บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ *Pythium* รวมถึงการสร้าง zoospore ใน 12 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งประกอบด้วย *P. insidiosum* ที่แยกได้จากผู้ป่วย pythiosis, *P. graminicola* และ *Pythium* spp.จากสิ่งแวดล้อมนั้นไม่พบความแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถแยก species ที่แตกต่างกันได้ จึงได้นำวิธีการศึกษาทางอณูชีววิทยา คือ วิธี PCR การ cloning และการหาลำดับเบสมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสของบริเวณ IGS-1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลาย ในที่นี้ได้ออกแบบ primers โดยอาศัยข้อมูลจาก GenBank ได้เป็น forward primer 1 : PI28SF และ reverse primer 6 : PI5SF ซึ่งครอบคลุมบริเวณ 28S rDNA และ 5S rDNA (รูปที่ 23) ผล PCR product ที่ได้ของแต่ละสายพันธุ์มีเพียงขนาดเดียวเท่านั้น คือ ประมาณ 4000 คู่เบส (รูปที่ 30) เมื่อนำไปศึกษาหาลำดับเบสโดยการทำ walking sequence ได้ความยาวประมาณ 2,500 คู่เบส ลำดับเบสบริเวณนี้ คือ บริเวณ 28S rDNA มีความอนุรักษ์ในทุกสายพันธุ์ สำหรับความยาวของบริเวณ IGS-1 ซึ่งมีลำดับเบสที่มีความหลากหลาย ได้ใช้วิธีการ cloning และ sequencing ได้ความยาวประมาณ 1,000 – 1,570 คู่เบส (รูปที่ 31, 32, 34 และ ตารางที่ 3) เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ IGS-1 ของทุกสายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์และทำ phylogenetic tree พบว่า สามารถแบ่ง *P. insidiosum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้เป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 32, 33 และ 34) สำหรับเชื้อ *P. gramionicola* มีความแตกต่างจากลำดับเบสของเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม จึงเป็นเชื้อที่จัดอยู่นอกกลุ่ม โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วย M17, PyCU3, PyCU7 และ PyCU8 กลุ่ม 2 ประกอบด้วย PyCU1, PyCU2, และ PyCU5 และกลุ่ม 3 ประกอบด้วย PyCU6, MMC45P21-2, PyCU4 และ MMC44P21-1 สำหรับแหล่งที่มาของเชื้อในแต่ละเชื้อมีความแตกต่างกันโดยกลุ่ม 1, 2, 3 มาจากภาคกลาง อีสาน และภาคเหนือ, ภาคกลาง, และภาคเหนือ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น จึงไม่สามารถที่จะกล่าได้อย่างชัดเจนถึงความแตกต่างของแหล่งที่มา

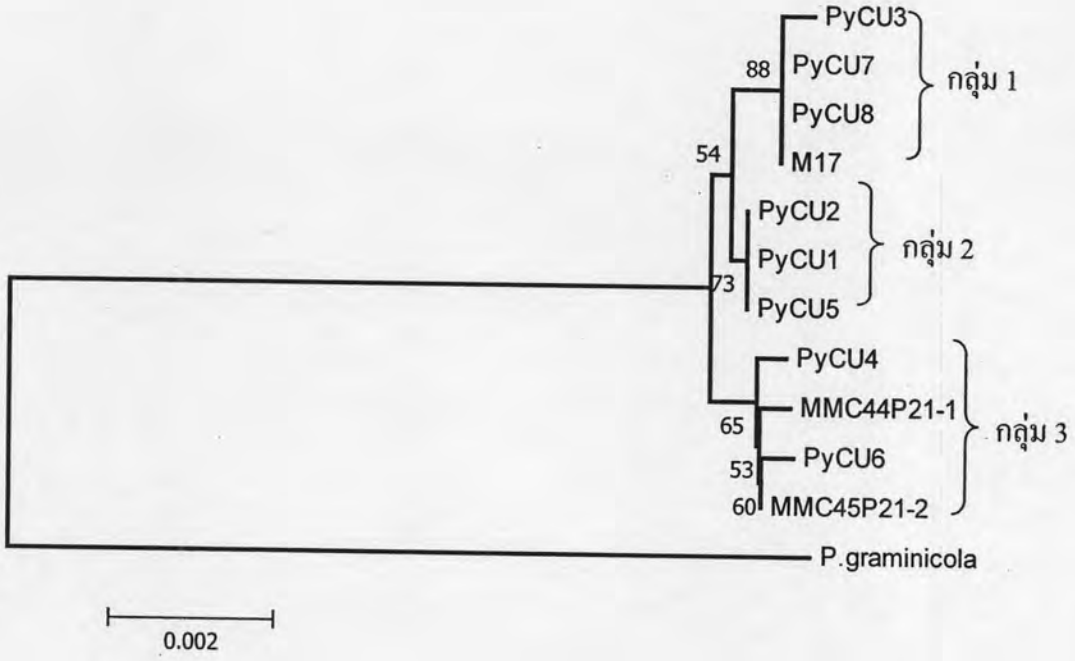
อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

Pythium 11 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยโดยได้พิสูจน์และยืนยันเชื้อทั้งหมดด้วยการศึกษาลักษณะมหสัณฐาน, ลักษณะจุลสัญฐาน และความสามารถในการสร้าง zoospore พบว่า ทุกสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาลำดับเบสบริเวณ rRNA gene ของเชื้อ *Pythium* ในบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ 28S ถึงบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ 5S โดยใช้ primers ที่ออกแบบ ในการทดลองนี้ พบว่ามีความยาวทั้งหมดประมาณ 4,000 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส ปรากฏว่า เชื้อ *P. insidiosum* 10 สายพันธุ์จากผู้ป่วย pythiosis (ในที่นี้รวมถึงDNA จาก *P. insidiosum*, M17, จำนวน 1 สายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. L. Mendoza) เชื้อ *Pythium* 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม คือ จากริมน้ำในเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จังหวัดลพบุรี และ เชื้อ *Pythium* อีก 1 สายพันธุ์ ที่ก่อโรคในพืช คือ *P. graminicola* นั้น มีความยาวของลำดับเบสในบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ 28S rRNA gene และบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ 5S rRNA gene ประมาณ 2,500 คู่เบส และ 55 คู่เบส ตามลำดับ และลำดับเบสที่อยู่ระหว่าง 28S rRNA และ 5S rRNA subunit คือ ลำดับเบสในส่วนของ IGS-1 ซึ่งเป็นบริเวณที่ความหลากหลายสูง (polymorphism) มีความยาวประมาณ 1.400-1.500 คู่เบส ยกเว้น *P. graminicola* ที่มีความยาวประมาณ 1,000 คู่เบส ซึ่งสั้นกว่าสายพันธุ์อื่นในการทดลองนี้

ลำดับเบสอนุรักษ์ทั้งบริเวณ 28S rRNA subunit และ 5S rRNA subunit ของ DNA จากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 12 สายพันธุ์มีลำดับเบสที่คล้ายกันมาก โดยเมื่อนำลำดับเบสส่วนอนุรักษ์ 28S มาเปรียบเทียบกับเชื้อ M17 และ ทำ phylogenetic tree (รูปที่ 37) พบว่าเชื้อที่เป็น *P. insidosum* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ดังตารางที่ 5 ดังนี้ คือ กลุ่ม 1 มี homology 99.96-100% ประกอบด้วยเชื้อ PyCU3, PyCU8 และ PyCU7 กลุ่ม 2 มี homology 99.92% ประกอบด้วยเชื้อ PyCU5, PyCU1และ PyCU2 และ กลุ่ม 3 มี homology 99.80-99.84% ประกอบด้วยเชื้อ PyCU4, MMC44P21-1, MMC45P21-2 และ PyCU6 ส่วนเชื้อ *P. graminicola* มี homology 97.77% ซึ่งผลที่ได้ในการจัดกลุ่มของลำดับเบสอนุรักษ์ 28S นั้นจะสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยการทำ phylogenetic tree ในส่วนลำดับเบส IGS-1 ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวภายหลังจากนี้

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ จำนวนเบสที่แตกต่าง และ เปอร์เซ็นต์ความเหมือน(homology)ในส่วนลำดับเบสอนุรักษ์ 28S subunit เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ M17

กลุ่ม	ชื่อ	จำนวนเบสที่แตกต่างกับเชื้อ M17 ในลำดับเบส 28S rRNA subunit (เบส)	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology)ในส่วนลำดับเบส 28S rRNA subunit
1	PyCU3	1	99.96%
	PyCU8	ไม่มี	100.00%
	PyCU7	ไม่มี	100.00%
2	PyCU5	2	99.92%
	PyCU1	2	99.92%
	PyCU2	2	99.92%
3	PyCU4	5	99.80%
	MMC44P21-1	5	99.80%
	MMC45P21-2	4	99.84%
	PyCU6	5	99.80%
	P. graminicola	55	97.77%



รูปที่ 37 แสดง Phylogenetic tree ในส่วนลำดับเบสอนุรักษ์ 28S rRNA subunit (2,500 คู่เบส) ของเชื้อ *Pythium* 12 สายพันธุ์

การศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกลุ่มเดียวกันโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาต้องอาศัยยีนที่ประกอบด้วยส่วนอนุรักษ์และส่วนที่มีความหลากหลาย เท่าที่มีการสืบค้นหลักฐานทางวิชาการมักนิยมใช้ rRNA gene บริเวณ intergenic transcribed (ITS) ซึ่งเป็น repetitive sequence และมีคุณสมบัติดังที่ได้กล่าวแล้ว ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ในกลุ่มพืช กลุ่มแบคทีเรีย กลุ่มปรสิต และกลุ่มเชื้อรา สำหรับเชื้อ *P. insidiosum* ก็มีหลักฐานการรายงานที่ใช้ ITS เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว ในปี ค.ศ. 2003 Schurko และคณะ รายงานการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* จำนวน 23 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากทวีปต่างๆ พบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 3 clade ตามแหล่งที่มาของเชื้อ โดยที่ Clade I ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก อเมริกาเหนือ, อเมริกากลาง และ อเมริกาใต้ Clade II ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้จาก เอเชีย, ประเทศออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา และ Clade III ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้จากประเทศไทย และ สหรัฐอเมริกา และ สำหรับเชื้อ *Pythium* spp. ที่ก่อโรคในพืช *Lagenidium gigateum* ที่ก่อพยาธิสภาพคล้ายโรค pythiosis ในสัตว์ และ *Phythopthora megasperma* ซึ่งมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับเชื้อ *Pythium* spp. ได้ถูกจัดแยกออกจากเชื้อ *P. insidiosum*อย่างชัดเจน (48) และจากนั้นได้ทำการศึกษาโดยมุ่งที่บริเวณ Intergenic spacer I (IGS-1) rDNA ด้วยวิธี PCR-RFLP

ปรากฏว่าได้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองที่กล่าวมาแล้ว ต่อมาในปี ค. ศ. 2004 นักวิทยาศาสตร์คณะเดิมได้สร้าง specific DNA probe ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่พัฒนาขึ้นที่มีขีดความสามารถสูงขึ้นในการจัดจำแนกเชื้อ *P. insidiosum* จากเชื้อ *Pythium* spp. และเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis และยังสามารถจัดจำแนกเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากภูมิภาคต่างๆได้ออกเป็น 3 clade โดยแบ่งตามความเข้มของการเกิด Hybridization ต่อ DNA probe โดย probe นั้นจะเป็นส่วน 530-bp *Hin*fI fragment ที่ได้มาจากส่วน IGS-1 ของเชื้อ *P. insidiosum* จะเห็นว่าผลการทดลองทั้งหมดนี้มีความสอดคล้องกัน และลำดับเบสในส่วน rRNA gene นั้นมีความสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อต่างๆ ซึ่ง rRNA gene นั้นประกอบด้วย ส่วนลำดับเบสอนุรักษ์คือ 18S, 5S, 28S และ 5.8S และเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับเบส สูง คือ ส่วน ITS (ประกอบด้วย ITS 1 และ 2) และ ส่วน IGS (ประกอบด้วย IGS-1 และ IGS-2) ซึ่งความหลากหลายของลำดับเบสในส่วน rRNA นี้ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้การจัดจำแนกเชื้อราชนิดต่างๆ เช่น *Aspergillus*, *Entomophaga,* และ *Fusarium* เป็นต้น ซึ่งลำดับเบสบริเวณ IGS สามารถบ่งบอกความใกล้ชิดทางสายพันธุ์ของเชื้อต่างๆ และมีศักยภาพสูงในการแยกความแตกต่างในระดับ genus และ species การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเชื้อ *Pythium insidiosum*

จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ในลำดับเบสบริเวณ IGS-1 พบว่าเชื้อที่เป็น *P. insidiosum* ทั้งหมดนั้นจะแยกออกจากกลุ่มเชื้อ *Pythium* ที่ก่อโรคพืช คือ *P. graminicola* ทั้งในการวิเคราะห์ในลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ 28S และ บริเวณ IGS-1 (รูปที่ 33 และ 37) และ *Pythium* spp. (ACCESSION No. APAB254193 GenBank) และเชื้อในกลุ่ม *Phytophthora* อย่างชัดเจน ซึ่งการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Schurko และคณะ ปี 2004 ที่จัดกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากกลุ่ม เชื้อ *Pythium* spp. ที่ก่อโรคพืช และเชื้อ *Phytophthora* การที่ได้กลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* ออกมาเป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 34) นั้นเมื่อวิเคราะห์กับข้อมูลรายละเอียดของแหล่งที่มา, เพศ/อายุ และ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ จากตารางที่ 4 นั้นพบว่าไม่มีความเกี่ยวข้องกันในการจัดแบ่งกลุ่ม เช่น ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ที่ได้จากชิ้นเนื้อจากตา คือ PyCU7 และ PyCU5 นั้นไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน PyCU7 อยู่กลุ่มที่ 1 และ PyCU5 อยู่กลุ่มที่ 2 หรือ แหล่งที่มาของเชื้อ เช่น จากภาคเหนือ คือ PyCU3 จาก จ. แพร่ จัดอยู่กลุ่มที่ 1 และ PyCU4 จาก จ. พิษณุโลกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสอนุรักษ์ 28S และ ลำดับเบสบริเวณ IGS-1 จะให้ผลที่สอดคล้องกันก็ตาม แต่เนื่องจากลำดับเบสอนุรักษ์ 28S ในทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีลำดับเบสที่คล้ายกันมากในขณะที่ลำดับเบสบริเวณ IGS-1 มีความหลายหลายมาก เพื่อให้การศึกษา วิเคราะห์การจัดจำแนกกลุ่ม หรือ การศึกษาระบาดวิทยา จนกระทั่งการใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการให้มีผลที่ถูกต้อง มีความผิดพลาดน้อย ควรจะต้องพิจารณาใช้ลำดับเบสบริเวณ IGS-1 เป็นข้อมูลสำคัญต่อไป

การที่จัดจำแนกกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ประเทศไทยในส่วน IGS-1 ออกเป็น 3 กลุ่มนั้น จะมีประโยชน์ในอนาคตในการออกแบบ specific primers หรือทำ Nested-PCR และสามารถใช้ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เชื้อ *P. insidiosum* ออกจากกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis อีกทั้งข้อมูลลำดับเบสที่ได้นั้นยังจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการทำ Phylogenetic หาความใกล้ชิดของเชื้อ *P. insidiosum* ของสายพันธุ์ไทย ต่อสายพันธุ์เชื้อ *P. insidiosum* จากแหล่งที่มาจากภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลกได้อีก และ ยังสามารถไปประยุกต์ใช้ในการทำ PCR-RFLP เพื่อทราบรูปแบบ (pattern) ลำดับเบสของเชื้อ *P. insidosum* ในสายพันธุ์ประเทศไทยในแต่ละกลุ่ม หรือ อาจไปเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศได้ อีกทั้งรูปแบบลำดับลำดับเบสที่ได้นั้นยังสามารถจะแยกความแตกต่างกับเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis ได้เช่นกัน