บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ คือ สตรอเบอรี่ 1 สตรอเบอรี่ 2 ทับทิม ส้ม 1 ส้ม 2 ฝรั่ง กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า ลำไย พลับ กาแฟ กล้วยไม้ ข้าวฟ่าง มะนาว และพริก พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรสูงมากโดยเฉพาะลักษณะโคโลนี ซึ่งให้สีตั้งแต่ สีขาว ส้ม เขียว หรือเทา สร้าง conidia รูปทรงกระบอกตรง มีขนาดตั้งแต่ 3.00-4.68 × 9.89-14.34 ไมครอน สร้าง appressoria ทั้งแบบผิวเรียบ และผิวขรุขระ มีขนาดตั้งแต่ 5.70-7.86 × 9.09-13.73 ไมครอน เชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่มีการสร้าง setae ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นไอโซเลทที่แยกได้จากมะนาวเพียงไอโซเลทเดียว สำหรับ sclerotia พบสร้างเพียงบางไอโซเลทเท่านั้น ซึ่งลักษณะและขนาดของ conidia และ appressoria รวมถึง ลักษณะ colony การสร้าง sclerotia และ setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างกัน

สำหรับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราพบว่ามีความแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.82-1.72 เซนติเมตรต่อวัน เมื่อมาจัดจำแนกโดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าทุกไอโซเลทที่แยกได้ถูกจัดอยู่ใน *C. gloeosporioides* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในครรชนีโรคพืชในประเทศไทยปี พ.ศ. 2537 (พัฒนา และคณะ, 2537) ถึงแม้ว่าในเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้าโดยส่วนใหญ่จะรายงานว่าเป็น *C. musae* ก็ตาม (Sherriff และคณะ, 1994; Al Zaemey และคณะ, 1993; Sreenivasaprasad และคณะ, 1996) แต่จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ตรวจพบ ในเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า ทั้งสีของโคโลนี ขนาด conidia และการสร้าง sclerotia ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ถูกจัดจำแนกอยู่ใน *C. gloeosporioides* แต่อย่างไรก็ตามสำหรับในเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยทั้งสองชนิดนี้ ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ามีความแตกต่างจากที่ได้มีรายงานไว้ เนื่องจากในปัจจุบัน การจัดจำแนกเชื้อรา *C. musae* ยังคงมีข้อขัดแย้งในการจัดจำแนก ซึ่งยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่แน่นอนได้ ซึ่งจะเห็นได้จากการศึกษาของ Hodson และคณะ (1993) รายงานว่าเชื้อรา *C. musae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. gloeosporioides* สูงมากความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบ และการมีพืชอาศัยที่แตกต่างไปอาจจะเป็นเพียงความแตกต่างในระดับ

subspecis เท่านั้น ซึ่งคัดค้านกับผลการจัดจำแนกแบบเดิม ในกรณีของเชื้อราซึ่งแยกได้จากข้าวฟ่าง รายงานการจัดจำแนกในหลายประเทศซึ่งมักจัดจำแนกให้อยู่ในสปีชีส์ *C. sublineolum* หรือ *C. graminicola* (Sreenivasaprasad และคณะ, 1996; Sheeiff และคณะ, 1994) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากเชื้อราในข้าวฟ่างที่นำมาศึกษาอย่างสิ้นเชิง แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยมีรายงานการเข้าทำลายข้าวฟ่างโดยเชื้อรา *C. gloeosprioides* เช่นกัน โดยการรายงานของ กิตติพงษ์ ในปี พ.ศ. 2525 ซึ่งได้รายงานไว้ในตรรชนีโรคพืชในประเทศไทย (พัฒนา และคณะ, 2537)

จากการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร PDB เพื่อนำมาสกัดตามวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจาก Rogers และ Bendich (1988) พบว่าควรเลี้ยงเส้นใยประมาณ 1-2 วัน จึงจะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะนำเส้นใยมาทำการสกัด เนื่องจากจะได้เส้นใยที่อ่อนทำการสกัดง่าย และ polysaccharides น้อย ทำให้ละลายตะกอนดีเอ็นเอได้ง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตามแม้จะใช้เวลาในการเลี้ยง เพียง 1-2 วันแล้วก็ตาม ก็ยังคงมีดีเอ็นเอจากเชื้อราบางไอโซเลทที่ไม่สามารถละลายได้โดยการใส่ buffer เพียงอย่างเดียว จึงต้องช่วยการละลายโดยนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน water bath หากดีเอ็นเอยังไม่ละลายจึงเติม buffer ให้มากขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถละลายตะกอนได้หมดทุกตัวอย่าง

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดทั้ง 15 ไอโซเลท โดยใช้ primer 4 คู่ คือ *Eco*RI-A/*Mes*I-CAG, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAC, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAT, *Eco*RI-AC/*Mes*I-C พบว่าดีเอ็นเอที่เคลื่อนผ่านเจลมีความยาวตั้งแต่ 200 - 1,000 base pair แต่แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจะอยู่ในช่วงความยาว 300 - 800 base pair ซึ่งสามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทได้ จึงทำการตรวจนับแถบดีเอ็นเอ พบว่า primer *Eco*RI-A/*Mes*I-CAG, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAC, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAT, *Eco*RI-AC/*Mes* I-C แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) ตั้งแต่ 48, 27, 50 และ 29 แถบตามลำดับ รวมแถบดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างได้ทั้งสิ้น 154 แถบซึ่งพบว่าเป็นจำนวนที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์คือประมาณ 150 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานการใช้เทคนิค AFLP ในเชื้อรา *Trichoderma* spp. (จินตนา, 2543) ซึ่งรายงานว่า polymorphic band มากกว่า 100 แถบ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ในการทดลองนี้เลือกนับเฉพาะดีเอ็นเอที่มีความยาวอยู่ในช่วง 300 - 800 baes pair เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีความชัดเจน และแยกออกจากกันได้ดี ซึ่งปัญหาแถบดีเอ็นเอ

แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์สามารถแก้ไขให้แยกออกจากกันได้ดีขึ้น โดยใช้ระยะเวลาในการ run นานขึ้น (O' Neil และคณะ, 1997) แต่ในการทดลอง ครั้งนี้ได้จำนวน polymorphic band ที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ไม่มีความจำเป็นที่จะเพิ่มระยะเวลาในการ run

จากการนำเทคนิค AFLP มาศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากพืชอาศัยต่างชนิดทั้ง 15 ไอโซเลทพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 11 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากสตรอเบอรี่1 และสตรอเบอรี่ 2 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากทับทิม กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากลำไย กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพลับ กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากมะนาว กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟ และข้าวฟ่าง กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากพริก กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากฝรั่ง กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ และกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยเชื้อราที่แยกได้จากส้ม 1 และส้ม 2 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีความผันแปรภายในสปีชีส์สูง ไม่สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ตามลักษณะของพืชอาศัย เช่นการเป็นไม้ผล เมื่อพิจารณาจาก dendrogram จะพบว่าเชื้อราในกลุ่มที่แยกได้จากมะม่วง สตรอเบอรี่ และ ทับทิม ซึ่งแสดงความสัมพันธ์แบบ monophyletic และเชื้อราในกลุ่มที่แยกได้จากกล้วยหอม กล้วยน้ำว้า ลำไย และมะนาว ซึ่งแสดงความสัมพันธ์แบบ monophyletic เช่นเดียวกัน ในการวางแผนป้องกันกำจัด หรือคัดพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในพืชทั้งสองกลุ่มควรทดสอบการ cross infection ภายในกลุ่มของเชื้อที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีรายงานการ cross infection ในผลไม้ จากการรายงานของ Freeman และ Shabi (1966) ซึ่งรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากแอลมอนด์ แอปเปิ้ล อโวคาโด มะม่วง pecan และเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากแอปเปิ้ล พืช pecan พบว่าทุกไอโซเลทที่นำมาทำการทดสอบสามารถผสมข้ามได้ แต่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันไป

สำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรภายในสปีชีส์ ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังไม่ทราบ แต่คาดว่า heterokaryosis และ parasexuality อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความผันแปร (Alakakoon และคณะ, 1992) เนื่องจาก รายงานการทดลองของ Masel และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งแยกได้จาก *Stylosanthes* spp. พบว่ามีความผันแปรสูง ซึ่งคาดว่าจะเกิดจาก chromosome rearragment ระหว่าง somatic growth หรือ parasexual combination ซึ่งมีผลทำให้เกิดการ mutation, insertion หรือ delection มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดโครโมโซม และเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อสาเหตุจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการเข้าทำลายพืช

อาศัยชนิดหนึ่งๆ ได้สูงขึ้น ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยสูง (อ้างโดย Alakakoon และคณะ, 1992)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เทคนิค AFLP DNA fingerprint เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง AFLP เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporiorides* เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอต้นแบบน้อย การทำปฏิกิริยา PCR ให้ผลน่าเชื่อถือ สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อภายในสปีชีส์เดียวกันซึ่งมีพืชอาศัยแตกต่างกัน (distinct specific form) ได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University