บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมจำนวน 623 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 17 แหล่ง จาก 15 จังหวัด สามารถแยกและเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมในห้องปฏิบัติการจนสามารถพัฒนาเป็นโคโลนีได้ 64 ไอโซเลต โดยพบว่าในบางแหล่งไม่สามารถแยกราที่ก่อไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมได้เลย ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะช่วงฤดูกาลและความสมบูรณ์ในแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกัน รวมทั้งเกี่ยวข้องกับชนิดของไลเคนที่นำมาศึกษาสอดคล้องกับรายงานของ Sangvichien (2005) ที่พบว่า อัตราการปลดปล่อยสปอร์และเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ของไลเคนมีความเกี่ยวข้องกับฤดูกาล ซึ่งมีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการปล่อยและการงอกของสปอร์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความสมบูรณ์ของแทลลัสไลเคน และชนิดของไลเคน

เมื่อนำไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมที่แยกได้มาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าไลเคนที่จัดกลุ่มได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย การกระจายตัวของไลเคนแต่ละสัณฐานวิทยานั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่จะมาจำกัดการกระจายพันธุ์ ดังจะเห็นได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันของสมาชิกในแต่ละกลุ่มที่จัดได้ มีความหลากหลายของแหล่งที่เก็บในภูมิภาคต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับ Vongshewarat (2000) พบว่าไลเคนในวงศ์ทริพิทิเลียซิอิเป็นไลเคนที่มีการแพร่กระจายทั่วไปในประเทศไทย

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของราเป็นวิธีการทางอณูวิทยาอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์และจัดจำแนกชนิดของราชนิดต่างๆ ร่วมทั้งไลเคน ซึ่งสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ถึงระดับสกุลและชนิด (Krupa, 1999; Schmitt และ Lumbsch, 2004) ตำแหน่ง ITS ยังเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้โดยทั่วไปในการจัดจำแนกชนิดของรา (White และคณะ, 1999) เทคนิค ITS-RFLP เป็นวิธีการที่ช่วยในการจัดจำแนกราในหลายๆกลุ่มเช่น กลุ่มรา ectomycorrhiza (Timonen, 1997) เมื่อนำราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ได้จากการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยามาทำการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคอณูวิทยา ITS-RFLP พบว่า สามารถจัดจำแนกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้เป็น 22 จีโนไทป์ จากกลุ่ม 6 ที่จัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยมีจำนวน 6 จีโนไทป์ มีสมาชิกมากกว่า 1 ไอโซเลตและ จำนวน 16 จีโนไทป์ จะมีสมาชิกในแต่ละจีโนไทป์เพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้น โดยแต่ละจีโนไทป์จะมีแบบแผน ITS-RFLP เป็นของตัวเอง ซึ่งทั้งหมดกระจายตัวอยู่ใน 6 กลุ่มสัณฐานวิทยา แสดงให้เห็นว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมมีความแปรผัน

ทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันมาก ซึ่งลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับรายงานของ Guzow-Krzemiska และ Wegrzyn (2000) ที่ได้ทำการจัดจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไลเคนสกุล *Melanelia* ที่ตำแหน่ง LSU และ SSU ด้วยเทคนิค RFLP พบว่า ในไลเคนชนิดเดียวกันสามารถพบเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันได้มากกว่าหนึ่งรูปแบบ โดยเป็นผลมาจากการเกิดมิวเตชั่นมีทั้งที่เกิดจากการเพิ่มลดจำนวนเบสนิวคลีโอไทด์ และหรือการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับรายงานของ Kanchanaprayudh และคณะ (2003) ที่พบว่าชิ้นส่วนของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ITS-RFLP ของ *Pisolithus* มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีการเพิ่มเข้าหรือลดลงของจำนวนเบสนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมที่ตำแหน่ง ITS และตำแหน่ง mtSSU โดยนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่า ที่ตำแหน่ง ITS จะมีความเหมือนกับรามีรายงานไว้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ที่จัดอยู่ในอันดับของ Trypetheliales และที่เหลือจะมีความเหมือนตรงกับราในอันดับอื่นๆ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนอยู่เพียงบางส่วนเท่านั้น และที่ตำแหน่ง mtSSU พบว่า มีความหลากหลายของข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูลมากกว่าตำแหน่ง ITS โดยความเหมือนกันราในอันดับ Trypetheliales และ Pyrenulales อยู่ระหว่าง 92-100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าในการศึกษาราที่ก่อให้เกิดไลเคนยังมีอยู่น้อยมากในตำแหน่ง ITS ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะตำแหน่ง ITS เป็นตำแหน่งที่มีการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ได้กับราทุกชนิดไม่ได้จำเพาะเจาะจงกันราในกลุ่มแอสโคไมโคตา (Larena และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นกลุ่มราที่ก่อให้เกิดไลเคนเป็นส่วนใหญ่และเนื่องจากการศึกษาไลเคนทางด้านอณูวิทยาส่วนใหญ่มักใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนของแทลลัสของไลเคนโดยตรง มากกว่าการแยกเฉพาะราที่ก่อให้เกิดไลเคนมาสกัดดีเอ็นเอ ทำให้อาจจะมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากราชนิดอื่นๆ ในธรรมชาติ (Hofstetter และคณะ, 2007; Ertz และคณะ 2009) ในขณะที่ตำแหน่ง mtSSU เป็นตำแหน่งมีการออกแบบไพรเมอร์ให้ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Zoller และคณะ, 1999) จึงทำให้ในฐานข้อมูล GeneBank ส่วนใหญ่พบเฉพาะข้อมูลที่ตำแหน่ง mtSSU

จากการวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU พบว่า มีความสอดคล้องกัน โดยสามารถแบ่งไอโซเลตราที่ก่อให้เกิดไลเคนออกเป็น 2 เคลด (ภาพที่ 4.3 และ 4.4) เคลดที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอันดับ Pyrenulales ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้ทั้งหมดมีลักษณะสัณฐานวิทยาและการทำปฏิกิริยาเคมีของเพอริทีเซียกับสารละลาย 10% KOH ตรงกับกลุ่ม III และ เคลดที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอันดับ Trypetheliales โดยเฉพาะในไลเคนสกุล

ทริพิทิเลียมบ่อยครั้งที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับไลเคนวงศ์ Pyrenulaceae สอดคล้องกับรายงานของ Aptroot (2009a) ที่กล่าวว่าในการจัดจำแนกไลเคนวงศ์ Pyrenulaceae และ Trypetheliaceae จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสีแอสโคสปอร์ที่สมบูรณ์เป็นหลักในการแยกทั้ง 2 วงศ์ออกจากกัน แต่บางครั้งลักษณะดังกล่าวมีลักษณะที่เหมือนกัน จึงทำให้ยากในการตัดสินใจในการจัดจำแนกได้ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไลเคนในกลุ่ม Pyrenulales ทั้งหมดจะมีเพอริทีเซียที่ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH แต่มีตัวอย่างไลเคนในกลุ่มทริพิทิเลียมบางตัวอย่าง (RN 5 และ SMS 17) มีเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH เช่นกัน ส่วนใหญ่แล้วตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในกลุ่มทริพิทิเลียมจะมีเพอริทีเซียที่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ดังนั้น การทำปฏิกิริยาเคมีกับ KOH ของเพอริทีเซียอาจจะสามารถใช้เป็นคุณสมบัติเบื้องต้นประการหนึ่งที่ใช้ในการประกอบการแยกไลเคน 2 กลุ่ม ออกจากกัน จากการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าสามารถแยก Pyrenulales ออกจาก Trypetheliales อย่างชัดเจนสอดคล้องกับรายงานของ De Prado และคณะ (2006) ที่ได้ทำการวิเคราห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง mtSSU และ nuLSU พบว่า ไลเคนวงศ์ Trypetheliaece แยกความสัมพันธ์ออกจากไลเคนวงศ์ Pyrenulaceae ที่เดิมทั้ง 2 วงศ์จัดอยู่ใน Dothideomycetes เหมือนกัน แต่ปัจจุบัน Pyrenulaceae ได้แยกตัวไปอยู่ใน Chaetothyriomycetes

จากการวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนเฉพาะในสกุลทริพิทิเลียมที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU พบว่าสามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้เป็น 2 เคลดใหญ่ 4 lineage ประกอบไปด้วย 8 กลุ่มย่อย ซึ่งทั้งหมดสามารถแบ่งได้เป็น 9 ชนิดตามลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนใหญ่มักมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย clade I มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ซึ่งในกลุ่ม A2 พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยามากกว่า 1 กลุ่มลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ มีเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังก้นสปอร์จำนวน 3 ผนัง เพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH (NSR 6 และ TSL 72) และมีเพอริทีเซียสีขาว ผนังก้นสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง เพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมมีกับสารละลาย 10% KOH แต่กลับ พบว่า กลุ่ม B มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเพอริทีเซียเป็นสีเหลือง ผนังก้นสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH เหมือนกับในตัวอย่างกลุ่ม A2 (NSR 6 และ TSL 72) ทั้งที่พันธุกรรมต่างกัน ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างเบื้องต้นได้ ดังนั้นเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะอื่นๆ อีกครั้งหนึ่งจึงพบว่าในกลุ่ม A2 และ B มีความแตกต่างกันในเรื่องของลักษณะการกระจายตัวของเพอริทีเซียและลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยง MYA พบว่า กลุ่ม A2 มีการกระจุกตัวของเพอริทีเซียมากกว่ากลุ่ม B และกลุ่ม A2 มีลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลแดง ในขณะที่ B มีโคโลนีสีดำ ส่วนใน clade II จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ในกลุ่ม D มี 3 กลุ่มย่อย

ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกัน (D2 D3 และ D4) ซึ่งมีลักษณะเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังกั้น สปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH แต่เมื่อศึกษาลักษณะโคโลนี พบว่า มีความแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน โดยสมาชิกที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันจะมีลักษณะโคโลนีที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ กลุ่ม D2 มีลักษณะโคโลนีและเส้นใยสีน้ำตาลแดง กลุ่ม D3 มีลักษณะโคโลนีและเส้นใยสีน้ำตาลเทา และ กลุ่ม D4 มีลักษณะโคโลนีและเส้นใยสีขาว ซึ่งการนำลักษณะโคโลนีของราที่ก่อให้เกิดไลเคนมาใช้ในการจัดจำแนกไลเคน ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเป็นครั้งแรก และจากการนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง mtSSU เปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GeneBank ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มี 3 ชนิดที่สามารถระบุชนิดที่แน่นอนได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สอดคล้องกัน ได้แก่ 1. *Trypethelium nitidiusculum* (NSR 16) 2. *Trypethelium tropicum* (RN 5 และ SMS 17) และ 3. *Trypethelium eluteriae* (ไอโซเลตที่อยู่ในกลุ่ม D2 D3 และ D4) โดยเฉพาะในกลุ่มนี้จากการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันจัดเป็น *Trypethelium eluteriae* เหมือนกัน จากการตรวจสอบข้อมูลชนิดของราจากฐานข้อในเว็บไซต์ http://www.indexfungorum.org พบว่า *Trypethelium eluteriae* มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากถึง 12 สายพันธุ์ จึงเป็นไปได้ว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมในกลุ่ม D2 D3 และ D4 อาจจะเป็นสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งใน 12 สายพันธุ์นี้ จะเห็นได้ว่าข้อมูลทางอณูวิทยามีความสอดคล้องกับข้อมูลที่มีมาก่อนหน้านี้ แต่ข้อมูลทางอณูวิทยาที่ได้นี้ยังแสดงให้เห็นว่า *T. eluteriae* น่าจะมีการจัดจำแนกเป็นชนิดใหม่มากกว่าที่จะจัดจำแนกเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนควรจะต้องมีการทบทวนการจัดจำแนกใหม่โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยวงศ์วานวิวัฒนาการ การทำปฏิกิริยาเคมีของเพอริทีเซียกับ 10% KOH และลักษณะของโคโลนีร่วมกันอีกครั้งหนึ่ง

สารในกลุ่มแซนโทน (xanthone) และแอนทราควิโนน (anthraquinone) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีรายงานการพบในไลเคนวงศ์ทริพิทิเลียซิอีได้ทั่วไป เช่น lichexanthone, parietin (Harris, 1984) draculone และ haematommone (Mathey และคณะ, 2002) โดยมีการศึกษาคุณสมบัติของสารในกลุ่มแซนโทนและแอนทราควิโนน พบว่า มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของรา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. (Mathey, 1979) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Manojlovic และคณะ, 2002) จากการศึกษาสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ด้วยวิธี TLC โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลายและมีระบบตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสารที่ราที่ก่อให้เกิดไลเคนผลิตได้เป็น 8 กลุ่ม (ตารางที่ 4.5) มีตำแหน่งค่า Rf ตั้งแต่ 0.00-0.87 ซึ่งมีบางกลุ่มเท่านั้นที่อาจจะใช้ลักษณะการสร้าง

สารทุติยภูมิในการจัดจำแนกได้ แต่บางกลุ่มพบว่าสารที่แยกได้มีลักษณะเหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ จึงไม่อาจจะนำลักษณะการสร้างทุติยภูมิมาใช้ในการจัดจำแนก Frisvad และคณะ (2008) กล่าวว่าสารทุติยภูมิที่ราสร้างขึ้นบางครั้งจะจำกัดอยู่ในสกุล อันดับ หรือ ไฟลัม เมื่อนำสารทุติยภูมิที่แยกองค์ประกอบได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด ด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่า ราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมไอโซเลต KY 418 เป็นไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้ ส่วนในไอโซเลตที่ไม่สามารถแยกองค์ประกอบของสารทุติยภูมิได้นั้นอาจจะเป็นเพราะปริมาณสารที่มีอยู่น้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องมาจากความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิของไลเคนมีความแตกต่างกันไปตามอายุในการเจริญและชนิดของไลเคนชนิดนั้นๆ หรือระบบตัวทำละลายที่ใช้อยู่ยังไม่มีความสามารถในการแยกองค์ประกอบของสารเหล่านั้นได้สอดคล้องกับรายงานของ Sangvichien (2005) พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิในสภาพการเลี้ยงแบบ static culture โดยส่วนใหญ่ราที่ก่อให้เกิดไลเคนทั้งหมดมีการสร้างสารทุติยภูมิเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงหรือสภาวะที่เหมาะสมทางสรีรวิทยาในการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิ ขยายส่วนในการเลี้ยงและนำมาแยกสารเพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไป เพื่อเป็นประโยชน์ทางการแพทย์และทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคต