บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Colletotrichum*

เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ถูกจัดจำแนกไว้ใน Sub-division Deuteromycotina Class Deuteromycetes Order Melanconiales Family Melanconiaceae Genus *Colletotrichum* (Sutton, 1980) มีลักษณะทั่วไปคือ สร้างเส้นใย (mycelium) เจริญดี มีการแตกกิ่งก้าน และมีผนังกั้น สีของเส้นใยมีตั้งแต่ไม่มีสีถึงสีน้ำตาลเข้ม สร้าง fruiting body เพื่อให้กำเนิดสปอร์ (conidia) เรียกว่า conidiomata แบบ acervulus ซึ่งมีสีอ่อนถึงสีน้ำตาล acervulus จะสร้างบนผิวพืชตรงชั้นของ subcuticle epidemal subepidermal หรือ peridermal ของพืช โดยอาจสร้างขึ้นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่มีสีถึงสีน้ำตาล มีผนังกั้น ผิวเรียบ แตกกิ่งก้านเฉพาะเซลล์ฐาน conidiophore เกิดจากเซลล์บนสุดของ conidiomata conidia จะเกิดโดยผนังชั้นในของ conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง จึงเรียกเซลล์นี้ว่า enteroblastic conidiogenous cell โดย conidiogenous cell ที่สร้างจะมีลักษณะใสไม่มีสี ผนังเรียบ รูปทรงกระบอก conidia มีเซลล์เดียว ไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (ยกเว้นขณะ germination) ลักษณะตรง หรือโค้งงอ มีรูปร่างหลายแบบ appressoria มีสีน้ำตาล ผิวเรียบหรือขรุขระ อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือสร้างหลายอันต่อกัน เมื่อนำเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บางครั้ง พบว่ามีการสร้าง sclerotia สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ เป็นกลุ่มอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจสร้าง setae ใน conidiomata หรือ sclerotia โดย setae ดังกล่าวมีสีน้ำตาล มีผนังกั้น ผิวเรียบ บริเวณโคนโป่งออก ปลายแหลม ลักษณะที่มี setae เรียกว่า setose การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในสกุลนี้จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* ใน Class Ascomycetes

ปัจจุบันพบสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* มากถึง 900 สปีชีส์ ซึ่งวิธีการในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรามีอยู่จำกัด โดยเป็นการจัดจำแนกเชื้อราเป็นกลุ่ม ๆ ตามลักษณะทาง taxonomy (taxa) โดย Von Arx (1957 อ้างโดย Sutton, 1992) จัดแบ่งเชื้อราเป็น 23 taxa แต่ภายหลัง (ปี 1981) จึงจัดเพิ่มเป็น 25 taxa Sutton (1980) จัดแบ่งได้เป็น 22 taxa สำหรับ Baxter *et al.* (1983 อ้างโดย Sutton, 1992) จัดแบ่งได้ 11 taxa นอกจากนี้ Baxter และ Van der Westhuizen (1984 อ้างโดย Sutton, 1992) ได้รายงานการจัดจำแนกเป็น 12 taxa ซึ่ง

ในการจัดจำแนกจะมีบางสปีชีส์ที่ซ้อนทับกันในแต่ละ taxa การจำแนกเหล่านี้จึงไม่ได้เป็นที่ยอมรับทั้งหมดทุก taxa และมีการแนะนำให้ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่ต่างกัน จากความแตกต่างของแต่ละวิธีการทำให้สามารถรวมเข้าด้วยกันและจัดสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ประมาณ 39 taxa ดังนี้คือ *C. acutatum C. capsici C. caricae C. caudatum C. circinans C. coccodes C. coffeanum C. corchori C. crassipes C. curvatum C. dematium C. destructivum C. falcatum C. fragariae C. fusarioides C. fuscum C. gloeosporioides C. gloeosporiodes var. minus C. gnaphalii C. graminicola C. helichrysi C. higginsianum C. liliacearum C. lindemuthianum C. linicola C. malvarum C. musae C. nigrum C. nymphaeae C. orbiculare C. paludosum C. phyllachoroides C. psoraleae C. spinaciae C. sublineolum C. trichellum C. trifolii C. truncatum C. typhae* (อ้างโดย Sutton, 1992)

เนื่องจากในการจัดจำแนกเชื้อรายังไม่มีการรับรองเพราะ บาง taxa ยังมีความยุ่งยากในการจัดจำแนก และยังมีบางชนิดถูกจัดได้หลาย taxa นอกจากนี้สภาพแวดล้อมยังมีผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ทำให้ลักษณะดังกล่าวมีการแสดงออกผิดไปจากเดิม ก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกยิ่งขึ้น (Freeman *et al.*, 1993) ดังนั้นจึงมีผู้สนใจหาวิธีการใหม่ ๆ ในการจัดจำแนกเชื้อรา ในกลุ่มนี้ให้มีประสิทธิภาพ และแน่นอนยิ่งขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมและเริ่มใช้กันอย่างแพร่หลายคือ การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อรา

Phylogeny หมายถึงความสัมพันธ์ และ/หรือ ประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เป็นเพียงการประเมิน (estimate) โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือ ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme หรือ restriction sites หรือ DNA sequence โดยนำมาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ภายใน หรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สำหรับเชื้อราเทคนิคทางอณูวิทยามีส่วนช่วยทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ phylogeny ของเชื้อราดังกล่าวสะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยโปรตีน และกรดนิวคลิอิคเป็นเครื่องมือในการศึกษา (Takamatsu, 1998) แต่การนำเอนไซม์ และโปรตีนมาใช้ในการศึกษา พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากเอนไซม์ และโปรตีนเป็นผลจากการแสดงกิจกรรมของยีน ซึ่งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้รับมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง จึงนิยมทำการศึกษาหรือตรวจสอบที่ระดับของดีเอ็นเอโดยตรง

Phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากลำดับเบสของยีนหนึ่งๆ สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์ และสามารถตอบคำถามเกี่ยวกับระยะเวลาที่เกิดการวิวัฒนาการ และปัญหาทางนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นได้ (Page and Holmes, 1996) โดย phylogenetic distance ระหว่างสิ่งมีชีวิต สามารถคำนวณได้จากจำนวนการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นในยีน ซึ่งมีรหัสในการสร้างโปรตีน หรือ ribonucleic acid (RNA) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะปรากฏในลำดับนิวคลีโอไทด์ (ลำดับเบส) ของยีน (Watson *et al.*, 1987)

การศึกษาด้านอณูวิทยา

ในปัจจุบันวิทยาการด้านอณูวิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษา และวินิจฉัยโรคพืชอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้มากขึ้นเป็นลำดับ อาทิเช่น มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ตลอดจนพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโครงสร้างประชากรของเชื้อสาเหตุ มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวางแผนและการควบคุมโรคที่เหมาะสม รวมทั้งการกักกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเทคนิคด้านอณูวิทยาที่นิยมนำมาใช้ในงานด้านการศึกษา และวินิจฉัยโรคพืช คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย นอกจากนั้นยังมีการนำเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequence analysis) มาใช้มากขึ้น

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker)

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ถือเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้หาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ และชัดเจน เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างถึงระดับพันธุกรรม ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานทำให้สามารถตรวจสอบบรรพบุรุษร่วมได้ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในชื่อที่รู้จักกันว่า "ลายพิมพ์-ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) โดยเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้อย่างมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) การระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืช และเชื้อรา (Weising *et al.*, 1995) ดีเอ็นเอเครื่องหมายถูกนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างดังนี้ (จุลภาค, 2541)

1. การเพิ่ม หรือสูญเสียไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่

2. เกิดการแทรกเข้ามาหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะ จดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่

3. จำนวนของดีเอ็นเอที่มีความซ้ำซ้อนต่อเนื่องแตกต่างกัน ตรงบริเวณระหว่างตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่

4. การเรียงลำดับเบสบนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น RFLP (restriction fragment length polymorphism) และ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ PCR (polymerase chain reaction) เช่น RAPD (random amplified polymorphism), SSR (simple sequence repeat) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Weising *et al.*, 1995) เป็นต้น

DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของ ดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion transition silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide bias (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราหลายๆ ชนิดซึ่งเป็นการศึกษา หรือตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอโดยตรงที่ให้ผลการตรวจสอบ หรือการศึกษาใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) มีหลายวิธีการด้วยกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการหาลำดับเบส ตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่ใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส เป็นต้น วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่นิยมในปัจจุบันคือ การใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบส และการใช้ PCR product ที่ผ่านการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยทั้งสองวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันกล่าวคือ วิธีการใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบสมีข้อดีกว่า วิธีการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ คือ ลำดับเบสที่ได้จะไม่เกิดความเสียหายอันเนื่องจาก

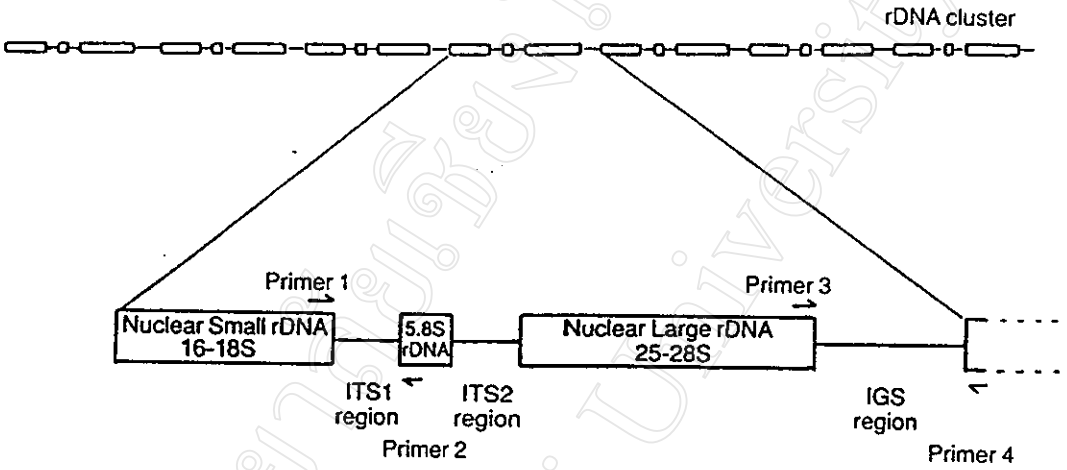
ขบวนการทางเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต และดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถเลือกใช้เฉพาะส่วนที่มีลำดับเบสที่ต้องการเท่านั้น ในขณะที่ขั้นตอนการ cloning ต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสมากกว่าส่วนที่ต้องการ อย่างไรก็ตามวิธีการ clone มีความจำเป็นในการหา individual alleles หรือส่วนที่แตกต่างกันของยีน ในกลุ่มที่มีตำแหน่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงกัน (coamplified) (Gyllensten *et al.*, 1992)

สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ และผ่านทางอินเตอร์เน็ต เนื่องจากในปัจจุบันมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ และโปรตีน ที่มีรายงานการวิจัยไว้ในศูนย์เก็บข้อมูลซึ่งมีเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (nucleotide database) โดยข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในสี่ศูนย์ที่สำคัญ ประกอบด้วย the DNA databank of Japan (DDBJ) the European molecular biology laboratory (EMBL) the GenBank และ the genome sequence database (GSDB) ซึ่งทั้งสี่ศูนย์นี้จะมีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าด้วยกัน โดยผู้ที่ทำการศึกษา หรือผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สามารถเข้าไปค้นหาข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบ และอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งข้อมูลไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของศูนย์ได้ (Burks, 1997) (ข้อมูลที่ตั้ง และที่อยู่ทางอินเตอร์เน็ตของศูนย์ทั้งสี่ แสดงไว้ในภาคผนวก)

nuclear ribosomal RNA genes (rDNA)

ลำดับเบสของ nuclear rRNA genes (rDNA) ใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่พบโดยทั่วไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทสำคัญในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน rDNA อาจเป็นผลที่เกิดจากการเกิดการวิวัฒนาการของจีโนมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต (Edel, 1997) กลุ่มของ rDNA พบได้ใน nuclei และ mitochondria ประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable สำหรับ nuclear rRNA genes ของเชื้อรา มีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงซ้ำๆ ต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งในส่วนของ subunits นี้ได้มีการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ Orders และ Kindoms ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes (Van der Auwera *et al.*, 1994 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998) และลำดับเบสส่วนที่เป็นมีความผันแปรคือ ตำแหน่ง spacer region ซึ่งส่วนที่อยู่ระหว่าง subunits จะเรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) และที่อยู่ระหว่างกลุ่มยีน (gene clusters) จะเรียกว่า intergenic spacer (IGS) (ดังแสดงใน *ภาพที่ 1*) ซึ่งใน

ส่วน spacers เหล่านี้ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ genera และ sub-species ได้ (Cooke and Duncan, 1997 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998)



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของไพรเมอร์บนไดอะแกรมแสดงหน่วยของ rDNA repeat units โดย ITS คือ internal transcribed spacer และ IGS คือ intergenic spacer (Mills *et al.*, 1992)

ปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลลำดับเบสของ rDNA ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิดเช่น *Neurospora* (Taylor *et al.*, 1991 อ้างโดย Bruns *et al.*, 1991) *Fusarium* (Waalwijk *et al.*, 1996) powdery mildew (Takamatsu *et al.*, 1999) รวมทั้งเชื้อรา *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 2000) โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณของ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส และเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree และนอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunits และได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางใน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ (Bridge and Arora, 1998) และ/หรือ ระหว่างประชากรภายใน สปีชีส์ (Hirata and Takamatsu, 1996; White *et al.*, 1990; Peterson, 1991)

Internal transcribed spacer (ITS)

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 (Bridge and Arora, 1998)

1. ตำแหน่งของยีนมีขนาดเล็ก (500-800 คู่เบส (bp)) และทำการ amplified ได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และสามารถใช้ universal primer เพียงตัวเดียวก็สามารถ amplified ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS และ conserved regions ของ rRNA subunits gene ได้

2. มีอยู่หลายร้อยชุดในเซลล์ทำให้ง่ายในการ amplify โดยที่แม้จะมี DNA sample น้อยก็สามารถศึกษาได้

3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีความผันแปรที่สูงมาก ระหว่างสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ทำให้สามารถใช้ในการคาดเดา (estimate) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และ การจัดแบ่งกลุ่ม รวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้

4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็ว โดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน และต่างกันในระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา

การวิเคราะห์ลำดับเบสบน ribosomal DNA ในเชื้อรามีจุดประสงค์ที่สำคัญดังนี้คือ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา และนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ต่อไป สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum* นั้นได้มีการศึกษาในต่างประเทศตั้งแต่ปี 1992 ตัวอย่างเช่น Mills *et al.* (1992) ทำการสังเคราะห์ไพร์เมอร์ CgInt จากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเปรียบเทียบลำดับเบสในช่วง ITS 1 ในเชื้อราเดียวกันที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกัน เพื่อให้ได้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราสปีชีส์นี้ (species specific primer) Sreenivasaprasad *et al.* (1994) ทำการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืช 12 ไอโซเลท ซึ่งเดิมถูกจัดจำแนกเป็น *C. fructigenum C. gloeosporioides C. musae*

และ *C. acutatum* โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1 พบว่าเชื้อเหล่านี้ควรจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *C. acutatum* Sreenivasaprasad *et al.* (1996) ศึกษาการจัดจำแนก และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง ITS บน rDNA จากเชื้อรา 18 สปีชีส์ ที่มีการจัดจำแนกไว้เดิม และเชื้อราที่ยังไม่ได้จำแนก จากนั้นนำผลที่ได้วิเคราะห์สร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อเหล่านี้ การศึกษาความสัมพันธ์ในเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากอโวกาโด อัลมอนท์ และสตรอเบอรี่ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสในช่วง ITS1 (Freeman *et al.*, 2000)

Sreenivasaprad *et al.* (1992) ศึกษาความผันแปรในการเรียงตัวของลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1 และความสัมพันธ์ระหว่าง เชื้อรา *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* และ *C. acutatum* โดยเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในสตรอเบอรี่ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีลักษณะ conidia และ appressorium คล้ายกัน แต่มีลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง setae และการเข้าทำลายพืชอาศัยต่างกัน เมื่อพิจารณาจากลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้คาดว่าลักษณะความแตกต่างที่พบในเชื้อราทั้งสองสปีชีส์ อาจเป็นเพียงลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์เท่านั้น จึงทำการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ในตำแหน่งที่ 1 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีการเรียงตัวต่างกันเพียง 3-7 เบส และเมื่อนำเชื้อราทั้งสองสปีชีส์ไปเปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. acutatum* พบว่ามีการเรียงตัวของเบสต่างออกไปถึง 36-37 เบส เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาพิจาณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อรา *C. fragariae* น่าจะถูกจัดให้เป็นเพียง subspecies หนึ่งในสปีชีส์ *Colletotrichum gloeosporioides* เท่านั้น

Sherriff *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA internally transcribed spacer 2 (ITS-2) ของเชื้อรา *Colletotrichum graminicola* ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพด, ข้าวฟ่าง และ Rottboellia เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อราคนละชนิด ผลจากการทดลองพบว่า ในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์ที่ก่อเกิดโรคกับข้าวโพด กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวฟ่าง และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับ Rottbocllia มีความเหมือนกันสูง (98-100%) ขณะที่ความเหมือนกันระหว่างกลุ่มของสายพันธุ์ต่างๆ เป็น 92% และเมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* อื่นมาทำการเปรียบเทียบร่วมพบว่า สายพันธุ์ที่ได้จากข้าวโพดมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่มาจากข้าวฟ่าง และ Rottbocllia ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางพันธุศาสตร์ที่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงสรุปได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดน่าจะเป็น *C. graminicola* ขณะที่สายพันธุ์ที่มาจากข้าวฟ่าง และ Rottbocllia เป็น *C. sublineolum*

Bailey *et al.* (1996) ศึกษาการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ในตระกูล Malvaceae ที่แยกได้จากพืชสี่ชนิดคือ *Sida spinosa, Lavatera trimestris, Malva pusilla* และ *Gossypium* sp. (ฝ้าย) เดิมมีการจัดจำแนกเชื้อราออกเป็น species ต่างๆ เนื่องจากความแตกต่างของชนิดพืช และเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดจำแนก แต่เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสบน rDNA มาช่วยในการจัดจำแนกที่ชัดเจน โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง ITS2 และ domain 2 (D2) ซึ่งอยู่ในช่วง 28S บน rDNA พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากพืช *Sida spinosa, Lavatera trimestris, Malva pusilla* อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. oriculae* *C. malvarum* *C. trifolii* ที่ใช้อ้างอิงซึ่งเชื้อราทั้งสามนี้ภายหลังถูกจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน คือ *C. oriculae* สำหรับพืชแต่ละชนิดจะถูกจัดให้มีความแต่แตกต่างกันใน formae species อันเนื่องจากเชื้อราในกลุ่มนี้มีความจำเพาะของเชื้อต่อพืชอาศัย (host-specific) ตัวอย่างเช่น *C. oriculae* f. sp. form *L. trimestris* ซึ่งเดิมมีชื่อว่า *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*, *C. oriculae* f. sp. form *S. spinosa* ซึ่งเดิมมีชื่อว่า *C. malvarum* และ *C. oriculae* f. sp. form *M. pusilla* ซึ่งเดิมมีชื่อว่า *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* เป็นต้น สำหรับเชื้อราที่แยกได้จาก *Gossypium* sp. ซึ่งเดิมมีชื่อว่า *C. gossypii* var. *cephalosporioides* และ *C. gossypii* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ใช้อ้างอิง

Brown *et al.* (1996) ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้ม โดยเชื้อราที่แยกได้นั้นแบ่งออกเป็น 3 strains ดังนี้คือ the fast-growing (FGG) strain, the slow-growing orange (SGO) strain และ the Key lime anthracnose (KLA) strain ซึ่งในการจัดจำแนก species ของเชื้อราโดยอาศัยลักกษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม SGO และ KLA เป็น *Colletotrichum acutatum* และกลุ่ม FGG เป็น *C. gloeosporioides* แต่เนื่องจากเชื้อราที่จัดจำแนกได้ดังกล่าวยังมีบางลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อราใน species เดียวกันที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นๆ จึงมีการนำเอาวิธีการทางด้านอณูชีวโมเลกุลมาใช้ยืนยันการจัดจำแนกที่ถูกต้อง เทคนิคที่นำมาใช้คือ RFLP และการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง ITS1 บน rDNA ผลที่ได้จากการใช้เทคนิค RFLP ใน rDNA พบว่าเชื้อในกลุ่ม SGO และ KLA มีรูปแบบแบนดีเอ็นเอแตกต่างจากเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากพืชอื่นและมีความแตกต่างภายในทั้งสองกลุ่มน้อยมาก สำหรับผลที่ได้จากการทำ RFLP ใน mtDNA พบว่าทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันสามารถแยกออกจากกันเป็นกลุ่มย่อยได้ซึ่งสนับสนุนการเข้าทำลายพืชที่แตกต่างกัน และในกลุ่ม FGG รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากเชื้อรา *C. acutatum* จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้พบว่าเชื้อราในกลุ่ม SGO และ KLA มีลำดับเบสต่างจากเชื้อรา *C. acutatum* ที่ใช้อ้างอิงเพียง 1 base เท่านั้น

สำหรับเชื้อราในกลุ่ม FGG มีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ใช้อ้างอิงมากถึง 97% นอกจากนี้จากการที่ใช้ species-specific primers (*Ca*Int และ *Ca*Int 2) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จึงสามารถสรุปผลที่ได้ชัดเจนว่า เชื้อราสาเหตุที่ในกลุ่ม SGO และ KLA คือ *C. acutatum* และในกลุ่ม FGG คือ *C. gloeosporioides*

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University