

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้ทั้ง 13 ไอโซเลท โดยอาศัยลักษณะรูปร่าง และขนาดของ conidia appressoria การมีหรือไม่มี setae sclerotia รวมทั้งพืชอาศัย ตามวิธีการของ Sutton (1980) พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ กันในประเทศไทยมีลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอก ถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเชื้อราที่แยกได้จาก บอนสี และกระเจียว ซึ่งมีลักษณะสปอร์รูปเคียว ถูกจัดจำแนกเป็น *C. capsici* สำหรับเชื้อราที่แยกได้จากมะเขือเทศซึ่งเป็นเชื้อที่ศึกษาในประเทศญี่ปุ่น ถูกจัดจำแนกเป็น *C. coccodes* เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้า ซึ่งตามรายงานโดยทั่วไปมีการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืชสกุลกล้วย (*Musa*) เป็น *C. musae* (Sutton, 1980; 1992) แต่จากการทดลองที่ได้ พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ข้อมูลดังแสดงใน ตารางที่ 3)

จากการศึกษาลำดับเบสในช่วงบริเวณ ITS บน rDNA ของเชื้อราทั้ง 13 ไอโซเลท พบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 มีขนาด 171-177 เบส และตำแหน่ง ITS2 มีขนาด 160-162 คู่เบส และที่ตำแหน่ง ITS1 จะมีความผันแปรสูงกว่าตำแหน่ง ITS2 และยีน 5.8S (27.07% 11.73% และ 0.65% ตามลำดับ) ดังนั้นตำแหน่ง ITS1 น่าจะเหมาะสมในการใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ดีกว่าตำแหน่งอื่นๆ Sreenivasaprasad et al. (1996) ได้มีการศึกษาความคล้ายคลึง (Homology) ภายในตำแหน่ง ITS1 ในกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* สปีชีส์ต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 58 ถึง 92 % และในการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างสปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อรา *Colletotrichum* และเชื้อรา *Nurospora crassa* ซึ่งทั้งสองจัดอยู่ใน Pyrenomyces พบว่ามีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 51 ถึง 60 % (Mills et al., 1992) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ G+C content ในตำแหน่ง ITS1 มีมากกว่าตำแหน่ง ITS2 Takamatsu et al. (1998) รายงานว่าค่าเปอร์เซ็นต์ G+C content ในเชื้อรา *Blumeria graminis* มีค่าน้อยกว่าเชื้อราแป้งพวกที่เป็นปรสิตกับพืชพวกใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมีผลให้เชื้อรา *Blumeria graminis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญต่ำกว่า

ในการวิเคราะห์หาค่า distance coefficient ในตำแหน่ง ITS1 เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยค่า distance coefficient มีค่าน้อยเท่าไรเชื้อราจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากยิ่งขึ้น จากรายงานที่มีการศึกษาในปัจจุบัน พบว่าในการจัดจำแนก

เชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละสปีชีส์ออกจากกันจะต้องอาศัยค่า distance coefficient ตั้งแต่ 3.6 % ขึ้นไป (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Colletotrichum linicola* และ *C. destructivum* ควรจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันด้วยมีค่า distance coefficient เพียง 1.1 % เชื้อรา *C. fuscum* และ *C. kahawae* ควรจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเชื้อราทั้งสองสปีชีส์มีความแตกต่างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพียง 0.6 และ 3.0 % ตามลำดับ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีการใช้ค่า distance coefficient ประมาณ 3.5 % ในการแยกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ดังรายงานของ Sherriff *et al.* (1994) จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า phylogenetic tree ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 13 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ เทียบกับลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum* 17 สปีชีส์ ที่มีรายงานใน DDBJ พบว่าสามารถแบ่งเป็นสี่กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบไปด้วยเชื้อรา 9 ไอโซเลท คือ บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก) โคนิน บีโกเนีย พลับ ลำไย กาแฟ ข้าวฟ่าง ส้ม และสแตคิส ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. fuscum* *C. gloeosporioides* และ *C. kahawae* ด้วยค่า distance coefficient ตั้งแต่ 0.0-3.5 % กลุ่มที่สองประกอบไปด้วยเชื้อรา *C. musae* และ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้า ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยค่า distance coefficient 1.2 % กลุ่มที่สามประกอบไปด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สองไอโซเลท (ไอโซเลท บอนสี (สปอร์รูปเคียว) และกระเจียว) และ *C. capsici* โดยมีค่า distance coefficient มากกว่า 3.6 % (5.8 % และ 7.6 % ตามลำดับ) สำหรับค่า distance coefficient ระหว่างเชื้อราไอโซเลทที่แยกได้จาก บอนสี และกระเจียว มีค่าเท่ากับ 1.7 % และกลุ่มที่สี่ประกอบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C. linicola* *C. destructivum* *C. dematium* และ *C. coccodes* (ค่า distance coefficient เท่ากับ 1.7 % 7.6 % 8.1 % และ 9.8 % ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบค่า distance coefficient และผลจาก tree ที่ได้เทียบกับผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบว่า ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ได้ในการทดลองนี้ บางสปีชีส์การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะสอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับเบสที่ได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อราในสปีชีส์ *C. gloeosporioides* ซึ่งเชื้อที่มีการจัดจำแนกอยู่ภายในกลุ่มนี้จะมีค่า distance coefficient ต่ำกว่า 3.6 % เช่นเดียวกับที่ Sreenivasaprasad *et al.* (1996) ได้รายงานไว้ และสอดคล้องกับวิธีการจัดจำแนกโดย Sutton ในปี 1980 ยกเว้นผลจากการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากบอนสี และกระเจียว ซึ่งมีสปอร์รูปลักษณะคล้ายเคียว เมื่อทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลที่ได้คือจัดอยู่ใน *C. capsici* แต่จากค่า distance coefficient ที่ได้มีค่าสูงกว่า 3.6 % เมื่อเทียบกับเชื้อ *C. capsici* ที่ใช้อ้างอิง ดังนั้นผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับหลักการ

ของ Sreenivasaprasad *et al.* (1996) อาจเนื่องจากการที่เชื้อในสปีชีส์นี้ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดมากนัก และอาจสามารถจัดแบ่งออกจากกันได้อีกสปีชีส์ ซึ่งเป็นจุดที่น่าจะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต นอกจากการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วยังมีการนำวิธีการทางโมเลกุลอื่นๆ มาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* เช่น เทคนิค RAPD (Mills *et al.*, 1992) การทำ RFLP ในส่วนของ rDNA และ mtDNA (Hodson *et al.*, 1992; Sreenivasaprasad *et al.*, 1992; 1993)

เมื่อพิจารณา tree ที่ได้ทั้งสองจะพบว่า 9 ไอโซเลทของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันถูกจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันคือ *C. gloeosporioides* แต่ภายในสปีชีส์เดียวกันนี้ก็สามารถจัดออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่า เชื้อราในสปีชีส์นี้มีความผันแปรสูง และเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวาง จึงน่าจะมีการจัดแบ่งออกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD ใน 39 ไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถแบ่งเชื้อราเหล่านี้ได้มากกว่า 12 กลุ่ม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับแหล่งของพืชอาศัย และสภาพภูมิประเทศ (Mills *et al.*, 1992) ซึ่งรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ rDNA และ mtDNA ของเชื้อสปีชีส์นี้ด้วยเทคนิค RFLP (Hodson *et al.*, 1992) เมื่อพิจารณาพืชอาศัยของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างตระกูลสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังเช่นเชื้อราที่แยกได้จากกาแฟไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท CGcofC ซึ่งแยกได้จากพืชชนิดเดียวกัน แต่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท 203 และ AV3/1 ที่แยกได้จากพืช *Aeschynomene virginica* และ *Persea americana* ตามลำดับ ในการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากกาแฟไม่มีความผันแปรมากนักเมื่อเทียบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดอื่นที่พบได้ทั่วไป (Hodson *et al.*, 1992; Sreenivasaprasad *et al.*, 1993) จากการศึกษาโดย Sherriff *et al.* (1994) ได้ทำการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสในตำแหน่ง Domain 1 (D1) D2 และ ITS2 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืช *Aeschynomene virginica* *Mangifera indica* และ *Malus domestica* สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกันน้อยมากที่จะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบน rDNA หรือ mtDNA ที่ได้จากเทคนิค RFLP เหมือนกัน (Hodson *et al.*, 1992) หรือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD (Mills *et al.*, 1992) ซึ่งให้เห็นว่ามีความผันแปรมากภายในเชื้อรา *C. gloeosporioides* และสำหรับผลของการวิเคราะห์ rDNA และ mtDNA ด้วยเทคนิค RFLP ของ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากสตอร์เบอร์หลายๆ ไอโซเลท พบว่าสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (Sreenivasaprasad *et al.*,

1992) ในพืชสกุล *Styosanthes* เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพืชในกลุ่มนี้สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (Sheriff, 1994)

การวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS1 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ และสามารถจัดกลุ่มสปีชีส์ใหม่ได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาเชื้อราที่มีความผันแปร และมีความใกล้ชิดกันภายในกลุ่มสูง ควรมีการศึกษาลำดับเบสในตำแหน่งอื่นๆ นอกจากตำแหน่ง ITS1 ร่วมด้วย เช่น 18 S และ 28 S เป็นต้น