บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อจากรากสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวจากพื้นที่เพาะปลูก 5 แห่งในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงราย พบเชื้อราในสกุล *Rhizoctonia* ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท เมื่อนำมาตรวจนับจำนวนนิวเคลียสโดยการย้อมด้วยสี Geimsa พบว่าเป็นรา binucleate *Rhizoctonia* 68 ไอโซเลท (97%) และ multinucleate *Rhizoctonia* 2 ไอโซเลท (3%) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ Martin (1988) และ Martin (2000) ที่พบรา binucleate *Rhizoctonia* 97 และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการจำแนกรานี้ออกเป็น anastomosis group (AG) จากความสามารถในการรวมเส้นใยกับ tester strain พบว่า binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้ประกอบด้วย 3 AG คือ AG-A, AG-G และ AG-P ในจำนวน 41.5, 37.1 และ 7.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แตกต่างจากรายงานของ Martin (1988) และ Martin (2000) ที่พบ binucleate *Rhizoctonia* AG A, AG-G และ AG-I เชื้อ AG-P ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่มีรายงานในสตรอเบอรี่มาก่อน ซึ่งผลจากการทำ PCR-RFLP ในส่วน 28S rDNA ก็ให้ผลตรงกันว่าเชื้อที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-P โดยมีรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 เอนไซม์เหมือนกับ tester AG-P (ภาพที่ 13) มีรายงานว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเช่นกัน ดังรายงานของ Oniki และคณะ (1984) ที่พบว่า *Rhizoctonia* AG-P สามารถทำให้เกิดอาการ black rot กับใบชาได้ (อ้างโดย Sneh และคณะ, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำในส่วนของการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค สำหรับ *Rhizoctonia* spp. ที่ไม่สามารถจำแนกได้มีจำนวน 10 ไอโซเลท เป็น multinucleate 2 ไอโซเลท และ binucleate 8 ไอโซเลท ในส่วนของ multinucleate ที่ไม่สามารถจำแนกได้เพราะไม่ได้ทำการศึกษาอย่างละเอียดเนื่องจากพบเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น แต่ได้ทดสอบการรวมเส้นใยกับ tester AG-5 ที่มีรายงานการพบในสตรอเบอรี่โดย Martin (1988) และ Martin (2000) และนำไปศึกษาการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งก็พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทดังกล่าวไม่สามารถรวมเส้นใยกับ tester AG-5 ได้ และมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างออกไป (ภาพที่ 13) สำหรับ binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ทั้ง 8 ไอโซเลทนี้เพราะเป็นไอโซเลทที่ไม่สามารถรวมเส้นใยกับ tester strain ทั้งหมดที่มีอยู่ได้ Masuhara และคณะ (1993) Mazzola (1997) และ Martin (2000) ก็พบปัญหาของ *Rhizoctonia* spp. ที่ทดสอบบางไอโซเลทไม่รวมเส้นใยกับ tester

strain เช่นกัน อาจเป็นไปได้ว่า tester strain ที่ได้รับมาใช้เปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้สูญเสียความสามารถในการรวมเส้นใยไป โดยพบว่าหลังจากได้รับ tester strain จาก Prof. Dr. Ogoshi และถ่ายเชื้อเพื่อเก็บเป็น stock มีบางไอโซเลทเจริญช้ามาก ใช้เวลาถึง 1 สัปดาห์จึงพบการเจริญของเส้นใยโดยเฉพาะ tester AG-I ไอโซเลท AV-2 และอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้ไม่พบ AG-I เลย จากปัญหาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราในสกุลนี้

เมื่อเปรียบเทียบความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG ในพื้นที่ต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันไป ตัวอย่างที่เก็บจาก แม่ริม พบเชื้อเพียง 2 AG คือ AG-A และ AG-G ในจำนวน 4 และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันถึง 10 ไอโซเลท ตัวอย่างจากบ้านบ่อแก้วพบทั้ง 3 AG ในจำนวนใกล้เคียงกันคือ พบ AG-A จำนวน 8 ไอโซเลท AG-G 5 ไอโซเลท และ AG-P 5 ไอโซเลท ตัวอย่างจากอินทนนท์พบ AG-A และ AG-G เช่นเดียวกับที่แม่ริม ในจำนวน 7 ไอโซเลทเท่ากัน และตัวอย่างจากอ่างขางพบเฉพาะ AG-A ในจำนวน 9 ไอโซเลท Martin (1988) และ LaMondia และ Martin (1989) ได้กล่าวถึงผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคว่า เชื้อทั้ง 3 AG สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงต่างกันที่อุณหภูมิต่างกัน โดยพบว่าในช่วงอบอุ่น (24 องศาเซลเซียส) AG-G สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงกว่า AG-I และ AG-A แต่ในช่วงอุณหภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส AG-I ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบ AG-G มากที่สุดในตัวอย่างจากแม่ริมซึ่งเป็นเขตพื้นราบและมีอุณหภูมิสูงกว่าพื้นที่อื่น ๆ ในขณะที่ไม่พบ AG-G เลยในตัวอย่างจากอ่างขางซึ่งเป็นพื้นที่สูงและมีอุณหภูมิต่ำ จึงอาจกล่าวได้ว่าความแตกต่างของเชื้อที่พบอาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่

จากการศึกษาการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 28S rDNA ด้วย primer LROR/LR7 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด (*Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Taq*I) พบว่า ไม่มีเอนไซม์ชนิดใดสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG แต่เมื่อนำผลของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด และขนาด PCR-product มาวิเคราะห์ร่วมกัน สามารถจัดกลุ่มได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG ซึ่งตรงกับรายงานของ Martin (2000) ที่ใช้เทคนิคและเอนไซม์เดียวกันนี้ในการจัดกลุ่มรา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างทั้งหมด 75 ไอโซเลท (เชื้อที่แยกจากพื้นที่ต่าง ๆ 70 ไอโซเลท และ tester strain AG-A, AG-G, AG-I, AG-P และ AG-5) แบ่งออกเป็น 12 กลุ่ม ประกอบด้วย AG-A 5 กลุ่ม AG-G 2 กลุ่ม AG-P, AG-I, AG-5, Unknown binucleate และ Unknown multinucleate อย่างละ 1 กลุ่ม โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละกลุ่มกับพื้นที่เก็บตัวอย่าง หลังจากสุ่มเลือกตัวแทนในแต่ละกลุ่มจำนวน 19 ไอโซเลท และ tester strain AG-A, AG-G, AG-I และ AG-5 รวมทั้งสิ้น 23 ไอโซเลทมาศึกษา

การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย primer ที่เฉพาะเจาะจงกับราในสกุล *Rhizoctonia* (ITS1F/Rhsp2) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ 8 ชนิด (*Cla*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I และ *Xmn*I) พบว่า ไม่มีเอนไซม์ใดสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG เช่นเดียวกับการใช้ดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA แต่เมื่อนำผลของเอนไซม์ *Cla*I, *Mbo*I และ *Rsa*I มาวิเคราะห์ร่วมกัน สามารถให้ผลในการแบ่งกลุ่มได้ตรงกับการจำแนกแบบ AG โดยตัวอย่างทั้ง 23 ไอโซเลทแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ประกอบด้วย AG-A 1 กลุ่ม AG-G 2 กลุ่ม AG-I, AG-P, AG-5, Unknown binucleate และ Unknown multinucleate อย่างละ 1 กลุ่ม และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละกลุ่มกับพื้นที่เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับการใช้ดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA ผลจากการทดลองทั้งสองแสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA และ ITS1-5.8S-ITS2 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการแบ่งกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จากสตรอเบอรี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างแล้วคัดเลือกตัวแทนในแต่ละกลุ่มก่อนนำมาจำแนกแบบ AG ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งโดยเฉพาะกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังพบความแตกต่างของผลการทดลองเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ดังได้พบรายงานของ Cubeta และคณะ (1991) ว่าได้เริ่มนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษารา binucleate *Rhizoctonia* เป็นครั้งแรกพบว่า เชื้อ AG-A และ AG-G ที่ทำการศึกษามีดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA เพียงขนาดเดียวคือ 1.4 กิโลเบส และเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II, *Taq*I, *Hha*I และ *Sau*3AI ก็พบว่าทั้ง AG-A และ AG-G มีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกันในทุกไอโซเลท ในขณะที่ Martin (2000) ได้นำเทคนิคและเอนไซม์เดียวกันมาใช้ในการศึกษารา binucleate *Rhizoctonia* ในสตรอเบอรี่พบว่า AG-A ที่ทำการศึกษามีดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA 3 ขนาด คือ 1.4, 1.8 และ 1.4+1.8 กิโลเบส เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า AG-A มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันถึง 6 รูปแบบ และ AG-G มี 5 รูปแบบ ในการศึกษาครั้งนี้ AG-A ที่พบมีดีเอ็นเอ 3 ขนาด เช่นเดียวกับ Martin (2000) และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 5 และ 2 รูปแบบใน AG-A และ AG-G ตามลำดับ ความแปรปรวนเหล่านี้ส่วนหนึ่งอาจอธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากธรรมชาติของเชื้อนี้ที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งนิวเคลียสทั้งสองอาจมีทั้งส่วนที่เหมือนและส่วนที่ต่างกัน ถ้านิวเคลียสทั้งสองมีดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA แตกต่างกันก็มีโอกาสที่จะเกิด PCR-product 2 ขนาดในตัวอย่างเดียว ความแตกต่างของนิวเคลียสนี้มีรายงานการพบในเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เช่นกัน Alahakoon และคณะ (1992) รายงานว่า conidia ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่เป็น field isolate ให้ RFLP pattern ที่แตกต่างกัน 2 แบบ ส่วน Harlton และคณะ (1995) ได้ทำ PCR-RFLP บริเวณ ITS ของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ที่เป็น field isolate พบว่ามีดีเอ็นเอหลายรูปแบบเช่นกัน ผลการจัดกลุ่มโดยใช้ดีเอ็นเอช่วง ITS1-5.8S-ITS2 และเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *Cla*I, *Mbo*I และ *Rsa*I ในการศึกษานี้ก็พบว่า AG-G มีรูปแบบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ ซึ่งความแปรปรวนเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า binucleate *Rhizoctonia* ที่ศึกษายังมีความผันแปรในระดับประชากรสูง และดีเอ็นเอในส่วนของ ribosomal gene นี้อาจไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อใน anastomosis group ต่าง ๆ เนื่องจากยังมีความผันแปรของผลในแต่ละการทดลองสูง จนถึงขณะนี้การจัดจำแนกราในสกุล *Rhizoctonia* ยังคงใช้วิธีแบ่งออกเป็น anastomosis group เป็นหลัก การศึกษาดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการรวมเส้นใยน่าจะให้ผลที่คงที่และตรงวัตถุประสงค์มากกว่า อย่างไรก็ตามการใช้ดีเอ็นเอในส่วนของ ribosomal gene ในการศึกษารา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากสตรอเบอรี่ทั้งในการศึกษาครั้งนี้และของ Martin (2000) ที่ให้ผลไปในทางเดียวกันชี้ให้เห็นว่า มีแนวโน้มที่จะนำ ribosomal gene และเทคนิค PCR-RFLP เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ที่แยกจากรากสตรอเบอรี่ได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่มีการจำแนกรา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากสตรอเบอรี่ออกเป็น anastomosis group (AG) ซึ่งยังขาดข้อมูลในหลาย ๆ ด้าน เช่น ความสามารถในการทำให้เกิดโรค และความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG ในแต่ละฤดูที่จะช่วยนำไปสู่การศึกษาวงจรของโรค และการป้องกันกำจัดทั้งการใช้สารเคมีและการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป การศึกษาครั้งนี้ได้มีการนำเทคนิค PCR-RFLP เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราดังกล่าว ซึ่งก็พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ primer ITS1F/Rhsp2 ที่มีข้อดีในด้านความเฉพาะเจาะจงต่อราในสกุล *Rhizoctonia* ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตอื่น และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 3 เอนไซม์ก็สามารถจัดกลุ่มได้ อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษายังค่อนข้างน้อยจึงควรมีการศึกษาถึงความคงที่ของแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ก่อนนำไปใช้งานจริง