บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากพืชอาศัยทั้งหมด 38 ชนิด (ตาราง 4) โดยศึกษาจากลักษณะของ colony รูปร่างและขนาดของ conidia และ appressoria การสร้าง/ไม่สร้าง sclerotia และ setae จากนั้นจัดจำแนก สปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์คือ

กลุ่มที่ 1 คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชอาศัย 33 ชนิด ได้แก่ ชมพู่ น้อยหน่า ฝรั่ง พุทรา มะนาว มะม่วง1 มะม่วง 2 มะละกอ ลำไย ส้ม1 ส้ม2 ส้มโอ กล้วยไม้1 กล้วยไม้2 กวนอิม กุก กุหลาบ1 กุหลาบ2 ข่าป่า เงินไหลมา ชงโค ทองหลางด่าง นมหนู ปัตตาเวีย ปุดคางคก มะลิ เล็บครุฑ วาสนา สาวน้อยประแป้ง กาแฟ พริก เม็กซิกัน พริกยักษ์ และสาบเสือ ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ เส้นใยฟูหนาแน่น สร้าง pigment ตั้งแต่สีขาว สีเขียวจนถึงสีเทาเข้ม อัตราการเจริญอยู่ที่ระดับ 10.9±5 มิลลิเมตรต่อวัน รูปร่าง conidia คล้ายแคปซูลหัวท้ายมน (cylindrical) หรือมนด้านหนึ่งและอีกแหลมที่ปลายอีกด้านหนึ่ง ขนาดประมาณ 9.8-25.7 x 2.5-12.3 ไมครอน มี appressoria ส่วนใหญ่รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) สีน้ำตาล ขนาดประมาณ 4.9-24.6 x 3.7-12.3 ไมครอน สร้าง setae และ scerotia บางไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 คือเชื้อรา *Colletotrichum musae* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า และกล้วยหอม ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้คือ เส้นใยเจริญดีกว่าและบางกว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* อัตราการเจริญอยู่ที่ 13.5±0.2 มิลลิเมตรต่อวัน สร้าง mass เป็นหยด สีส้มข้นจำนวนมาก สร้าง pigment สีเทาอมส้ม รูปร่าง conidia เป็นแคปซูลหัวท้ายมน (cylindrical) ขนาดประมาณ 15.4-36.0 x 4.9-6.4 ไมครอน ซึ่งคล้ายกับ conidia ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* แต่แตกต่างกันตรงรูปร่างของ appressoria ซึ่งมีรูปร่างแบบไม่สม่ำเสมอ (irregular) สีน้ำตาลเข้ม ขนาดประมาณ 9.8-19.7 x 7.4-17.2 ไมครอน ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีappressoria คล้ายกระบอง จึงสามารถใช้แยกเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ 3 คือเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ พริกชี้ฟ้า สตรอเบอรี และแอปเปิล ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้คือ เส้นใยละเอียดคล้ายกำมะหยี่ ค่อนข้างแบน เจริญช้า สร้าง pigment สีส้มแกมเทา อัตราการเจริญอยู่ที่ 8.84±1 มิลลิเมตรต่อวัน รูปร่าง conidia คล้ายลูกรักบี้หัวท้ายแหลม (fusiform) ขนาดประมาณ 12.2-17 x 3.7-4.9ไมครอน appressoria มีสีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ขนาดประมาณ 9.8-19.1 x 4.9-9.8 ไมครอน ไม่สร้าง setae

กลุ่มที่ 4 คือเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพืชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ เศรษฐีไซ่อน แอฟริกันไวโอเลต และผักโขม ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้คือ เส้นใยหนาค่อนข้างหยาบ มีสีเขียวแก่จนถึงสีเทา รูปร่าง conidia โค้งคล้ายเคียว (falcate) ขนาดประมาณ 14.1-32.1 x 2.5-6.4 ไมครอน มี guttulate (ลักษณะคล้ายฟองอากาศ) อยู่ภายใน appressoria สีน้ำตาล มีทั้งรูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ขนาดประมาณ 9.8-17.2 x 4.9-14.8 ไมครอน สร้าง setae จำนวนมาก แต่ไม่สร้าง sclerotia

จากจำนวนของพืชอาศัยที่ถูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เข้าทำลาย พบว่าเชื้อราสปีชีส์ *C. gloeosporioides* เข้าทำลายพืชอาศัยได้มากชนิดที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพัชรา (2543) ศรัญญา (2544) และ เอมอร (2544) และพบเชื้อรา *C. gloeosprorioides* เข้าทำลายสตรอเบอรีอีกด้วย (ธารทิพยและคณะ, 2547) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *C. gloeosprorioides* บาง strain มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชบางชนิด เช่น เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ทำลายอัลมอนด์ในอิสราเอล (Freeman *et al.*, 1996; Katan and Shabi, 1996) และเชื้อรา *C. capsici* ก็เป็นเชื้ออีกสปีชีส์หนึ่ง ซึ่งมีรายงานการเข้าทำลายพืชอาศัยหลายชนิดเช่นกัน (ธารทิพยและคณะ, 2547) เช่น พริก ฝ้าย มะเขือยาว ปอกระเจา (Mordue, 1971) มะเขือเทศ (วิรัชและคณะ, 2528) และมะละกอ (กรรณิการ์, 2528) เป็นต้น แต่เคยมีรายงานว่าเชื้อที่เข้าทำลายผักโขมเป็นเชื้อรา *C. truncatum* (พัฒนาและคณะ, 2534b)

นอกจากนี้ การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ยังสามารถใช้วิธีอื่นได้อีก เช่น Adaskaveg and Hartin (1997) รายงานว่า การทนสารกำจัดเชื้อรา benomyl ของเชื้อสามารถแยกเชื้อราสาเหตุ *C. gloeosporioides* ในส้มและมะละกอ ออกจากเชื้อรา *C. acutatum* ในสตรอเบอรีได้ โดยเชื้อ *C. gloeosporioides* ทุกไอโซเลทไม่สามารถทนสาร benomyl ได้ในขณะที่เชื้อรา *C. acutatum* ทุกไอโซเลทไม่ถูกยับยั้งการเจริญ และยังพบอีกว่าเชื้อรา *C. acutatum* เจริญช้ากว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยอุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อรา *C. acutatum* อยู่ที่ 25.0-26.5 องศาเซลเซียส (สูงสุดที่ 33.0 องศาเซลเซียส) และเชื้อรา *C. gloeosporioides* อยู่ที่ 26.0-28.5 องศาเซลเซียส (สูงสุดที่ 35.5 องศาเซลเซียส) (Vinnere, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ และมีการยืนยันผลเช่นเดียวกันในอีกหลายงานวิจัย (Bernstein *et al.*,1995; Gunnell and Gubler,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1992; Simmon, 1965 และ Sutton, 1992) ในบางกรณี การใช้เพียงลักษณะรูปร่างของ conidia อย่างเดียว สามารถจำแนกเชื้อได้ เช่น การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* ในสตรอเบอรี พบ 3 สปีชีส์ คือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีรูปร่างหัวท้ายมน เชื้อรา *C. fragariae* มีรูปร่างปลายข้างหนึ่งมน อีกข้างแหลม และเชื้อรา *C. acutatum* มีรูปร่างหัวท้ายแหลม (Smith and Black, 1990; Denoyes and Baudry, 1995)

การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวยังมีข้อจำกัด เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการศึกษาของนักวิจัยแต่ละคนแตกต่างกัน และลักษณะความผันแปรของเชื้อแต่ละไอโซเลท จึงทำให้เกิดความสับสนและไม่แน่นอนในการจำแนกชนิดของเชื้อ (Sutton, 1992) ลักษณะที่คล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกันของเชื้อราแต่ละชนิดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความลำบากในการจำแนกเชื้อ (Adaskaveg and Hartin, 1997; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) Vaillancourt and Hanau (1992) รายงานว่าลักษณะ appressoria ของเชื้อรา *C. graminicola* (Ces.) G.W. Wils. ในข้าวโพด ข้าวฟ่าง และอ้อย มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามลักษณะเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในเชื้อชนิดเดียวที่เข้าทำลายพืชอาศัยต่างชนิดกัน (Swart, 1999) Baxter *et al.* (1993) กล่าวว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของ appressoria ภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่ง Gunnell and Gubler (1992) พบว่าลักษณะ appressoria ไม่สามารถจำแนกเชื้อภายในสปีชีส์ได้เนื่องจากขนาดและรูปร่างมีความคล้ายคลึงกันมากเกินไป จากข้อมูลข้างต้นทำให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก (Freeman *et al.*, 1998) ดังนั้นวิธีทางอณูวิทยาจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยใช้ในจัดจำแนกเชื้อ และหนึ่งในวิธีซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายคือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 41 ชนิด ด้วยเทคนิค ISSR โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น microsatellite ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มของเชื้อราได้ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีในรายงานอ้างอิงเพียง 2 ไพรเมอร์จาก 7 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 161 แถบ เมื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Phylip และสร้าง dendrogram เพื่อแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbor-joning พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อราที่นำมาศึกษาได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และจากกลุ่มใหญ่นี้ยังแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อย 12 กลุ่ม จะเห็นว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* แยกกลุ่มออกจากเชื้อรา *C. musae*, *C. acutatum* และ *C. capsici* แต่มีเชื้อรา *C. gloeosporioides* บางไอโซเลท ได้แก่ ส้มโอ ส้ม 1 ส้ม 2 ปุดคางคก มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *C. musae* ที่แยกได้จากกล้วยน้ำว้าและกล้วยหอม ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้สอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งสามารถแยกกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามสปีชีส์ได้ จากการทดลองดังกล่าวยังสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เป็น 10 กลุ่มย่อย แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีความผันแปรภายในสปีชีส์สูง ไม่สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ตามลักษณะพืชอาศัย เช่น การเป็นไม้ผล หรือไม้ดอกไม้ประดับ ดังรายงานของ Freeman (1998) กล่าวว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อรา species complex ที่มีความซับซ้อนภายในสปีชีส์ค่อนข้างสูง และสามารถแบ่งเชื้อราในสปีชีส์นี้ออกเป็น 6 form species นอกจากนี้ยังมีการแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* var. *minus* Simmonds เป็นอีกสปีชีส์หนึ่งในจำนวน 39 สปีชีส์ของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* อีกด้วย (Sutton, 1992) ซึ่งเทคนิค ISSR นี้สามารถยืนยันความหลากหลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้มากกว่าการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้การจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา เช่น เทคนิค ISSR ช่วยให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนภายในประชากรเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ได้แน่นอนและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved