หัวกลับไปจนถึงวงรีขนาด 28-56 x 24-44 ไมโครเมตร (μm) แอนเทอริเดียมมีรูปร่างเป็นแบบกระบอกจนถึงกลม มีสีใสไปจนถึงสีค่อนข้างเหลืองและมีผนังเรียบ ผนังมีขนาด 1.5-3.5 ไมโครเมตร แอนเทอริเดียมมีขนาด 22-42 ไมโครเมตร โอโอสปอร์มีสีเหลืองขนาด 13.5-19.8 ไมโครเมตร (Palti และ Cohen, 1980) และมักไม่ค่อยพบการสร้างโอโอสปอร์ (Thomas, 1996)

2.1.4 กลไกในการเกิดโรค (Mechanism of Pathogenesis)

ราสัมผัสพืชได้โดยการปลิวมาตามลมหรือติดมากับน้ำ สภาพแวดล้อมต่างๆที่มีต่อพืช เช่น การถ่ายเทอากาศและอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญของราบนผิวพืชอาศัยก่อนที่ราจะแทงผ่านเข้าสู่พืช เช่น การกระตุ้นให้ชูโอสปอร์ปล่อยออกมาจากสปอร์แรงเจียม หรือการงอกของสปอร์ ชูโอสปอร์ที่งอกออกมาจากสปอร์แรงเจียมจะเคลื่อนที่ด้วยหาง (flagella) ระยะเวลาแล้วพักอยู่กับที่และสลับหางทิ้งแล้วงอกต่อไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ นอกจากสภาพแวดล้อมแล้ว สารที่ถูกปล่อยออกมาจากพืชก็มีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่และการงอกของสปอร์ การที่สารถูกปล่อยออกมาจากพืชแล้วมีอิทธิพลต่อการชักนำชูโอสปอร์ให้มาสะสมที่บริเวณผิวพืชนั้น เรียกว่า คีโมแทกซิส (chemotaxis) ตามปกติการแทงผ่านเข้าสู่พืช (Penetration) ของราสาเหตุโรค เส้นใยหรือสปอร์จะงอกเป็นเส้นใย (germ tube) และเข้าทางช่องเปิดทางธรรมชาติหรือทางบาดแผล แต่การแทงผ่านเข้าสู่พืชของชูโอสปอร์เกิดขึ้น เริ่มจากชูโอสปอร์สลับหางออกเป็นชูโอสปอร์ที่มีถุงหุ้มอยู่ภายนอก (zoospore encystment) ช่องว่างหรือแวคิวโอ (vacuole) ภายในถุง (cyst) ขยายใหญ่ขึ้นในระหว่างการงอกออกมาเป็นเส้นใย (germ tube) เพื่อเข้าแทงสู่พืชต่อไป

การเกิดโรคติดเชื้อของพืชเกือบทั้งหมด เป็นผลของปฏิกิริยาทางชีวเคมีระหว่างสารที่เชื่อปล่อยออกมาในพืชหรือจากที่พืชสร้างขึ้น และเกี่ยวข้องกับกาเกิดโรคทั้งทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งเอนไซม์ สารพิษ สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้สำคัญ

ต่อความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรคมกหรือน้อยแตกต่างกันไป เชื้อโรคมสร้างสารเมื่อเชื้อเจริญอยู่บนพืชอาศัยและได้รับการกระตุ้นจากพืชอาศัย ปฏิกิริยาของสารต่างๆ มีดังนี้

1. เอนไซม์ย่อยสารที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเซลล์ สารอาหารต่างๆ ในเซลล์ และแทรกกระบวนการของพืชปกติ
2. สารพิษมีปฏิกิริยาโดยตรงต่อโปรโตพลาสซึม (protoplasm) และรบกวนความสามารถในการยอมให้ของเหลวผ่านเข้าออกของเซลล์
3. สารที่ควบคุมการเจริญเติบโตจะมีผลทางด้านฮอร์โมนในการเพิ่มหรือลดความสามารถของการแบ่งและเติบโตของเซลล์ (ชัยวัฒน์, 2546)

2.1.5 ขบวนการในการป้องกันโรคของพืช (Mechanisms of Plant Defense)

ในขณะที่เชื้อสาเหตุบุกกรุกเข้าสู่ต้นพืชโดยสมบูรณ์แล้ว พืชบางชนิดบางพันธุ์แสดงอาการอ่อนแอ ขณะที่พืชบางพันธุ์แสดงอาการต้านทาน ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าพืชบางพันธุ์ไม่แสดงอาการเลย และในบางครั้งพบว่าพืชบางชนิดแสดงอาการของโรคในระยะแรก แต่ต่อมากลับแสดงอาการของโรคลดลงและมีการเจริญเติบโตเกือบเป็นปกติ ทั้งๆ ที่อาการควรจะรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ หลังจากเชื้อโรคเข้าทำลายแล้ว เป็นต้น

มีรายงานว่าพืชต่างชนิดกันจะมีการป้องกันตัวเองต่างกัน และพืชแต่ละชนิดอาจมีกลไกในการป้องกัน (defense mechanism) หลายอย่าง สำหรับต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรค ปฏิกิริยาโต้ตอบของพืชที่มีต่อเชื้อโรคหนึ่งๆ อาจเกิดขึ้นแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อและสภาพแวดล้อม เช่น หากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรค พืชก็สามารถรอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อได้ ในทางตรงข้ามหากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแต่ไม่เหมาะสมต่อพืช เชื้อโรคก็จะเจริญเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว กลไกของการป้องกันตนเองของพืชมีหลายอย่าง และแต่ละอย่างจะไม่ให้ผลในการป้องกันโรคได้โดยลำพัง แต่กลไกเหล่านี้จะต้องสัมพันธ์กันด้วย ในพืชที่ต้านทานต่อโรคนั้นอาจมีกลไกหลายอย่างที่ช่วยให้เกิดความต้านทานแก่พืช อย่างไรก็ตามเชื้อโรคก็มีความสามารถในการสร้างสายพันธุ์ (strain) ใหม่ๆ ให้มีความรุนแรง (virulent) มากขึ้นกว่าเดิม เพื่อที่จะได้ต่อต้านกับขบวนการป้องกันตนเองของพืชได้ (ชัยวัฒน์, 2546)

Wenjing (1991) ได้รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ Polyphenol Oxidase (PPO), Peroxidase (PO) และ Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) ในใบแดงกวาที่ถูกเข้าทำลายด้วยรา *P.cubensis* ในธรรมชาติ พบว่าในใบที่ต้านทานต่อเชื้อใน

ระดับสูงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้น 1.5-1.6 เท่า และมีขนาดของไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) ของ PPO เกิดขึ้นใหม่ 2 ขนาด กิจกรรมของ PO เพิ่มขึ้น 3 เท่า และมีขนาดของไอโซเอนไซม์เกิดขึ้นใหม่ 2 ขนาด ส่วนกิจกรรมของ PAL เพิ่มขึ้น 0.7-0.8 เท่า หลังจากเชื้อเข้าทำลาย ในใบที่ด้านทานในระดับปานกลาง PPO เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า และมีไอโซเอนไซม์ 1 ขนาด PO เพิ่มขึ้น 3 เท่า และมีไอโซเอนไซม์ 1 ขนาด ส่วน PAL เพิ่มขึ้น 0.4 เท่า ในใบที่อ่อนแอ PPO เพิ่มขึ้น 1 เท่า ไม่มีขนาดของไอโซเอนไซม์เกิดขึ้น PO เพิ่มขึ้น 2 เท่า และได้ไอโซเอนไซม์ 1 ขนาด

Wenming (1993) ได้ศึกษาเกี่ยวกับกลไกการต้านทานของแตงกวาต่อโรคราน้ำค้าง พบว่าความต้านทานของแตงกวาต่อโรคราน้ำค้างมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความจุของคลอโรฟิลล์ ความจุน้ำตาล และกิจกรรมของคาตาเลสในใบแตงกวา นอกจากนั้นแล้วการปลูกเชื้อในระยะต้นกล้าในพันธุ์ต้านทานแสดงการเพิ่มขนาดของเอนไซม์ PAL เพิ่มขึ้น 2 ขนาด แต่ในพันธุ์ที่ไม่ต้านทานเอนไซม์ PAL เพิ่มขึ้นเพียง 1 ขนาด

2.1.6 การป้องกันกำจัด

การป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้างในแตงกวาทำได้โดย การคลุมเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชเมตาแลกซิล เอพرون หรือ ริโดมิลเอ็มแซด ก่อนปลูก ปลูกอย่าให้แน่นเกินไป และทำให้โปร่ง เพื่อลดความชื้นและทำให้อากาศถ่ายเทสะดวก เพื่อป้องกันการระบาดของเชื้อ เมื่อมีการระบาดเล็กน้อยให้เก็บใบที่เป็นโรคออกไปเผาทำลาย หากโรครุนแรงมากให้ใช้สารแคปแทน ไชเน็บ หรือมาเน็บ อัตรา 35-40 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นบริเวณใต้ใบให้ทั่วถึง และฉีดพ่นอีกครั้งห่างกันประมาณ 5-7 วัน และถ้าในช่วงนั้นมีหมอกและน้ำค้างมากควรฉีดพ่นด้วยเกลือเซดเอ็มแปดและแอนทาโคลสลับกันเพื่อป้องกันการดื้อสารเคมีของเชื้อ หรือปลูกด้วยพันธุ์ที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง (กัทลิวัลย์ และอนงค์, 2546; ลาก, 2548)

Becker และ Miller (2009) แนะนำให้ปลูกพืชที่เป็นพันธุ์ต้านทานหรือพันธุ์ที่ทนทานต่อโรคราน้ำค้างและให้เลือกพื้นที่ปลูกเป็นที่ๆ มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก มีแสงและความชื้นต่ำ ก่อนที่จะมีการกระจายของโรคควรที่จะกำจัดต้นที่เป็นโรคทิ้งเพื่อลดการแพร่กระจายต่อไป

Mackenzie (2010) แนะนำให้ฉีดพ่นสารกำจัดราให้ครอบคลุมทั้งใบและลำต้นของแตง และในการให้น้ำของแตงนั้น ให้ใช้การให้น้ำทางท่อ (soaker hose) แทนการใช้สปริงเกอร์

2.2 การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างของแตงกวา

รา *Pseudoperonospora cubensis* สามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ได้หลายชนิด ในปี 1932 Doran ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของพืชอาศัยวงศ์แตงต่อระดับความรุนแรงของโรค เขาพบว่าโรคราน้ำค้างมีความรุนแรงมากในแตงกวา รองลงมาคือ แตงไทย และแตงโม ตามลำดับ ฉะนั้นจึงได้มีการศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ ตามแหล่งปลูก โดยในปี 1980 Palti และ Cohen ได้รายงานว่าเส้นใยของเชื้อ *P. cubensis* มีขนาด 5.4-7.2 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีขนาดยาว 180-400 ไมโครเมตร กว้าง 5-7 ไมโครเมตร และสปอร์แรงเจียมมีขนาด 20-40 x 14-25 ไมโครเมตร ในปี 2008 Choi และ Shin ได้ทำการศึกษาเชื้อราน้ำค้างที่ประเทศเกาหลี พบว่าก้านชูสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. cubensis* มีขนาด 230-500 x 5-7.5 ไมโครเมตร สปอร์แรงเจียมมีขนาด 20-35.8 x 15-23.8 ไมโครเมตร ต่อมาในปี 2008 Colucci ได้รายงานว่าสปอร์แรงเจียมของเชื้อมีขนาด 20-40 x 14-25 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีขนาดยาว 180-400 ไมโครเมตร กว้าง 5-7 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 20 ไมโครเมตร ราน้ำค้างต่างสถานที่กันจะมีขนาดแตกต่างกัน แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้จากการวัดขนาดของเชื้อยังไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของราสาเหตุของโรคราน้ำค้างได้ ฉะนั้นจึงได้มีการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดโรคระหว่างพืชอาศัยที่อยู่ในวงศ์แตงและราน้ำค้าง ในปี 1986 Thomas ศึกษาความสัมพันธ์ในการเกิดโรคราน้ำค้างจากรา *P. cubensis* กับพืชอาศัย 6 ชนิด และได้จำแนกเชื้อ *P. cubensis* ออกเป็น 5 พาโทไทป์ (pathotypes) ตามความจำเพาะของเชื้อในการเข้าทำลายพืชอาศัย (ตารางที่ 1) ซึ่งพาโทไทป์ (pathotype) หรือสายพันธุ์ย่อย (Kirk และคณะ, 2001) ของรา *P. cubensis* เป็นแบบของการเกิดโรคราน้ำค้างที่ถูกกำหนดจากปฏิกิริยาการเกิดโรคราน้ำค้างที่เกิดขึ้นในพืชอาศัยวงศ์แตงอันเนื่องมาจากรา *P. cubensis*

ในปี 2003 Cohen และคณะ ได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างรา *P. cubensis* ที่เป็นสาเหตุของโรคราน้ำค้างกับพืชอาศัยวงศ์แตงในอิสราเอล ระหว่างปี 1974-2001 พบว่ารา *P. cubensis* ซึ่งทำให้เกิดโรคนบนแตงกวา เมล่อน ฟักทอง และสควอช ได้ถูกจัดไว้ในพาโทไทป์ที่ 3 บนแตงโมจัดไว้ในพาโทไทป์ที่ 6 ในปี 2008 Holmes และคณะ ศึกษาพาโทไทป์ของเชื้อ *P. cubensis* ที่ North Carolina พบว่าความสามารถในการเข้าทำลายพืชอาศัยที่ต่างกันของเชื้อแตกต่างจากที่ Thomas และคณะได้รายงานไว้ในปี 1988

นอกจากจะมีการจำแนกราสเหตุของโรคราน้ำค้างจากปฏิกิริยาการเกิดโรคระหว่างเชื้อและพืชอาศัยแล้ว ปัจจุบันมีการนำเอาความรู้และเทคนิคด้านดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์หาความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ Riethmüller และคณะ (2002) ได้ศึกษาความ

ตารางที่ 1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชอาศัยวงศ์แตงกับพาโทไทป์ของรา *P. cubensis*

ชนิดพืชอาศัย (ชื่อวิทยาศาสตร์)	พาโทไทป์ของรา <i>P. cubensis</i>				
	1	2	3	4	5
1. แตงกวา (<i>Cucumis sativus</i>)	+	+	+	+	+
2. แตงไทย (<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>)	+	+	+	+	+
3. แตงกวาดอง (<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>)	-	+	+	+	+
4. แตงกวาดอง (<i>C. melo</i> var. <i>acidulous</i>)	-	-	+	+	+
5. แตงโม (<i>Citrullus lanatus</i>)	-	-	-	+	+
6. ฟักทอง (<i>Cucurbita</i> spp.)	-	-	-	-	+

+ = ความเข้ากันได้โดยตรงระหว่างเชื้อและพืชอาศัย

- = ความเข้ากันไม่ได้หรือความเข้ากันได้เล็กน้อยระหว่างเชื้อและพืชอาศัย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Thomas (1996)

แตกต่างทางพันธุกรรมของราน้ำค้าง (*Peronospora*) โดยใช้ rDNA ต่อมา Patzak (2005) ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ในการจำแนก *Pseudoperonospora humuli* และ *Podospaera macularis* ในฮอป (*Humulus lupulus*) จากงานวิจัยของ Choi และคณะ (2006) ได้นำลำดับเบสของส่วน ITS มาใช้ในการวิเคราะห์รา *P. cubensis* ซึ่งเข้าทำลายพืชในสกุล *Cucumis* และ *Cucurbita* และรา *P. humuli* ที่เข้าทำลายพืชในสกุล *Humulus* จากการวิเคราะห์รา *P. cubensis* และ *P. humuli* พบว่าลำดับเบสบริเวณ ITS ของราทั้งสองมีความเหมือนกันในระดับที่สูงมาก และในการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของก้านชูสปอร์แรงเจียม สปอร์แรงเจียมและส่วนที่เกี่ยวกับการแตกออกของสปอร์แรงเจียม (dehiscence apparatus) บ่งบอกถึงลักษณะที่คล้ายคลึงกันของราทั้งสองชนิดนี้ จากการรายงานของ Gema และคณะ (2007) กล่าวไว้ว่าในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาจัดจำแนกนั้นเป็นเรื่องที่ยากและมีปัญหามากในการจัดจำแนกของราในคลาส Peronosporomycetes เช่น ราน้ำค้าง ซึ่ง Gema ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ *Peronospora* สาเหตุของโรคราน้ำค้างในพืชวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของส่วน ITS เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อ และได้ลงความเห็นว่าเป็น

สกุลที่มีความใกล้ชิดกับ *Pseudoperonospora* มากที่สุด Hudspeth และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับดีเอ็นเอของราในคลาส Peronosporomycetes โดยการใช้ mtDNA มาช่วยในการสร้างสายวิวัฒนาการของ Peronosporomycetes ซึ่งจะครอบคลุมทั้งลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางพันธุกรรมจีโนมของ Peronosporomycetes เขาได้ศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของ Peronosporomycetes โดยใช้ Cytochrome c oxidase subunit II หรือยีน *COX2* พบว่าผลผลิตของ *COX2* ของราในคลาส Peronosporomycetes ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ และในปี 2003 Hudspeth และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้างและลำดับเบสของยีน *COX2* และตั้งสมมติฐานว่าราน้ำค้างและราสนิมขาวไม่มีความสัมพันธ์กัน ราสนิมขาวไม่ได้อยู่ในอันดับเดียวกับราน้ำค้าง ราสนิมขาวได้ถูกตั้งเป็นอันดับใหม่อย่างชัดเจนและเป็นฐานของอันดับที่อยู่ภายใน Peronosporomycetidae ต่อมา Thines และคณะ (2008) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของราน้ำค้างในพืชวงศ์หญ้าพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของราสกุล *Peronosclerospora* และ *Sclerospora* โดยใช้ลำดับเบสของยีน *COX2* ในการจัดจำแนกได้

Cytochrome c oxidase subunit II ชื่อย่อคือ *COX2* เป็นหน่วยย่อยที่ 2 ของ Cytochrome c oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ซับซ้อน เป็นองค์ประกอบของห่วงโซ่ของการหายใจและมีส่วนร่วมในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก Cytochrome c ไปให้ออกซิเจน ในยูคาริโอตเอนไซม์นี้จะอยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial inner membrane) ในโปรคาริโอตจะพบในพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เอนไซม์นี้จะประกอบด้วย 3-4 หน่วยย่อย (polypeptides) ในโปรคาริโอต (prokaryotes) จนถึงมากกว่า 13 หน่วยย่อย ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (mammals) หน่วยย่อยที่ 2 (*COX2*) การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก Cytochrome c ไปยังตัวเร่งปฏิกิริยาในหน่วยย่อยที่ 1 *COX2* จะประกอบด้วยบริเวณของผนังสองด้านที่ติดกับ N-terminus และโปรตีนหลักของ periplasmic หรือช่องว่างของผนังด้านในของไมโทคอนเดรีย *COX2* จะเตรียม substrate-binding site ซึ่งมีทองแดงอยู่ตรงกลางเรียกว่า Cu(A) เป็นไปได้ว่าจะเป็นตัวรับตัวแรกใน cytochrome c oxidase (Adkins และคณะ, 1996)

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture Isolation)

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อจะเติบโตอยู่ร่วมกันหลายชนิดและสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกรจะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยเทคนิคที่ใช้ในการทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์นั้น Choi และคณะ (1999) ได้รายงานวิธีที่ทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์มีหลายวิธี เช่น ใช้แท่งแก้วปลายแหลมหรือเข็มปลายแหลมที่ใช้ในการตรึงแมลงมาใช้ในการแยกเชื้อ โดยแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว (single spore isolation) หรือใช้สารปฏิชีวนะมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อในการแยกให้ได้

เชื้อที่บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังมีวิธีการแยกสปอร์เดี่ยวจากสปอร์แขวนลอย เป็นต้น Ho และ Ko (1997) ได้ใช้วิธีการนำสปอร์แขวนลอยมาเลี้ยงบน water agar เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เมื่อสปอร์งอกจึงย้ายสปอร์เดี่ยวลงอาหารใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

2.3 ปฏิกริยาระหว่างเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* กับพืชอาศัย

รา *Pseudoperonospora cubensis* มีความสามารถในการเข้าทำลายพืชที่หลากหลายและแตกต่างกัน ในประชากรของเชื้อเอง รา *P. cubensis* แสดงคุณสมบัติความเข้ากันได้ (compatible) กับพืชอาศัยในบางชนิดในวงศ์ Cucurbitaceae อย่างไรก็ตามจีโนมไทป์ของพืชอาศัยก็จะเป็นตัวกำหนดความต้านทานที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ความต้านทานนี้เป็นผลมาจากความเข้ากันได้ของกระบวนการเมตาบอลิซึมและการปรับตัวทางพันธุกรรมสำหรับการสร้างกลไกการป้องกันตัวของพืช ฉะนั้นจึงได้มีการใช้ความเข้ากันได้และไม่ได้ (compatible/ incompatible) ระหว่างเชื้อกับพืชอาศัยที่แตกต่างกันมาใช้ในการจัดจำแนกพาโทไทป์ของเชื้อ ปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุสามารถอธิบายได้ตามสมมุติฐานยีน-ต่อ-ยีน (gene-for-gene concept) ของ Flor (Lebeda และ Cohen, 2010) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่า ในพืชอาศัยจะมียีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรค ส่วนในเชื้อโรคนั้นจะมียีนหรือสารพันธุกรรมที่ควบคุมเกี่ยวกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยที่ยีนในพืชอาศัยที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อสายพันธุ์ (race) ของเชื้อโรคนั้น ก็จะมียีนที่มีความจำเพาะเจาะจงของเชื้อโรคมาทำลายยีนที่ต้านทานในพืชอาศัยได้ การจะเกิดโรคได้จะต้องเกิดปฏิกริยาระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย ในทางพันธุศาสตร์พืชอาศัยจะมีการแสดงออกอยู่ 2 แบบ คือ ต้านทาน (resistance) และอ่อนแอ (susceptible) ในขณะที่เชื้อโรคจะแสดงความสามารถในการก่อให้เกิดโรคได้ (pathogenicity) ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ รุนแรง (virulent) และไม่รุนแรง (avirulent) เมื่อเชื้อและพืชอาศัยเกิดปฏิกริยาขึ้นจะเกิดผลคือแบบของการเข้าทำลาย (infection type) ซึ่งมี 2 แบบ คือ การเข้าทำลายต่ำ (Low infection type) และการเข้าทำลายสูง (High infection type) สำหรับแบบของการเข้าทำลาย จะเป็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมในพืชและในเชื้อโรคที่ควบคุมอยู่ ซึ่งจะต้องเป็นยีนที่สอดคล้องกัน (corresponding gene) โดยมีข้อกำหนดว่ายีนที่ไม่รุนแรง (Avirulent gene) จะเกิดปฏิกริยาแบบการเข้าทำลายสูงได้เฉพาะพืชที่มีจีโนมไทป์ที่อ่อนแอต่อโรคเท่านั้น แต่ถ้าบนพืชที่ต้านทานโรคนั้นจะเกิดการเข้าทำลายต่ำ ส่วนยีนที่รุนแรง (Virulent gene) สามารถก่อให้เกิดโรคได้รุนแรงทั้งบนพันธุ์ที่ต้านทานและพันธุ์ที่อ่อนแอ (ตารางที่ 2) (ชัยวัฒน์, 2546; Agrios, 2005)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนของพืชและเชื้อ และแบบการตอบสนองของโรค ในระบบพีชอาศัย-เชื้อสาเหตุ ตามสมมุติฐานยีน-ต่อ-ยีน สำหรับหนึ่งยีน

Virulent or avirulent genes in the pathogen	Resistance or susceptibility genes in plant	
	R (resistance) dominant	r (susceptible) recessive
A (avirulent) dominant	AR (-)	Ar (+)
a (virulent) recessive	aR (+)	ar (+)

2.4 ความต้านทานของพืช

2.4.1 ความต้านทานแบบจำเพาะ (R Gene Resistance, Race-specific, Monogenic or Vertical resistance) ความต้านทานชนิดนี้จะถูกควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ ซึ่งอาจจะเป็นยีนหลัก (major gene) เพียงยีนเดียว หรือสองสามคู่ ยีนนี้ควบคุมขั้นตอนหลักในการรับรู้เชื้อโรค โดยพีชอาศัยและแสดงออกเป็นการต้านทานต่อเชื้อ ในการต้านทานของพืชจะปรากฏเป็นความไม่สามารถเข้ากันได้ของยีน ซึ่งพืชแสดงออกโดยการเกิดปฏิกิริยา HR (Hypersensitive Reaction) หรืออาจจะปรากฏเป็นภูมิคุ้มกันของพืช หรืออาจจะยับยั้งการสืบพันธุ์ของเชื้อโรค ลักษณะของความต้านทานโรคปรากฏให้เห็นชัดเจน สามารถที่จะแยกออกจัดกลุ่มเป็นต้านทานหรือไม่ต้านทานได้ง่าย ลักษณะความต้านทานนี้จะหมดลงทันทีที่มีเชื้อโรคตัวอื่นที่ไม่ใช่ตัวเดิมนั้นมาเข้าทำลาย

2.4.2 ความต้านทานแบบไม่จำเพาะ (Partial, Quantitative, Polygenic or Horizontal resistance) ความต้านทานชนิดนี้จะถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายยีนซึ่งอาจจะเป็นยีนย่อย (minor gene) ลักษณะการต้านทานไม่สามารถปรากฏให้เห็นชัดเจน (Agrios, 2005)

2.4.3 ความทนทานต่อโรค (tolerance) เป็นลักษณะที่พืชแสดงอาการเป็นโรค แต่ยังสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ตามปกติ โดยไม่กระทบกระเทือนต่อผลผลิต

Jenkins (1942, 1946) อ้าง โดย Vliet และคณะ (1974) ได้ทำการทดสอบแสงควาสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง พบว่าพันธุ์ Chinese long และ Puerto Rico No. 37 มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ในระดับสูง และถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ ต่อมา Doruchowski และ Lakowska-Ryk (1992) ศึกษาแสงควาพันธุ์ WI 4783 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้ พบว่าลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างถูกควบคุมด้วยยีนค้อย 3 คู่ คือ *dm-1*, *dm-2* และ *dm-3*



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างของแตงกวา

เก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างที่พบในแตงกวาจากจังหวัดลำปาง ลำพูน และ เชียงใหม่ บันทึกข้อมูลของแต่ละไอโซเลทในแหล่งที่เก็บและบันทึกลักษณะของแผลที่เกิดขึ้นบนใบแตงกวา จากนั้นปีดสปอร์แรงเจียมของเชื้อเก็บไว้ในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Pseudoperonospora cubensis* สาเหตุโรคราน้ำค้างของแตงกวา

3.2.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างของรา *Pseudoperonospora cubensis*

นำตัวอย่างใบแตงกวาซึ่งแสดงอาการของโรคราน้ำค้างและมีราเจริญอยู่บนผิวด้านใต้ใบมาศึกษารูปร่างลักษณะด้วยการทำสไลด์ชั่วคราว โดยการใช้เข็มเย็บสะกดลงไปบนแผ่นทรงบริเวณโคนก้านชูสปอร์แรงเจียมที่โผล่ขึ้นมา แล้วนำเชื้อไปย้อม (mounting) ในแลคโตฟีนอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบดูลักษณะของสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกลักษณะของสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียมของแต่ละไอโซเลท

3.2.2 การวัดขนาดสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียม

นำสไลด์ชั่วคราวของรา *P. cubensis* ซึ่งเตรียมไว้มาวัดขนาดของสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียม โดยวัดจำนวน 100 สปอร์แรงเจียม และ 100 ก้านชูสปอร์แรงเจียม ต่อ 1 ไอโซเลท วัดขนาดทั้งความกว้างและความยาวของสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละไอโซเลท

3.3 การจำแนกสายพันธุ์ของรา *Pseudoperonospora cubensis* โดยการทดสอบกับพืชอาศัย

3.3.1 เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ไอโซเลทของรา *P. cubensis* ที่เป็นสาเหตุของโรคราน้ำค้างของแตงกวา ซึ่งเก็บจากจังหวัดลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่

3.3.2 ชุดพืชทดสอบ

นำเมล็ดพืชอาศัยชนิดต่างๆ ได้แก่ แตงกวา แตงไทย แตงกวาดอง แตงโม ฟักทอง น้ำเต้า บวบ เหลี่ยม แฟง และมะระ (ภาคผนวก ค) เพาะในวัสดุปลูก Krassmann KTS2 (Germany) ซึ่งเป็นวัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้นกล้ามีใบเลี้ยงสองใบ จึงนำมาใช้ทดสอบกับเชื้อราน้ำค้างไอโซเลทต่างๆ

3.3.3 การเตรียมเชื้อและการปลูกเชื้อ

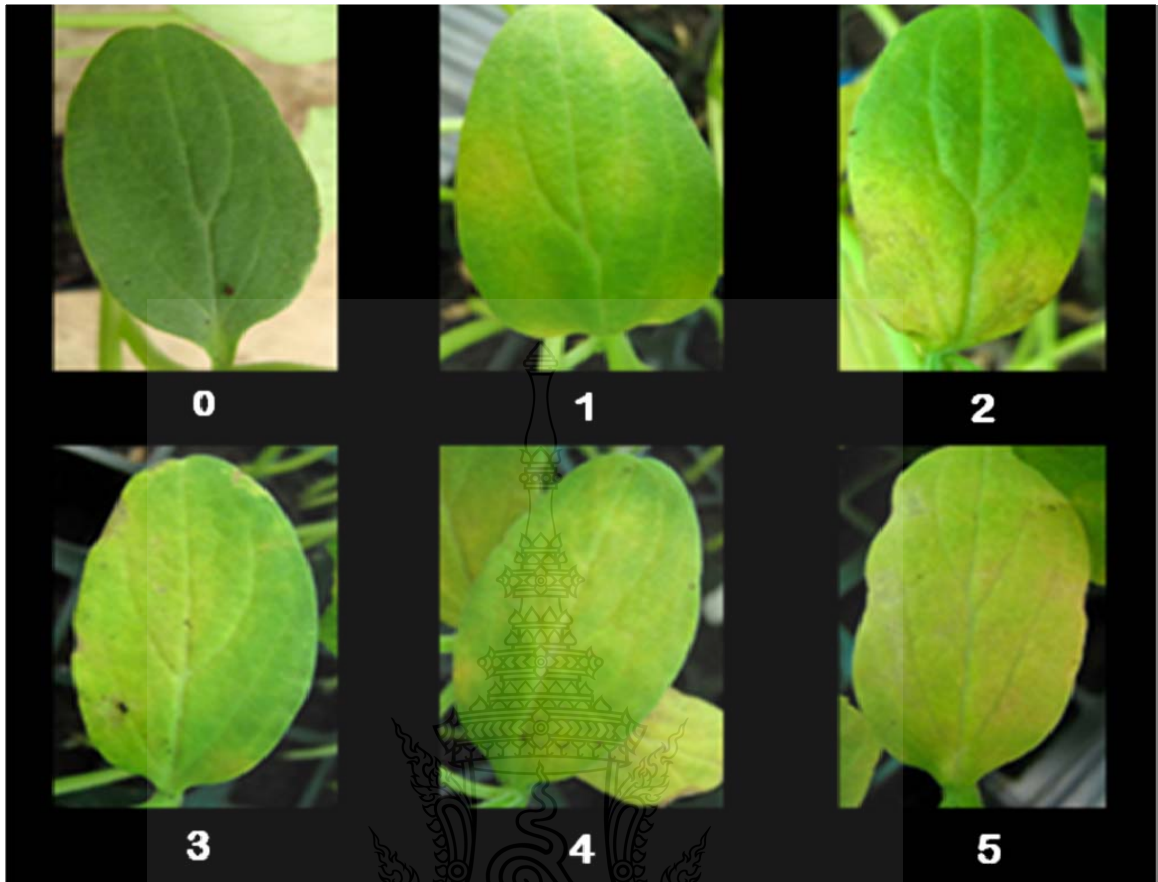
นำสปอร์แรงเจียมของรา *P. cubensis* ที่เก็บในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ในการนับสปอร์เพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยเท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาพ่นเป็นฝอยละเอียดลงบนพืชทดสอบที่เตรียมไว้ โดยพ่นที่ด้านหลังใบแตงกวา และนำพืชไปบ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสูง นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาวางไว้ในโรงเรือนตามปกติ ทำการประเมินระดับของการเกิดโรคราน้ำค้างหลังจากปลูกเชื้อได้ 7 วัน ใช้พืชทดสอบจำนวน 10 ต้นต่อชนิดของพืชอาศัย และใช้พืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อเป็นชุดควบคุม

3.3.4 การประเมินระดับการเกิดโรค

ประเมินหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน โดยระดับของการเกิดโรคแบ่งเป็น 6 ระดับ ตามวิธีของ วิลลาซีนี และคณะ (2550) ดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 1)

ระดับ

- 0 = ไม่พบแผลโรคราน้ำค้าง
- 1 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 20 % ของพื้นที่ใบ
- 2 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 40 % ของพื้นที่ใบ
- 3 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 60 % ของพื้นที่ใบ
- 4 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 80 % ของพื้นที่ใบ
- 5 = พบแผลโรคราน้ำค้าง 100 % ของพื้นที่ใบ



ภาพที่ 1 ระดับการเกิดโรคราน้ำค้างบนใบเลี้ยงของแตงกวา

0 = ไม่พบแผลโรคราน้ำค้าง

1 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 20 % ของพื้นที่ใบ

2 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 40 % ของพื้นที่ใบ

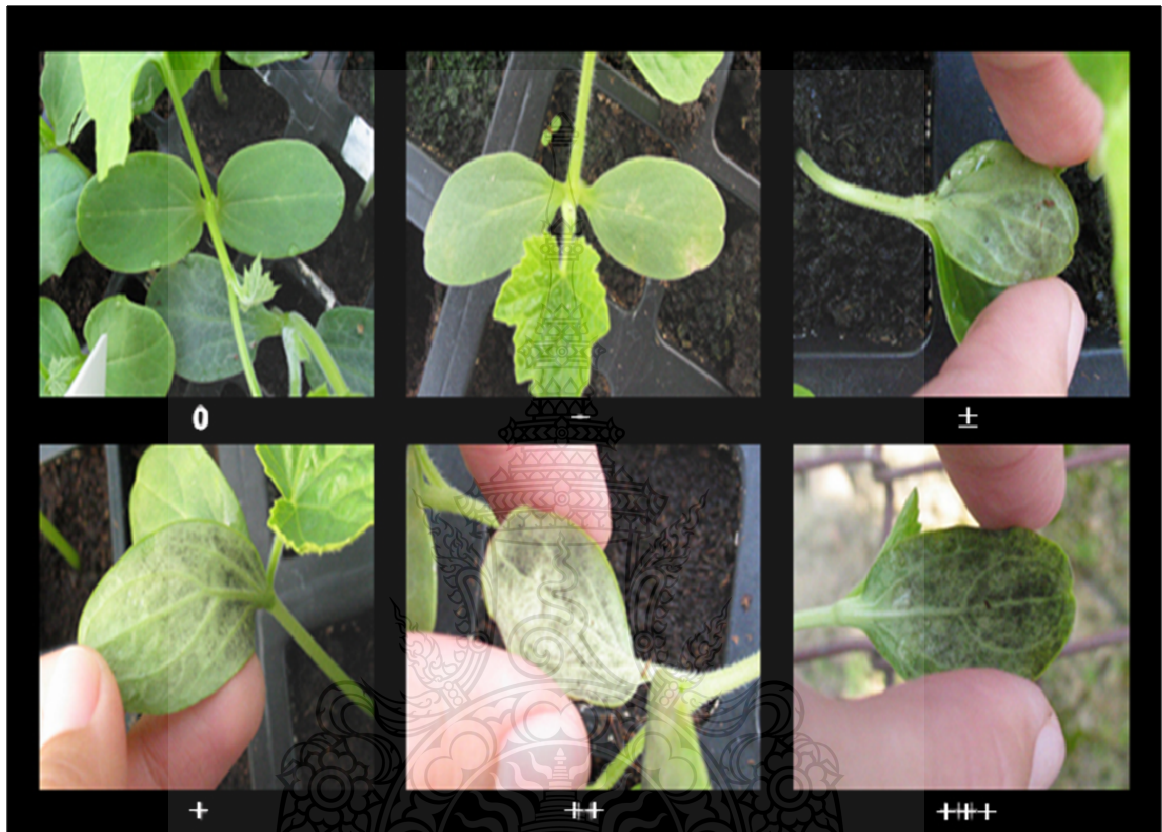
3 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 60 % ของพื้นที่ใบ

4 = พบแผลโรคราน้ำค้างไม่เกิน 80 % ของพื้นที่ใบ

5 = พบแผลโรคราน้ำค้าง 100 % ของพื้นที่ใบ

3.3.5 การประเมินระดับการสร้างสปอร์ของราน้ำค้าง

ประเมินจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อและพืชอาศัย โดยระดับของการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 6 ระดับ ตามวิธีของ Cohen และคณะ (2003) ดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ระดับการสร้างสปอร์ของราน้ำค้าง

- 0 = ไม่พบแผลโรคราน้ำค้าง จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันไม่ได้ (incompatible)
- = พบแผลแต่ไม่พบการสร้างสปอร์ จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันไม่ได้ (incompatible)
- ± = มีการสร้างสปอร์บนแผลแต่มีปริมาณน้อยมาก จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันได้ต่ำ (lowly compatible)
- + = มีการสร้างสปอร์เล็กน้อยบนแผล จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันได้ต่ำ (lowly compatible)
- ++ = มีการสร้างสปอร์ปานกลางบนแผล จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันได้ปานกลาง (moderately compatible)
- +++ = มีการสร้างสปอร์มากมายบนแผล จัดเป็นปฏิกิริยาแบบเข้ากันได้สูง (highly compatible)

3.4 การศึกษาความหลากหลายของรา *Pseudoperonospora cubensis* โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *COX2* และ การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากซูโอสปอร์ โดยใช้เม็ดเหล็กสแตนเลส (stainless steel beads) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตีให้ซูโอสปอร์แตก โดยใช้เครื่องเขย่า เขย่าหลอดที่มีสปอร์แรงเจียมใน homogenization buffer 200 μ l หลังจากนั้นเติม lysis buffer 200 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติม precipitation buffer 128 μ l กลับหลอด 10 ครั้ง แช่วหลอดในน้ำแข็งนาน 10 นาที ผสม CHCl_3 300 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/วินาที นาน 10 นาที ใส่น้ำลงในหลอดใหม่ ผสม isopropanol ที่เย็น 1 เท่าปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยการพลิกหลอด และหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/วินาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอน ดีเอ็นเอ ด้วยเอทานอล 70% ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่เติม RNase (10 μ g/ml) ประมาณ 25 μ l ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอรวมโดยวิธีการ gel electrophoresis บนอะกาโรสเจล (Agarose Gel) 1%

3.4.2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่พิมพ์ต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *COX2* (Hudspeth และคณะ, 2003) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *COX2* การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะทำในปริมาตร 25 μ l ตามส่วนประกอบในตารางที่ 3 โดยใช้เครื่อง Thermocycler Biometra (Germany) ซึ่งมีรอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 4 และใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของรา *Fusarium* จำนวน 9 คู่ (ตารางที่ 5) เป็นไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มนอกเหนือจากการใช้ไพรเมอร์ของยีน *COX2*

3.4.3 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

โดยตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบน 1% TAE agarose gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 10 μ g/l และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ (Phylogenetic analysis)

เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นจัดกลุ่มของแถบดีเอ็นเอที่พบในแต่ละช่วงตามขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม TreeCon ในการวิเคราะห์ผลและสร้างแผนภูมิประชากรพันธุศาสตร์ (Phylogenetic tree) ของรา *P.cubensis*



ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *COX2*

และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

H ₂ O	18.5 µl
10X PCR buffer*	2.5 µl
dNTPs (2.5 mM)	1 µl
<i>COX2F-N</i> หรือ Forward ของไมโครแซทเทลไลท์ (10 µM)	0.5 µl
<i>COX2R</i> หรือ Reverse ของไมโครแซทเทลไลท์ (10 µM)	0.5 µl
DNA template (~20 ng)	1 µl
<i>Taq</i> DNA polymerase (1 unit/ µl)	1 µl
Total	25 µl

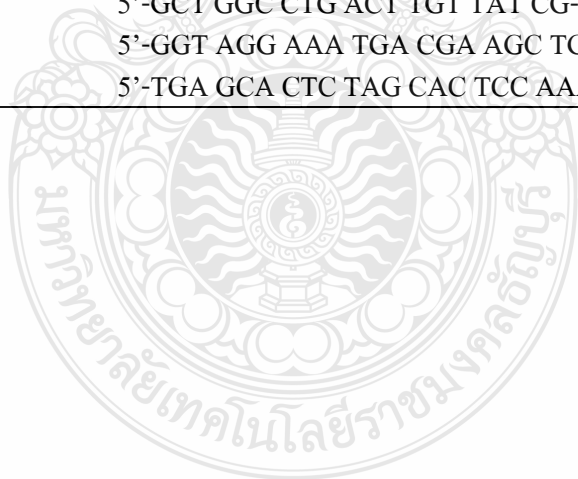
* 10X PCR buffer (300 mM Tricine, 1% Triton X-100, 50 mM β-mercaptoethanol, 20 mM MgCl₂, pH 8.4)

ตารางที่ 4 รอบการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน cytochrome c oxidase subunit II (*COX2*)

94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 35 รอบ
56 องศาเซลเซียส	1 นาที	
72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 5 โพรเมอร์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของรา *Fusarium* จำนวน 9 คู่

ชื่อโพรเมอร์ (Oligo name)	ลำดับเบส จากปลาย 5'ไปยัง 3' (Sequence 5'--> 3')
MB2F	5'-TGC TGT GTA TGG ATG GAT GG-3'
MB2R	5'-CAT GGT CGA TAG CTT GTC TCA G-3'
MB5F	5'-ACT TGG AGG AAA TGG GCT TC-3'
MB5R	5'-GGA TGG CGT TTA ATA AAT CTG G-3'
MB9F	5'-TGG CTG GGA TAC TGT GTA ATT G-3'
MB9R	5'-TTA GCT TCA GAG CCC TTT GG-3'
MB10F	5'-TAT CGA GTC CGG CTT CCA GAA C-3'
MB10R	5'-TTG CAA TTA CCT CCG ATA CCA C-3'
MB11F	5'-GTG GAC GAA CAC CTG CAT C-3'
MB11R	5'-AGA TCC TCC ACC TCC ACC TC-3'
MB13F	5'-GGA GGA TGA GCT CGA TGA AG-3'
MB13R	5'-CTA AGC CTG CTA CAC CCT CG-3'
MB14F	5'-CGT CTC TGA ACC ACC TTC ATC-3'
MB14R	5'-TTC CTC CGT CCA TCC TGA C-3'
MB17F	5'-ACT GAT TCA CCG ATC CTT CG-3'
MB17R	5'-GCT GGC CTG ACT TGT TAT CG-3'
MB18F	5'-GGT AGG AAA TGA CGA AGC TGA C-3'
MB18R	5'-TGA GCA CTC TAG CAC TCC AAA C-3'



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเก็บตัวอย่างและการศึกษาลักษณะอาการโรคราน้ำค้างของแตงกวา

จากการเก็บตัวอย่างใบแตงกวาพันธุ์ต่างๆ แคนตาลูป และบวบเหลี่ยม ที่พบเป็นโรคราน้ำค้างจากแหล่งปลูกในภาคเหนือ ช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2551-2552 สามารถรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างได้จำนวนทั้งสิ้น 17 ไอโซเลท (ตารางที่ 6)

ลักษณะอาการโรคราน้ำค้างที่พบในแต่ละตัวอย่างมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยลักษณะอาการที่พบคือ เริ่มจากแผลเป็นสีเหลือง (yellow lesion) ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเหลืองซีด (chlorosis) แผลจะถูกจำกัดโดยเส้นใบ (clearly limited by veins) ทำให้แผลมีลักษณะเป็นเหลี่ยม (angular) เมื่อเชื้อเข้าทำลายมากขึ้นแผลจะขยายและลูกกลมเชื่อมต่อกันไปทั่วทั้งใบ ต่อมาแผลที่พบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง เมื่อสภาพอากาศชื้นก็จะเห็นบริเวณใต้ใบตรงตำแหน่งแผลสีเหลืองมีลักษณะสีเทาปกคลุมอยู่ ซึ่งลักษณะสีเทาที่เกิดขึ้นนั้นคือสปอร์แรงเจียมที่เชื้อสร้างขึ้น (ภาพที่ 3) ลักษณะอาการที่กล่าวมานี้สอดคล้องกับที่ Colucci ได้รายงานไว้ในปี 2008 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Palti และ Cohen (1980); Lebeda และ Cohen (2010) ซึ่งรายงานไว้ว่าลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างจะเกิดขึ้นที่ใบแก่ก่อน จากนั้นลามไปยังใบที่อ่อนกว่า เมื่อโรคพัฒนาขึ้นแผลจะรวมตัวกันเป็นแผลขนาดใหญ่ขึ้นจนครอบคลุมทั้งใบ ในช่วงที่มีความชื้นสูงจะพบใต้ใบตรงตำแหน่งของแผล มีเส้นใยสีขาวเกาะเป็นกลุ่มและมีสปอร์เป็นผงสีดำ ผงสีดำที่พบคือก้านชูสปอร์แรงเจียมและสปอร์แรงเจียมของเชื้อสาเหตุ

4.1.1 ลักษณะอาการโรคและลักษณะของราน้ำค้างบนแตงกวาและแตงร้านในจังหวัด

ลำปาง (*Pseudoperonospora cubensis* isolate Lampang)

ราน้ำค้างไอโซเลทนี้ เป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากแตงกวาและแตงร้านภายในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา อ.เมือง จ.ลำปาง ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างที่ได้จากไอโซเลทนี้จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแตงกวาและแตงร้านที่ปลูก แผลของโรคราน้ำค้างจะเป็นแผลเหลี่ยมสีเหลืองถูกจำกัดด้วยเส้นใบ ในแตงบางสายพันธุ์ลักษณะของแผลมีขนาดเล็กกระจายทั่วใบ บางสายพันธุ์แผลจะเชื่อมต่อกันเป็นแผลขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4 ก และ ข) ลักษณะลักษณะของราชนิดนี้ ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีความยาวเฉลี่ย 299.1 μm มีสีใส (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non-septate) บริเวณฐานของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะโป่งออกเล็กน้อย แขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะแตกแขนงประมาณ 3-5 ครั้ง และมีความยาวเฉลี่ย 17.6 μm สปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ย 29.12X18.90 μm สี

น้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม รูปรี (ellipsoidal) ส่วนปลายมี papilla เป็นช่องทางออกของชูโอสปอร์ (ภาพที่ 4 ค และ ง)

4.1.2 ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างบนแตงกวา แคนตาลูป และบวบ

เห็บผลเล็กในจังหวัดลำพูน (*Pseudoperonospora cubensis* isolate Lamphun)

ไอโซเลทลำพูนนี้แยกมาจากแตงกวา แคนตาลูป และบวบเห็บผลเล็ก โดยลักษณะอาการโรคราน้ำค้างในพืชทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะเป็นแผลสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล แผลจะถูกจำกัดด้วยเส้นใบ ทำให้เห็นเป็นลักษณะแผลเห็บ (ภาพที่ 5 ก-ค) ก้านชูสปอร์แรงเจียมของเชื้อมีความยาวเฉลี่ย 277.4-302.9 μm มีการแตกแขนง 4-4 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะมีลักษณะแหลม และมีความยาวเฉลี่ย 11.3-17.7 μm สปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 27.77-31.87 X 17.36-20.12 μm มีรูปรี (ellipsoidal) รูปไข่หัวกลับ (obvoid) รูปไข่ (ovoid) และรูปรีค่อนข้างกลม (subglobose) และมี papilla ที่บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียม สปอร์แรงเจียมมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 5 ง-ฉ)

4.1.3 ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างบนแตงกวาในจังหวัดเชียงใหม่

(*Pseudoperonospora cubensis* isolate Chiangmai)

ราน้ำค้างไอโซเลทนี้ เก็บมาจากแตงกวาในจังหวัดเชียงใหม่ อาการของแผลจะเป็นแผลเห็บ มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อลุกลามทำให้แผลขยายติดกันเป็นแผลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แผลมีสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล (ภาพที่ 6 ก และ ข) ลักษณะของราน้ำค้างไอโซเลทนี้ ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีขนาดยาว 255.3-323.9 μm มีการแตกแขนง 3-6 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะมีลักษณะแหลมและมีความยาวเฉลี่ย 12.2-17.6 μm ส่วนสปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 25.87-30.09 X 16.89-18.95 μm สปอร์แรงเจียมมีรูปรี (ellipsoidal) รูปไข่หัวกลับ (obvoid) และรูปไข่ (ovoid) บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียมมี papilla เป็นทางออกของชูโอสปอร์ สปอร์แรงเจียมมีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 6 ค และ ง)

ตารางที่ 6 เชื้อสาเหตุโรคน้ำค้างในพืชวงศ์แตงที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดในภาคเหนือ

ไอโซเลข	พืชอาศัย		สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ
1	แตงกวาพันธุ์โตโต๊	จังหวัด	สถาบันวิจัยฯ ลำปาง	8 ก.ย. 51
2	แตงกวา	ลำปาง	บ.ใหม่พัฒนา ต.พิชัย อ.เมือง	8 ก.ย. 51
3	แตงกวา	จังหวัด	บ.ป่าซางน้อย ต.บ้านแป้น อ.เมือง	4 พ.ย. 51
4	แตงกวา	ลำพูน	บ้านป่าซาง อ.ป่าซาง	5 พ.ย. 51
5	แตงกวา		บ.สบทา ต.ปากบ่อง อ.ป่าซาง	23 มี.ค. 52
6	แคนตาลูป		บ.สบทา ต.ปากบ่อง อ.ป่าซาง	23 มี.ค. 52
7	บวบเหลี่ยมผลเล็ก		บ.ก້อง ต.ปากบ่อง อ.ป่าซาง	23 มี.ค. 52
8	แตงกวา	จังหวัด	บ้านเหล่าป๋วย อ.ดอยหล่อ	6 พ.ย. 51
9	แตงกวา	เชียงใหม่	บ้านเหล่าป๋วย อ.ดอยหล่อ	6 พ.ย. 51
10	แตงกวา		อ.แม่ริม	9 ส.ค. 52
11	แตงกวา		อ.แม่ใจ	9 ส.ค. 52
12	แตงกวา		บ.ทุ่งหมากหนุ่ม อ.จอมทอง	15 มี.ค. 52
13	แตงกวา		บ.ทุ่งหมากหนุ่ม อ.จอมทอง	15 มี.ค. 52
14	แตงกวา		บ.ทุ่งหมากหนุ่ม อ.จอมทอง	15 มี.ค. 52
15	แตงร้าน Belt Alpha Type		บ.เพื่อนเกษตร ต.หางดง อ.หางดง	9 ส.ค. 52
16	แตงกวาชัยชนะ 411	จังหวัด	บ.เสรีราช ต.ช่องแคบ อ.พบพระ	10 ส.ค. 51
17	แตงกวาสรแดง No. 7	ตาก	บ.แม่จะเรา อ.แม่ระมาด	10 ส.ค. 51

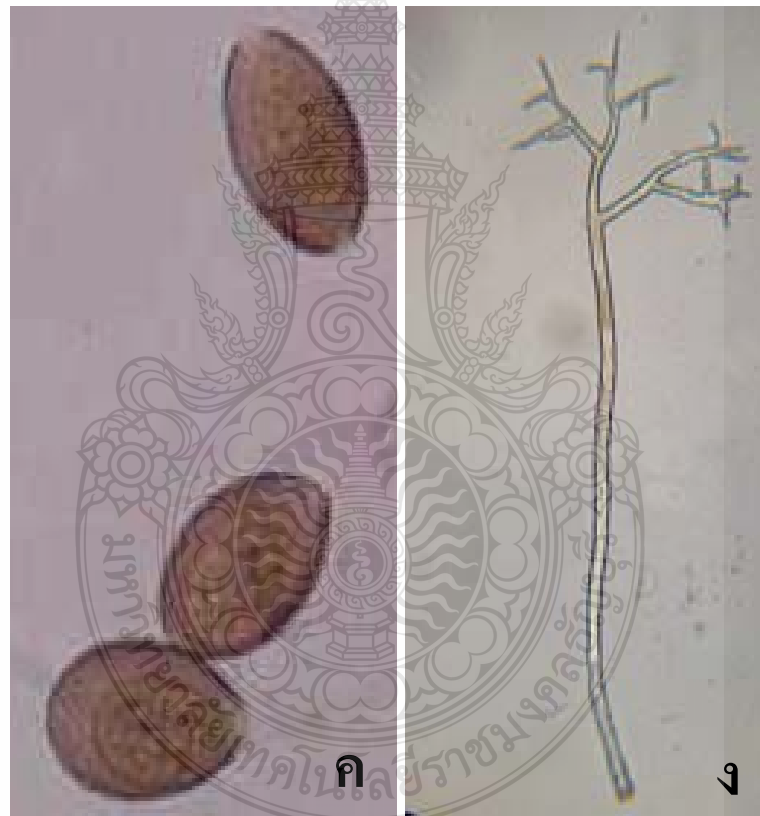
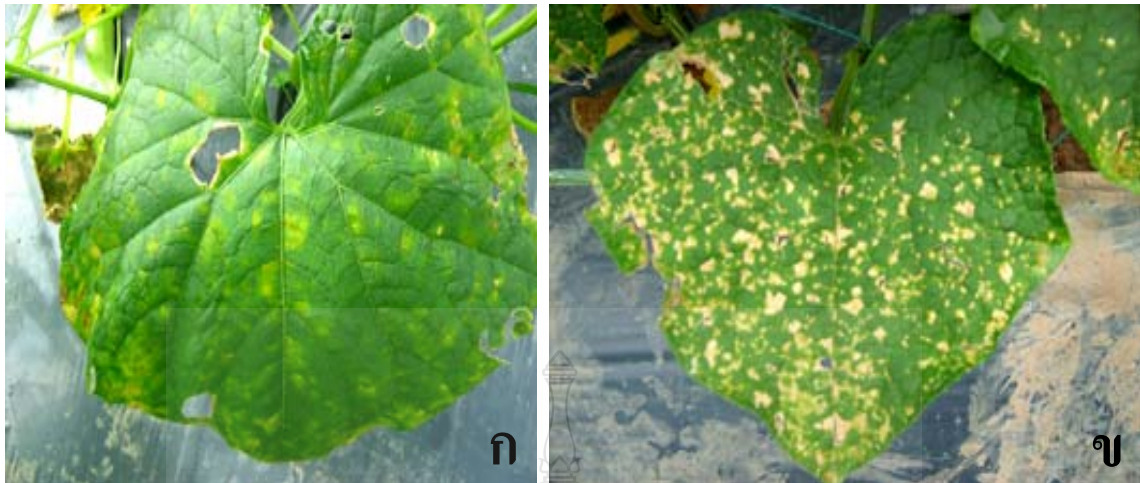


ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของโรคน้ำค้างบนใบแตงกวา

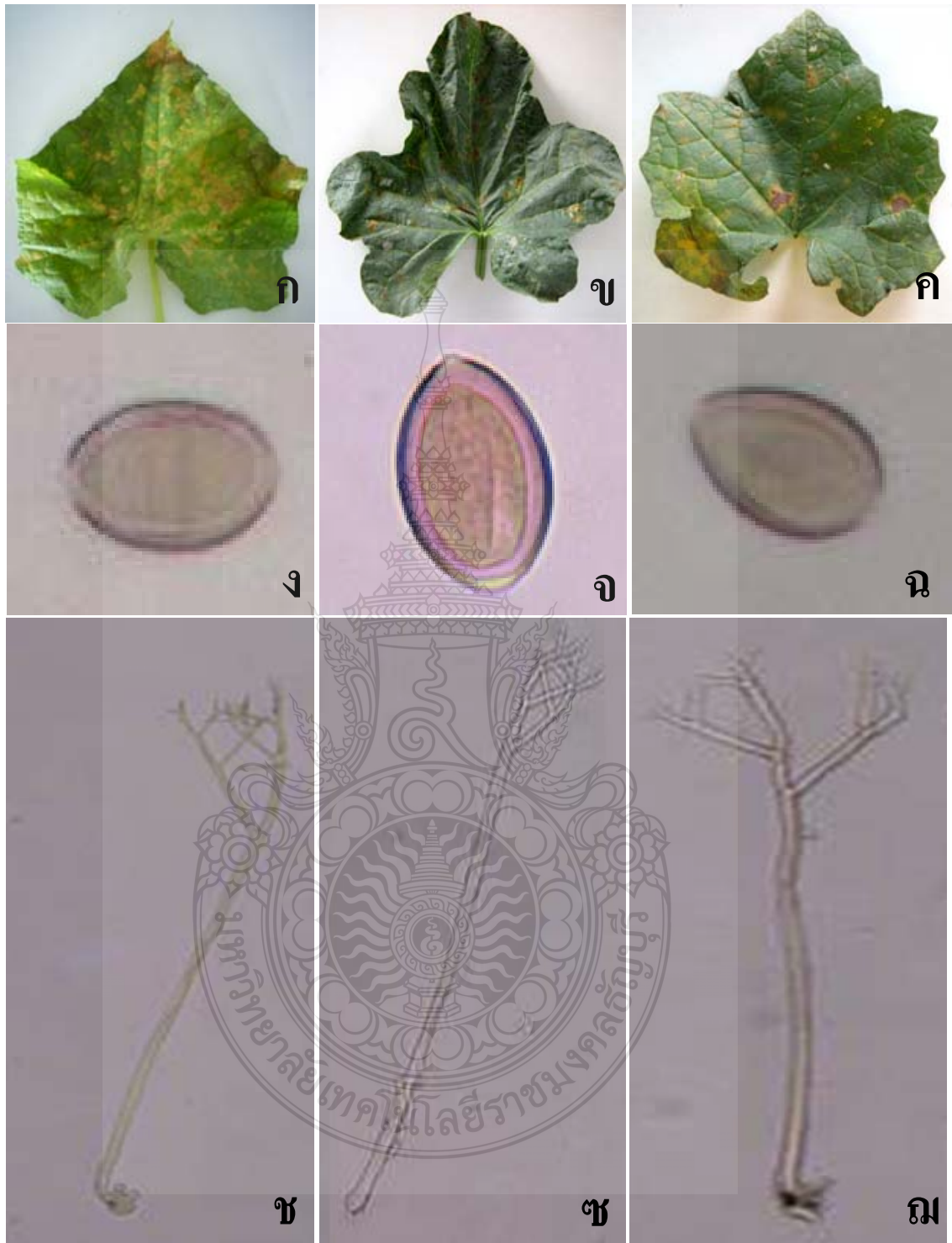
(ก) แผลราน้ำค้างบนใบแตงกวาในระยะเริ่มต้น

(ข) ใต้ใบตรงบริเวณแผลสีเหลืองมีสปอร์แรงเจริญของเชื้อลักษณะสีเทาปกคลุมอยู่

(ค) เมื่อเชื้อเข้าทำลายมากขึ้น แผลขยายลุกลามไปทั่วทั้งใบและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง



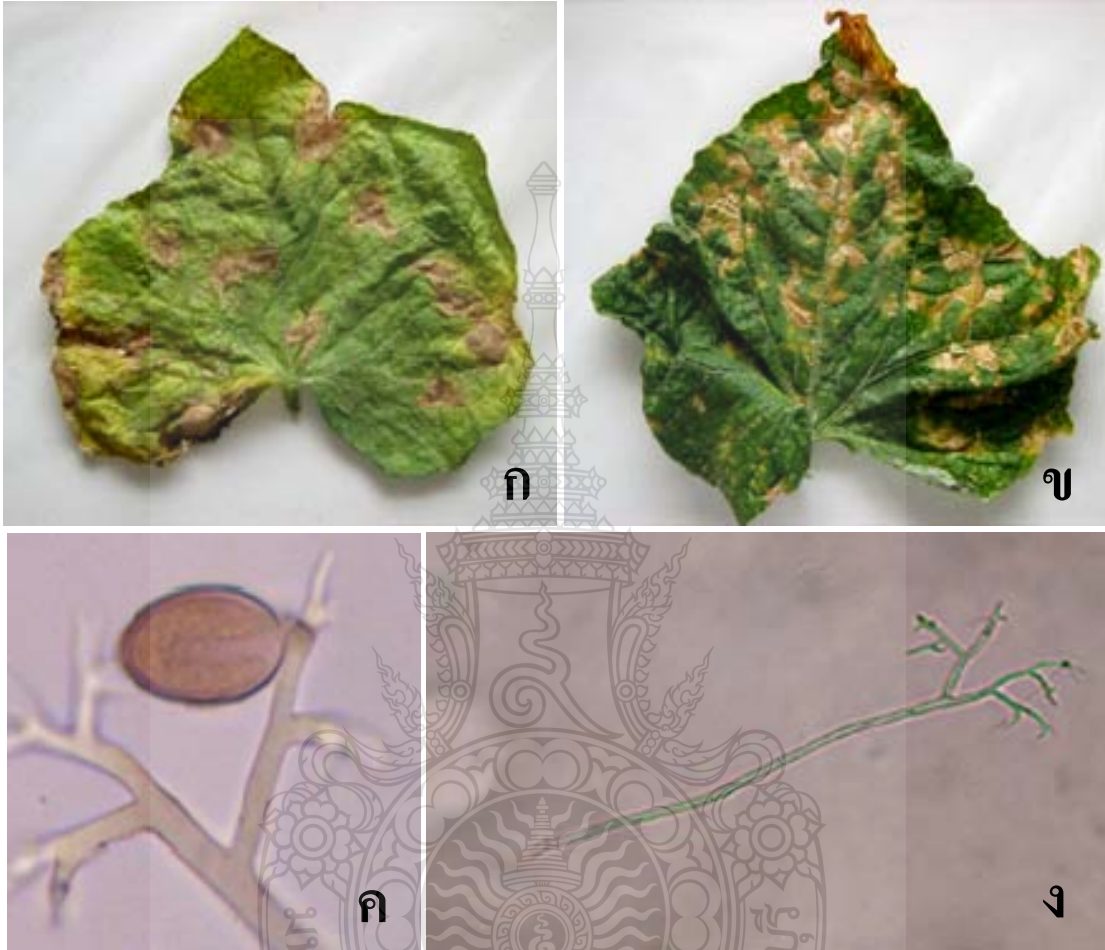
ภาพที่ 4 ลักษณะอาการ โรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทลำปาง
(ก และ ข) ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างที่พบบนใบแตงกวาและแตงร้าน
(ค และ ง) ลักษณะสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียม ที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
แบบใช้แสง



ภาพที่ 5 ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทลำพูน

(ก-ค) ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างที่พบบนใบแตงกวา แคนตาลูป และบวบเหลี่ยมผลเล็ก

(ง-ฉ) ลักษณะสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียม ที่แยกจากแตงกวา แคนตาลูป และบวบเหลี่ยมผลเล็ก และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 6 ลักษณะอาการโรคและสัณฐานวิทยาของราน้ำค้างไอโซเลทเชียงใหม่
(ก และ ข) ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างที่พบบนใบแตงกวา
(ค และ ง) ลักษณะสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียม ที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
แบบใช้แสง

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Pseudoperonospora cubensis*

4.2.1 ลักษณะรูปร่างของรา *Pseudoperonospora cubensis*

จากการนำใบแตงกวาที่แสดงอาการของโรคราน้ำค้างมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) พบว่ารามีการสร้างก้านชูสปอร์แรงเจียมออกมาทางปากใบ และที่ปลายของก้านชูสปอร์แรงเจียม จะมีการสร้างสปอร์แรงเจียมออกมาที่ปลายของแต่ละก้าน จากการตรวจดูลักษณะของสปอร์แรงเจียม และก้านชูสปอร์แรงเจียมจากสไลด์ชั่วคราว ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) พบว่าสปอร์แรงเจียมที่กำลังงอกออกมาจากปลายของก้านชูสปอร์แรงเจียม จะมีรูปร่างกลม และเมื่อเริ่มแก่จะเปลี่ยนเป็นรูปร่างรี (elliptical) รูปไข่ (ovoid) รูปไข่หัวกลับ (obovoid) และรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) สีของสปอร์แรงเจียม มีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม ที่ปลายของสปอร์แรงเจียมจะมี papilla เป็นทางออกของซิวโอสปอร์ ส่วนก้านชูสปอร์แรงเจียมมีสีใส (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non-septate) บริเวณฐานของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะโป่งออกเล็กน้อย การแตกแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะแตกแขนงประมาณ 3-6 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมจะมีลักษณะแหลม (ภาพที่ 7) จากลักษณะที่กล่าวมาทั้งหมดนี้สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อ *P. cubensis* ที่ได้มีการรายงานไว้ (Colucci, 2008; Choi และ Shin, 2008)

4.2.2 การวัดขนาดก้านชูสปอร์แรงเจียมและสปอร์แรงเจียม

จากการวัดขนาดของก้านชูสปอร์แรงเจียมและสปอร์แรงเจียมของรา *P. cubensis* ที่เข้าทำลายแตงกวาตามธรรมชาติในจังหวัดลำปาง, ลำพูน และเชียงใหม่ (ตารางที่ 7 และ 8) (ภาพที่ 8) พบว่า

ไอโซเลทลำปาง ก้านชูสปอร์แรงเจียมของรา *P. cubensis* มีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 299.1 X 13.5 μm ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีการแตกแขนง 3-5 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียม จะมีลักษณะแหลมและมีความยาวเฉลี่ย 17.6 μm สปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ย 29.12 X 18.90 μm และมีรูปร่างรี (ellipsoidal) และมี papilla ที่บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียม สปอร์แรงเจียมมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม

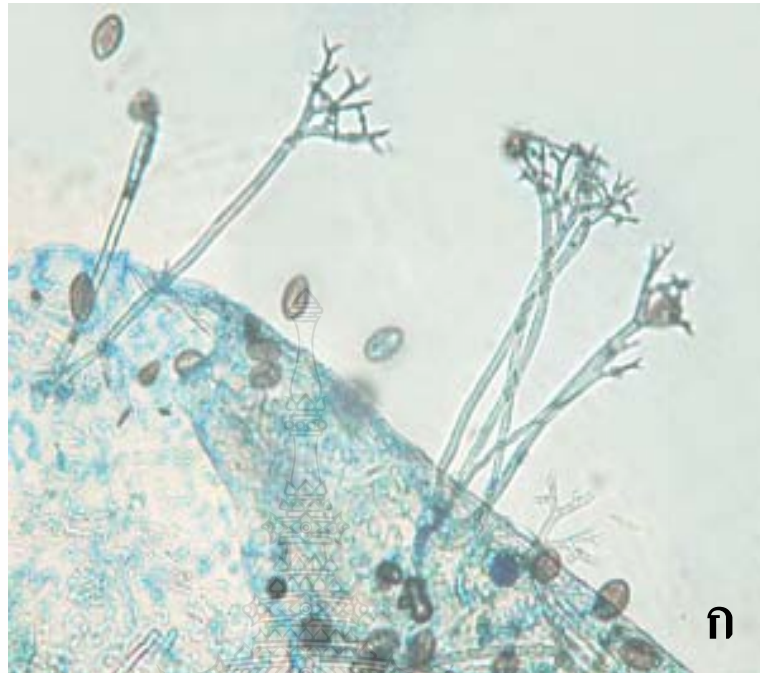
ไอโซเลทลำพูน มีขนาดก้านชูสปอร์แรงเจียมเฉลี่ยตั้งแต่ 277.4-283.8 X 10.9-14.1 μm ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีการแตกแขนง 4-4 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์มีลักษณะแหลมและมีความยาวเฉลี่ย 11.3-13.3 μm สปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 27.77-31.87 X 17.36-20.12 μm และมีรูปร่างรี (ellipsoidal) รูปไข่หัวกลับ (obovoid) รูปไข่ (ovoid) และรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียมมี papilla สปอร์แรงเจียมมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม

ไอโซเลทเชียงใหม่ ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 255.3-323.9 X 10.9-15.9 μm ก้านชูสปอร์แรงเจียมมีการแตกแขนง 3-6 ครั้ง และที่ปลายแขนงของก้านชูสปอร์แรงเจียมมีลักษณะแหลม

และมีความยาวเฉลี่ย 12.2-17.6 μm สปอร์แรงเจียมมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 25.87-30.09 X 16.89-18.95 μm มีรูปร่างรี (ellipsoidal) รูปไข่หัวกลับ (obovoid) และรูปไข่ (ovoid) บริเวณปลายของสปอร์แรงเจียมมี papilla สปอร์แรงเจียมมีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม

โดยขนาดก้านชูสปอร์แรงเจียมที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Choi และ Shin (2008) ที่ได้รายงานไว้ว่าก้านชูสปอร์ของเชื้อ *P. cubensis* มีขนาด 230-500 x 5-7.5 μm และขนาดของสปอร์แรงเจียมก็สอดคล้องกับการรายงานของ Colucci (2008) ที่พบว่าขนาดสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. cubensis* มีขนาด 20-40 x 14-25 μm



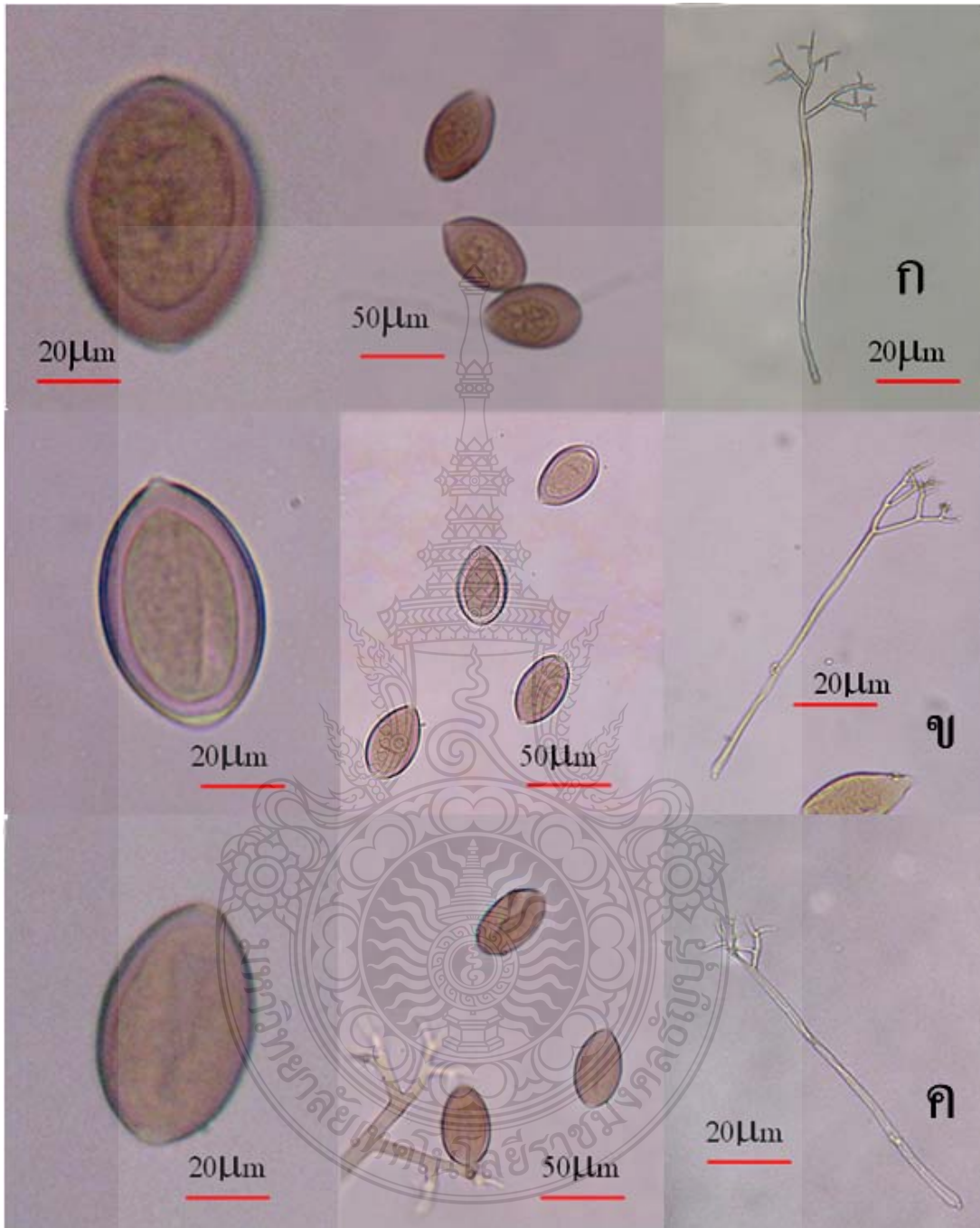


ก



ข

ภาพที่ 7 ลักษณะรูปร่างของรา *Pseudoperonospora cubensis* (ก) ลักษณะของสปอร์แรงเจียม และก้านชูสปอร์แรงเจียมที่งอกออกมาจากปากใบ (ข) ลักษณะของสปอร์แรงเจียม ขณะกำลังเริ่มงอกออกมาจากปลายก้านชูสปอร์แรงเจียม



ภาพที่ 8 ลักษณะสปอร์แรงเจียมและก้านชูสปอร์แรงเจียมของรา *Pseudoperonospora cubensis*

- (ก) ไอโซเลท ที่ 1 จากจังหวัดลำปาง
- (ข) ไอโซเลท ที่ 5 จากจังหวัดลำพูน
- (ค) ไอโซเลท ที่ 12 จากจังหวัดเชียงใหม่

ตารางที่ 7 ลักษณะและขนาดของก้านชูสปอร์แรงเจียมของรา *Pseudoperonospora cubensis*
ไอโซเลขตต่างๆ

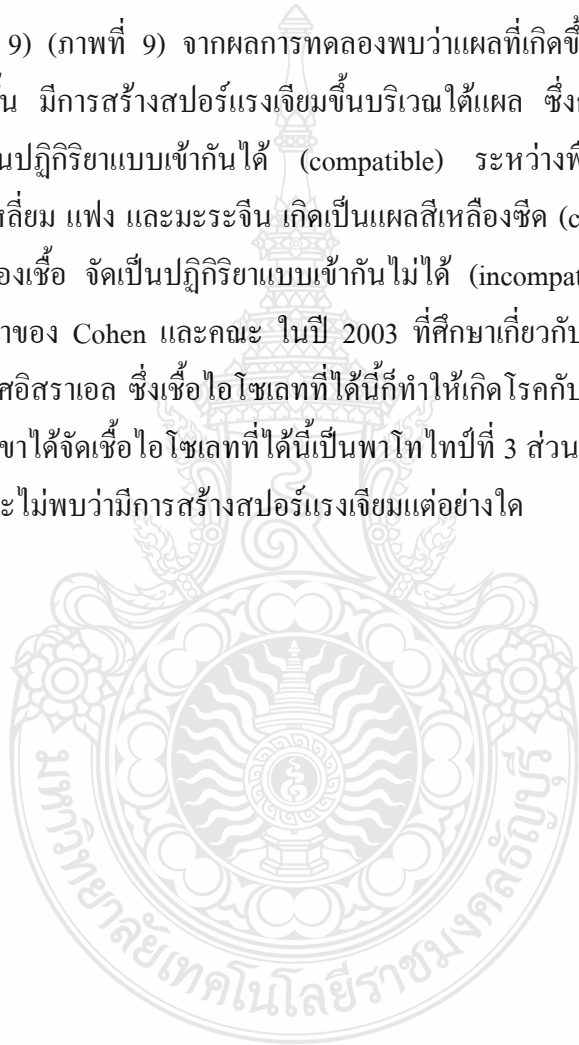
ไอโซ เลขต	ก้านชูสปอร์แรงเจียม		จำนวน ครั้งการ แตก	แขนงสุดท้ายของก้านชูสปอร์แรงเจียม	
	ขนาด (ยาวXกว้าง) (μm)	ค่าเฉลี่ย (μm)		ความยาว(μm)	ค่าเฉลี่ย (μm)
1	250.9-325.6 X 10.0-17.8	299.1 X 13.5	3-5	12.7-22.9	17.6
2	-	-	-	-	-
3	203.5-330.8 X 9.8-19.9	277.4 X 14.1	3-5	10-17.9	12.8
4	240.3-389.6 X 8.6-16.5	282.3 X 12.6	4-4	7.5-15.5	11.3
5	245.8-390.7 X 9.2-17.0	283.8 X 10.9	3-6	10.9-22.0	13.3
6	200.9-370.5 X 10.5-23.0	302.9 X 13.4	3-5	10.0-24.7	15.9
7	204.1-350.8 X 9.2-15.7	279.6 X 10.0	3-5	10.7-25.1	17.7
8	249.5-390.8 X 10.2-23.3	323.9 X 15.9	3-5	10.2-23.4	15.4
9	20.1-32.6 X 13.9-23.4	313.3 X 14.6	3-5	12.0-22.9	17.6
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	18.5-29.9 X 11.7-21.3	266.3 X 11.8	3-6	10.0-24.0	15.2
13	20.5-33.1 X 14.7-22.9	255.3 X 10.9	3-6	10.1-22.7	12.2
14	23.5-34.1 X 13.1-22.3	262.1 X 12.1	3-6	10.5-24.8	14.9
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ข้อมูลขนาด รูปร่าง และสีของสปอร์แรงเจียมของรา *Pseudoperonospora cubensis*
ไอโซเลขที่ต่างๆ

ไอโซ เลข	สปอร์แรงเจียม		รูปร่าง	สี
	ขนาด (ยาวXกว้าง) (μm)	ค่าเฉลี่ย (μm)		
1	17.1-36.7 X 13.2-22.5	29.12X18.90	ellipsoidal	Pale-Dark brown
2	-	-	-	-
3	18.3-36.5 X 14.7-25.9	30.75X19.37	ellipsoidal, obvoid, ovoid และ subglobose	Pale-Dark brown
4	24.9-37.2 X 15.3-27.4	31.87X20.12	ellipsoidal, obvoid และ ovoid	Pale-Dark brown
5	17.7-35.1 X 13.7-25.1	27.77X17.36	ellipsoidal, obvoid, ovoid และ subglobose	Pale-Dark brown
6	18.0-35.5 X 13.2-24.9	28.55X18.05	ellipsoidal, obvoid, ovoid และ subglobose	Pale-Dark brown
7	20.3-36.2 X 14.1-25.3	30.40X19.11	ellipsoidal, obvoid และ ovoid	Pale-Dark brown
8	22.5-34.8 X 13.7-22.1	30.09X18.24	ellipsoidal, obvoid และ ovoid	Pale-Dark brown
9	20.1-32.6 X 13.9-23.4	28.20X18.95	ellipsoidal, obvoid และ ovoid	Pale-Dark brown
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	18.5-29.9 X 11.7-21.3	25.87X16.89	obvoidและovoid	Pale-Dark brown
13	20.5-33.1 X 14.7-22.9	28.30X18.45	obvoidและovoid	Pale-Dark brown
14	23.5-34.1 X 13.1-22.3	30.00X17.82	ellipsoidal, obvoid และ ovoid	Pale-Dark brown
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-

4.3 การจำแนก *Pseudoperonospora cubensis* โดยความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย

จากการศึกษาการจำแนก *P. cubensis* โดยใช้ความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย พบว่าไอโซเลทของราน้ำค้างที่เก็บจากภาคเหนือทั้งหมด 11 ไอโซเลท สามารถเข้าทำลายแตงชนิดต่างๆได้ไม่แตกต่างกัน Thomas และคณะ (1987) ได้กล่าวไว้ว่าราสาเหตุของโรคราน้ำค้างที่สามารถเข้าทำลายแตงกวา แตงกวาดอง และแตงไทยนั้น ถูกจัดอยู่ในพาโทไทป์ที่ 3 (Pathotype 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการปลูกเชื้อในการศึกษาราน้ำค้างทั้ง 11 ไอโซเลทและสามารถเข้าทำลายแตงกวา แตงกวาดองและแตงไทยได้ (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 9) จากผลการทดลองพบว่าแผลที่เกิดขึ้นกับชุดพืชทดสอบที่รา *P. cubensis* เข้าทำลายนั้น มีการสร้างสปอร์แรงเจียมขึ้นบริเวณใต้แผล ซึ่งการที่เชื้อสามารถสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้นั้นจัดเป็นปฏิกริยาแบบเข้ากันได้ (compatible) ระหว่างพืชและเชื้อ ส่วนแตงโมดำ ฟักทอง น้ำเต้า บวบเหลี่ยม แฟง และมะระจีน เกิดเป็นแผลสีเหลืองซีด (chlorosis) ใต้แผลไม่พบการสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อ จัดเป็นปฏิกริยาแบบเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Cohen และคณะ ในปี 2003 ที่ศึกษาเกี่ยวกับราน้ำค้างที่เก็บจากแตงกวาและเมล่อน ในประเทศอิสราเอล ซึ่งเชื้อไอโซเลทที่ได้นี้ก็ทำให้เกิดโรคกับแตงกวา แตงกวาดอง และแตงไทย เช่นกัน และเขาได้จัดเชื้อไอโซเลทที่ได้นี้เป็นพาโทไทป์ที่ 3 ส่วนในฟักทอง น้ำเต้า และบวบ จะเกิดแผลสีซีดจางและไม่พบว่ามีการสร้างสปอร์แรงเจียมแต่อย่างใด



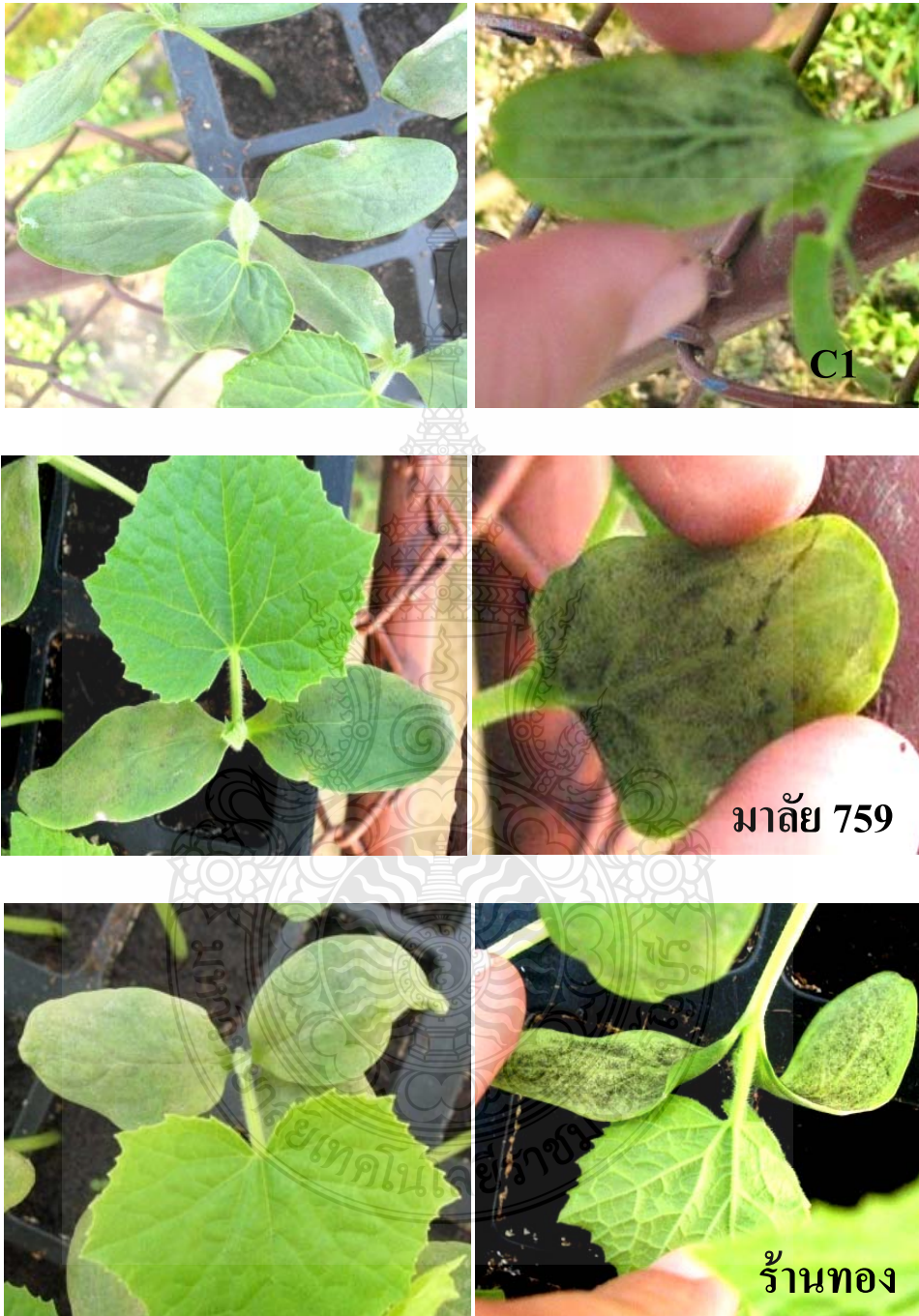
ตารางที่ 9 ปฏิบัติการเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชอาศัย เมื่อทดสอบกับเชื้อราน้ำค้างไอโซเลทจากภาคเหนือ

พืชอาศัย	ไอโซเลท											
	ลำปาง		ลำพูน			เชียงใหม่						
	1	3	4	5	8	9	10	11	12	13	14	
1. แดงกวา C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แดงกวา มาลัย 759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แดงร้านร้านทอง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. แดงไทย	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. Kamini	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PI420149(Freeman cucumber)*#8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. PI200819(95) # 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. แดงโมคำ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. ฟักทอง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. น้ำเต้า	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8. บวบเหลี่ยม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. แพง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. มะระจีน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ:

- + หมายถึง ปฏิบัติการแบบเข้ากันได้ (compatible) หรือ เชื่อสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้
- หมายถึง ปฏิบัติการแบบเข้ากันไม่ได้ (incompatible) หรือ เชื่อไม่สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้

1. แตงกวา (*Cucumis sativus*)



ภาพที่ 9 ลักษณะการเกิดโรคในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อราน้ำค้างไอโซเลทจากจังหวัดลำพูน
เป็นเวลา 7 วัน

2. แตงไทย (*Cucumis melo* var. *reticulatus*)



3. แตงกวาดอง (*Cucumis melo* var. *conomon*)



ภาพที่ 9 (ต่อ)

4. แตงกวาดอง (*Cucumis melo* var. *acidulus*)



5. แตงโมดำ (*Citrullus lanatus*)



6. ฟักทอง (*Cucurbita maxima*)



ภาพที่ 9 (ต่อ)

7. น้ำเต้า (*Lagenaria vulgaris*)



8. บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula*)



9. แฟง (*Benincasa hispida*)



10. มะระจีน (*Momordica charantia*)



ภาพที่ 9 (ต่อ)

4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis*

จากการนำน้ำค้ำไอโซเลทลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่ จำนวน 11 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าไม่เห็นแถบดีเอ็นเอรวม (genomic DNA) ซึ่งอาจจะเกิดจากปริมาณของดีเอ็นเอรวมมีน้อยเกินไป จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอรวมเมื่อตรวจโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อนำดีเอ็นเอรวมมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *COX2F-N* และ *COX2R* (Hudspeth และคณะ, 2000) จากผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 630 คู่เบส (base pair) ครั้งแรกไม่พบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าว และเมื่อนำมาทำซ้ำได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดระหว่าง 100-400 คู่เบส (ภาพที่ 10) Göker และคณะ (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *COX2* และ *NADH1* ของเชื้อ *P. humuli* และ *P. urticae* พบว่าเชื้อ *P. humuli* และ *P. urticae* อยู่ในกลุ่มที่จำแนกตามวิวัฒนาการ (Clade) เดียวกัน และมีความเหมือนกันมาก การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนใดยีนหนึ่ง ในการแยกหรือวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมนั้นเป็นไปได้ยาก สำหรับ *COX2* เป็นยีนบนไมโทคอนเดรียมีการอนุรักษ์สูง ความผันแปรมีค่อนข้างน้อย

จากนั้นได้ทดสอบและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษารา *Fusarium* และ *Phytophthora* spp. (Bogale คณะ, 2005) ผลปรากฏว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถนำมาใช้กับรา *P. cubensis* ได้ เพราะสามารถแยกขนาดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ 7 คู่ คือ MB2, MB5, MB10, MB11, MB14, MB17 และ MB18 ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน โดยคู่ไพรเมอร์ MB2 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ขนาดประมาณ 90, 130, 210, 220 และ 380 คู่เบส (ภาพที่ 11) คู่ไพรเมอร์ MB5 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ขนาด 150 และ 220 คู่เบส (ภาพที่ 12) คู่ไพรเมอร์ MB10 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ขนาดประมาณ 150, 210 และ 220 คู่เบส (ภาพที่ 14) คู่ไพรเมอร์ MB11 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันบน 3% TAE อะกาโรสเจล 2 แถบ ขนาดประมาณ 90 และ 380 คู่เบส (ภาพที่ 15) คู่ไพรเมอร์ MB 14 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ขนาดประมาณ 150 และ 380 คู่เบส (ภาพที่ 17) คู่ไพรเมอร์ MB17 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ขนาดประมาณ 100 และ 120 คู่เบส (ภาพที่ 18) คู่ไพรเมอร์ MB18 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ขนาดประมาณ 150, 350 และ 380 คู่เบส (ภาพที่ 19) ส่วนคู่ไพรเมอร์ MB9 (ภาพที่ 13) และ MB13 (ภาพที่ 16) ไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน

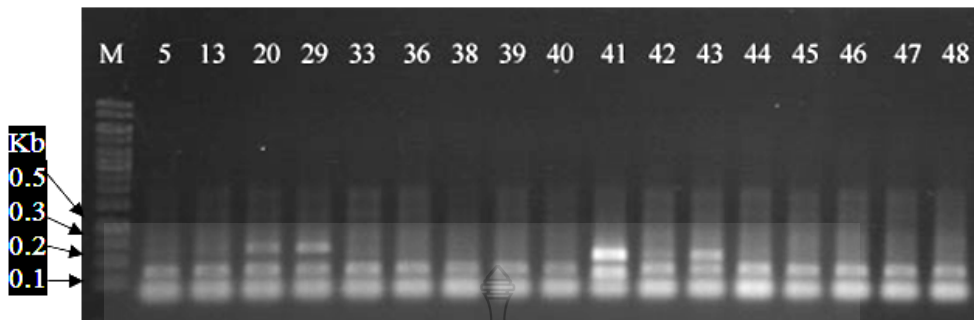
เมื่อนำข้อมูลเบื้องต้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์คู่ที่ให้ความแตกต่าง มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม Treecon ตั้งค่า Bootstrap ที่ 100 แบบ Neighbor-joining

และเลือกใช้วิธี UPGMA สร้างแผนภูมิกลุ่มประชากร สามารถแบ่งกลุ่มประชากรของรา *P. cubensis* ได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 20) โดยตัวอย่างเชื้อจากภาคเหนือ จำนวน 11 ไอโซเลต ในการทดลองนี้ ถูกจัดอยู่ใน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 (ภาพที่ 20)

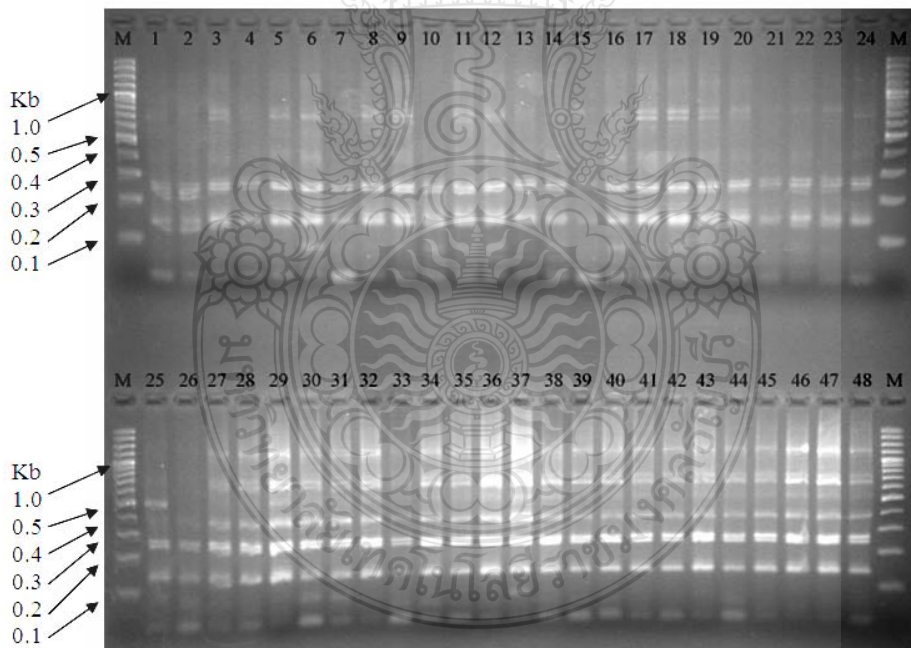
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต 1 (iso1) จากจังหวัดลำปาง ไอโซเลต 5 (iso5) และ ไอโซเลต 7 (iso7) จากจังหวัดลำพูน ไอโซเลต 12 (iso12) ไอโซเลต 13 (iso13) และ ไอโซเลต 14 (iso14) จากจังหวัดเชียงใหม่

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต 4 (iso4) จากจังหวัดลำพูน ไอโซเลต 8 (iso8) ไอโซเลต 9 (iso9) ไอโซเลต 10 (iso10) และ ไอโซเลต 11 (iso11) จากจังหวัดเชียงใหม่

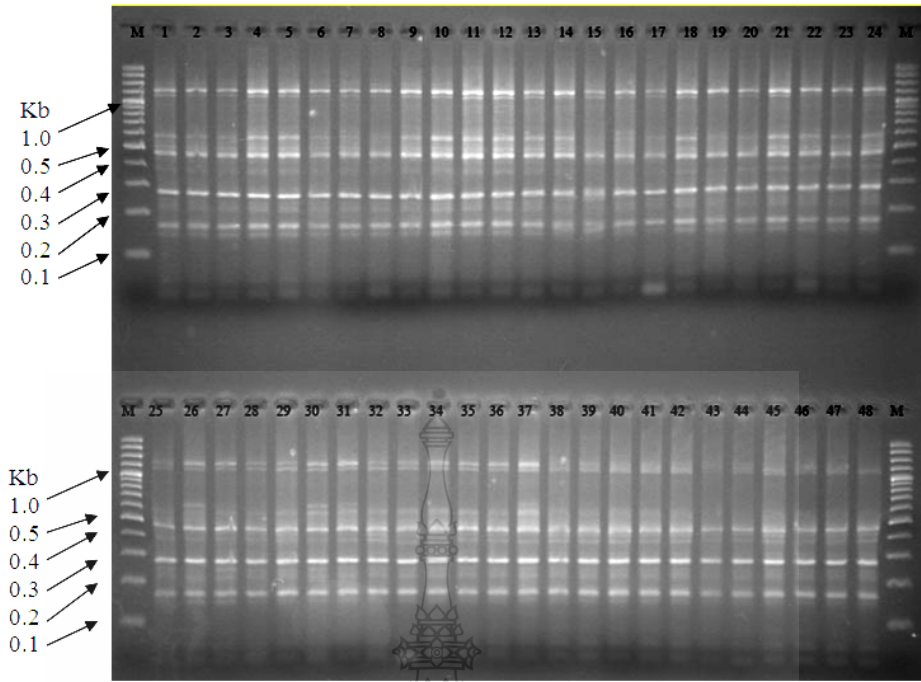
จะเห็นได้ว่าตัวอย่างทั้ง 11 ไอโซเลต มีประชากรที่ลักษณะทางพันธุกรรมมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับระยะมาตรฐาน (10%) การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากราสปิซีส์อื่น เพื่อใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *P. cubensis* นั้น เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนเท่าการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค AFLP การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม เช่น การจำแนกชนิดและลักษณะของเชื้อรา *Microbotryum violaceum* ที่เป็นสาเหตุของโรคราเขม่าดำในอับละอองเกสร (Bucheli และคณะ, 1998) และการจำแนกชนิดและลักษณะของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ซึ่งเป็นราแมลง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนก (Rehner และ Buckley, 2003)



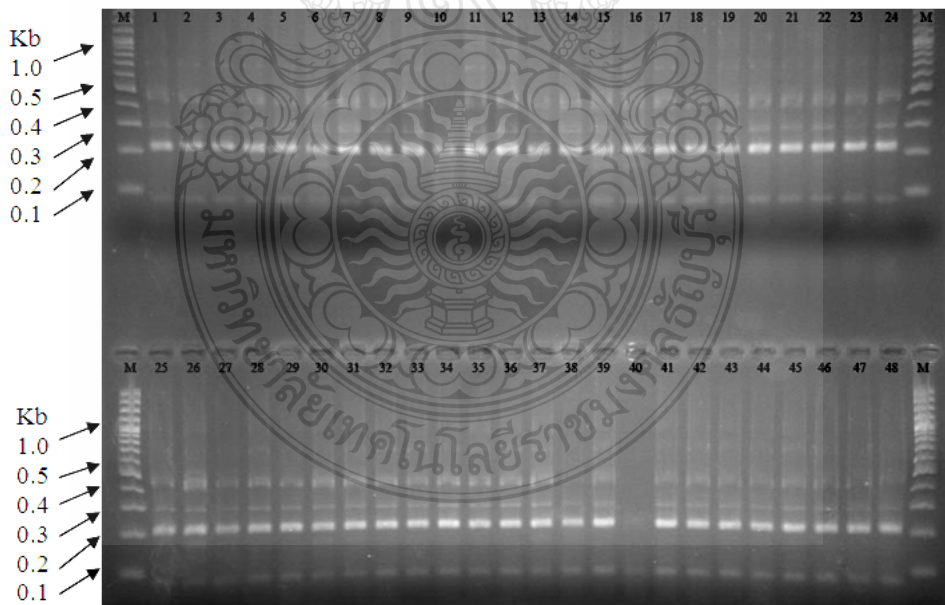
ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *COX2* และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



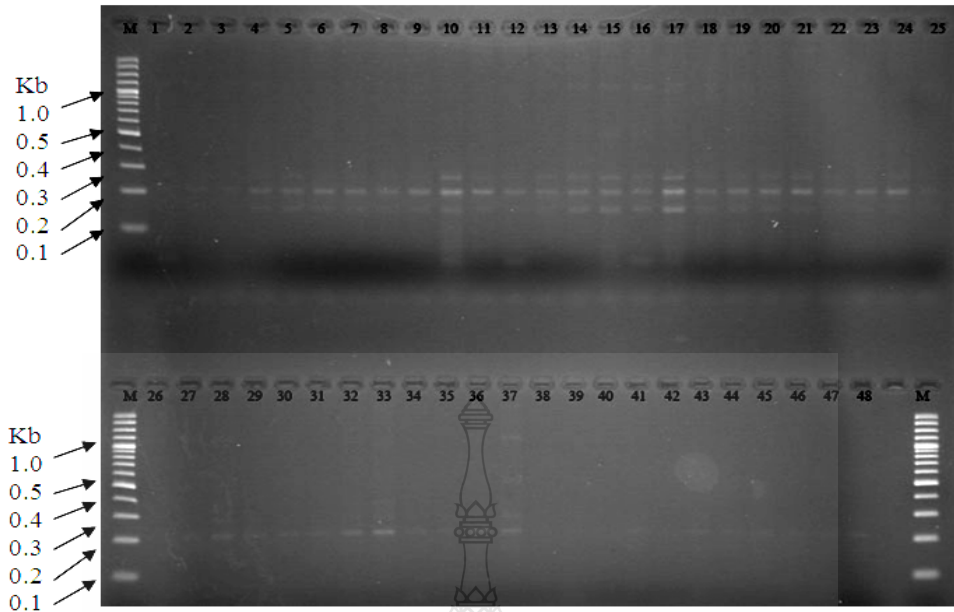
ภาพที่ 11 สายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB2 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



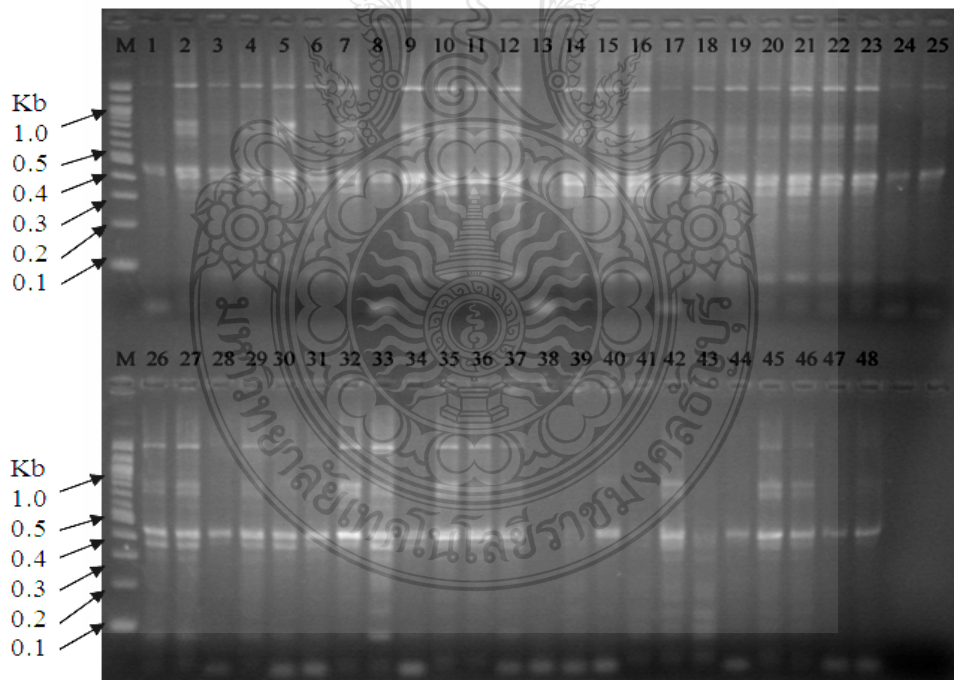
ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB5 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



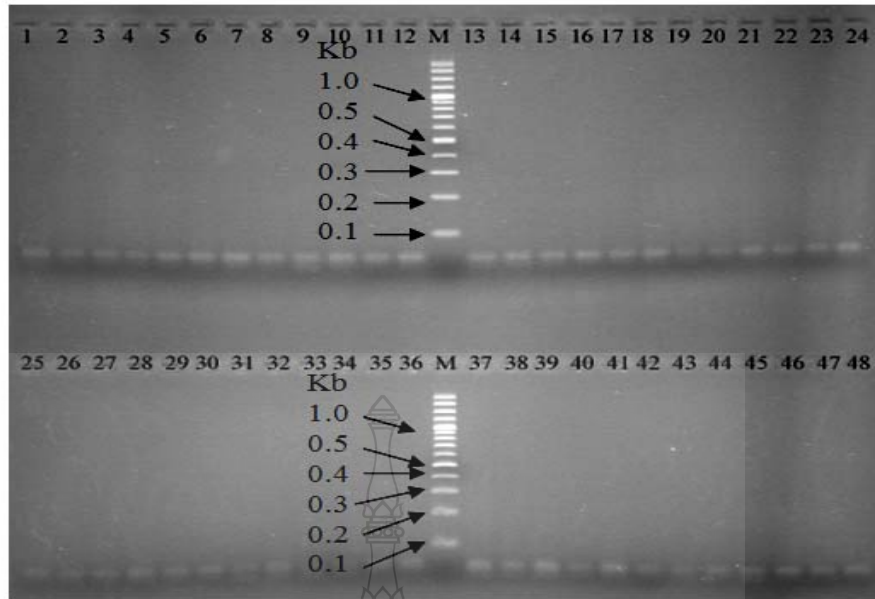
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB9 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



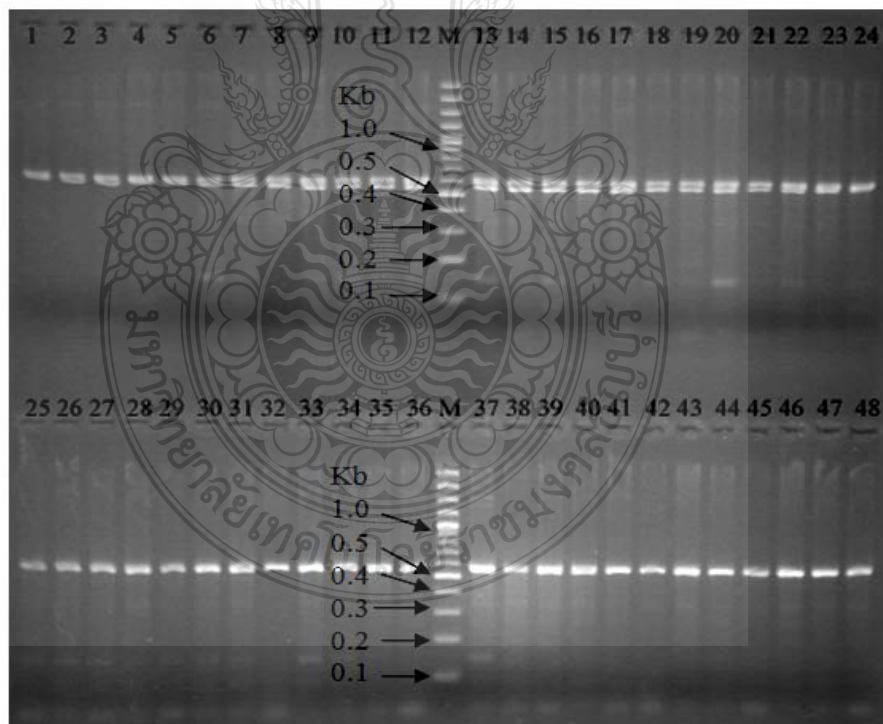
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB10 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



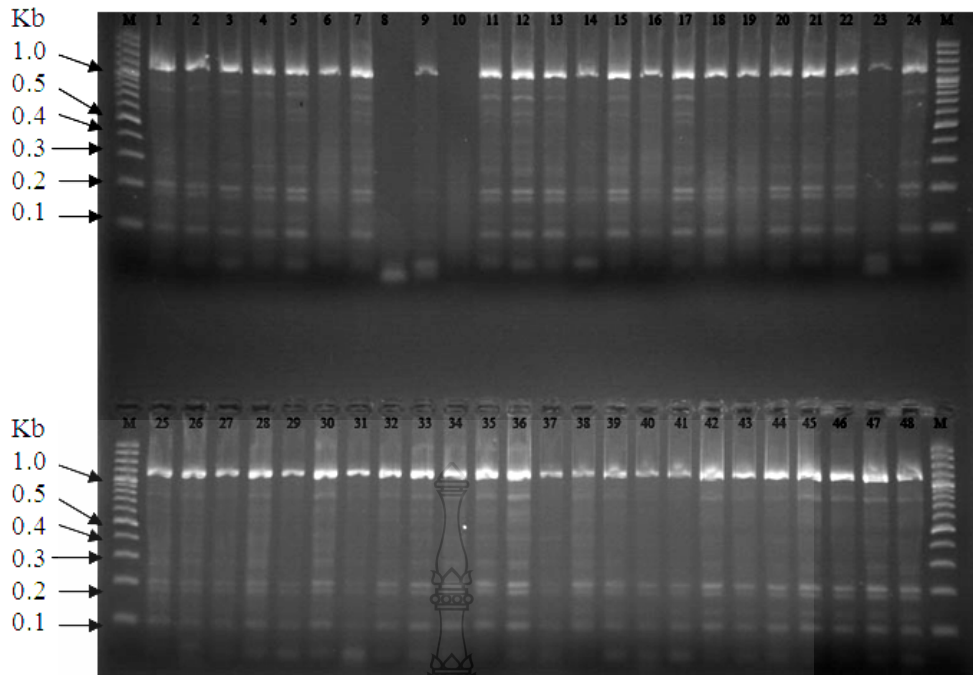
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB11 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



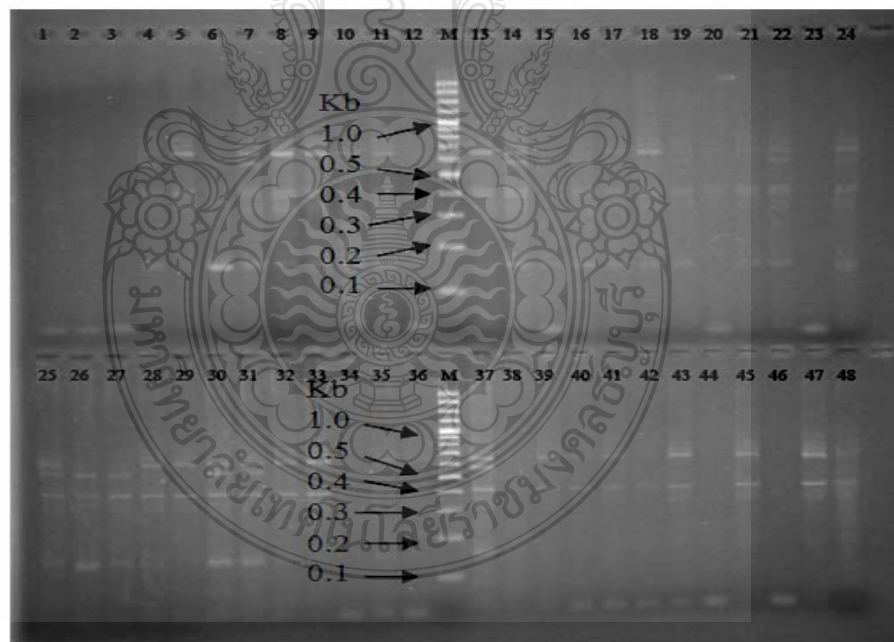
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB13 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



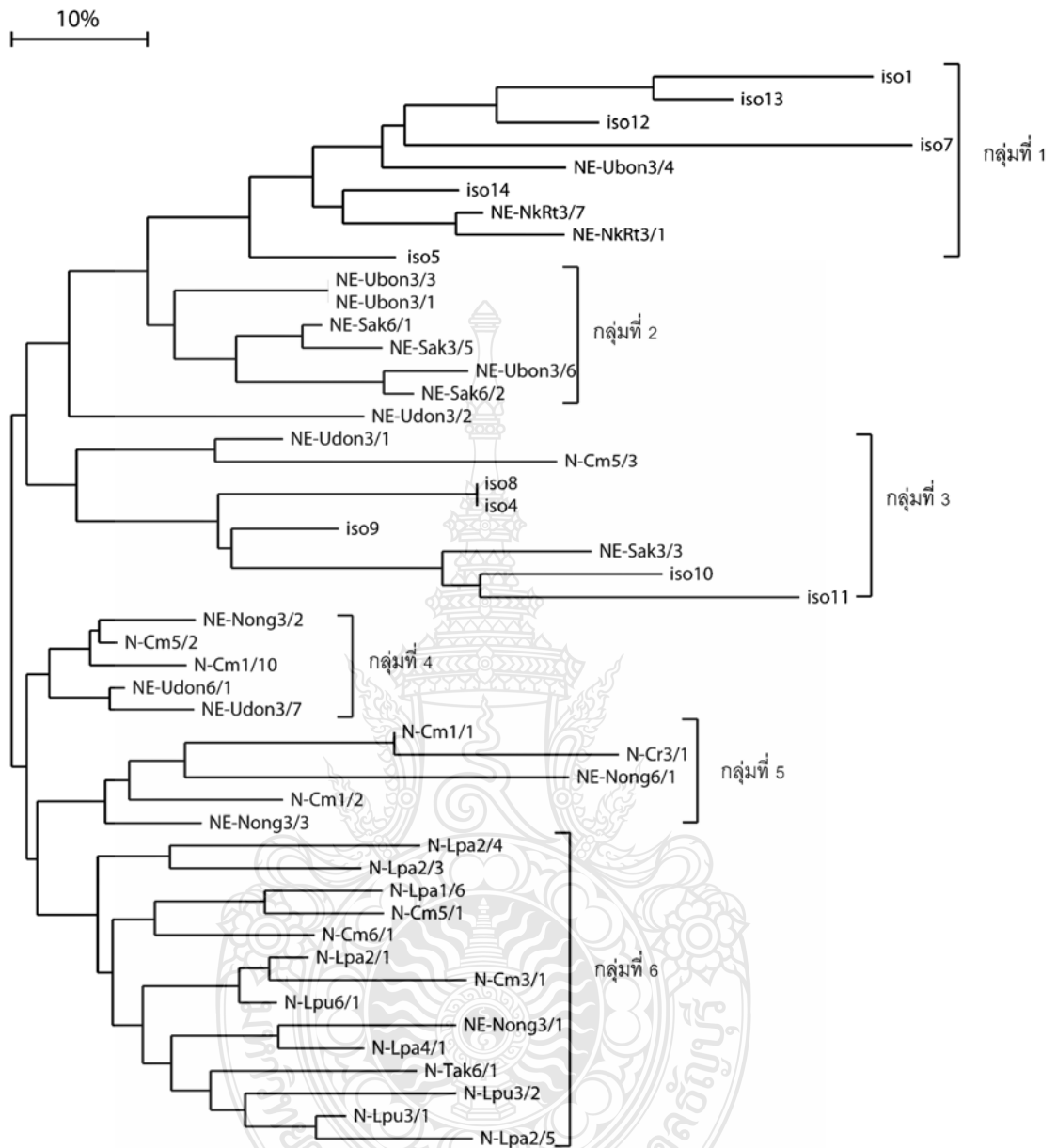
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB14 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB17 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Pseudoperonospora cubensis* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ MB18 และเปรียบเทียบขนาดด้วยแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ไอโซเลท 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 (ช่องเจลที่ 38-48)



ภาพที่ 20 แผนภูมิประชากรพันธุศาสตร์ของรา *Pseudoperospora cubensis* จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวม

จากแหล่งต่างๆ จำนวน 48 ตัวอย่าง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MB2-MB18 รวม 9 คู่ (ตารางที่ 5)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างของแตงกวาในภาคเหนือ สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้าง (*Pseudoperonospora cubensis*) จากจังหวัดลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่ จำนวน 11 ไอโซเลท ลักษณะอาการโรคที่พบบนใบแตงกวาจะเป็นแผลสีเหลือง รูปร่างของแผลมีลักษณะเป็นเหลี่ยมซึ่งถูกจำกัดด้วยเส้นใบ เมื่อเชื้อเข้าทำลายมากขึ้นแผลจะขยายและดูกลม ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้งในที่สุด โดยเชื้อมีการสร้างสปอร์แรงเจียมบริเวณใต้ใบตรงตำแหน่งของแผล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *P. cubensis* พบว่าก้านชูสปอร์แรงเจียมมีขนาด $255.3 - 323.9 \times 10.0 - 15.9 \mu\text{m}$ และโคนก้านมีลักษณะค่อนข้างโป่งออก สปอร์แรงเจียมขนาด $25.8 - 31.9 \times 16.9 - 20.1 \mu\text{m}$ มีรูปร่างรี (ellipsoidal) รูปไข่หัวกลับ (obvoid) และ รูปไข่ (ovoid) สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม
2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย ไอโซเลทของเชื้อราน้ำค้างทั้งหมดจัดอยู่ในพาโทไทป์ที่ 3
3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราน้ำค้างทั้งหมด 11 ไอโซเลท จำแนกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้
 - กลุ่ม 1 จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1 (จังหวัดลำปาง) ไอโซเลท 5 และ 7 (จังหวัดลำพูน) ไอโซเลท 12, 13 และ 14 (จังหวัดเชียงใหม่)
 - กลุ่ม 3 จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 4 (จังหวัดลำพูน) ไอโซเลท 8, 9, 10 และ 11 (จังหวัดเชียงใหม่)

บรรณานุกรม

- กัทลีวัลย์ สุขช่วย และ อนงค์ พืชชัยพหล. 2546. การคัดเลือกแตงกวา 141 พันธุ์/สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคน้ำค้างในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธีการปลูกเชื้อ. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. น. 289-303.
- ชัยวัฒน์ โตอนันต์. 2546. เอกสารประกอบการสอน ความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อสาเหตุของโรคในระดับโมเลกุล. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2548. แตงกวา. งานศูนย์บริการวิชาการและฝึกอบรม ฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio48-49/48-490007.htm (21 พฤศจิกายน 2553)
- นิพนธ์ ไชยมงคล. 2550. แตง. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยแม่โจ้. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา www.vegetweb.com/wp-content/download/Cucumber.pdf (29 พฤศจิกายน 2553)
- พีอาร์เน็ตเวิร์ค. 2553. อีสท์เวสต์ซีดป्लीม แล็บมาตรฐานอีสต้า (ISTA ACCREDITED LAB) แห่งแรกในประเทศไทย และ แล็บเอกชนแห่งแรกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา <http://www.pr-network.in.th/main/ews/140--ista-credited-lab-.html> (29 พฤศจิกายน 2553)
- लग नलकसं. 2548. ข่าวส่งเสริมการเกษตร. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา <http://phangnga.doe.go.th/tubpud/news.doc> (3 กรกฎาคม 2551)
- วารสารวิจัยรัฐ. 2548, ไม่เลื่อยกินได้, สุริยศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 120 น.
- วิลาสินี กวีกิจธรรมกุล ประสาทพร สมิตะมาน และ จานุลักษณ์ ขนบดี. 2550. เทคนิคในการคัดเลือกพันธุ์แตงกวาต้านทานต่อโรคน้ำค้างอย่างรวดเร็ว. น. 91-97. ใน รายงานการประชุมวิชาการ อารักขาพืช ครั้งที่ 8. พิษณุโลก.
- วิจัยรักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรีโปรดักท์. กรุงเทพฯ. 351 น.

- วิโรจน์ สุนทรภัก และ โสภภาพิณณ์ บถพิบูลย์. 2548. แดง. กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. 1 น.
- สุชาติพ ภมรประวัติ. 2551. หมอชาวบ้าน. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, กรุงเทพฯ. 87 น.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ปี 2547-2552. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=8115 (29 พฤศจิกายน 2553)
- Adkins, R.M., Honeycutt R. L. and Disotell, T. R. 1996. Evolution of Eutherian Cytochrome c Oxidase Subunit II: Heterogeneous Rates of Protein Evolution and Altered Interaction with Cytochrome c. *Mol. Biol. Evol.* 13(10):1393-1404.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. ELSEVIER Academic Press, Florida. 952 p.
- Ainsworth, G. C., Sutton, B. C., and Hawksworth, D. L. 1983. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of The Fungi*. 7th ed. CABI Publishing, Surrey. 655 p.
- Babadoost, M. 2001. Downy Mildew of Cucurbits. Report on plant disease No.927. Department of Crop Science. University of Illinois at urbana-champaign. 3 p.
- Becker, R. and Miller, S.A. 2009. Managing Downy Mildew in Organic and Conventional Vine Crops. Fact Sheet: Hyg-3127-09. Ohio State University. 4 p.
- Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Steenkamp, E. T. 2005. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex *Molecular Ecology Notes* 5(3): 622-624.
- Bucheli, E., Gautschi, B. and Shykoff, J. A. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum*. *Molecular Ecology* 7: 657-666.
- Choi, Y. W., Hyde, K. D. and Ho, W. H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38.
- Choi, Y-J, Hong, S-B, Shin H-D. 2006. A re-consideration of the *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humui* based on molecular and morphological data. *Mycol. Res.* 109 (7): 841-848.

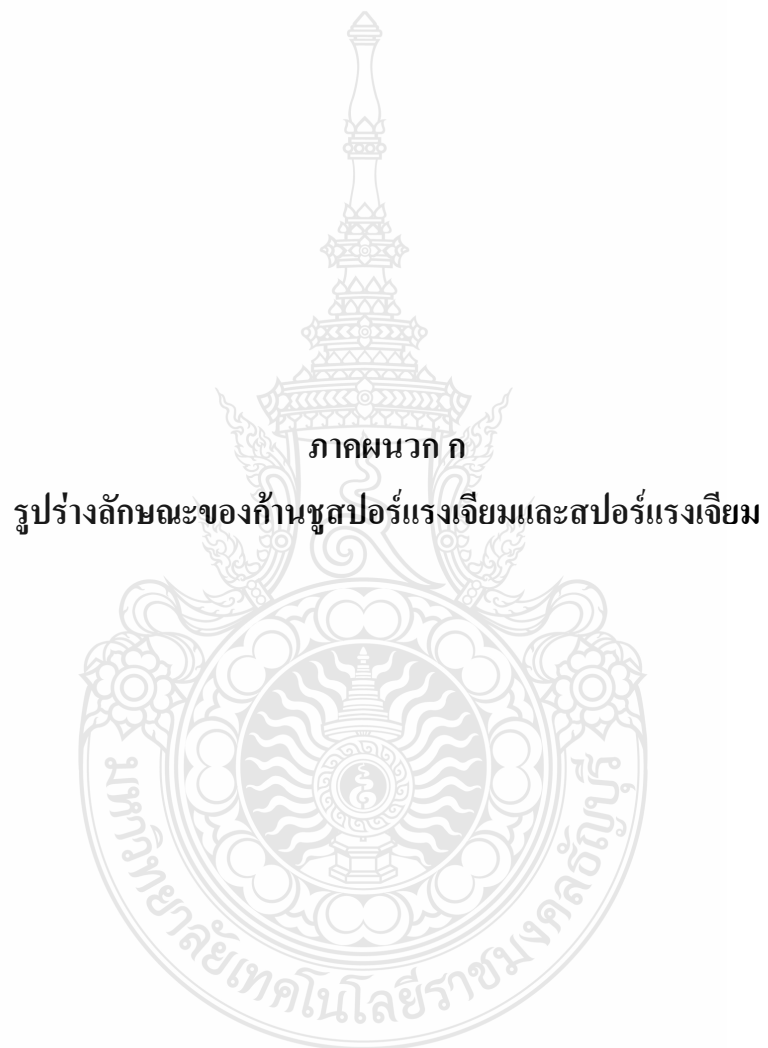
- Choi, Y. J. and Shin, H. D. 2008. First record at downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* on bottle gourd in Korea. *Plant Pathology* 57: 371.
- Cohen, Y., Meron, I. N. and Zuriel, S. 2003. A new pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew to cucurbits in Israel. *Phytoparasitica* 31: 458-466.
- Colucci, S. J. 2008. Host Range, Fungicide Resistance and Management of *Pseudoperonospora cubensis*, Causal Agent of Cucurbit Downy mildew. M. S. Thesis. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 156 p.
- Donald, M. F. 1914. Downy mildew of Cucurbits. Department of Plant Pathology and Crop Physiology. Louisiana State University.
- Doran, W.L. 1932. Downy mildew of cucumbers. Mass. Agric. Exp. St. Bull. No. 283.
- Doruchowski, R. W. and Lakowska-Ryk, E. 1992. Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* Berk&Curt) in *Cucumis sativus*. Pp. 66-69. In R. W. Doruchowski (ed.). Proceedings of the 5th Eucarpia Cucurbitaceae Symposium. Skierniewice-Warazawa, Poland.
- Gema, Markus and Voglmayr. 2007. Phylogeny of Peronospora, parasitic on Fabaceae, based on ITS sequences. *Mycological Research* 112: 502-512.
- Gunter, C. 2006. Vegetable Crops Hotline. Southwest Purdue Agricultural. 466 p.
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., and Oberwinkler, F. 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* 44(2): 105-122.
- Ho, W. C. and Ko, W. H. 1997. A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38: 41-44.
- Hudspeth, D. S. S., Nadler, S. A. and Hudspeth, M. E. S. 2000. A *cox2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* 92(4): 674-684.
- Hudspeth, D. S. S., Nadler, S. A. and Hudspeth, M. E. S. 2003. A *cox2* phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. *Fungal Diversity* 13: 47-57.

- Holmes, G. J., Colucci, S. J., and Adams, M. L. 2008. Fungicide Resistance and Pathotype Determination Of *Pseudoperonospora cubensis*, Causal Agent Of Cucurbit Downy Mildew. North Carolina State University.
- Jenkins, J.M. 1942. DOWNY MILDEW RESISTANCE IN CUCUMBER. J. Hered. 33:36-38.
- Kirk, P.M., Cannon, P. F., David, J.C. and Staples, J. A. 2001. Dictionary of the Fungi. 9th ed. CABI Publishing, Surrey. 655 p.
- Lebeda, A. and Cohen, Y. 2010. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. European Journal of Plant Pathology 129: 157-192.
- Lindenthal, M. , Steiner, U., Dehne, H.-W. and Oerke, E.-C. 2005. Effect of Downy Development on Transpiration of Cucumber Leaves Visualized by Digital Infrared Thermography. The American Phytopathological Society 95: 233-240.
- Mackenzie, C.M. 2010. How to Control Downy Mildew on Cucumbers. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา http://www.ehow.com/how_7366759_control-downy-mildew-cucumbers.html (29 พฤศจิกายน 2553)
- Palti, J. 1974. The significance of pronounced divergences in the distribution of *Pseudoperonospora cubensis* on its crop hosts. Phytoparasitica 2: 109-115.
- Palti, J. and Cohen, Y. 1980. Downy mildew of Cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The fungus and Its Host, Distribution, Epidemiology and Control. Phytoparasitica 8(2):109-147.
- Patzak, J. 2005. PCR detection of *Pseudoperonospora humuli* and *Podosphaera macularis* in *Humulus lupulus*. Plant Protect. Sci. 41: 141-149.
- Rehner, S. A. and Buckley, E. P. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Molecular Ecology Notes: 409-411.

- Riethmüller, A., Vogmayr, H., Göker, M., Weiß, M. and Oberwinkler, F. 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronospora) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94(5): 834-849.
- Savory, A.E., Granke, L.L., Lina, M., Varbanova, M., Hausbeck, K.M. 2011. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular Plant Pathology* 12: 217–226.
- Thines, M., Göker, M., Telle, S. and Ryley, M. 2008. Phylogenetic relationship of graminicolous downy mildew based on cox2 sequence data. *mycological research* 112: 345-351.
- Thomas, C. E. 1996. Downy mildew. Pp. 24-26. *In* T. A. Zitter, D. L. Hopkins and C. E. Thomas, eds. APS Press, St. Paul. MN.
- Thomas, C. E., Inaba, T. and Cohen, Y. 1987. Physiological specialization in *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology* 77: 1621-1624.
- Thomas, C. E., Cohen, Y., McCreight, Y. D., Jourdain, E. L. and Cohen, S. 1988. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo*. *Plant Dis.* 72: 33-35.
- Vliet Van, G. J. A. and Meijsing, W. D. 1974. Inheritance of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost. in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 23 : 251–255.
- Waterhouse, G. M. and Brothers, M. P. 1981. The Taxonomy of *Pseudoperonospora*. *Mycological Papers*, No. 148. CMI Kew Surrey England.
- Wenjing, L.J. 1991. On the change of enzyme activities of cucumber leaf infected by *Pseudoperonospora cubensis*. *Acta Phytopathologica Sinica*. 1991-04.
- Wenming, L.Q. 1993. The resistant mechanism of cucumber varieties to Downy mildew. *Acta Agriculturae Boreali—Sinica*. 1993-01.

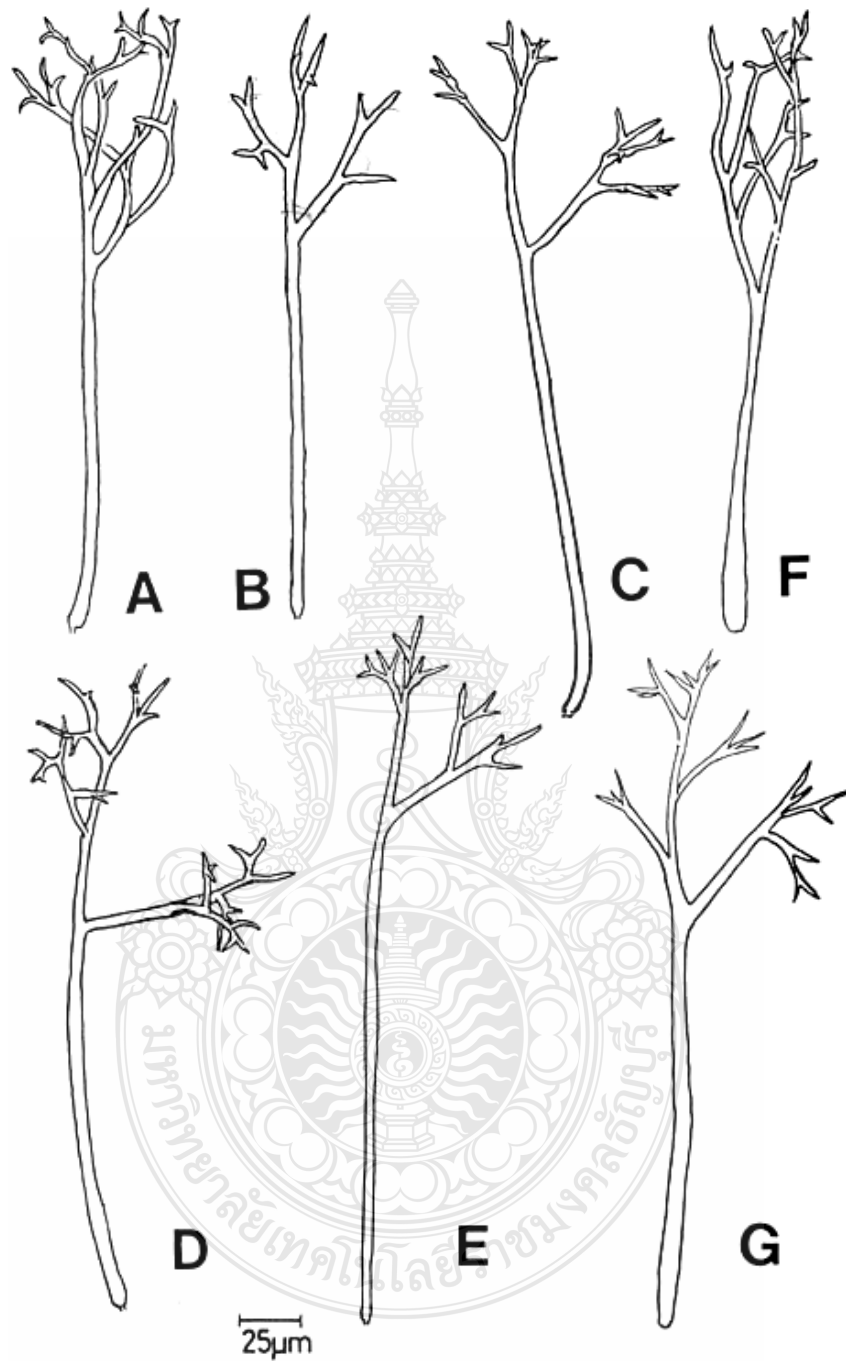
ภาคผนวก





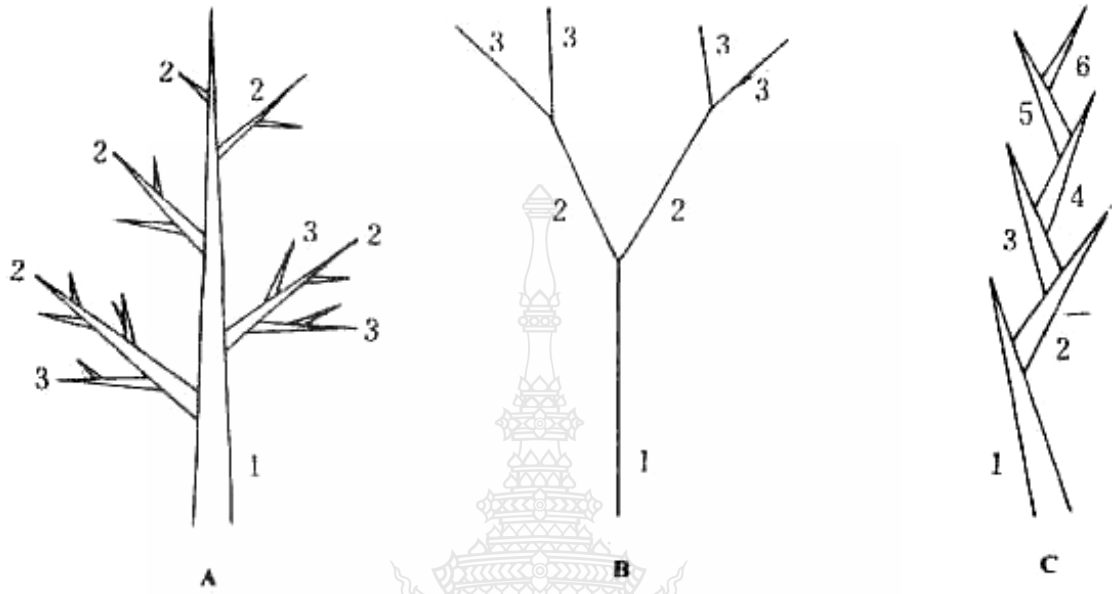
ภาคผนวก ก

รูปร่างลักษณะของกำนชูสปอร์แรงเจียมและสปอร์แรงเจียม



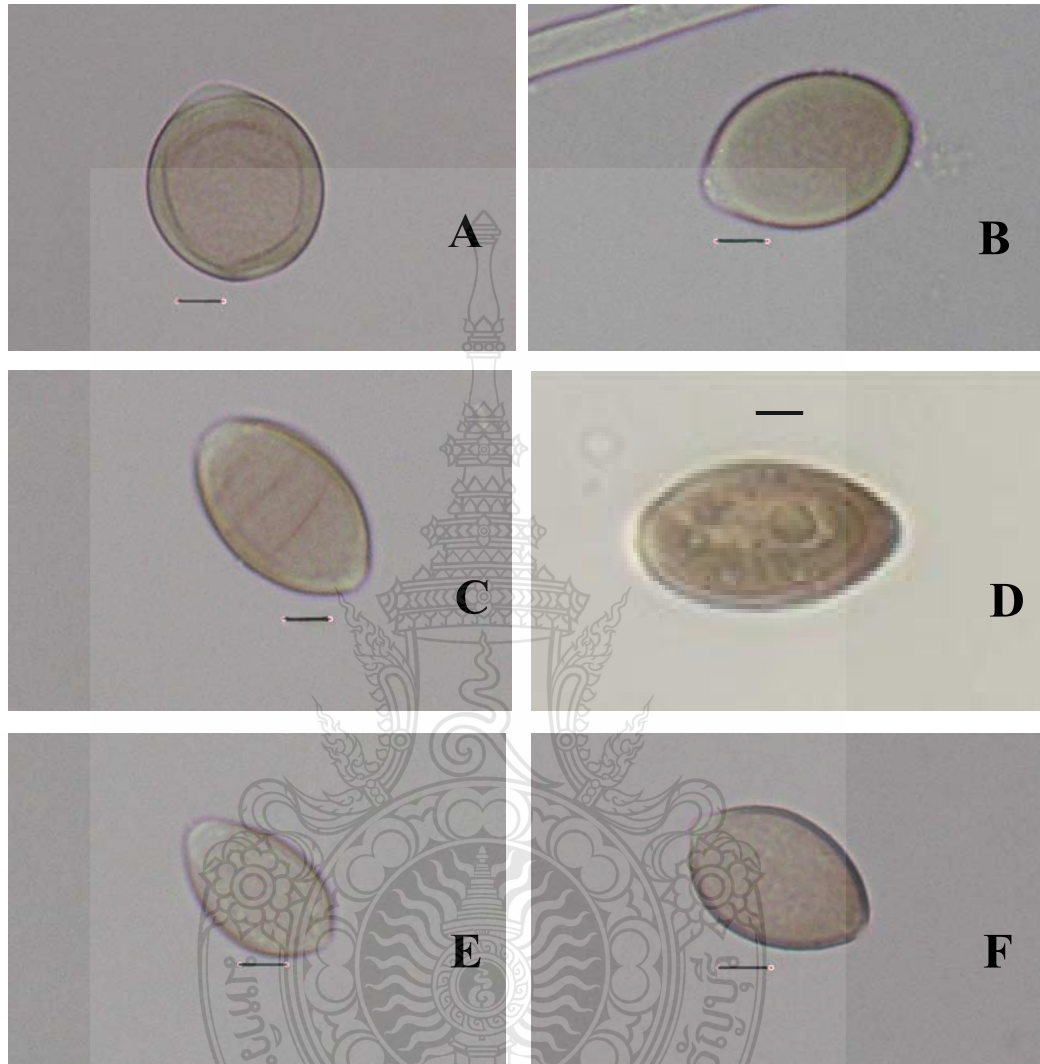
ภาพผนวกที่ 1 โครงร่างของก้านชูสปอร์แรงเจียมแบบต่างๆ ของรา (A) *Pseudoperonospora cubensis* (B) *P. urticae* (C) *P. cannabina* (D) *P. humuli* (E) *P. cetidis* (F) *P. cassia* และ (G) *Pseudoperonospora* spp.

ที่มา : Waterhouse และ Brothers (1981)



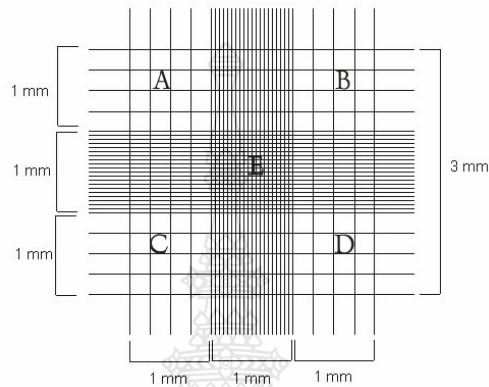
ภาพผนวกที่ 2 รูปแบบการแตกแขนงของก้านชูสปอร์ (A) Monopodial branching (B) Dichotomous branching และ (C) Sympodial branching

ที่มา : Ainsworth และคณะ (1983)



ภาพผนวกที่ 3 รูปร่างสปอร์แรงเจียมของรา *Pseudoperonospora cubensis* (A) รูปกลม (Globose) (B) รูปค่อนข้างกลม (Subglobose) (C) รูปรี (Ellipsoid) (D) รูปรีก้น (Oval) (E) รูปไข่ (Ovoid) และ (F) รูปไข่หัวกลับ (Obovoid)

ภาคผนวก ข
การคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อที่ปลูกบนพีช (Inoculum)
ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)



แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวนสปอร์ (Counting areas) A, B, C, D และ E

จากตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

วิธีการคำนวณ

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จะนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400$ ตารางมิลลิเมตร
3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.มม.
4. สมมุติว่าสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ.มม.
5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ. ซม หรือ 1 มล. ซึ่ง 1 มล. เท่ากับ 1000 ลบ.มม.

$$\begin{aligned}
 \text{ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ. มม. นับสปอร์ได้} &= Y \text{ สปอร์} \\
 \text{ถ้าใน 1000 ลบ. มม. (1 มล.) จะมีสปอร์} &= Y \times 1000 \times 1/0.1 \text{ สปอร์} \\
 &= Y \times 1 \times 10^4 \text{ สปอร์ / มล.}
 \end{aligned}$$

6. ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุติจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์ / มล.

7. การตรวจนับสปอร์เพื่อวัดความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้สปอร์แขวนลอยมีกระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับหลายๆครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือ เซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน Scale ของ Haemocytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 สปอร์/มล. เป็นต้น

ภาคผนวก ค
ชุดพืชทดสอบใช้ในการจำแนกพาโทไทป์ของรา *Pseudoperonospora cubensis*



ลำดับ ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ ภาษาอังกฤษ	ชื่อสามัญ ภาษาไทย	พันธุ์ที่ใช้ทดสอบ	แหล่งที่มาของ เมล็ดพันธุ์
1	<i>Cucumis sativus</i>	cucumber	แตงกวา	C1 ลูกผสมมาลัย 759 ร้านทอง	สถาบันฯลำปาง บ.เจียไต๋ บ.เพื่อนเกษตรกร
2	<i>Cucumis melo</i> var. reticulatus	muskmelon	แตงไทย	-	บ.เจียไต๋
3	<i>Cucumis melo</i> var. conomon	Oriental pickling melon	แตงกวาดอง	Kamini PI420149(Freeman cucumber)*# 8	บ.เจียไต๋ USA, Kansas
4	<i>Cucumis melo</i> var. acidulus	pickling melon	แตงกวาดอง	PI200819(95) # 1	Myanmar, Mandaley
5	<i>Citrullus lanatus</i>	watermelon	แตงโม	แตงโมพันธุ์เปลือกดำ	บ.เจียไต๋
6	<i>Cucurbita maxima</i>	Pumpkin	ฟักทอง	-	บ.เจียไต๋
7	<i>Lagenaria vulgaris</i>	Bottle gourd	น้ำเต้า	-	บ.advance seeds
8	<i>Luffa acutangula</i>	Angle luffah	บวบเหลี่ยม	บวบเหลี่ยมลูกผสม	บ.เจียไต๋
9	<i>Benincasa hispida</i>	White gourd	ฟ่าง	-	บ.เจียไต๋
10	<i>Momordica</i> <i>charantia</i>	Bitter gourd	มะระ	มะระจีน	บ.TSA

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราน้ำค้าง

1. Homogenization Buffer

Tris-HCl	50 mM
NaCl	0.1 M
sucrose	0.2 M
EDTA	10 mM
pH 8.0	
2% β -mercaptoethanol	

2. Lysis Buffer

Tris-HCl	50 mM
EDTA	50 mM
2.5 % SDS	
pH 8.0	

3. Precipitation Buffer

potassium acetate	3M
pH 5.2	



ภาคผนวก จ
การประเมินระดับการเกิดโรคราน้ำค้างในชุดพืชทดสอบ
หลังการปลูกเชื้อราน้ำค้างไอโซเลตต่างๆ

ตารางผนวกที่ 2 การเกิดโรคน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อรา น้ำค้าง ไอโซเลท ที่ 3

พืชทดสอบ	หลังปลูกเชื้อ 3 วัน		หลังปลูกเชื้อ 7 วัน		หลังปลูกเชื้อ 10 วัน		หลังปลูกเชื้อ 14 วัน	
	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม
1. แดงกวา C1	0	0	1.18	1.665	11.91	5.98	15.28	35.415
แดงกวา มาลัย 759	0	0	1.87	2.665	24.83	7.5	34.64	20.25
แดงร้านร้านทอง	0	0	1.275	2	23.59	19.75	35.935	31.665
2. แดงไทย (ตราสิงห์โต)	0	0	0	0.5	4.12	2.25	19.37	8.75
แดงไทย (เจียไต๋)	0	0	0.77	2.6	10.44	11.4	49.66	45
3. แดงกวาดอง Kamini	0	0	3.055	1.9	24.68	17.3	48.845	44.7
แดงกวาดอง PI420149 #8	0	0	2.89	1.9	32.625	3.375	71.36	54.165
4. แดงกวาดอง PI200819(95) # 1	0	0	1.705	2.08	26.165	12.25	55.63	57.08
5. แดงโมคำ	0	0	0.29	1.125	1.54	3.5	2.31	3.875
6. ฟักทอง	0	0	0	0	0	0	0	0
7. น้ำเต้า	0	0	1.33	1.875	4.625	1.625	2.27	5.5
8. บวบเหลี่ยม	0	0	0	0	0	0	0	0
9. แฝง (เจียไต๋)	0	0	0.33	0	5.33	0	7.5	0
10. มะระจีน	0	0	0	0	0	2	0	3.75

ตารางผนวกที่ 3 การเกิดโรคน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อรา น้ำค้าง ไอโซเลท ที่ 4

พืชทดสอบ	หลังปลูกเชื้อ 3 วัน		หลังปลูกเชื้อ 7 วัน		หลังปลูกเชื้อ 10 วัน		หลังปลูกเชื้อ 14 วัน	
	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม
1. แดงกวา C1	0	0	0.445	1.665	9.125	5.98	24.61	35.415
แดงกวา มาลัย 759	0	0	0.855	2.665	17.5	7.5	30.3	20.25
แดงร้านร้านทอง	0	0	1.12	2	15.88	19.75	29.61	31.665
2. แดงไทย (ตราสิงห์โต)	0	0	0	0.5	2.5	2.25	13.14	8.75
แดงไทย (เจียไต๋)	0	0	0.28	2.6	4.2	11.4	44.2	45
3. แดงกวาดอง Kamini	0	0	2.95	1.9	23.05	17.3	44.565	44.7
แดงกวาดอง PI420149 #8	0	0	3.95	1.9	28.605	3.375	62.5	54.165
4. แดงกวาดอง PI200819(95) # 1	0	0	0.775	2.08	24.73	12.25	65.275	57.08
5. แดงโมคำ	0	0	0.09	1.125	1.045	3.5	1.59	3.875
6. ฟักทอง	0	0	0	0	0	0	0	0
7. น้ำเต้า	0	0	1	1.875	0.95	1.625	2.45	5.5
8. บวบเหลี่ยม	0	0	0	0	0	0	0	0
9. แฝง (เจียไต๋)	0	0	0	0	1.83	0	2.385	0
10. มะระจีน	0	0	0	0	0	2	0	3.75

ตารางผนวกที่ 7 การเกิดโรคน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อรา น้ำค้าง ไอโซเลท ที่ 10

พืชทดสอบ	หลังปลูกเชื้อ 3 วัน		หลังปลูกเชื้อ 7 วัน		หลังปลูกเชื้อ 10 วัน		หลังปลูกเชื้อ 14 วัน	
	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม
1. แดงกวา C1	0	0	8.43	2.25	33.75	3.9	51.1	24.2
แดงกวา มาลัย 759	0	0	10.8	2	36.28	5.875	52.25	16.5
แดงร้านร้านทอง	0	0	20.5	0	31.375	18.5	48.4	24.165
2. แดงไทย (ตราสิงห์โต)	0	0	27.22	0.4	37.75	1	48.25	0
แดงไทย (เจียไต๋)	0	0	10.045	2.4	47	5.75	49.77	4
3. แดงกวาดอง Kamini	0	0	10.58	2.775	29.975	19.75	46.375	40
แดงกวาดอง PI420149 #8	0	0	5.75	2.25	31.125	8.375	68.33	46.25
4. แดงกวาดอง PI200819(95) # 1	0	0	1.54	1.125	24.54	13.75	55.965	37.5
5. แดงโมคำ	0	0	0	0	4.315	2.875	4.29	3.25
6. ฟักทอง	0	0	2	1.625	0	0	0	0
7. น้ำเต้า	0	0	0	0	5.635	1.375	7.905	5.625
8. บวบเหลี่ยม	0	0	0	0.2	0.35	0	0.35	0
9. แฝง (เจียไต๋)	0	0	0	0	0	0	0	0
10. มะระจีน	0	0	8.43	2.25	0	2	0	3.75

ตารางผนวกที่ 8 การเกิดโรคน้ำค้างในชุดพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อรา น้ำค้าง ไอโซเลท ที่ 11

พืชทดสอบ	หลังปลูกเชื้อ 3 วัน		หลังปลูกเชื้อ 7 วัน		หลังปลูกเชื้อ 10 วัน		หลังปลูกเชื้อ 14 วัน	
	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม	ปลูกเชื้อ	ควบคุม
1. แดงกวา C1	0	0	1.64	1.665	13.875	5.98	22.65	35.415
แดงกวา มาลัย 759	0	0	1.94	2.665	23.34	7.5	36.645	20.25
แดงร้านร้านทอง	0	0	2.2	2	26.165	19.75	39.91	31.665
2. แดงไทย (ตราสิงห์โต)	0	0	0.83	0.5	6.5	2.25	36.66	8.75
แดงไทย (เจียไต๋)	0	0	2.3	2.6	10.7	11.4	45.7	45
3. แดงกวาดอง Kamini	0	0	5.125	1.9	25.875	17.3	50.5	44.7
แดงกวาดอง PI420149 #8	0	0	2.975	1.9	23.325	3.375	53.83	54.165
4. แดงกวาดอง PI200819(95) # 1	0	0	2.555	2.08	24.94	12.25	51.155	57.08
5. แดงโมคำ	0	0	0.33	1.125	2.33	3.5	2.78	3.875
6. ฟักทอง	0	0	0	0	0	0	0	0
7. น้ำเต้า	0	0	0.755	1.875	2.025	1.625	2.52	5.5
8. บวบเหลี่ยม	0	0	0	0	0	0	0	0
9. แฝง (เจียไต๋)	0	0	0	0	0.6	0	2.05	0
10. มะระจีน	0	0	0	0	1.5	2	3.5	3.75

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุชีรา ธานีคำ
วัน เดือน ปีเกิด	21 มกราคม 2528
ที่อยู่	38/1 หมู่ที่ 1 ตำบลปากบ่อง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน 51120
การศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ. ศ. 2551
ประสบการณ์การทำงาน	พ. ศ. 2551- ปัจจุบัน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาการบริหารศัตรูพืช อย่างยั่งยืน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ผลงานทางวิชาการ	การนำเสนอผลงานภาคแผ่นภาพ ในหัวข้อ “ลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำ ค้างและการเกิดโรคในแตงกวา” ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)