บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของ *Fusarium oxysporum.*

Genus *Fusarium* ประกอบด้วยเชื้อราหลายสปีชีส์ที่เข้าทำลายพืชหลายชนิด เป็นสาเหตุของโรคเมล็ดเน่า รากเน่า โคนเน่า ก้านเน่า เหี่ยว เหลือง ผักและผลเน่า (Gerlach and Nirenberg, 1982) เชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในดิน เข้าทำลายได้ทั้งพืชปลูกและพืชป่า สามารถทำลายทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะพืชที่อ่อนแอ และเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง (Bruehl, 1987)

สำหรับโรคพืชที่สำคัญซึ่งเกิดจากเชื้อราในกลุ่มนี้ ได้แก่ โรคเมล็ดเน่าจะเกิดขึ้นเมื่อมีสปอร์ปลอมปนมากับเมล็ดหรือในดิน ซึ่งจะเข้าทำลายและเจริญแฝงเข้าไปกับพืช เมล็ดที่มีเชื้ออยู่มักจะเน่าและตายก่อนที่ต้นจะงอกโผล่พ้นผิวดิน รากแขนงเล็กๆ ก็จะถูกทำลายในที่สุด ในกรณีของข้าวโพดพบว่าจะเกิดโรคก้านฝักเน่าซึ่งพบได้ทุกๆ ปีของการเพาะปลูก และก่อให้เกิดความเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะเมื่อเกิดฝนตกชุกในช่วงระยะก่อนออกดอก บริเวณก้านฝักมักจะถูกทำลายก่อน จากนั้นจึงเกิดที่ใบ และฝักของข้าวโพด ตามลำดับ ซึ่งมีผลให้ก้านฝัก แก่ก่อนกำหนดแตก หักและเน่าตายในที่สุด นอกจากนั้นฝักที่อยู่บนก้านที่แตกอาจมีโอกาสสัมผัสผิวดินซึ่งจะมีโอกาสเกิดโรคเพิ่มขึ้น สำหรับโรคฝักและเมล็ดเน่าของธัญพืช จะก่อให้เกิดความเสียหายเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งการเข้าทำลายที่รุนแรงนอกจากจะทำให้ผลผลิตต่ำแล้ว ยังทำให้คุณภาพลดลงอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นเมล็ดพันธุ์ที่มีเชื้อแฝงอยู่อาจมีการสร้างสารพิษของเชื้อสาเหตุ ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายกับสัตว์เลี้ยงและมนุษย์เมื่อบริโภคเข้าไป เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว ในบางครั้ง ฝักที่มีความสมบูรณ์ อาจมีสปอร์ของเชื้อราปนเปื้อนอยู่ หากสภาวะในการเก็บรักษาไม่เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่อมีความชื้นสูงเชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษขึ้นมาได้ (Lucas, 1995)

ส่วนโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เป็นโรคที่พบแพร่หลายและสร้างความเสียหายในทุก ๆ แหล่งที่มีการเพาะปลูกโดยเฉพาะกับมะเขือเทศ เป็นโรคที่ระบาดรุนแรงในภูมิอากาศอบอุ่น และในสภาพดินทรายของเขตร้อน ในสหรัฐอเมริกาโรคเหี่ยวมีความรุนแรงมากที่สุดในทางตอนใต้และตอนกลางของประเทศ ส่วนทางตอนเหนือจะมีบทบาทเฉพาะกับพืชที่มีการ

ปลูกในโรงเรือนเท่านั้น (Agrios, 1988) สำหรับอาการเริ่มแรกของโรคเหี่ยวจะปรากฏ vein clearing ที่บริเวณด้านนอกของใบอ่อนเพียงเล็กน้อย ต่อมาเมื่อใบแก่จะแสดงอาการ epinasty ที่บริเวณใบซึ่งเกิดจากการเหี่ยวของ petioles พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นกล้ามักจะเกิดอาการเหี่ยว แคระแกร็น และใบล่างเหลือง บางครั้งมีการสร้างรากมากเกินไป ลำต้นและใบเหี่ยว ใบร่วง เกิด necrosis ที่ขอบใบ และจะตายในที่สุด ในกรณีพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่ อาการที่เกิดขึ้นมักพบบริเวณด้านข้างของลำต้นและลุกลามขึ้นไปด้านบนจนกระทั่งใบและลำต้นตายในที่สุด ในบางครั้งผลก็ถูกทำลายด้วยซึ่งจะทำให้เกิดอาการเน่า ผลร่วง และเกิดจุดดำขึ้นบนผล สำหรับรากสามารถถูกเชื้อเข้าทำลายได้เช่นกันโดยจะเกิดขึ้นเมื่อต้นเริ่มแสดงอาการแคระเกร็น เมื่อทำการผ่าดูด้านข้างของต้นพืชที่เป็นโรคพบว่าบริเวณโคนต้นจะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลที่ท่อลำเลียง อาการดังกล่าวจะแพร่ขยายขึ้นไปด้านบนของต้นพืช ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ในบางครั้งต้นพืชอาจถูกทำลายก่อนที่จะถึงฤดูการเก็บเกี่ยว แต่โดยทั่วไปแล้วการเข้าทำลายที่รุนแรงจะไม่เกิดขึ้นหากอุณหภูมิของดินและสภาพอากาศค่อนข้างสูงในระหว่างฤดูกาลเพาะปลูก (Agrios, 1997)

วงจรชีวิตของเชื้อ เริ่มขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ conidia จะสร้าง germ tube และเส้นใยจะงอกแทงผ่านปลายรากโดยตรงหรือผ่านทางบาดแผล เส้นใยจะเจริญผ่าน cortex ของราก ไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อเจริญมาถึงท่อลำเลียงก็จะแผ่ขยายไปถึงลำต้น ยอด ของต้นพืช ในขณะที่อยู่ในท่อลำเลียงเส้นใยจะมีการแตกแขนงและสร้าง microconidia ซึ่งจะถูกปลดปล่อยและแพร่กระจายไปตามระบบท่อลำเลียงของพืช เส้นใยจะแทงผ่านไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกันและจะผลิต microconidia ต่อไป (นุชนารถ, 2524)

ในระยะหลังการเพาะปลูก เชื้อราจะมีชีวิตอยู่รอดโดยอาศัยอยู่ในดิน ฝัก เมล็ด และเศษซากพืช ในรูปของ conidia หรือเส้นใย จะเริ่มวงจรชีวิตอีกครั้งเมื่อมีการปลูกพืชในฤดูต่อไป สำหรับการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ ในบางครั้งอาจมีเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด คือมีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่างเชื้อชนิดอื่นเช่น *Pythium*, *Rhizoctinia* ซึ่งมีบทบาทในการจำกัดผลผลิตของพืช (Lucas, 1995)

Bell and Mace (1981) ให้ความเห็นว่าโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* นั้น ตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคก็คือ อุณหภูมิ ซึ่งมีบทบาทมากกว่าชนิดของพืชอาศัย เช่น ความต้านทานต่อโรคเหลืองในกะหล่ำปลีไม่ว่าความต้านทานนั้นจะเกิดจากยีนเพียงตัวเดียวหรือหลายตัว ก็ถูกทำลายลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 24 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับความต้านทานต่อโรคเหี่ยวในถั่วจะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิดังกล่าว cortical จะถูกทำลายอย่างรุนแรงในถั่วทุกตระกูล แต่ก็ไม่ใช่ปัญหาใหญ่สำหรับพืชทั้งสองชนิด ทั้ง

นี้เนื่องจากมันสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพอากาศเย็นได้ดี และสามารถให้ผลผลิตในช่วงอุณหภูมิที่ยังไม่เหมาะสมต่อการระบาดของโรค ในบางครั้งเมื่อความชื้นในดินสูงและอุณหภูมิต่ำมาก พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะยังคงให้ผลผลิตได้ดี แต่ในบางกรณีเชื้อราก็เข้าทำลายผลและปนมากับเมล็ดได้ แต่โดยทั่วไปผลที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะเน่าและร่วง เมล็ดที่มีเชื้อปนมาสามารถกำจัดออกได้โดยขบวนการคัดเลือกและทำความสะอาดซึ่งจะลดการแพร่กระจายของเชื้อได้ (ประเทือง, 2538)

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในทุก formae speciales เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส สรีรวิทยาพื้นฐานของเชื้อชนิดนี้ทั้งในสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค และสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนั้นยังคงมีความคล้ายคลึงกันไม่ว่าเชื้อจะมีการพัฒนาไปเพียงใด ซึ่งมีความเชื่อว่ามีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่เข้าทำลายพืชต่างชนิดกัน เช่น flax ถั่ว และ กะหล่ำปลี ก็จะมีสรีรวิทยาพื้นฐานที่ไม่ต่างกัน โดยทั่วไปเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อที่เข้าทำลายพืชได้ดีในเขตอบอุ่นดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่สำหรับโรคเหี่ยวที่เกิดกับแตงหอมและแตงโม นอกจากนั้น ช่วงของอุณหภูมิที่แตกต่างออกไปคือ ที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดอาการไหม้ของต้นกล้าทั้งระยะก่อนและหลังงอก ซึ่งความรุนแรงขึ้นกับความเครียดของน้ำในดิน นอกจากพืชดังกล่าวแล้วยังมี โรคเหี่ยวของถั่ว ซึ่งถูกเข้าทำลายที่อุณหภูมิ 21-22 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยทั่วไป คือ 28 องศาเซลเซียส สำหรับพืชเมืองหนาว เช่น flax ถั่ว และกะหล่ำปลี ต้นกล้าที่เจริญก่อนจะได้เปรียบเนื่องจากว่าพืชจะเจริญเติบโตก่อนที่อุณหภูมิจะเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ ทำให้ความเสียหายเกิดขึ้นน้อยลง (Bruehl, 1987)

สำหรับการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ควรจะใช้หลายวิธีผสมผสานกันเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เริ่มตั้งแต่การปลูกพืช เช่น การคลุกเมล็ดก่อนปลูก การดูแลรักษาดินทั้งก่อนและหลังปลูก Russell (1977) ได้รายงานว่าการพรวนดินจะทำให้อัตราการซึมของน้ำดีขึ้น ความแน่นของดินลดลง ดินระบายอากาศได้ดี ทำให้รากมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายในดินได้มากขึ้น นอกจากนั้นยังมีการใช้ต้นกล้าที่ปราศจากโรค ใช้พืชพันธุ์ต้านทาน การปลูกพืชหมุนเวียน การให้ปุ๋ย และการใช้สารเคมี เป็นต้น Bruehl (1987) รายงานว่าในพืชบางชนิดการปลูกจากเมล็ดโดยตรงจะให้ผลในการลดปริมาณโรคที่จะเกิดขึ้น และประหยัดแรงงานได้ดีกว่าการย้ายต้นกล้าไปปลูกในแปลงเพาะ ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการเข้าสู่พืชโดยการ ใช้เครื่องมือต่างๆ การเกิดบาดแผล ในขณะทำการย้ายปลูก

เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการสนับสนุนเกี่ยวกับการควบคุมโรคโดยชีววิธี โดยมีการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุ เช่น *Trichoderma*, *Gliocladium* และ *Chaetomium* เป็นต้น นอกจากนั้นเชื้อสาเหตุที่มีการพักตัวอยู่ในดินในระยะหลังการเพาะปลูก สามารถนำพลาสติกใสคลุมดิน เพื่อให้ความร้อนช่วยลดปริมาณเชื้อที่ตกค้างอยู่ในดินได้ ซึ่งจะช่วยลดการเกิดโรคในฤดูเพาะปลูกต่อไป (Lucas, 1995)

การจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Fusarium* ถูกจัดอยู่ใน Division Eumycota, Subdivision Deuteromycotina (asexual stage) หรือ Subdivision Ascomycotina (sexual stage), Class Hyphomycetes, Order Hyphales (Moniliales), Family Tuberculariaceae, Genus *Fusarium* สร้าง conidia 3 ชนิดคือ microconidia, macroconidia และ chlamydospore (Agrios, 1997) สำหรับ microconidia ซึ่งพบอยู่เสมอเป็นจำนวนมาก มีลักษณะใสไม่มีสี จำนวน 1-2 เซลล์ รูปร่างกลมจนถึงรี มีขนาดอยู่ในช่วง 5-12 x 2.2-3.5 ไมครอน ส่วน macroconidia ลักษณะใสไม่มีสี ลักษณะหัวท้ายเรียวแหลมกล้ายรูปเคียว หรืออาจมน จำนวน 3-5 septate มีขนาดแตกต่างกันไป เช่น conidia ที่มี 3 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 27-46 x 3-5 ไมครอน conidia ที่มี 4 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 35-60 x 3-5 ไมครอน ส่วน conidia ที่มี 6-7 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 50-66 x 3.5-5 ไมครอน โดย conidia ส่วนใหญ่ที่พบจะมีจำนวน 3 septate สำหรับ chlamydospores มีลักษณะกลม ผิวเรียบ ผนังหนา มีเซลล์เดียว สร้างเมื่อเส้นใยมีอายุมาก ผลิตบริเวณกลางหรือปลายเส้นใย ลักษณะโคโลนีมีหลายสี ตั้งแต่สีขาว สีพีช สีชมพู สีเทา และสีม่วง เจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 อาหารที่เหมาะกับการเจริญคือ PSA (Potato Sucrose Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) และ OA (Oatmeal Agar) (Booth, 1977) conidia ทั้งสามแบบที่เชื้อรา *Fusarium spp.* สร้างขึ้น สามารถพบได้ทั้งในดินและบนต้นพืช เมื่อพืชที่เป็นโรคตาย เส้นใยและ conidia จะเปลี่ยนมาอาศัยในดิน และสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน ในกรณีที่มีการย้ายพืชจากที่ไปยังอีกที่หนึ่งสามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อได้ หากพืชนั้นมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ (ประเทือง, 2538)

โรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium spp.* มีหลายชนิดด้วยกัน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่โรคที่สร้างความเสียหายและมีบทบาทสำคัญคือโรคเหี่ยว เนื่องด้วยความจำเพาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อต่อพืชอาศัย ซึ่งในระยะเริ่มแรกนักโรคพืชได้อาศัยลักษณะใน

การเข้าทำลายพืชอาศัยดังกล่าวในการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ โดยใช้แต่ละเชื้อที่จำเพาะต่อแต่ละพืชอาศัยให้เป็นสปีชีส์ใหม่ จึงทำให้มีรายงานมากขึ้น เช่น Breuhl, (1987) รายงานว่าเชื้อที่เข้าทำลายมะเขือเทศให้ชื่อว่า *F. lycopersici* , เข้าทำลายฝ้ายชื่อว่า *F. vasinfectum*, เข้าทำลายแตงโมชื่อว่า *F. niveum*, เข้าทำลาย flax ชื่อว่า *F. lini*, เข้าทำลายกล้วยชื่อว่า *F. cubense* เข้าทำลายกะกล่ำปลีชื่อว่า *F. conglutinans*, เข้าทำลายยาสูบชื่อว่า *F. oxysporum* var. *nicotianae*, และเข้าทำลายถั่วชื่อว่า *F. orthoceras* var. *pisi*.. เป็นต้น ซึ่ง Linford (1928) ได้ให้คำอธิบายเกี่ยวกับโรคเหี่ยวของถั่วว่า เกิดจากเชื้อที่อยู่ใน variety *F. orthoceras* ซึ่งจัดอยู่ใน Sectioin Elegans ของ Wollenweber. ต่อมา Johnson ได้รายงานจัดจำแนกเชื้อราที่เข้าทำลายยาสูบว่าเป็น variety หนึ่งของ *F. oxysporum*. ส่วน Carpenter ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของเชื้อที่เข้าทำลายกระเจี๊ยบกับฝ้าย ซึ่งเชื้อทั้งสองถูกจัดอยู่ใน *F. oxysporum* เชื้อ *Fusarium* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวจะถูกจัดให้อยู่ใน Section Elegan ใน Genus *Fusarium*.

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่ามีความยุ่งยากในการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ ซึ่งก่อให้เกิดความสับสน ดังนั้น Synder and Hansen (1940) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *F. oxysporum* เสียใหม่ โดยจัดแบ่งเป็น formae speciales (f.sp.) ซึ่งอาศัยความแตกต่างในการก่อให้เกิดโรคเป็นสำคัญกว่าการแบ่งแยกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และได้มีการยึดเอาหลักการจัดจำแนกของ Synder and Hansen นี้มาใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นระยะเวลานาน โดย Booth (1971) สามารถจำแนกได้ถึง 72 formae speciales, Armstrong and Armstrong (1981) สามารถจัดจำแนกได้ 70 formae speciales.

สำหรับการจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่ว่าจะเป็นขนาดและรูปร่างของ conidia จำนวนของผนังกั้น การมีหรือไม่มี chlamydospore สีและลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และความสามารถในการทำให้เกิดโรคในพืชอาศัยนั้น มีอยู่หลายระบบด้วยกัน เช่น Wollenweber and Reinking (1935) ได้เสนอการจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* โดยแบ่ง 16 sections, 65 species, 55 variety และ 22 forms. ส่วน Booth (1977) ได้เสนอว่าเชื้อ *Fusarium* ใน 16 sections นั้น เป็น section ที่รวมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวไว้ทั้งหมด และสามารถแยกย่อยออกเป็น 3 subsection คือ subsection contrictum, subsection orthocera และ subsection oxysporum. และ Nelson (1991) ได้แบ่งเชื้อ *Fusarium* ใน 16 sections นี้ออกเป็น 10 species, 18 variety และ 12 form. แต่ในปี 1986 Joffe ทำการศึกษา *Fusarium* จากดิน เมล็ด และพืชที่สลายตัวแล้ว ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อราในกลุ่มนี้ได้เป็น 13 sections โดยมี 33 species, 14 varieties เป็นต้น

ในการจัดระบบ taxonomy โดย International Code of Botanical Nomenclature นั้น จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ โดยรวมเอา section, species และ variety ไว้ด้วย ดังนั้นปัญหาที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในการจัดจำแนกเชื้อ *Fusarium* คือ ความหลากหลายในเรื่องของรูปร่างลักษณะ รวมทั้งความรุนแรงของเชื้อ, การคาบเกี่ยวกันของระยะ anamorph และ telemorph, ความสัมพันธ์กันภายใน section, การแยก species, การเปลี่ยนแปลงโดย mutation และ การบ่งชี้ subgroup อย่างไรก็ตาม การจำแนกในระดับ species ภายใน subdivision ของเชื้อรา *Fusarium* จะยึดเอาการลักษณะทางสรีรวิทยาเป็นหลัก เช่น formae speciales และ race หรือการใช้หลักทางพันธุศาสตร์ เช่น Vegetative Compatibility Groups (VCGs) ซึ่งยังไม่มีบันทึกไว้โดยสถาบันดังกล่าว ดังนั้นจึงมีการนำลักษณะ physiolgy, genetics และ molecular biology มาใช้เป็นเครื่องมือในการประเมิน taxonimic, phylogenetic, pathogenic relationship ระหว่าง/ภายใน species ของเชื้อรา *Fusarium* ซึ่งจะช่วยกำหนดและรับรองถึงขอบเขตและความเกี่ยวพันระหว่าง section และ species แทนที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะถูกนำมาใช้แทนที่การทดสอบทาง microscopic ของเชื้อบางชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ อันจะทำให้ระบบ taxonomy นั้น มีความน่าเชื่อถือ สมเหตุสมผล และสะดวกต่อการนำไปใช้ โดยปราศจากข้อสงสัยเช่นในอดีต และในปีเดียวกัน Peterson จึงได้ทำการวิเคราะห์ phylogenetic ของ *Fusarium* species โดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณ ribosomal RNA ซึ่งพบว่าบริเวณดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการสร้าง Phylogenitic ได้เป็นอย่างดี (Windel, 1991)

การจัดจำแนกดังกล่าวข้างต้นนั้น พบว่ามีอยู่หลายวิธีซึ่งยังไม่สามารถหาหลักเกณฑ์ที่แน่นอนได้ ก่อให้เกิดความสับสน และยุ่งยาก อันเนื่องมาจากความผันแปรของเชื้อรา ทั้งในเรื่องของสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา และความสามารถในการทำให้เกิดโรค และยังมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาร่วมกับการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ซึ่งจะช่วยให้งานด้านอนุกรมวิธานของเชื้อราที่มีความแปรผันสูง เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและแน่นอนมากขึ้น โดยประสบผลสำเร็จในเชื้อราหลายชนิด เช่น *Colletotrichum* (Sherriff *et al.*, 1995) และ powdery mildew (Takamatsu *et al.*, 1999) เป็นต้น นอกจากจะช่วยในเรื่องการจัดจำแนกแล้วยังสามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ภายใน formae speciales ต่างๆ ได้อีกด้วย

การใช้เทคนิคด้านอณูชีววิทยาในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต

Phylogeny หรือ phylogenesis หมายถึงความสัมพันธ์และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วเป็นเพียงการ "ประเมิน" (estimate) โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือ ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme หรือ restriction sites หรือ DNA sequence โดยนำมาเปรียบเทียบกันและหาความสัมพันธ์ภายในหรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แนวทางการศึกษาแบ่งได้เป็น 2 แนวทาง คือ phenetic และ cladistic โดยที่ phenetic relationships เป็นการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา โดยอาศัยพื้นฐานจากค่า similarity หรือ distance ที่ได้จากข้อมูลที่ศึกษา ในขณะที่ cladistic relationships เป็นการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทุกค่ามาวิเคราะห์ร่วมกัน และมีการอ้างอิงถึงบรรพบุรุษ ซึ่งสามารถใช้ศึกษา evolutionary pathway ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ทั้งสองแบบสามารถแสดงผลให้เห็นได้ดีที่สุดในรูป dendrogram หรือ tree นั่นเอง คำว่า phenogram และ cladogram เป็นศัพท์เฉพาะที่หมายถึง phenetic relationships และ cladistic relationships ตามลำดับ (Swofford,1996)

การสร้าง dendrogram นั้นมีจุดมุ่งหมายที่จะหาข้อสรุปทางความสัมพันธ์หรือวิวัฒนาการของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในระดับ species ที่ใกล้เคียงกันหรือในระดับอื่นที่สูงกว่า ต่อมาในปัจจุบันวิธีการศึกษาแบบนี้ได้มีการนำมาใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำกว่า species เช่น สายพันธุ์ต่างๆ ใน species เดียวกัน ในขั้นพื้นฐานการสร้าง dendrogram สามารถทำได้ 3 วิธีการหลักๆ คือ distance matrix method (นิยมเรียกว่า cluster analysis), maximum parsimony และ maximum likelihood (Roderic and Holmes, 1998)

DNA เครื่องหมาย

เป็น DNA เครื่องหมาย (DNA marker) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี เนื่องจากความแตกต่างนี้มาจากสารพันธุกรรมโดยตรงที่สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ ในชื่อที่รู้จักกันว่า "ลายพิมพ์ DNA" (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กัน

มากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (Identification), อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของสิ่งมีชีวิต, พันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) การปรับปรุงพันธุ์ (Breeding), ตลอดจนระบาดวิทยา (Epidemiology) ของพืชและเชื้อรา (Weising *et al.*, 1995) ทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้มาอธิบายถึงวิวัฒนาการ รวมทั้งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ DNA เครื่องหมายยังสามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมได้ และทำให้ทราบตำแหน่งของยีนต่างๆ ที่มีความสำคัญในพืช สัตว์ หรือ จุลินทรีย์ที่มีจีโนมที่มีความซับซ้อน ยีนแต่ละยีนเป็นเพียงชิ้น DNA เล็กๆ ที่ประกอบเป็นจีโนมหรือ DNA เส้นยาวของโครโมโซม เมื่อทราบตำแหน่งของยีนแต่ละยีนทำให้สามารถนำ DNA เครื่องหมาย (marker assisted selection) ไปใช้เพื่อช่วยคัดเลือกพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ปฏิบัติกันทั่วไปในงานปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ หลายชนิดในปัจจุบัน ดังเช่นได้มีการสร้างแผนที่ยีน QTL ซึ่งเป็นยีนที่ให้ความต้านทานต่อเชื้อ *Puccinia hordei* ที่เข้าทำลายข้าวบาร์เล่ย์ โดย Qi *et al.* ในปี 1999 พบว่ายีนแต่ละตัวจะก่อให้เกิดความต้านทานแตกต่างกันไปในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่น QTL3 จะมีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคในระยะต้นกล้า และ QTL5 ในระยะต้นโต เป็นต้น

DNA เครื่องหมายสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ DNA เครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ DNA เครื่องหมายที่ใช้วิธีการ polymerase chain reaction (PCR) เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), Rapid Amplified of cDNA Ends (RACE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), single strand conformation polymorphism (SSCP), simple sequence length polymorphism (SSLP), inter-simple sequence repeat (ISSR), ligase chain reaction (LCR) และ denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) เป็นต้น (จุลภาค, 2540) สำหรับความเหมาะสมของแต่ละเทคนิคในการศึกษาลายพิมพ์ DNA นั้น แสดงไว้ในตารางที่ 1 (Weising *et al.*, 1995) ซึ่ง DNA เครื่องหมายต่างๆ มีหลักการดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเหมาะสมของเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการศึกษาลายพิมพ์ DNA ในระดับต่างๆ

Technique	Genus	Genus/Species	Species
Sequencing conserved genes	+	+/-	-
cpDNA (RFLP)	+	++	-(+)
rDNA (RFLP)	+/-	+	+
Sequencing variable sequences	+/-	+	+/-
Nuclear DNA (RFLP)	-	+	+
Allozymes	-	+	+
PCR-based fingerprinting	-	+/-	++
Hybridization-based fingerprinting	-	+/-	++

หมายเหตุ ++ (เหมาะสมที่สุด), + (เหมาะสม), +/- (เหมาะสมบางกรณี), - (ไม่เหมาะสม)
ที่มา : Weising *et al.*, (1995)

1. SSR (Simple Sequence Repeat)

SSR เป็น oligonucleotide ที่ประกอบด้วย simple sequence repeat ซึ่งเป็นลำดับเบสสั้นๆ ที่มี nucleotide ซ้ำๆ กันประมาณ 2, 3, 4 และ 5 nucleotide เช่น (CA)n (n=10-60) พบกระจายทั่วไปบน eukaryotic genome และ ใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาลายพิมพ์ DNA โดยนำมาใช้เป็น probe และ primer ใน hybridization fingerprinting และ RCR fingerprinting ตามลำดับ (Powell *et al.*, 1996; Weising *et al.*, 1995; Zietkiewicz *et al.*, 1994) ข้อดีของ DNA เครื่องหมายชนิดนี้ คือ ให้แถบ DNA จำนวนมาก และ polymorphism สูง เช่น inter-simple sequence repeat (ISSR) simple sequence length polymorphism (SSLP) บางชนิดจัดเป็น codominant marker สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตที่เป็น homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ จำนวน primer ที่ใช้มีมาก และ เนื่องจากใช้เทคนิค PCR จึงใช้ DNA ตั้งต้นในปริมาณน้อย นอกจากนี้การแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของ primer ระหว่างนักวิจัยทำได้ง่าย เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาเกี่ยวกับแผนที่โครโมโซม และพันธุศาสตร์ประชากร DNA เครื่องหมายชนิดนี้เคยใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรกลุ่มย่อยในมนุษย์ (Weising *et al.*, 1995)

2. RAPD (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) เพียงชนิดเดียวเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย primer ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่าปกติ คือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ในจีโนมอาจมีหลายบริเวณที่ไกลกันมากๆ หรือทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ใกล้กัน และมีทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตของ PCR เมื่อนำผลผลิตของ PCR มาแยกโดย electrophoresis ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จะได้แถบ DNA ที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Weising *et al.*, 1995) เช่น Kiss (1997) ได้ใช้เทคนิค RAPD เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium lateritum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค chlorotic leaf distortion ของ sweet potato จำนวน 15 isolates และจากพืชอาศัยที่แตกต่างกันอีก 9 isolates โดยสกัด DNA จากเส้นใยของเชื้อรา แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้ primer ที่แตกต่างกัน 17 แบบ พบว่าเชื้อราที่แยกมาจาก sweet potato 12 isolates นั้นมีค่าความเหมือนกัน (similariy) 0.86-1.00 และแบ่งออกเป็น 2 subgroups คือ subgroup A มีความเหมือนกันมากกว่า 0.99 ส่วน subgroup B มีความเหมือนกัน 0.86-0.88

3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP เป็นวิธีการศึกษาโดยใช้หลักการของการตัด DNA ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะตัด DNA ที่ตำแหน่งที่มีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสแบบจำเพาะ หรือตำแหน่งจดจำ (recognition site) เท่านั้น เมื่อ DNA ในบริเวณจำเพาะถูกตัดออกจะทำให้ได้ชิ้นของ DNA ขนาดต่างๆ กัน และหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสในบริเวณจุดตัดจำเพาะเกิดขึ้น ไม่ว่าจะด้วยสาเหตุใดจะมีผลทำให้ชิ้น DNA ที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดและรูปแบบเปลี่ยนไป เรียกว่า polymorphism ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเรียกว่า "ลายพิมพ์ DNA" ในปี 1997 Davis และคณะได้ทำการศึกษาความผันแปรของเชื้อ *Xanthomonas albilineans* สาเหตุโรคใบเหี่ยวของอ้อยจำนวน 218 isolates จากแหล่งปลูกที่ต่างกัน 31 แหล่ง โดยใช้ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ เช่น Spe I แล้วแยกวิเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่าโรคระบาดที่เกิดขึ้นในรัฐฟลอริด้านั้น เกิดจากการนำเชื้อเข้ามาจากแหล่งอื่น

4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorhism)

AFLP เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดย Zabeau and Vos ในปี 1993 ซึ่งเป็นการผสมผสานระหว่าง RFLP และ RAPD ซึ่ง polymorphism จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ additional base เหมือนกับ RFLP แต่ตรวจสอบด้วย PCR เหมือนกับ RAPD โดยที่ความยาวและความจำเพาะของ primer ที่ใช้ ตลอดจน PCR condition ที่เหมาะสมของ AFLP จะได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ สามารถเลือกเพิ่มปริมาณ DNA บนจีโนมซึ่งมีความซับซ้อนได้เป็นอย่างดี โดยที่จำนวนของ amplified fragment มีมาก ซึ่งจะขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม ความถี่ของเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะและจำนวนเบสที่จับกับ PCR primer ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้สร้างลายพิมพ์ DNA เพื่อที่จะจำแนกชนิดและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกันและภายในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน จัดเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญและใช้กันมากอย่างแพร่หลายในงานวิจัยที่เกี่ยวกับอณูชีววิทยา

5. DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของเส้น DNA โดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของ DNA ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion, transition, silent หรือ selected ของยีน และนอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide bias โดยที่ผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ 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 ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาหรือตรวจสอบในระดับของ DNA โดยตรง น่าที่จะให้ผลการตรวจสอบหรือศึกษาใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด มีรายงานการศึกษาของ Jasalavich *et al.* ในปี 1995 เกี่ยวกับการเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง 18S rRNA, 5.8S rRNA และ internal transcribed

specers (ITS1 และ ITS2) ของเชื้อรา *Alternaria* จำนวน 4 species ซึ่งเป็นสาเหตุของพืชในตระกูล Crucifers พบว่าลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5.8s rDNA ของเชื้อราทั้งสี่ชนิดนั้นมีความเหมือนกัน ส่วนในตำแหน่ง ITS1 นั้นมีความผันแปรสูงในลำดับเบสและความยาว ส่วนในตำแหน่ง 18s rDNA นั้น เป็นบริเวณที่ความคงตัวสูง (highly conserved) สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางพันธุ-กรรม (phylogenetic analysis) โดยใช้วิธี parsimony และ maximum likelihood สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในส่วน ITS และ IGS เป็นส่วนที่เกิดวิวัฒนาการได้เร็วที่สุดและอาจทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ภายในจีนัสเดียวกัน หรือระหว่างประชากร (White *et al.*, 1990) จึงสามารถใช้ primer ที่มีตำแหน่งอยู่ภายใน gene เพื่อสังเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS (<300 คู่เบส) และนำมาหาลำดับเบสบริเวณ ITS เพื่อเปรียบเทียบได้ (Muthumeenakshi *et al.*, 1994)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ามีการนำเทคนิค DNA เครื่องหมายมาใช้ในงานด้านอนุกรม-วิธานและจัดจำแนกเชื้อราให้ถูกต้อง โดยเฉพาะกับเชื้อราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังนำมาใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมโรค เช่น การวางแผนในการป้องกันกำจัด และการคัดเลือกพันธ์ต้านทาน เป็นต้น (McDonald, 1997)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาหาโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อรามากขึ้นเป็นลำดับ (Vos *et al.*, 1995) เนื่องจากมีข้อดีกว่า RFLP คือมีขั้นตอนการทำงานน้อย ไม่ยุ่งยาก ใช้ปริมาณ DNA ต่ำ และมีข้อดีกว่า RAPD เนื่องจากสามารถตรวจหา polymorphism ได้หลาย loci นอกจากนี้ primer ของ AFLP มีขนาดยาวกว่า primer ของ RAPD ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จาก AFLP จึงให้ผลดีกว่าและสามารถทำซ้ำได้ผลเช่นเดิม (วิชัย, 2541)

ตัวอย่างรายงานการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาหรือเครื่องหมาย DNA ชนิดต่างๆ เพื่อจัดจำแนก หรือศึกษาความผันแปรของเชื้อรา *Fusarium* spp. ดังต่อไปนี้

Bai (1999) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP ในการค้นหา gene ที่ต้านทานต่อโรค scab ของข้าวสาลี โดยใช้ลูกผสมระหว่างข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน (Ning 7840) และพันธุ์อ่อนแอ (Clark) ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีด conidiospores ของเชื้อสาเหตุ *Fusarium graminearum* ที่บริเวณกลางฝักข้าวสาลีของลูกผสมรุ่น F5, F6 , F7 และ F9 โดยในระยะสามวันแรกให้นำพืชไว้ใน moist chamber เพื่อกระตุ้นการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ แล้วจึงย้ายปลูกในโรงเรือน การประเมินหาค่า

ความต้านทานจะทำ 4 ครั้งคือที่ระยะ 3, 9, 15 และ 21 วัน หลังทำการปลูกเชื้อ พบว่าความต้านทานที่เกิดขึ้นถูกควบคุมโดย minor gene จากนั้นทำการสกัด DNA จากลูกผสมรุ่น F9 จำนวน 133 ต้น และทำการคัดเลือก AFLP primer ร่วมกันทั้งหมด 300 คู่เพื่อให้ได้มาซึ่งความแตกต่างของแถบ DNA แล้วนำมาวิเคราะห์การกระจายแบบกลุ่มใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแถบ DNA ที่ต่างกันอย่างน้อย 1 แถบสามารถบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้จากการใช้ primer 20 คู่ และการกระจายตัวของแต่ละแถบ DNA จะถูกประเมินจากลูกผสมทั้งหมด แถบ DNA ที่แตกต่างจำนวน 11 แถบจากการใช้เทคนิค AFLP แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กับความต้านทานที่เกิดขึ้น ซึ่งแต่ละแถบที่ต่างกันนั้นจะให้ค่า R^2 (total variation) สูงถึง 53% ซึ่งแถบไหนที่มีค่า R^2 สูงจะถูกจัดอยู่ใน single linkage group.

Simon (1998) ประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP เพื่อบ่งชี้ยีน (I2 gene) ในจีโนมของมะเขือเทศ ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 โดยทำการแยกโครโมโซมจากยีสต์ (yeast artificial chromosome, YAC) ซึ่งมีความยาวประมาณ 750 kb ซึ่งครอบคลุมบริเวณที่เป็นตำแหน่งของ I2 gene และใช้เทคนิค AFLP ในการค้นหากลุ่มของ I2 gene ที่ต้องการ จากนั้นทำการ clone DNA ที่ได้ให้กับ cosmid เพื่อส่ง gene ดังกล่าวให้กับพืช ซึ่งต้องใช้ cosmid จำนวน 3 ตัวในการใส่ I2 gene ให้สมบูรณ์ โดย cosmid ทั้งสามจะมีการใช้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาด 7 kb ร่วมกัน ซึ่งชิ้นส่วนดังกล่าวจะบรรจุรหัสของ open reading frame ซึ่งคล้ายกับ nucleotide binding site ของ leucine-rich repeat family ในยีนต้านทาน เมื่อเร็วๆ นี้มีการค้นพบ I2C-1 gene และ I2C-2 gene เพิ่มเข้ามาอยู่ในตำแหน่งนี้ด้วย แต่อย่างไรก็ตามยีนทั้งสองไม่มีบทบาทต่อความต้านทานในพืช และไม่ได้ทำหน้าที่เป็นยีนต้านทาน ในกลุ่มของ I2 gene นั้น พบว่ามีบริเวณที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอยู่ 2 ตำแหน่งภายใน leucine-rich repeat ซึ่งเกิดจากการหายไปหรือการเพิ่มขึ้นของ leucine-rich repeat จึงมีข้อเสนอแนะว่า leucine-rich repeat มีความเกี่ยวพันกันอย่างจำเพาะกับ I2 gene

Wang (2000) กล่าวว่าเทคนิคทางอณูชีววิทยานับเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ยิ่งในการช่วยคัดเลือกยีนที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวในแตงโม ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* การวิเคราะห์การกระจายตัวแบบกลุ่มถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้ยีน (Fom-2 gene) ซึ่งเป็นยีนที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 0 และ race 1 ทำการคัดเลือก DNA จากลูกผสมรุ่น F2 ระหว่าง MR-1 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และ AY ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ โดยอาศัยเทคนิค AFLP ในการบ่งชี้ Fom-2 gene ซึ่งใช้ primer 240 PstI/MseI และ 200 EcoRI/MseI ร่วมกัน จากการทดลองพบว่ามีแถบ DNA ที่แตกต่างจำนวน 15 ตำแหน่งที่มีส่วน

เกี่ยวข้องกับ Fom-2 gene ซึ่งตำแหน่งที่ได้ทั้งหมดเกิดจากการใช้ EcoRI/MseI และมีความสัมพันธ์กับการทดลองในลูกผสมที่ได้จากการผสมกลับ (backcross) ระหว่าง MR-1 x Ay และ AY สำหรับการคัดเลือกโดยใช้ ACT/CAT1 และ AAC/CAT1 จะได้ DNA ขนาด 1.7 และ 3.3 cM ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้เทคนิค AFLP (AGG/CCC) และ RAPD ซึ่งพบว่าการกระจายตัวของ Fom-2 gene มีความสัมพันธ์กัน

Mayer (1997) ได้พัฒนา DNA marker สำหรับยีนต้านทานต่อโรคเหี่ยวในถั่วเขียว (*Cicer arietinum* L.) ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* อันจะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนต้านทาน เพื่อที่จะได้มาซึ่งแนวทางในการผสมพันธุ์พืชใหม่ที่มีความต้านทานดีขึ้น โดยพัฒนาลูกผสมรุ่น F6 ระหว่างพ่อแม่ที่เป็นพันธุ์ต้านทาน (WR-315) และพันธุ์อ่อนแอ (C-104) จากนั้นทำการคัดเลือกครั้งแรกในลูกรุ่น F3 โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งใช้ primer UBC-170 และ CS-27 จากการวิเคราะห์พบว่ามี recombinant ระหว่าง marker ทั้งสองกับตำแหน่งของยีนต้านทาน 7% และ recombinant ระหว่างตำแหน่งที่ตรงกัน 6% จากนั้นนำชิ้น DNA มาหาลำดับเบสเพื่อนำไปสร้าง primer ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณเฉพาะตำแหน่งยีนที่สนใจ โดยใช้ primer CS-27F/CS-27R เพื่อจะนำไปสร้าง allele specific associated primers (ASAPs) การสร้าง marker จากเทคนิคทั้งสองนั้นเป็นหนทางในการค้นพบยีนต้านทานซึ่งจะนำไปถ่ายทอดให้กับพืชที่อ่อนแอ และช่วยให้การคัดเลือก germplasm ให้รวดเร็วและง่ายยิ่งขึ้น

Namiki (1994) ได้รายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium oxysporum* จำนวน 5 formae speciales ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับ cucurbit โดยอาศัยเทคนิคลายพิมพ์ DNA ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำปานกลางของยีน FOLR1 ถึง FOLR4 ทำการเลือก clone ยีนทั้งสี่จาก genomic library ของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lagenariae* 03-05118 โดยมีตัวแทนของ DNA จากเชื้อที่เข้าทำลายเฉพาะใน cucurbit ทั้งหมด 5 formae speciales คือ *cucumerinum*, *melonis*, *lagenariae*, *niveum* และ *momordicae* จำนวน 50 strains และที่เข้าทำลายพืชอื่นอีก 6 strains นำ DNA ของพืชทั้งหมดมาทำการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRV แล้วนำมา hybridized กับ probe ของ FOLR ที่ติดฉลากกัมมันตรังสีด้วย phosphorus-32 รูปแบบลายพิมพ์ของ FOLR จะแสดงให้เห็นความแตกต่างในระดับ formae speciales ของเชื้อแต่ละ strain ได้พบว่าเชื้อทั้ง 56 strains จะให้รูปแบบลายพิมพ์ DNA ทั้งหมด 52 แบบ ตรวจสอบโดยใช้ FOLR probe ซึ่งจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี unweighted-pair-group method using average (UPGMA) และวิเคราะห์โดยใช้ parsimony จากรูปแบบของลายพิมพ์ DNA ชี้ให้เห็นว่า formae speciales ที่เข้าทำลาย cucurbit ถูกจัดให้อยู่

ในกลุ่มเดียวกันทั้ง 5 formae speciales อย่างไรก็ตามยังพบความแตกต่างเกิดขึ้นใน formae speciales melonis โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการทำให้เกิดโรค กล่าวคือกลุ่มแรกเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวใน muskmelon กับ oriental melon ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งนั้นเป็นสาเหตุเฉพาะใน muskmelon เท่านั้น ลายพิมพ์ DNA จากพืชที่เข้าทำลายเฉพาะใน formae speciales ของ cucurbit เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

Kistler (1991) พบชิ้นส่วนของ DNA ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กันในระดับปานกลางในเชื้อ *Fusarium oxysporum* จากการตัดชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเลือก clone ยีน pEY1, pEY2, pEY7 และ pEY10 ที่มีความยาว 1.1, 1.1, 2.3 และ 1.2 kb จาก genomic DNA เพื่อใช้ในการค้นหาลำดับเบสซ้ำ โดยใช้เป็นตัวติดตามในขบวนการ hybridization จากการย่อยของเอนไซม์ endonuclease ของ *F. oxysporum* ใน strain ต่างๆ ซึ่งตัวติดตามสามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของแต่ละ strain อย่างเด่นชัด จึงสามารถนำมาใช้ในศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ที่เข้าทำลาย crucifer ของ *F. oxysporum* ผลจากการวิเคราะห์โดยวิธี parsimony แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *F. o.* f.sp. *conglutinans* แต่ละ strain มีบรรพบุรุษร่วมกัน แต่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างบรรพบุรุษของ *F. o.* f.sp. *conglutinans* กับ *F. o.* f.sp. *raphani* และ *F. o.* f.sp. *matthioli* นอกจากนั้นยังสามารถใช้ ตัวติดตาม pEY2 ในการบ่งชี้ภูมิศาสตร์ระหว่างประชากรของ *F. o.* f.sp. *conglutinans* ได้ดี ส่วน pEY10 พบว่ามีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของ *F. o.* f.sp. *cubense* เป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในกล้วย

Kim (1993) ใช้ mtDNA เพื่อศึกษาความเกี่ยวเนื่องระหว่าง formae speciales ของ *Fusarium oxysporum* ในพืชสกุล cucurbitaceae โดยใช้เชื้อในการทดลองทั้งหมด 39 isolates ซึ่งรวมถึง formae speciales ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวใน cucurbit ทั้ง 5 formae speciales เอาไว้ด้วย นำมาวิเคราะห์หาค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) โดยใช้เทคนิค RFLP ของ mtDNA ซึ่งทำการย่อย DNA ทั้งหมดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ PstI, HindIII และ EcoRI จากนั้นนำมาทำ southern blotted เพื่อ hybridized กับ *F. o.* f.sp. *niveum* mtDNA polyprobe (pFON2a-pFON8b) การปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบ DNAของ mtDNA จะถูกตรวจสอบโดยวิธี unweighted-pair-group method using average (UPGMA) และนำไปวิเคราะห์โดยใช้ parsimony ผลปรากฏว่าสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 14 กลุ่ม ซึ่งในแต่ละ forma specialis จะให้รูปแบบของแถบ DNA แต่ละแบบที่ไม่เหมือนกัน ส่วนอีกสองรูปแบบ (RFLPG-fspI and IX)

เกิดขึ้นกับ 4 และ 2 formae speciales ตามลำดับ รูปแบบของแถบ DNA ใน *F. o.* f.sp. *niveum* จะมีความคล้ายกันมาก แม้ว่าจะเป็น isolate ที่แยกมาจากต่าง formae speciales ก็ตาม จากการวิเคราะห์โดย UPGMA แสดงให้เห็นว่า *F. o.* f.sp. *niveum* (RFLPG-fspI) มีความหลากหลายของ formae speciales น้อยที่สุด ในขณะที่ *F. o.* f.sp. *cucumerinum* มีความแตกต่างกันมากที่สุด อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีชี้ให้เห็นว่า *F. oxysporum* ในแต่ละ formae speciales ทั้งหมด ที่เข้าทำลาย cucurbit นั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่ในบางกรณี isolate ที่ได้มาจาก formae speciales ที่ต่างกันนั้น มีพันธุกรรมคล้ายกันมากกว่า isolate ที่แยกมาจาก forma specialis เดียวกัน