บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อราแป้งใน Tribe Phyllactinieae เข้าทำลายในเขตภาคเหนือของประเทศไทย พบว่ามีพืชอาศัยของเชื้อราแป้งดังกล่าวรวม 15 ชนิด จัดอยู่ใน 8 family ซึ่งประกอบด้วยพืชผัก วัชพืช และไม้ป่าผลัดใบ ส่วนมากจะพบเชื้อราแป้งในกลุ่มนี้บนไม้ป่าผลัดใบโดยพบว่าเป็นเชื้อราแป้งใน genus *Oulariopsis* ทั้งสิ้น ส่วนในพืชอื่น ๆ เช่น พริก และหม่อน เป็นพืชผัก และพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และจากตัวอย่างพืชทั้ง 15 ชนิดนี้มีมากถึง 13 ชนิดที่เป็นการรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทย และในจำนวน 13 ชนิดนี้มี 2 ชนิดที่เป็นการรายงานพบครั้งแรกในโลก จากตัวอย่างทั้งหมดพบโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในพืชอาศัย 4 ชนิด โดยพบว่าพืชอาศัยที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลายจะมีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมอยู่บนส่วนต่าง ๆ ของพืช และจะพบที่บริเวณด้านใต้ใบเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเชื้อราแป้งใน Tribe Phyllactinieae นี้เป็นพวกที่มีการเจริญของเส้นใยแบบภายใน (endophytic) กล่าวคือ จะสร้างเส้นใยเจริญเข้าไปในปากใบของพืชอาศัย และสร้าง haustorium ส่งเข้าไปดูดกินอาหารจากเซลล์ที่อยู่ภายในโดยไม่พบการสร้าง haustorium เข้าไปดูดอาหารจาก epidermal cell ของพืชเลย ด้วยเหตุนี้จึงพบเชื้อราในกลุ่มนี้มากที่ด้านใต้ใบพืช (hypophyllous) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีปากใบมากกว่าด้านบนใบ ส่วนโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะพบลักษณะของ ascomata ที่มีสีดำ หรือสีน้ำตาลเข้มขึ้นเป็นกลุ่มหรือกระจัดกระจายอยู่ทั่วใบ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งดังกล่าวในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาสัยลักษณะของ conidia, conidiophore, mycelium, appressorium, appendage, จำนวนของ asci ในแต่ละ ascoma และรูปแบบการงอกของ conidia ตามวิธีการของ Hirata (1942) พบว่าเชื้อราแป้งในกลุ่มนี้นี้มีการสร้าง conidia แบบเดี่ยว โดยสร้าง conidia เพียง 1 conidium ต่อวัน ซึ่งลักษณะรูปร่างและขนาดของ conidia, conidiophore, foot cell, mother cell, mycelium cell และ germ tube ผันแปรไปตามชนิดของพืชอาศัย, ลักษณะของ conidia ตั้งแต่ clavate, subcylindric-cylindric, ovoid, ellipsoid และ apically point ภายใน conidia ไม่มี fibrosin body, เซลล์ที่ฐานของ conidiophore (foot-cell) เป็นแบบตรง ทรงกระบอก หรือ บิดเป็นเกลียวขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดพืช ที่บริเวณเส้นใยมีการสร้าง appressorium ผันแปรตามชนิดของเชื้อราและพืชอาศัยตั้งแต่แบบ slightly nipple, hook หรือ elongate, lobed, multi-lobed จนถึง coral-like shaped ซึ่งอาจเกิดแบบเดี่ยวและ/หรือแบบตรงกันข้าม เมื่อ conidia งอกมีการสร้าง germ tube เป็นแบบ polygoni type และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศที่อบอุ่น และมีความชื้นสูงตลอดทั้งปีทำให้เชื้อราแป้งมักไม่ค่อยมีการสร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการจัดจำแนก เช่น เชื้อราแป้งที่พบบนคูน (*Cassia fistula*) ที่มีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง genera โดยการสร้าง conidia ที่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อราแป้งใน genus *Oculariopsis* ทั่วไป นอกจากนี้ conidiophore ยังมีขนาดที่สั้นกว่าอีกด้วย จากการศึกษาต่อมาพบว่า ในปลายฤดูกาลเพาะปลูก (บางปี) เชื้อราแป้งชนิดนี้มีการสร้าง ascomata เป็นแบบเดียวกับเชื้อราแป้งใน genus *Phyllactinia* ซึ่งก่อให้เกิดความสับสนว่าเชื้อราแป้งที่มีการสร้าง conidia จะเป็นเชื้อราแป้งชนิดเดียวกับที่มีการสร้าง ascomata หรือไม่ เพราะตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาเชื้อราแป้งที่เข้าทำลายคูนยังไม่พบ conidia ที่มีรูปร่างเช่นเดียวกับ conidia ของเชื้อรา *Phyllactinia* เลย ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ทำให้ลักษณะดังกล่าวมีการแสดงออกที่ผิดแปลกไปจากเดิม

จากการเก็บตัวอย่างของเชื้อราแป้งในรูปตัวอย่างแห้ง โดยการนำเอาใบพืชที่เป็นโรคมาสอดเข้าในระหว่างคู่ของกระดาษหนังสือพิมพ์ นำไปใส่ในถุงพลาสติกที่มี silica gel บรรจุอยู่และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น พบว่าใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ใบพืชจึงแห้งสนิท และจะต้องเปลี่ยนคู่กระดาษหนังสือพิมพ์ 2-3 วันต่อครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ใบพืชชื้น เพราะถ้ามีความชื้นจะทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าปนเปื้อนได้ง่าย การเก็บรักษาแบบนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน แต่สภาพดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งจะสลายไปได้ง่าย ซึ่งถ้าหากต้องการนำเชื้อราแป้งไปศึกษาต่อทางด้านอณูชีววิทยา ควรเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส เนื่องจากความเย็นจะทำให้ดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งไม่เสื่อมสลายได้ง่าย สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยที่ดีเอ็นเออยู่ในสภาพสมบูรณ์ และทำให้เชื้อราอื่นเข้าปนเปื้อนได้น้องลงอีกด้วย

ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยทั้ง 15 ชนิด โดยใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเขี่ยเอา conidia เดี่ยว ๆ ประมาณ 10-15 conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลงใน Eppendorf tube ที่มี extraction buffer ภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค nested PCR พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 600-700 เบส ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีนี้สามารถลดการปนเปื้อนลงได้ เพราะการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการเขี่ยเส้นใยและ conidia ของเชื้อราแป้งโดยตรงจากพืชอาศัยภายใต้กล้อง stereo microscope ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอมักเกิดการปนเปื้อนจากเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช และเชื้อราอื่นที่อาศัยอยู่บริเวณผิวของพืชอาศัย ดังนั้นในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนเหล่านี้จึงได้ประยุกต์จากวิธีการดังกล่าวโดยเขี่ย conidia เดี่ยว ๆ บนวุ้น และคัดเลือกเอาเฉพาะ conidia ที่สะอาดเท่านั้น นอกจากนี้ ควรสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สด และใหม่จะได้ผลดีกว่า เพราะมีการปนเปื้อนน้อยกว่าตัวอย่างแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มาหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS และ 28S ของเชื้อราแป้งทั้ง 15 ชนิด และเปรียบเทียบผลจาก tree ที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศในการทดลองนี้ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ เชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยทั้ง 15 ชนิดจัดอยู่ใน Tribe Phyllactinieae แต่เนื่องจากเชื้อราแป้งบางชนิดไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะจัดจำแนกได้อย่างชัดเจน การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาร่วมในการจัดจำแนกจะทำให้การจัดจำแนกเชื้อราแป้งดังกล่าวมีประสิทธิภาพ และแม่นยำมากยิ่งขึ้น เช่น ในกรณีของเชื้อราแป้งที่พบบนคูนที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคาบเกี่ยวกันระหว่าง genus ซึ่งก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก ต่อมาได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ร่วมในการจัดจำแนก และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี rDNA sequencing พบว่าเชื้อราแป้งดังกล่าวมีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อราแป้งที่สร้าง ascoma ซึ่งจัดอยู่ใน genus *Phyllactinia* ดังนั้นหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียวมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อราแป้งที่พบบนคูน เชื้อราแป้งดังกล่าวจะถูกจัดอยู่ใน genus *Erysiphe* แต่เมื่อนำผลของลำดับเบสที่ได้มาร่วมในการจัดจำแนกสามารถจัดเชื้อราแป้งนี้อยู่ใน genus *Phyllactinia* อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาเชื้อราที่มีความผันแปรสูง เช่น เชื้อราที่อยู่ต่าง genus หรือ family ควรมีการศึกษาลำดับเบสในตำแหน่ง 18S และ 28S ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์นั้นจะช่วยให้การหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มได้ผลดีมากกว่าการใช้ยีนในตำแหน่ง ITS ที่หากเชื้อรามีความแตกต่างกันมากเกินไปจะนำมาเปรียบเทียบกันไม่ได้ ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาทั้งตำแหน่ง ITS และ 28S ของเชื้อราแป้ง พบว่า เชื้อราแป้งที่พบบนคูนนั้นเป็นเชื้อราแป้งชนิดเดียวกันโดยที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบส 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราแป้งในกลุ่มนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ตำแหน่ง ITS ในการจัดจำแนก เนื่องจากมีความแตกต่างกันมากเกินไป ส่วนในตำแหน่งของ 28S พบว่าได้ผลดีสามารถจำแนกเชื้อราแป้งดังกล่าวได้สอดคล้องกับข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ นอกจากนี้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อราแป้งที่ได้มีรายงานไว้ใน DDBJ ยังพบว่าเชื้อราแป้งใน genus *Phyllactinia* เป็นเชื้อราที่มีความผันแปรสูง อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved