

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* เข้าทำลายในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ. ศ. 2546-2547 พบพืชอาศัยของเชื้อราแป้งใน subgenus นี้รวม 60 species ใน 23 family พืชอาศัยที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลาย พบผลสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมอยู่บนส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ลำต้น ดอก ใบ และผล เป็นต้น ในกรณีที่ระบาดรุนแรง อาจปกคลุมทั่วทั้งต้น และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งเหล่านี้ในระหว่างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope พบว่ามีลักษณะสำคัญดังนี้ คือ สร้าง conidia ต่อกันเป็นสายโซ่ (chain-type) ภายใน conidia มี fibrosin body โดยที่เส้นใยสร้าง appressoria ที่มีรูปร่างไม่แตกต่างจากเส้นใยปกติ (indistinct) หรือ nipple-shaped เมื่อ conidia งอกสร้าง germ tube เป็นแบบ fuliginea-type หรือ pannosa-type ซึ่งคล้ายกับลักษณะของเชื้อราแป้งใน subgenus *Setoidium* (teleomorph: genus *Cystotheca*) ที่มีสร้าง conidia ต่อกันเป็นสายโซ่ (chain-type) ภายใน conidia มี fibrosin body ที่เส้นใยพบ appressoria แบบ indistinct หรือ nipple-shaped เมื่อ conidia งอก germ tube เป็นแบบ pannosa-type แต่แตกต่างกันที่เชื้อราแป้งใน subgenus *Setoidium* มีเส้นใยที่มีผนังหนา (aerial hypha) ทำให้ลักษณะของ colony มีสีเข้ม เห็นได้ชัดเจน (ชัยวัฒน์, 2546) จากการวัดขนาด และตรวจดูลักษณะของเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยต่างชนิดกัน พบว่ามีขนาดต่างกันไปตามชนิดของพืชอาศัย และถ้าใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้ไม่สามารถแยกได้ว่าเชื้อราแป้ง subgenus นี้ในระยะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะจัดอยู่ใน section ไต สำหรับเชื้อราแป้งในประเทศไทยมีเพียงบางชนิดที่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เช่น เชื้อราแป้งที่พบบนอาซาเลีย (*Rhododendron* sp.) (ฮาไพวรรณ, 2547) และ เชื้อราแป้งที่พบบนกระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrata*) (To-annun *et al.*, 2003) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่เชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* ไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในปัจจุบันได้นำวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมมาใช้ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในราแป้ง (Mori *et al.*, 2000, Takamatsu, 2004) และเทคนิคนี้ถูกเสนอให้ใช้เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราแป้งที่พบเพียงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ กับเชื้อราแป้งที่มีการจัดจำแนก species จากลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Cunnington *et al.*, 2003)

สำหรับการศึกษาการเก็บตัวอย่างแห้งของพืชที่เป็นโรคราแป้ง โดยเก็บในกระดาษหนังสือพิมพ์ แล้วใส่ในถุงพลาสติกที่มี silica gel เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ถ้าตัวอย่างพืชเป็นพืชขอบน้ำ อาจมีเชื้อราอื่นปนเปื้อนได้ และสภาพ DNA ของเชื้อราแป้งอาจเสื่อมสลายได้ง่าย แต่การเก็บตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อน ดังนั้นการเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราแป้งที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จึงเหมาะแก่การเก็บรักษาตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราแป้งที่ต้องการนำ DNA ของเชื้อราแป้งไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพราะสภาพ DNA ของเชื้อราแป้งที่เก็บรักษาด้วยวิธีนี้ไม่เสื่อมสลายง่าย และไม่มีการปนเปื้อนจาก DNA ของเชื้อราอื่น

จากการสกัด DNA ของเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัย 19 ชนิด แล้วนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าปรากฏแถบ DNA แถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 450-500 เบส และเมื่อนำผลผลิตของ PCR มาหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS พบว่าปริมาณลำดับเบสบริเวณ ITS มี 443-487 คู่เบส โดยลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS2 มีความผันแปรของลำดับเบสมาก เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของบริเวณอื่น 5.8S ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Takamatsu *et. al.* (1998) ที่พบว่าความผันแปรของขนาดลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อราแป้งขึ้นอยู่กับขนาดของลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS2 เพราะ 5.8S เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserve site) ที่มีขนาดคงที่ คือ 154 คู่เบส จึงทำให้ความผันแปรของลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS2 ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับ genus, ระหว่าง species หรือภายใน species เดียวกันของเชื้อราแป้ง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองด้านขนาดของลำดับเบสบริเวณ ITS ของตัวอย่างเชื้อราแป้ง genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* ทั้ง 19 ชนิด มีขนาดสั้น (443-487 เบส) สอดคล้องกับรายงานของ Takamatsu *et. al.* (1998) ที่ได้แบ่งเชื้อราแป้งตามขนาดของลำดับเบสบริเวณ ITS เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลำดับเบสบริเวณ ITS ยาว (ขนาดประมาณ 552-563 เบส) ได้แก่ เชื้อราแป้งใน genus *Erysiphe*, *Leveillula* และ *Phyllactinia* เช่น เชื้อราแป้ง *Erysiphe betae* (563 เบส) หรือ *Leveillula taurica* (556 เบส) (ตามที่มีรายงานใน DDBJ) สำหรับกลุ่มที่มีลำดับเบสบริเวณ ITS สั้น (ขนาดประมาณ 475-487 เบส) ได้แก่ เชื้อราแป้งใน genus *Blumeria*, *Sawadaea*, *Cystotheca* และ *Podosphaera* เช่น เชื้อราแป้ง *Podosphaera tridactyla* (467 เบส) (ตามที่มีรายงานใน DDBJ) และได้รายงานว่า การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะของระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มากกว่าลักษณะของการสืบพันธุ์ แบบอาศัยเพศ

เมื่อศึกษาเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยทั้ง 19 ชนิด สามารถจัดอยู่ใน genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* ซึ่งในระยะของ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ใน family Erysiphaceae, tribe Cystothecaeae, subtribe Cystothecianae, genus *Podosphaera* แต่ไม่สามารถระบุถึง section ได้ แต่เมื่อนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาใช้ร่วมกันโดยหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี rDNA sequencing แล้วสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งทั้ง 19 ชนิดนั้นอยู่ใน section *Sphaerotheca* อย่างไรก็ตามในการศึกษาเชื้อราที่มีความผันแปรสูง เช่นเชื้อราที่อยู่ต่าง genus หรือ family ควรมีการศึกษาลำดับเบสในยีน 18S และ 28S ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์จะช่วยให้การหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มได้ผลดีมากกว่าการใช้ยีนในตำแหน่ง ITS ที่หากเชื้อรามีความแตกต่างกันมากเกินไปจะนำมาเปรียบเทียบกันไม่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved