

*Pythium insidiosum* จัดอยู่ใน Kingdom Straminipila, Phylum Oomycota, Order Peronosporales และ Family Pythiaceae เป็น aquatic fungus-like (มีลักษณะคล้ายเชื้อรา) อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำนิ่ง เชื้อ *P. insidiosum* เป็นเพียงสปีชีส์เดียวที่สามารถก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงคน และเป็นสาเหตุของโรค pythiosis ปัจจุบันพบรายงานผู้ป่วยโรค pythiosis มากขึ้น การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์บริเวณ Intergenic spacer 1 (IGS-1) gene ตั้งอยู่ระหว่าง 28S rDNA และ 5S rDNA subunit ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความซ้ำกัน และมีความหลากหลายในลำดับเบส ลำดับเบสบริเวณนี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ถึงในระดับสปีชีส์ ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ในประเทศไทย 10 สายพันธุ์, เชื้อ *Pythium* 1 สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อมซึ่งได้จากน้ำในเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.ลพบุรี และเชื้อที่ก่อโรคในพืช 1 สายพันธุ์ คือ เชื้อ *P. graminicola* โดยเชื้อทั้งหมดได้พิสูจน์และยืนยันจากการศึกษาลักษณะมหสังฐาน, จุลสังฐาน และการสร้าง zoospore ในการศึกษาได้ทำการศึกษาลำดับเบสในส่วน rRNA gene ตั้งแต่ 28S ถึง 5S ซึ่งครอบคลุมลำดับเบสบริเวณ IGS-1 ผลที่ได้พบว่าลำดับเบสในส่วนอนุรักษ 28S และ 5S มีความยาวประมาณ 2,500 คู่เบส และ 55 คู่เบสตามลำดับ ในเชื้อ *P. insidiosum* 10 สายพันธุ์จากผู้ป่วย pythiosis, เชื้อ *Pythium* ที่แยกได้จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ และ เชื้อ *Pythium* ที่ก่อโรคในพืช คือ *P. graminicola* ส่วนบริเวณ IGS-1 นั้นมีความยาวของลำดับเบสประมาณ 1,400-1,500 คู่เบส ในเชื้อ *P. insidiosum* 10 สายพันธุ์จากผู้ป่วย pythiosis และเชื้อ *Pythium* ที่แยกได้จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ ส่วนเชื้อ *P. graminicola* มีความยาวประมาณ 1,000 คู่เบส และนำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ IGS-1 มาวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 3.1 พบว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วย M17, PyCU3, PyCU7 และ 1 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากน้ำในเขื่อนป่าสัก คือ PyCU8, กลุ่ม 2 ประกอบด้วย PyCU1, PyCU2, และ PyCU5 และกลุ่ม 3 ประกอบด้วย PyCU6, MMC45P21-2, PyCU4 และ MMC44P21-1 ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อ *P. insidiosum* ในกลุ่ม 1 เป็นเชื้อที่มาจากผู้ป่วยทางภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคอีสาน, กลุ่ม 2 เป็นเชื้อที่มาจากผู้ป่วยทางภาคกลางของประเทศไทย และกลุ่ม 3 จากผู้ป่วยทางภาคเหนือ ของประเทศไทย

*Pythium insidiosum* is classified in Kingdom Straminipila, Phylum Oomycota, Order Peronosporales and Family Pythiaceae based on the ribosomal DNA information, mainly. This organism, an aquatic parafungus, lives in stagnant water. Up to now, *P. insidiosum*, only one species in genus *Pythium*, has been reported as an etiologic agent of pythiosis in mammalian including human. The incidence of this disease has been increasing, so the rapid and accurate diagnosis is required. In this study, we focus on the analysis of Intergenic Spacer 1 (IGS-1) rRNA region. This region is located as a bridge between 28S rDNA and 5S rDNA subunits. This single locus is more variable than existing loci, resulting the advantage to exploit as a tool to differentiate the strains level. After confirming the tested strains which were isolated from patients with pythiosis, an environmental strain from Pasak Dam, and a strain of *P. graminicola* which is a plant pathogen, on the aspects of their morphology and zoospore production, all of their genomic DNAs were prepared for the IGS-1 analysis. Cloning and walking sequence of the PCR product using primers designed from 28S rDNA and 5S rDNA were the techniques using to analyse the IGS-1 region. The result demonstrated that the conserved sequences were revealed in the 2.5 Kb of 28S rRNA region and 55 bp of 5S rRNA region among the 10 strains from patients, a strain from environment and *P. graminicola*. It is of interesting that the DNA polymorphism was demonstrated in the region of IGS-1, 1.4-1.5 Kb, in 10 strains from pythiosis patients, a strain from environment, Pasak Dam and 1 Kb in *P. graminicola*. To demonstrate the relationship among these strains, the phylogenetic tree using program MEGA 3.1 was performed. The result showed that all these strains were separated into 3 groups. The first group (group 1) is composed of 3 strains from pythiosis patient, M17, PyCU3, PyCU7 and another strain, PyCU8 from environment. The second group (group 2) is composed of 3 strains of *Pythium* isolated from pythiosis patient, PyCU1, PyCU2 and PyCU5. The last group (group 3) is composed of 4 strains, PyCU4, MMC45P21-2, PyCU6 and MMC44P21-1, all were isolated from pythiosis patients too. The origin of group 2 and group 3 were derived from Central part and Northern part of Thailand, respectively, whereas that of group 1 was from Central, Northern and NorthEastern part. Further study is required even this study imply that the source of the organism is one of the factor involving in the grouping. This preliminary result will be very useful for epidemiologic study and the differentiation in the strain level.