บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยานั้น พบว่าเชื้อราที่นำมาศึกษาทั้ง 15 formae speciales พบว่าเชื้อทั้งหมดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ *F. oxysporum* กล่าวคือ เส้นใยมีความละเอียด ฟู และหนา ส่วนสีของโคโลนีที่พบคือ สีขาว ชมพู และม่วง อัตราการเจริญเฉลี่ยต่อวัน คือ 2.93 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเจริญเต็มจานอาหาร 8-10 วัน สำหรับลักษณะโครงสร้างของ microconidia พบทั้งแบบทรงรี และทรงกระบอก มี 1-2 เซลล์ ขนาดอยู่ในช่วง 5.91-10.05 ไมครอน ส่วน macroconidia ที่เพียงลักษณะเดียวคือ ทรงเสี้ยวพระจันทร์ซึ่งมีหัวท้ายเรียวแหลม พบ 1-3 septate ซึ่งมีขนาด 22.18-33.15 ไมครอน ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Seifert (2000) ใน *Fusarium* Interactive Key และใน Laboratory Guide to the Identification of the Major Species of *Fusarium* ของ Booth (1977) ซึ่งได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ซึ่งกล่าวไว้ว่า เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA อัตราการเจริญบน PDA เป็นสิ่งแรกที่สามารถนำมาจำแนกเชื้อชนิดนี้ได้ ระหว่างกลุ่มที่มีการเจริญช้า (มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน) ส่วนอีกกลุ่มซึ่งมีอัตราการเจริญเร็ว (มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-10 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน) เส้นใยที่เจริญเหนือผิวอาหาร ส่วนใหญ่มักมีลักษณะเป็นปุยเหมือนฝ้าย แต่ก็มีบาง species ที่เส้นใยจะเรียบ และมีปริมาณน้อยซึ่งมักจะมีอัตราการเจริญช้าไปด้วย ส่วนสีของโคโลนีจะมีหลากหลายและผันแปรไปตามชนิดของเชื้อ ตั้งแต่สีขาว ส้ม ชมพู เทา และม่วง ขนาดของ microconidia อยู่ที่ช่วงระหว่าง 5-12 x 2.2-3.5 ไมครอน มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปรีคล้ายไข่ หรือทรงกลม ซึ่งจะตรงหรือโค้งก็ได้ สำหรับ macroconidia จะมีขนาดอยู่ระหว่าง 27-60 x 3-5 ไมครอน พบ septate ได้ 3-5 septate ส่วนในกรณีของ chlamydospore จะมีรูปร่างกลม อาจพบเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ก็ได้ ที่บริเวณปลายหรือกลางเส้นใย สำหรับการศึกษาเชื้อ *Fusarium* ในครั้งนี้ พบว่าการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละ formae speciales ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ นอกจากนั้นเชื้อชนิดนี้ยังมีความแปรผันสูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นผลให้การจำแนกยุ่งยากขึ้น ดังนั้นจึงนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการจำแนก และหาความสัมพันธ์ ของ

เชื้อราชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Windel (1991) กล่าวไว้ว่า เทคนิคที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล น่าจะนำมาใช้เพื่อประเมิน taxonomy วิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ภายในสปีชีส์ของเชื้อ *Fusarium* ซึ่งสามารถนำมาใช้รับรองและกำหนดขอบเขตความสัมพันธ์ของเชื้อชนิดนี้ ให้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น แทนที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

สำหรับการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราทั้งหมดออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่ม A คือ *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*, กลุ่ม B ประกอบด้วย *F. o.* f.sp. *phaseoli*, *F. o.* f.sp.*adzukicola*, *F. o.* f.sp. *cucumerinum*, *F. o.* f.sp. *melonis*, *F. o.* f.sp. *luffae* และ *F. o.* f.sp. *lagenaria*, กลุ่ม C ประกอบด้วย *F. o.* f.sp. *narscissi*, *F. o.* f.sp. *cepae* และ *F. o.* f.sp. *asparagi*, กลุ่ม D คือ *F. o.* f.sp. *lini*, กลุ่ม E คือ *F. o.* f.sp. *fragariae*, กลุ่ม F คือ *F. o.* f.sp. *vasinfectum*, กลุ่ม G คือ *F. o.* f.sp. *apii*, กลุ่ม H คือ *F. o.* f.sp. *pini*, และกลุ่ม I ประกอบด้วย *F. moniliforme* และ *F. solani* จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแต่ละ formae speciales ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มอื่นๆ เช่น ในกลุ่ม B ที่มีสมาชิกในกลุ่มมากที่สุด ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มาจากพืชในตระกูล Cucurbitaceae และกลุ่ม C สมาชิกในกลุ่มทั้งหมดก็มาจากพืชตระกูล Liliaceae เช่นเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อในแต่ละกลุ่มนั้นจะมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Namiki (1994) ที่ศึกษาเกี่ยวกับ *Fusarium oxysporum* ที่เข้าทำลาย cucurbit ซึ่งทำการทดสอบกับเชื้อ *F. oxysporum* จำนวน 5 formae speciales คือ cucumerinum, melonis, lagenariae, niveum และ momordicae จำนวน 50 strains ร่วมกับ formae speciales ที่ได้จากพืชชนิดอื่นอีก 6 strains จากนั้นทำการย่อย DNA ทั้งหมดโดยเอนไซม์ EcoRV และ hybridized กับ FOLR probe ที่ติดฉลากด้วย 32P และนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม UPGMA และ parsimony analysis พบว่า formae speciales ที่มาจากพืชชนิดอื่น มีความแตกต่างกับ cucurbit อย่างชัดเจน ส่วน *lagenariae*, *niveum*, *cucumerinum* และ *momordicae* จะถูกจัดอยู่ด้วยกันเป็นกลุ่มเดียว ส่วน melonis จะถูกแยกออกมา เนื่องจากลายพิมพ์ DNA ที่ต่างกันของเชื้อ 2 strains ที่เข้าทำลายพืชต่างชนิดกันคือ muskmelon และ oriental melon ดังนั้น จึงให้ข้อสรุปได้ว่า รูปแบบของลายพิมพ์ DNA จากพืชชนิดอื่น จะมีความแตกต่างกับ formae speciales ที่ได้มาจาก cucurbits ซึ่งจะมีรูปแบบของลายพิมพ์ DNA ที่คล้ายกันมากกว่า ซึ่งแสดงถึงความใกล้ชิดและความสัมพันธ์ของเชื้อภายในกลุ่มที่มาจากพืชตระกูลเดียวกัน นอกจากนั้นในการทดลองครั้งนี้ เชื้อราใน formae speciales *adzukicola*, *cucumerinum* และ *phaseoli* ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน

และ *asparagi* ถูกแยกออกไปอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งให้ผลตรงกันกับงานวิจัยของ อุไรลักษณ์ (2544) ที่ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการจากลำดับเบสบริเวณตำแหน่ง ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 ของเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 11 formae speciales พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่ง *adzukicola, gladioli, raphani, cucumerinum, phaseoli, nicotianae* กลุ่มที่สอง *cyclaminis, lycopersici* race 1, *lycopersici* race2, *radicis-lycopersici* และ กลุ่มที่สาม *asparagi*

สำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค AFLP อันเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราออกจากกันได้โดยใช้ DNA ต้นแบบปริมาณน้อย และทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ โดยพบว่าให้จำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างมาก ซึ่งจำนวนแถบ DNA บน AFLP gel จะขึ้นอยู่กับจำนวนเบส (selective base) ที่เพิ่มต่อจาก primer ในการทดลองนี้ พบว่า ถ้าเพิ่มจำนวนเบสใน primer *Eco*RI 2 เบส และ *Mse*I 3 เบส จะให้จำนวนแถบ DNA น้อย แต่ถ้าเพิ่มเบสในทั้ง 2 primer เพียง 1 เบส พบว่า ให้แถบ DNA จำนวนมาก มีลักษณะเป็นปื้น (smear) ดังนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนเบส ER-1/MS-3 และ ER-2/MS-1 ซึ่งจะให้จำนวนแถบ DNA ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ส่วนรูปแบบ (pattern) ของแถบ DNA พบว่า ในแต่ละ isolate จะมีรูปแบบของแถบ DNA ส่วนใหญ่เหมือนกัน มีเพียงบางส่วนที่แตกต่างกันและสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง isolate ได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลเมื่อนำมาจัดกลุ่ม โดยการทำ cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 9 กลุ่ม โดยความเชื่อมั่นใน dendogram ที่ได้ สามารถวัดได้จากค่า bootstap ซึ่งได้แสดงไว้ในภาพที่ 8 ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาการจัดจำแนก isolate ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ นอกจากนี้ พบว่าภายในกลุ่มเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ทั้ง 15 formae speciales ที่นำมาศึกษานั้นมีความผันแปรค่อนข้างสูงเมื่อสังเกตจากค่า similarity น้อยกว่า 0.70

การศึกษาลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ทั้ง 15 formae speciales ในครั้งนี้นอกจากจะใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกชนิดแล้ว ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนา DNA เครื่องหมายที่จำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อราได้ โดยสกัดแยกแถบ DNA ที่แตกต่างกันจาก gel จากนั้นนำมาหาลำดับเบสเพื่อใช้ในการออกแบบ primer หรือใช้เป็น DNA ติดตาม (probe) ซึ่งจะได้ DNA เครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ ช่วยให้การจัดจำแนกชนิดเชื้อราภายใน forma specialis ของ *F. oxysporum* หรือใช้ในการค้นหายีนต้านทานในต้นพืช เช่น การศึกษาของ Wang ในปี 2000 เพื่อนำมาสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อ *F. o.* f.sp. *melonis* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว นอกจากนี้อาจนำมาใช้กับสายพันธุ์ที่

ผลิตขึ้นเป็นการค้าหรือสายพันธุ์กลายที่พัฒนาขึ้นมาได้ เพื่อใช้เป็น DNA เครื่องหมายในการศึกษานิเวศวิทยาต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University