

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *F. oxysporum* Schlecht.

F. oxysporum จัดอยู่ใน Division Eumycota, Subdivision Deuteromycotina, Class Hyphomycetes, Order Moniliales, Family Tuberculariaceae, Genus *Fusarium* (Barnett and Hunter, 1972) เป็นราที่จัดอยู่ในกลุ่ม Imperfect fungus เนื่องจากยังไม่พบ sexual spores เส้นใยมีผนังกัน ไม่มีสี คอเมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นมีสีซึ่งจะมีสีต่างๆ กันไปแล้วแต่สภาวะแวดล้อม (ประเทือง, 2538)

Booth (1977) รายงานว่าโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* มีหลายสีตั้งแต่ สีซีดขาว เหลือง ชมพู จนถึงม่วง และเจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ระหว่าง 6.5-7.0 สร้าง conidia 2 แบบ คือ microconidia และ macroconidia ตามปกติเชื้อราจะสร้าง microconidia จำนวนมาก microconidia มี 1 หรือ 2 เซลล์ รูปร่างต่างกันไปตั้งแต่รูปกลมจนถึงรูปไข่ หรือรูปโค้ง และมีขนาด 5-12 x 2.2-3.5 ไมครอน microconidia จะสร้างจาก phialide ซึ่งเจริญจากด้านข้างของเส้นใย หรือจาก phialide ที่เจริญมาจากคอนิไดโอฟอร์สั้น ๆ ที่แตกแขนงจากเส้นใย macroconidia เมื่อเจริญเต็มที่พบว่ามี 3-5 septa รูปร่างส่วนใหญ่จะโค้งปลายเรียว ส่วนน้อยจะยาวตรงมีขนาดต่างกันไป macroconidia สร้างจาก phialide ที่เจริญมาจากด้านข้างของเส้นใย แต่เมื่อเชื้อราอายุมากขึ้น macroconidia จึงจะสร้างจากสปอร์โรโคเคียแทน ขนาดของ macroconidia ที่พบมีขนาดแตกต่างกันไปเช่น สปอร์ที่มี 3 septa มีขนาด 27-46 x 3-5 ไมครอน สปอร์ที่มี 4 septa มีขนาด 35-60 x 3-5 ไมครอน สปอร์ที่มี 6-7 septa มีขนาด 50-66 x 3.5-5 ไมครอน แต่ที่พบบ่อยคือ สปอร์ที่มี 3 septa สำหรับการสร้าง chlamydospore จะสร้างจากส่วนปลายสุด หรือระหว่างกลางของเส้นใย chlamydospore อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นสาย มีสีใส ผนังเรียบหรือขรุขระ

การเข้าทำลายพืชอาศัย

เชื้อราจะเข้าทำลายพืชโดยตรงในดินโดย germ tube ของสปอร์หรือเส้นใยจะแทรกตัวเข้าทางปลายรากโดยตรง หรือโดยทางแผล หรือที่จุดกำเนิดของรากแขนง (ประเทือง, 2538) อุณหภูมิของดินเป็นปัจจัยสำคัญในการเข้าทำลายพืช ถ้าอุณหภูมิของดินต่ำกว่า 17 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (สุกัลกษณ์, 2527) เมื่อเชื้อราเข้าทำลายพืช พืชจะแสดงอาการโดยทั่วไปคือ ใบหรือส่วนต่าง ๆ ของพืชจะเหี่ยวลง โดยจะเริ่มจากใบล่าง หากใช้มีดผ่าก้านใบเหล่านี้ออกทั้ง

ตามยาวและตามขวาง จะพบว่าส่วนของท่อน้ำท่ออาหาร (Vascular bundle) เน่าเสียเป็นสีดำ หรือ สีน้ำตาล หลังจากนั้น สีของใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองและแห้งตายในที่สุด (Crowhurst และคณะ, 1995) หลังจากเชื้อราเข้าไปในพืชแล้ว เชื้อราจะรบกวนพืช (Dimond, 1995 อ้างโดย สุริยวัณ, 2539) ด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้คือ

1. เชื้อราสามารถผลิตสารพิษที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น lycomarasmin และ fusaric acid ซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลง permeability ของเซลล์ โดยทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนของเซลล์
2. เชื้อราสามารถผลิต cellulolytic และ pectolytic enzyme ซึ่งย่อยสลายสารประกอบ pectin ในผนังเซลล์ สารที่ได้จากการย่อยสลายมีลักษณะคล้าย gels ไปเกาะสะสมกันที่ vessel ทำให้เกิดการอุดตันเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าที่ท่อน้ำ (xylem) ของพืชติดเชื้ออาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเกิดการออกซิไดซ์สารพวก dihydroxyphenol ไปเป็น quinones แล้วเกิดการ polymerize ไปเป็นสารพวก melanins ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลดำ และไปเกาะที่ vessels ทำให้มีผลต่อการลดการไหลของน้ำด้วย
3. ในพืชบางชนิดจะพบเชื้อราผลิตสาร polysaccharides และสารอื่น ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และสามารถเคลื่อนผ่าน xylem ไปสะสมที่ขอบใบ ทำให้เกิดอาการขอบใบไหม้ หรืออาจจะค้างอยู่ใน xylem ทำให้เกิดการอุดตันของ vessels เป็นผลให้ก้านใบลำต้นเหี่ยว
4. ในพืชบางชนิดเชื้อราสามารถผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดของพืช เช่น ethylene และ IAA ซึ่งสามารถทำให้ก้านใบโค้งงอ และเกิดรากที่โคนต้นเหนือดินขึ้นมาได้

การจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจำแนกได้แก่ ความแตกต่างในด้านรูปร่าง ขนาด จำนวน ผนังกัน (septation) และสีของ spore รวมถึงลักษณะการเจริญเติบโตในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้ลักษณะทางสัณฐานเป็นหลักในการจำแนกเชื้อรา *Fusarium* มีอยู่หลายระบบด้วยกัน เช่น ระบบของ Wollenweber และ Reinking ในปี 1935 ซึ่งได้จัดแบ่งเชื้อออกเป็น section ต่าง ๆ 16 sections 65 species 55 varieties และ 22 forms การจำแนก sections ของเชื้อ *Fusarium* spp. ในระบบนี้ใช้ลักษณะที่ไม่ซับซ้อน เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะการสร้าง basal foot cell ของ macroconidia รูปร่างและลักษณะการสร้าง chlamydospore ส่วนการแบ่งแยก species ใน sections จะใช้ลักษณะการสร้างของ sporodochia สีของ stroma และจำนวน septate ใน macroconidia ระบบของ Snyder และ Hansen ในปี 1945 ใช้ลักษณะความสามารถของเชื้อในการเข้าทำลายพืชต่างชนิดกันมาใช้แบ่ง species ออกเป็น subspecific formae speciales หรือ

race ระบบของ Booth ในปี 1971 ใช้ลักษณะการสร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) และลักษณะของ phialide มาใช้ในการแบ่งแยก (อ้างโดย เฉลิมศักดิ์, 2534)

สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* ได้จัดจำแนกโดยอ้างอิงระบบของ Snyder และ Hansen ในปี 1945 เมื่อพบว่าเชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายพืชชนิดใดจึงจะมีการตั้งชื่อและเสนอให้ใช้ formae speciales (biological form) สำหรับจำแนกความแตกต่างในด้านการก่อให้เกิดโรคกับพืช (pathogenicity) โดยใช้ชื่อพืชชนิดนั้นตั้ง formae speciales ขึ้นตามหลังชื่อ *Fusarium oxysporum* เช่น เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวของคาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus*) ว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Cuba and Ames, 1953) ส่วนเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว หรือ โรคหัวเน่าแห้ง ของแกลดิโอลัส (*Gladiolus hybrida*) ว่าเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Magie and Wilfrit, 1974) เป็นต้น ส่วนเชื้อราที่ดำรงชีวิตแบบ saprophyte จะใช้เฉพาะ species ไม่มี formae speciales ตามหลัง คือ *Fusarium oxysporum*

Booth (1971) กล่าวว่า *Fusarium* เป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีความผันแปรมาก ทั้งในรูปร่างลักษณะ และทางสรีรวิทยา รวมทั้งความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยที่ลักษณะความผันแปรที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ (William, 1981) อายุพืช (Hart and Endo, 1987) และวิธีการปลูกเชื้อ (Kraft and Hugland, 1978) และนอกจากนี้การผันแปรดังกล่าวยังเป็นการผันแปรที่เกิดได้แบบถาวร และแบบชั่วคราว (Booth, 1971) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เกิดจากสิ่งกระทบภายนอกเหล่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ ศศิพันธุ์ (2526) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะบางประการในรา *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* โดยพบว่าราสร้างโคโลนีที่มี sector หลังการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องบนอาหาร PDA ในห้องปฏิบัติการติดต่อกัน 3 รุ่น sector ที่ปรากฏมีรูปร่างไม่คงที่ อาจเป็นรูปพัดหรือรูปใบไม้ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราต่อไปพบว่า โคนิเดียเดี่ยวที่แยกได้จากส่วนที่เจริญเป็นปกติสามารถสร้างโคโลนีที่เกิด sector ได้ และในทำนองเดียวกัน โคนิเดียเดี่ยวที่แยกได้จากส่วนที่เป็น sector สามารถที่จะสร้างโคโลนีที่ปกติได้เช่นกัน โคนิเดียของเชื้อราในส่วนที่เกิด sector งอกได้เร็วกว่า และแตกแขนงได้มากกว่าโคนิเดียของเชื้อราจากส่วนปกติ และเชื้อราส่วนที่เกิด sector สามารถสร้างเมล็ดโครโคนิเดีย และไมโครโคนิเดีย ได้มากกว่าอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างในเรื่องจำนวนนิวคลีโอไอน์แต่ละเซลล์ของเชื้อราทั้งจากส่วนปกติและเชื้อราจากส่วนที่มี sector โดยพบว่าในเชื้อราส่วนปกติมีจำนวนนิวคลีโอไอน์ตั้งแต่ 1-7 แต่เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบของเชื้อราในส่วนที่ปกติจะมีนิวคลีโอไอน์ 1-2 ในขณะที่ส่วนที่เกิด sector มีนิวคลีโอไอน์ตั้งแต่ 1-9 และที่พบเซลล์ส่วนใหญ่

มีนิเวศเป็น 2, 3 และ 4 โดยปกติทั่วไปแล้ว *formae speciales* ของ *F. oxysporum* นั้นมีความเฉพาะเจาะจงในการเกิดโรคต่อชนิด (species) พืช เช่น *formae speciales lycopersici* ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ *formae speciales pisi* ทำให้เกิดโรคกับถั่วลันเตา *formae speciales cucumerinum* ทำให้เกิดโรคกับแตงกวา เป็นต้น (Wheeler, 1972) แต่ต่อมาพบว่า *formae speciales* ของ *F. oxysporum* หนึ่งๆ สามารถเข้าทำลายพืชที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันได้ เช่น ในงานทดลองของ เพชรินทร์ (2533) พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *melonis* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคเหี่ยวของแตงเทศ สามารถทำให้เกิดโรคกับ แตงกวา แตงไทย และ ฟัก ซึ่งเป็นพืชในสกุล Cucurbitaceae เหมือนกันได้ แต่ความรุนแรงของ โรคที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน

จะเห็นได้ว่าการจัดจำแนกเชื้อรา *F. oxysporum* หากใช้วิธีการจำแนกตามสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา รวมทั้งตามความสามารถในการก่อโรคนี้เป็นวิธีการที่ย่างยากซับซ้อน และอาจเกิดความสับสนได้ ในปัจจุบันจึงได้มีการใช้เทคนิคทางด้านอนุชีววิทยาร่วมกับการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพงานด้านอนุกรมวิธานของเชื้อรา โดยเฉพาะในเชื้อราที่มีความยุ่งยากซับซ้อนในการจัดสปีชีส์ หรือมีความผันแปรทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างสูง ซึ่งทำได้สำเร็จได้ผลดีในเชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อรา powdery mildew (Takamatsu *et al.*, 1999) และ เชื้อรา Collettrichum (Sherriff *et al.*, 1995) เป็นต้น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อรา

Phylogeny หมายถึงความสัมพันธ์และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เป็นเพียงการประเมิน (estimate) โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือ ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme หรือ restriction sites หรือ DNA sequence โดยนำมาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ภายในหรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (พัชรา, 2541) สำหรับเชื้อรา เทคนิคทางอนุวิทยามีส่วนช่วยทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ phylogeny ของเชื้อราดังกล่าวสะดวก รวดเร็วและมีความแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยโปรตีน และ กรดนิวคลีอิกเป็นเครื่องมือในการศึกษา (Takamatsu, 1998) แต่การนำเอนไซม์ และ โปรตีน มาใช้ในการศึกษา พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากเอนไซม์ และ โปรตีนเป็นผลจากการแสดงกิจกรรมของยีนซึ่งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้รับมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง (พรพิทท์, 2538) ในปัจจุบันจึงนิยมทำการศึกษาหรือตรวจสอบที่ระดับของดีเอ็นเอโดยตรง

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดีเนื่องจากการตรวจสอบความแตกต่างของสารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดลักษณะไปยังลูกหลานได้ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ในชื่อที่รู้จักกันว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA fingerprint) DNA fingerprint เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) และ อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) ระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืช และเชื้อรา (จินตนา, 2543) ทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้อธิบายถึงวิวัฒนาการรวมทั้งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ polymerase chain reaction (PCR) เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ simple sequence repeat (SSR) เป็นต้น (Weising และคณะ, 1995 อ้างโดย จินตนา, 2543) ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ มีหลักการดังต่อไปนี้

Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม ได้แก่ Williams et al. (1990) และ Welsh and McClelland (1990) โดยใช้ random primer (arbitrary primer) เพียงชนิดเดียวเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย primer ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่าปกติคือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ในจีโนมอาจมีหลายบริเวณที่ใกล้เคียงกันมาก ๆ หรือทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ใกล้เคียงและมีทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตของ PCR เมื่อนำผลผลิตของ PCR มาแยก โดย electrophoresis ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Weising และคณะ, 1995 อ้างโดย จินตนา, 2543) RAPD เป็นวิธีการที่ง่าย และรวดเร็วในการตรวจสอบในระดับพันธุกรรม

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

คือ ความแตกต่าง หรือความหลากหลายของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme ที่แยกได้จากแบคทีเรีย) และจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ เรียก

ว่าตำแหน่งจดจำ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิด ประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้น ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ แล้วตรวจสอบด้วย probe ที่สามารถ hybridize ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ถ้าดีเอ็นเอมาจากแหล่งที่ต่างกัน หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเรียกว่า polymorphism (จินตนา, 2543)

Amplified fragment length polymorphic (AFLP)

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดยการผสมผสานระหว่าง RFLP และ RAPD ซึ่ง polymorphism จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ additional base เหมือนกับ RFLP แต่ตรวจสอบด้วย PCR เหมือนกับ RAPD ความยาวและความจำเพาะของ primer ที่ใช้ตลอดจน PCR condition ที่เหมาะสมของ AFLP จะได้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ (จินตนา, 2543)

DNA sequence analysis

คือการตรวจหาการเรียงลำดับของเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของเส้นดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion, transition, silent หรือ selected ของยีน และนอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide bias โดยที่ผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดสามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ หรือจาก nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) EMBL (European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Database of Japan) (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราหลายๆ ชนิดซึ่งเป็นการศึกษา หรือ ตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอ โดยตรงนำที่จะให้ผลการตรวจสอบหรือการศึกษาใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

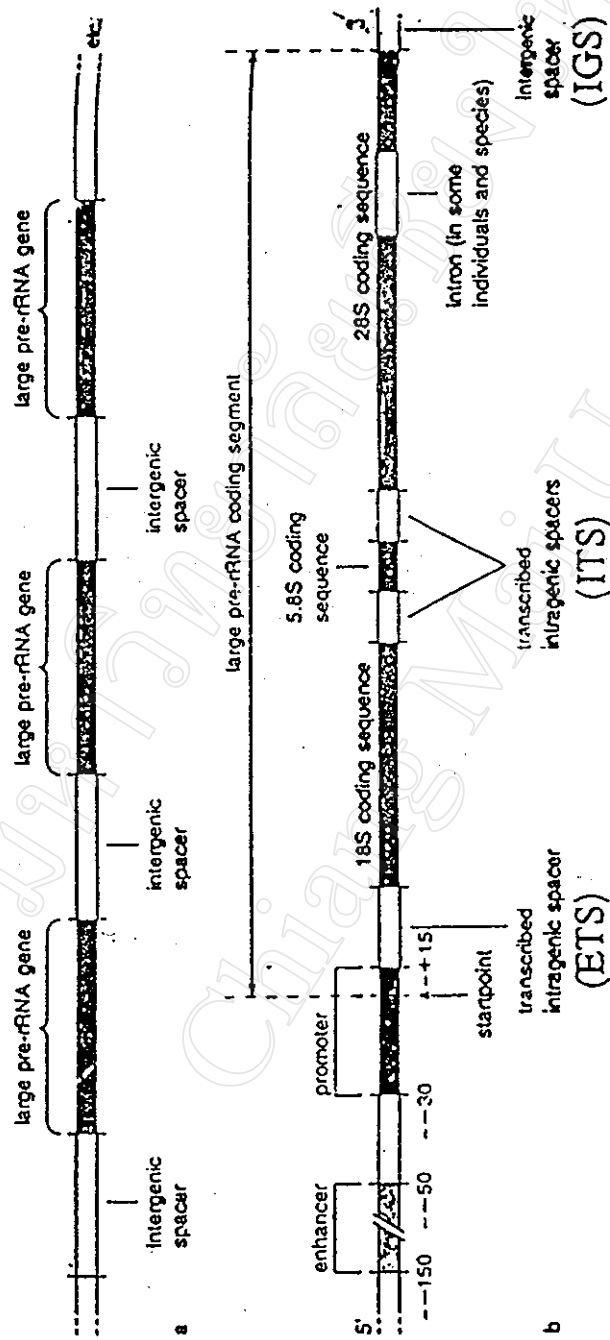
Nuclear rRNA genes (rDNA)

RNA gene (rDNA) ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรง ซึ่งลำดับเบสของ rDNA ได้นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา กลุ่มของ ribosomal RNA gene พบได้ใน nuclei และ mitochondria ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable ที่รวมกันเป็น small rRNA subunits (5.8S) และ large rRNA subunits สำหรับเชื้อราแล้ว nuclear rRNA genes ของเชื้อรามีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงซ้ำ ๆ ต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็น conserved จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์หลาย ๆ อย่างระหว่างเชื้อราที่มีความใกล้เคียงกัน (distantly related fungi) ตำแหน่ง spacer region ระหว่าง subunits จะเรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) และที่อยู่ระหว่างกลุ่มยีน (gene clusters) จะเรียกว่า intergenic spacer (IGS) และนอกจากนี้ mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunits และได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ (Bridge and Arora, 1998) และ/หรือ ระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ (Hirata and Takamatsu, 1996; White et al., 1990; Peterson, 1991)

Internal transcribed spacer หรือ ITS region (Bridge และ Arora, 1998)

ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะพบอยู่ในหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของ rRNA (ภาพที่ 1) โดยพบอยู่ระหว่าง highly conserved small subunit rRNA gene, 5.8S subunit rRNA gene และ large subunit rRNA gene พบว่ามีการนำเอาลำดับเบสในบริเวณ ITS มาทำการเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิดเนื่องจาก

1. ตำแหน่งของยีนมีขนาดเล็ก (500-800 bp) และทำการ amplified ได้ง่ายด้วย เทคนิค PCR และสามารถใส่ universal primer เพียงตัวเดียวก็สามารถ amplified ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS และ conserved regions ของ rRNA subunits gene ได้
2. มีอยู่หลายร้อยชุดในเซลล์ทำให้ง่ายในการ amplify โดยที่แม้จะมี DNA sample น้อยก็สามารถศึกษาได้
3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีการผันแปรที่สูงมาก ระหว่างสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ทำให้สามารถใช้ในการประเมิน (estimate) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และ การจัดแบ่งกลุ่ม รวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้



ภาพที่ 1 Large pre-rRNA gene และตำแหน่ง spacer

(a) แสดงจำนวนซ้ำของ large pre-rRNA genes

(b) การจัดเรียงของ coding sequences และ internal transcribed spacer (Wolfe, 1993 อ้างโดย วริษา, 2541)

4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็วโดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน และต่างกันในช่วงสปีชีส์ของเชื้อรา

ตัวอย่างรายงานการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง ITS เพื่อจัดจำแนก และศึกษา phylogeny ของเชื้อรา

Ospina-Giraldo *et al.* (1998) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS-1, ITS-2 และ 5.8S rDNA ของ *Trichoderma* spp. 15 สายพันธุ์ ซึ่งมี 6 สายพันธุ์ที่ศึกษาเป็น *T. harzianum* จาก 4 biotypes (Th1, Th2, Th3 และ Th4) จากการศึกษาพบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกัน กลุ่มแรกประกอบด้วย biotype Th1, Th2 และ Th4 ขณะที่อีกกลุ่มประกอบด้วย biotypes Th3 และ สายพันธุ์อื่นของ *T. harzianum* / *atroviride* (sect. *Trichoderma*) จากแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลก Th3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. harzianum* / *atroviride* ซึ่งสองสปีชีส์นี้เมื่อดูจากลักษณะของ conidia แล้ว *T. atroviride* และ *T. harzianum* มีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้จำแนกผิดพลาดเสมอ จากการวิเคราะห์ข้อมูลระดับโมเลกุลแล้ว biotype Th3 ควรจัดอยู่ใน *T. atroviride* มากกว่าที่จะเป็น *T. harzianum*

Kuhls *et al.* (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. reesei* ที่ผลิต cellulase กับ teleomorph ของเชื้อราชนิดนี้คือ *Hypocrea jecorina* และสปีชีส์อื่น ๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* ใน sect. *Longibrachiatum* โดยอาศัยเทคนิค PCR fingerprinting และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS-1, ITS-2 และ 5.8S rDNA จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* ใน sect. *Longibrachiatum* ออกเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่แตกต่างกันได้แก่ *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* และ *T. reesei* สำหรับ teleomorph *H. schweinitzii* และ *H. jecorina* มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในขณะที่ *H. jecorina* และ anamorph *T. reesei* มีลำดับเบสเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดหรืออาจเป็นสปีชีส์เดียวกัน ความผันแปรระหว่าง *T. reesei* และ *H. jecorina* อยู่ในระดับเดียวกับที่พบในระหว่างทุกๆ สายพันธุ์ของ *H. jecorina* แต่จะต่ำกว่าความผันแปรที่พบระหว่างสปีชีส์อย่างมาก จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและแผนผังของ PCR fingerprinting ที่มีความเหมือนกันสูง แสดงให้เห็นว่า *T. reesei* และ *H. jecorina* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิด และแตกต่างจาก *T. longibrachiatum* อย่างชัดเจน

Anderson et al. (1998) จำแนกเชื้อราและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ spore- cyst ของเชื้อรา *Ascospaera* spp. 20 species โดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของเชื้อรา ในตำแหน่ง ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR ใช้ primer 2 ชนิด ซึ่งมีลำดับเบส 20 เบส แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่า สามารถแบ่ง *Ascospaera* เป็น 4 กลุ่ม คือ *A. apis*, *A. aggregata*, *A. atra* และ *A. acerosa* แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อรา เหล่านี้ พบว่า *A. acerosa* และ *A. asterophora* มีความเหมือนกัน 98-100% *A. atra* และ *A. duoformis* เหมือนกัน 100% *A. aggregata*, *A. subcuticulata*, *A. proliferda*, *A. solina* เหมือนกัน 32-69% และ *A. apis*, *A. colubrina*, *A. flava*, *A. larvis*, *A. major*, *A. variegata* และ *A. calarrima* เหมือนกัน 44-61 %

Kiss (1997) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Ampelomyces* ซึ่งเป็น hyperparasite ของราแป้ง จำนวน 46 isolates ด้วยการใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) วิเคราะห์ตรงตำแหน่ง ITS โดยทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี PCR ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาวิเคราะห์ด้วยวิธี RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 20 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราเป็น 7 กลุ่ม isolates ที่อยู่ใน RFLP group ต่างกันจะพบในสถานที่เดียวกันได้ และใน species เดียวกัน ใน Family Erysiphaceae เข้าทำลายบน host เดียวกันได้อีกด้วย ดังนั้นการตรวจสอบหาความแตกต่างด้านพันธุกรรมจะช่วยในการจำแนกเชื้อรา isolates ต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้าน biocontrol ต่อไป

Skouboe et al. (1999) ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งประกอบไปด้วยตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ใน 52 สายพันธุ์ ของ 29 terverticillate taxa ในเชื้อ *Penicillium* subg. *Penicillium* ที่ทำการเก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยที่เลี้ยงไว้จากนั้นนำ ดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ rDNA โดยใช้เทคนิค PCR แล้วก็นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสพบว่า เชื้อราทั้ง 29 terverticillate taxa มีความผันแปรสูงมากในเชื้อ *Penicillium roqueforti* และมีความผันแปรน้อยในเชื้อ *Penicillium aurantiogriseum* และเชื้อราในกลุ่ม terverticillate เป็นระยะ perfect stage (telemorphs) ของเชื้อ *Eupenicillium*

Jasalavich et al. (1995) ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง 18S rRNA, 5.8S rRNA และ internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) ของเชื้อราในสปีชีส์ *Alternaria* ซึ่งเป็นสาเหตุของพืชในตระกูล Crucifers ซึ่งประกอบด้วย *Alternaria brassicae*, *A.*

brassicicola, *A. raphani*, *A. alternata* และเชื้อรา *Pleospora herbarum* พบว่าลำดับเบสในตำแหน่ง 5.8S rDNA ของเชื้อรา *Alternaria* ทั้ง 4 ชนิด มีความเหมือนกันและเมื่อเทียบกับเชื้อรา *P. herbarum* พบว่ามีลำดับเบสเพียง 1 เบสที่ต่างกัน สำหรับลำดับเบสในตำแหน่ง internal transcribed spacer โดยเฉพาะ ITS1 พบว่ามีความผันแปรสูงทั้งลำดับเบสและความยาว ลำดับเบสในตำแหน่ง 18S rDNA พบว่าเป็นยีนอนุรักษ์ที่มีความคงตัวสูง (highly conserved) แต่ก็มี ความแตกต่างอย่างชัดเจนในจีโนมที่ต่างกัน สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic analysis) โดยใช้วิธีการ parsimony และ maximum like lihood พบว่าสามารถ แยกความแตกต่างของจีโนมและสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน ผลจากการทดลองสรุปว่า เชื้อรา *Alternaria* ทั้งหมดที่ทำการศึกษามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และพบว่าเชื้อราในจีโนม *Pleospora* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับจีโนม *Alternaria* มากกว่าจีโนม *Leptosphaeria*

Schlick et al. (1994b) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่าง ๆ และ *Trichoderma* spp. สปีชีส์อื่น ๆ รวมทั้งสายพันธุ์ที่ถูกชักนำให้ เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา โดยใช้ phage M13 DNA oligonucleotide (CT) 8 และ (GTG) 5 เป็น probe ใน hybridization fingerprinting และ oligonucleotide GGCATCGGCC, (GTG) 5, (CAC) 5 และ M13 sequence GAGGGTGGCGTTCT เป็น primer ใน PCR fingerprinting และผลการทดลองพบว่า สามารถจำแนกชนิดของสายพันธุ์ต่างๆ และสายพันธุ์กลาย (mutant) ออกจากกันได้ด้วยแผนผังลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (fingerprint pattern) ที่ต่างกัน การฉายรังสี แกมมาจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแผนผังลายพิมพ์ดีเอ็นเอใหม่ ซึ่งทำให้แยกออกจากสายพันธุ์ ดั้งเดิม (wild type) ได้อย่างชัดเจน จึงนับเป็นประโยชน์ต่อการขอรับสิทธิบัตรของสายพันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS-1 และ ITS-2 ของ rDNA พบว่าเหมือนกันทั้งในสาย พันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

Sherriff et al. (1995) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA internally transcribed spacer 2 (ITS-2) ของเชื้อรา *Colletotrichum graminicola* ที่ก่อให้เกิด โรคกับข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อราคนละชนิด ผลจากการทดลองพบ ว่าในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์ที่ก่อเกิดโรคกับข้าวโพด กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวฟ่าง และกลุ่มที่ ก่อให้เกิดโรคกับ *Rottboellia* มีความเหมือนกันสูง (98-100%) ขณะที่ความเหมือนกันระหว่าง กลุ่มของสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็น 92% และเมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* อื่นมาทำการเปรียบเทียบร่วม พบว่า สายพันธุ์ที่ได้จากข้าวโพด มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่มาจากข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* ซึ่ง ผลการทดลองนี้ยืนยันลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางพันธุศาสตร์ที่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่ง

สรุปได้ว่าสายพันธุ์ของ เชื้อรา *Colletotrichum* ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดน่าจะเป็น *C. graminicola* ขณะที่สายพันธุ์ที่มาจาก ข้าวฟ่าง และ *Rottboellia* เป็น *C. sublineolum*

จะเห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลำดับเบสในตำแหน่ง ITS โดยวิธีการต่างๆ ในหลาย ๆ การทดลองนั้นมีความเหมาะสม สามารถใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนก รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของเชื้อราต่างๆ ได้เป็นอย่างดี และยังสามารถใช้ร่วมกับการศึกษาด้วยวิธีอื่นได้ ทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับของทุกฝ่าย