บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* เข้าทำลาย พบว่ามีพืชอาศัยของเชื้อราดังกล่าวรวม 40 ชนิด (30 family) ประกอบด้วยวัชพืช ผัก ไม้ผล ไม้ดอกและไม้ประดับ ซึ่งบางชนิดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ สัก, มะละกอ, มะขาม, พุทรา, มะเขือเทศ และถั่วเหลือง เป็นต้น และจากตัวอย่างพืชทั้ง 40 ชนิดนี้มี 31 ตัวอย่างที่เป็นการรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทย โดยพบว่าพืชอาศัยที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลาย จะมีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมอยู่บนส่วนต่างๆ ของใบพืช เนื่องจากเชื้อราแป้งใน subgenus *Pseudoidium* นี้มีเส้นใยเจริญอยู่ภายนอกเซลล์พืช และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งเหล่านี้ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยลักษณะ รูปร่าง และขนาดของ conidia, conidiophore, foot cell, mycelium, appressorium และการงอกของ conidia ตามวิธีการของ Hirata (1942) พบว่าเชื้อราใน subgenus *Pseudoidium* มีลักษณะสำคัญดังนี้คือ สร้าง conidia เป็นแบบเดี่ยว (สร้าง conidia 1 conidium ต่อวัน) มีรูปร่างผันแปรไปตามชนิดของพืชอาศัยตั้งแต่ cylindric, ellipsoid, ovoid ถึง doliform ภายใน conidia ไม่มี fibrosin body บนก้าน conidiophore ที่มี foot cell เป็นแบบตรงหรือโค้งงอขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดพืช บริเวณเส้นใยมีการสร้าง appressorium แบบ lobe ซึ่งอาจเกิดแบบเดี่ยวและ/หรือแบบตรงกันข้าม เมื่อ conidia งอกมีการสร้าง germ tube เป็นแบบ polygoni type สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราแป้งใน subgenus *Pseudoidium* นั้น เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศที่อบอุ่น และมีความชื้นสูงตลอดทั้งปีทำให้เชื้อราแป้งที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อราแป้งดังกล่าว แต่จากการจัดจำแนกของ Braun and Takamatsu (2000) กลุ่มของเชื้อราแป้งที่สร้าง conidia แบบเดี่ยวนั้นมีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ใน tribus Erysipheae ซึ่งเชื้อราแป้งใน tribus นี้ประกอบด้วยเชื้อราแป้งใน genus *Typhulochaeta*, *Brasiliomyces* และ *Erysiphe* แต่เชื้อราแป้งในสอง genus แรกนั้นไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ ไม่มีการสร้าง conidia ส่วนเชื้อราแป้งใน genus *Erysiphe* ซึ่งประกอบด้วย 4 section ได้แก่ section *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* และ *Bulbouncinula* มีการสร้าง conidia จึงอาจกล่าวได้ว่า เชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัย 40 ชนิดนี้จัดอยู่ใน tribus Erysipheae genus *Erysiphe* แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียวใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนก ไม่สามารถระบุ section ได้ เนื่องจากว่าเชื้อราแป้งทั้ง 4 section มีการสร้าง conidia แบบเดี่ยวทั้งสิ้น (Takamatsu *et al.*, 2002) นอกจากนี้การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ยังมีความยุ่งยากในการจัดจำแนก เช่น เชื้อราแป้งที่พบบนคูน (*Cassia fistula*) ที่มีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง genera โดยสร้าง conidia ที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อราแป้งทั่วไปที่จัดอยู่ใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* นอกจากนี้ conidiophore ยังมีรูปร่างผอมบาง จากการศึกษาต่อมาพบว่าในปลายฤดูเพาะปลูก (บางปี) เชื้อราแป้งชนิดนี้สร้าง ascoma เป็นแบบเดียวกับเชื้อราแป้งใน genus *Phyllactinia* ซึ่งก่อให้เกิดความสับสนว่าเชื้อราแป้งที่มีการสร้าง conidia จะเป็นเชื้อราแป้งชนิดเดียวกับที่มีการสร้าง ascomata หรือไม่ เพราะตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาเชื้อราแป้งที่เข้าทำลายคูนยังไม่พบ conidia ที่มีรูปร่างเช่นเดียวกับ conidia ของเชื้อรา *Phyllactinia* (สร้าง conidia แบบเดี่ยว รูปร่าง clavate, oblanceolate, rhomboid หรือ angular ภายใน conidia ไม่มี fibrosin body, appressorium เป็นแบบ lobe, สร้าง germ tube แบบ polygoni ซึ่งจัดอยู่ใน genus *Ovulariopsis*) ซึ่งลักษณะที่มีการคาบเกี่ยวนี้อาจเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ทำให้ลักษณะดังกล่าวมีการแสดงออกผิดไปจากเดิม

จากการทำตัวอย่างแห้งใบพืชที่เป็นโรค โดยนำใบพืชมาวางบนคู่กระดาษหนังสือพิมพ์ นำไปใส่ในถุงพลาสติกที่มี silica gel อยู่และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น พบว่าใช้เวลาประมาณ 5-7 วันใบพืชจึงแห้งสนิท และต้องเปลี่ยนคู่กระดาษหนังสือพิมพ์ 2-3 วันต่อครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ใบพืชขึ้น เพราะหากใบพืชขึ้นจะทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าปนเปื้อนได้ การเก็บรักษาตัวอย่างพืชในสภาพอุณหภูมิห้องนี้สามารถเก็บใบพืชไว้ได้นาน แต่หากต้องการนำเชื้อราบนตัวอย่างแห้งใบพืชไปศึกษาต่อในด้านอณูชีววิทยานั้น ควรเก็บรักษาตัวอย่างแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เนื่องจากความเย็นจะทำให้ DNA ของเชื้อราไม่เสื่อมสภาพได้ง่าย และสามารถเก็บตัวอย่างแห้งไว้ได้นานกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อีกทั้งทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าปนเปื้อนได้น้อยลง

ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยทั้ง 40 ชนิด โดยใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเขี่ย conidia เดี่ยว ๆ ประมาณ 5-10 conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลงใน eppendorf tube ที่มี extract buffer ในหลอด ภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไป เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 600-700 เบส ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีนี้สามารถลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอได้ เพราะการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งโดยปกตินิยมใช้วิธีการเขี่ยเส้นใยของเชื้อราแป้งบนพืชอาศัยโดยตรงภายใต้กล้อง stereo microscope ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอเกิดการปนเปื้อนจากเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช ที่ติดมากับเข็มเขี่ยขณะเขี่ยเส้นใยของเชื้อราแป้ง หรือปนเปื้อนจากเส้นใยของเชื้อราชนิดอื่นที่อาศัยอยู่บริเวณผิวของพืชอาศัย ดังนั้นเพื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แก้ปัญหาการปนเปื้อนเหล่านี้จึงนำวิธีการเขี่ย conidia โดยตรงมาใช้ นอกจากนี้ควรสกัดดีเอ็นเอจาก conidia ของเชื้อราแป้งบนตัวอย่างพืชสด เพราะมีการปนเปื้อนน้อยกว่าตัวอย่างพืชแห้ง

จากการนำผลผลิตของ PCR มาหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS ของเชื้อราแป้งทั้ง 40 ชนิด พบว่าสามารถวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อราแป้งบนพืชอาศัยได้ 24 ชนิด ส่วนเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยที่เหลืออีก 16 ชนิดนั้นไม่สามารถวิเคราะห์หาลำดับเบสได้ ซึ่งจากการทดลองอีกหลายซ้ำมีแนวโน้มว่าอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ เพราะมีเชื้อราอื่นปะปนกับตัวอย่างเชื้อราแป้งที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส หรือตัวอย่างที่นำมาสกัดนั้นเกิดปัญหาการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดจากการสกัด ดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งบนตัวอย่างพืชแห้งที่เก็บไว้เป็นเวลานานดีเอ็นเอจึงเสื่อมสภาพ

เมื่อเปรียบเทียบผลจาก tree ที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกันคือ เชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยทั้ง 24 ชนิดจัดอยู่ใน tribus Erysipheae genus *Erysiphe* แต่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุถึง section ได้ ซึ่งการจัดจำแนกเป็นเพียงการคาดคะเน หากนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาร่วมในการจัดจำแนกจะทำให้การจัดจำแนกเชื้อราแป้งดังกล่าวมีประสิทธิภาพ และแม่นยำมากยิ่งขึ้น เช่น ในกรณีของเชื้อราแป้งที่พบบนคูน ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศคาบเกี่ยวกันระหว่าง genus ซึ่งก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก ต่อมาได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ร่วมโดยหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี rDNA sequencing พบว่าเชื้อราแป้งดังกล่าวมีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อราแป้งที่สร้าง ascomata ที่มี appendage เป็นแบบ bulbous base ซึ่งจัดอยู่ใน genus *Phyllactinia* ดังนั้นหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียวจะจัดเชื้อราแป้งที่พบบนคูนไว้ใน genus *Erisyphe* เมื่อนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาร่วมด้วยจึงสามารถจัดเชื้อราแป้งนี้อยู่ใน genus *Phyllactinia* อย่างไรก็ตามในการศึกษาเชื้อราที่มีความผันแปรสูง เช่น เชื้อราที่อยู่ต่าง genus หรือ family ควรมีการศึกษาลำดับเบสใน 18S และ 28S ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์นั้นจะช่วยให้การหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มได้ผลดีมากกว่าการใช้ยีนในตำแหน่ง ITS ที่หากเชื้อรามีความแตกต่างกันมากเกินไปจะนำมาเปรียบเทียบกันไม่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved