บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

เชื้อราแป้งจัดเป็น obligate parasite ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เชื้อราแป้งได้รับอาหารจากพืชโดยเส้นใยที่เจริญอยู่เหนือผิวพืชสร้าง specialized hyphae ที่เรียกว่า haustoria (feeding organ) แทงเข้าสู่ภายในเซลล์ของ epidermal cell ของพืชเพื่อดูดกินอาหาร เชื้อราแป้งมีการสืบพันธุ์ได้ 2 แบบคือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจัดอยู่ใน Class Deuteromycetes Order Moniliales Family Moniliaceae ประกอบด้วย 4 genera (Cook *et al.*, 1997) ในระยะนี้เชื้อราจะสร้าง conidia เกิดอยู่บนก้านที่เรียกว่า conidiophore ซึ่งอาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆ ที่เรียกว่า solitary หรือ single type (สร้าง conidia 1 conidium ต่อวัน) หรือเกิดต่อกันเป็นสายโซ่ที่เรียกว่า chain type (สร้าง conidia มากกว่า 1 conidium ต่อวัน) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ใน Class Ascomycetes Order Erysiphales Family Erysiphaceae ประกอบด้วย 13 genera (Braun and Takamatsu, 2000) ในระยะนี้เชื้อราจะสร้าง sexual spore (ascospore) เกิดอยู่ในถุง ascus ที่อยู่ภายใน fruiting body ที่เรียกว่า ascoma (cleistothecium) ที่มีลักษณะกลม มีสีเข้ม หรือสีดำ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ชัยวัฒน์, 2546)

สำหรับประวัติการศึกษาเชื้อราแป้งเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1753 Linnaeus (อ้างโดยชัยวัฒน์, 2546) ได้ศึกษาลักษณะของเส้นใยสีขาวของเชื้อราแป้งที่พบบนใบของ *Humulus*, *Acer*, *Lumia*, *Geleopsis* และ *Lithospermum* โดยเขาตั้งชื่อเชื้อราแป้งนี้ว่า *Mucor erysiphe* ซึ่งนับเป็นชื่อแรกของเชื้อราแป้งในระบบการตั้งชื่อแบบ binomial ที่ภายหลังต่อมาชื่อ *Mucor* นี้ถูกลบออกจากสารบบของชื่อเชื้อราแป้ง แต่สำหรับ *Erysiphe* ได้นำมาใช้เป็นชื่อ genus และท้ายสุดใช้เรียกเป็นชื่อ family ของเชื้อราแป้งมาจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อราแป้งอย่างจริงจังได้เริ่มขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1805 และ 1851 โดย De Candolle (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ซึ่งเขาได้อธิบายถึงลักษณะของเชื้อราแป้งหลาย species โดยส่วนมากอธิบายถึงพืชอาศัย ตำแหน่งของเส้นใยและ ascocarp และบางส่วนได้อธิบายถึง appendage ด้วย ต่อมาในปี ค.ศ. 1815 Fries (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ได้รวมเชื้อราแป้งทั้งหมดจัดไว้ในชื่อของ *Erysiphe varium* ซึ่ง Wallroth (1819) (อ้างโดยชัยวัฒน์, 2546) ได้นำมาพิจารณาใหม่และจัดรวมเข้าไว้ในกลุ่มของเชื้อรา *Uredo* และได้เปลี่ยนชื่อเชื้อราในกลุ่มนี้ใหม่เป็น *Alphitomorpha* ซึ่งการศึกษาของเขาในครั้งนี้ได้อธิบายลักษณะภายนอกอย่างละเอียดของเชื้อราแป้งหลายชนิด สำหรับงานวิจัยพื้นฐานด้านอนุกรมวิธานของเชื้อราแป้งเริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1819 โดย Schlechtendahl เป็นบุคคลแรกที่จำแนกเชื้อราแป้งที่สร้างหนึ่ง ascus ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ascocarp ออกจากเชื้อราแป้งที่สร้างหลาย asci ในหนึ่ง ascocarp ในปี ค.ศ. 1829 Kunze (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ได้ตีพิมพ์เชื้อราแป้งใน genus *Podosphaera* ซึ่งในปีเดียวกันนี้ Fries (1829) อ้างโดย ชัยวัฒน์ (2546) ได้จัดเชื้อราแป้งใน *Erysiphe* ไว้ใน Perisporieae และอธิบายเชื้อราในกลุ่มนี้ไว้ถึง 16 species ซึ่งเชื้อราแป้งส่วนใหญ่ที่เขาศึกษานั้นจำแนกตามงานของ De Candolle, Wallroth และ Schlechtendal ซึ่งเขาเน้นให้เห็นถึงกลุ่มของเชื้อราที่จัดเป็น species complex ซึ่งต่อมา Wallroth (1833) (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ก็ได้จัดจำแนกตามแนวความคิดของ Fries (1829) ต่อมาในปี ค.ศ. 1834 Schweinitz ได้อธิบายเชื้อราแป้งจำนวนมากที่พบในตอนเหนือของอเมริกา และ Castagne (1845 และ 1851) อ้างโดย ชัยวัฒน์ (2546) นับเป็นคนแรกที่จำแนกชนิดของเชื้อราแป้งตามจำนวนของ ascospore ที่สร้างในหนึ่ง ascus

การจัดจำแนกเชื้อราแป้งอย่างทันสมัย (modern) เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1851 โดย Lèveillè (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ซึ่งเขาได้จำแนกเชื้อราแป้งออกเป็น 6 genera คือ *Calocladia, Erysiphe, Phyllactinia, Podosphaera, Sphaerotheca* และ *Uncinula* ตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ได้แก่ลักษณะของ asci, ascospore และลักษณะของ appendages แต่ในงานของเขาได้ละเลยลักษณะสำคัญของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนการจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นปรากฏว่ามีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวางในอีกหลายปีต่อมา แต่เป็นไปในลักษณะกระจัดกระจายไม่เป็นแนวทางเดียวกัน ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของ ascocarp ที่มีสีดำ กับเส้นใยสีขาว และก้าน conidiophore เป็นไปอย่างค่อยเป็นค่อยไป (ชัยวัฒน์, 2546) ต่อมา Braun (1987, 1995) ได้จัดจำแนกเชื้อราแป้งในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศออกเป็น 4 genera และระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศออกเป็น 18 genera (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม Braun ยังคงให้ความสำคัญกับการจำแนกตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มากกว่าการจัดจำแนกตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2000 Braun and Takamatsu ได้รวบรวมผลงานการศึกษาเชื้อราแป้งในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยอาศัยผลการศึกษาของ Cook *et al.* (1997) ที่ศึกษาลักษณะของเชื้อราแป้งโดยใช้กล้อง SEM ร่วมกับผลการศึกษาของ Takamatsu *et al.* (1999) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุล (rDNA sequence analysis) และนำมาเปรียบเทียบกับการจัดจำแนกเชื้อราแป้งแบบเดิมตามรายงานของ Braun (1987, 1995) ที่อาศัยลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นหลักในการจัดจำแนก พบว่าการจัดจำแนกแบบเดิมมีความไม่สัมพันธ์กัน จึงได้เสนอแนะการจัดจำแนกแบบใหม่ โดยรวมลักษณะการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบเข้าด้วยกัน ซึ่งสามารถจัดจำแนกออกเป็น 13 genera (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Braun, 1987, 1995)

Family	Subfamily	Tribus	Subtribus	Genera
Erysiphaceae	Erysiphoideae	Cystotheceae		*Cystotheca*
				Podosphaera
				Sphaerotheca
		Erysipheae	Sawadaeinae	*Sawadaea*
			Typhulochaetinae	*Typhulochaeta*
			Microsphaerinae	*Microsphaera*
				Medusosphaera
				Arthrocladiella
			Erysiphinae	*Blumeria*
				Erysiphe
				Brasiliomyces
				Setoerysiphe
			Uncinulinae	*Uncinula*
				Uncinuliella
				Bulbouncinula
	Phyllactinioideae			*Phyllactinia*
				Leveillula
				Pleochaeta

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศร่วมกับผลการศึกษาด้านอณูชีววิทยา (Braun and Takamatsu, 2000)

Family	Tribus	Subtribus	Genera	Sections	Subsection
Erysiphaceae	Blumerieae		*Blumeria*		
	Cystotheceae	Cystothecianae	*Cystotheca*		
			Podosphaera	Podosphaera	
				Sphaerotheca	Sphaerotheca Magnicellulatae
		Sawadaeinae	*Sawadaea*		
	Erysipheae	Typhulochaetinae	*Typhulochaeta*		
		Erysiphinae	*Brasiliomyces*		
			Erysiphe	Erysiphe Microsphaera Uncinula	
	Golovinomyceteae	Golovinomycetinae	*Golovinomyces*	Depressi Golovinomyces	
		Arthrocladiellinae	*Arthrocladiella*		
		Neoerysiphinae	*Neoerysiphae*		
	Phyllactinieae		*Phyllactinia*		
			Leveillula		
			Pleochaeta		

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งของ Lèveillè (1851) (อ้างโดย ชัยวัฒน์, 2546) ที่จำแนกเชื้อราแป้งใน genus *Erysiphe* ออกเป็น genus ย่อย ๆ ตามจำนวนของ ascus และตามชนิดของ appendage ซึ่งการจัดจำแนกของเขานี้ นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาในด้านการจัดจำแนกเชื้อราแป้งต่อเนื่องเรื่อยมาตลอดจนสิ้นศตวรรษที่ 20 (Salmon 1900; Blumer 1933, 1967; Yarwood 1978; Braun 1987, 1995) อ้างโดย ชัยวัฒน์ (2546) ซึ่งโครงสร้างของ ascoma นี้ได้กลายเป็นหลักสำคัญในการจัดจำแนกชนิดและ phylogeny ของเชื้อราแป้งมาจนกระทั่งเทคโนโลยีด้านการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด Scanning Electron Microscopy (SEM) เพื่อตรวจดูลักษณะผิวของ conidia ของเชื้อราแป้ง (Cook *et al.* 1998, 1999, 2000; Braun 1999, Braun and Takamatsu, 2000) อ้างโดย ชัยวัฒน์ (2546) ได้รับการพัฒนาและได้กลายมาเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มูลเหตุสำคัญของการจัดจำแนกเชื้อราแป้งใหม่ด้วยเหตุผลคือ ลักษณะต่าง ๆ ของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนับเป็นลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิดในระดับ genus และการศึกษาด้าน phylogeny ของเชื้อราแป้งมากกว่าลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เคยใช้กันมาในอดีต โดยลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ถูกลดระดับลงมาใช้ในการจัดจำแนกในระดับ species แทน การจัดจำแนก genus ของเชื้อราแป้งแบบใหม่นี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากการจำแนกแบบเดิมอย่างมาก ซึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจกันนักในกลุ่มของผู้ที่ไม่ได้เป็นนักอนุกรมวิธาร (non-taxonomists) อย่างไรก็ตาม Braun *et al.* (2002) ได้ให้เหตุผลว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้นับเป็นผลมาจากความก้าวหน้าด้านวิทยาศาสตร์อย่างแท้จริง

สำหรับในประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้น กล่าวคือมีสภาพอากาศที่อบอุ่นและมีความชื้นสูงตลอดทั้งปี ทำให้เชื้อราแป้งที่พบในประเทศไทย มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นส่วนใหญ่ (Sontirat *et al.*, 1994) ด้วยเหตุนี้ในอดีตที่ผ่านมาที่การจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น จึงมีผลทำให้การจัดจำแนกชนิดเชื้อราแป้งในประเทศไทยไม่อาจกระทำได้ ซึ่งนับเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาเชื้อราแป้งในประเทศไทยมาจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Braun *et al.* (2002) ที่ชี้ให้เห็นว่าลักษณะต่าง ๆ ของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกของเชื้อราแป้งในระดับ genera ได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาถึงการจำแนกชนิดเชื้อราแป้งในประเทศไทย ตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

สำหรับประวัติของการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราแป้ง ตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือระยะ conidial state ในระดับ species เริ่มขึ้นโดย Ferraris (1912) อ้างโดย ชัยวัฒน์ (2546) ซึ่งจัดแบ่งกลุ่มเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* ออกตามขนาดและรูปร่างของ conidia ในปี ค.ศ. 1980 Boesewinkel นับเป็นคนแรกที่จัดทำ key สำหรับจัดจำแนกชนิดเชื้อราแป้งตามลักษณะของ conidial state ซึ่งได้แก่ลักษณะของ conidia, conidiophore, appressoria, haustoria, fibrosin body และเส้นใย โดยจัดกลุ่มได้มากกว่า 12 กลุ่ม และในปี ค.ศ. 1987 Braun ได้จัดจำแนกเชื้อราแป้งโดยใช้ลักษณะต่างๆ ของเส้นใย (เป็น ectoparasitic หรือ endoparasitic) และรูปร่างของ conidia เป็นหลักในการจัดจำแนกโดยละเลยลักษณะที่สำคัญอื่นๆ เช่น appressorium, การมีหรือไม่มี fibrosin body, การสร้าง conidia ต่อกันเป็นสายโซ่หรือเกิดเดี่ยวๆ ฯลฯ, ลักษณะการงอกของ conidia เป็นต้น ทำให้สามารถจัดจำแนกเชื้อราแป้งได้เพียง 4 genus (ตารางที่3) ต่อมา Cook *et al.* (1997) ได้ริเริ่มนำลักษณะของผิว conidia และลักษณะอื่นๆ เช่น รอยต่อระหว่าง conidia กับ conidiophore ที่ตรวจพบโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscopy, SEM) ในเชื้อราแป้งทุก genus นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะต่างๆ ที่สำรวจได้โดยกล้อง SEM นี้ไปช่วยเสริมลักษณะต่างๆ ที่ตรวจพบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscopy,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LM) และยังสอดคล้องกับการศึกษาด้านอณูชีววิทยา (ด้าน DNA analysis) อีกด้วย ซึ่ง Cook *et al.* (1997) ได้จัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศใน genus *Oidium* ออกเป็น 8 subgenera ต่อมา To-aunu *et al.* (2002) ได้รายงานพบเชื้อราแป้งใน subgenus ใหม่ที่พบบนพืช *Phyllanthus* spp. ด้วยเหตุนี้เชื้อราแป้งใน genus *Oidium* ในปัจจุบันจึงมีสมาชิกรวมทั้งสิ้น 9 subgenera (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Braun, 1987)

กลุ่มที่ 1 : เส้นใยเจริญอยู่ภายนอกพืชอาศัย มีเพียง genus เดียวคือ *Oidium*	กลุ่มที่ 2 : เส้นใยเจริญภายในพืชอาศัย มี 3 genus
1. *Oidium* 1.1 Chain-type or Euoidium 1.2 Single-type or Pseudoidium	2.1 *Ovulariopsis* 2.2 *Oidiopsis* 2.3 *Streptopodium*

ตารางที่ 4 การจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Cook *et al.* 1997; To-anun *et al.* 2002)

Family	Genus	Subgenus	Teleomorphs
Moniliaceae (Erysiphaceae)	1. *Ovulariopsis*	-	*Phyllactinia*
	2. *Streptopodium*	-	*Pleochaeta*
	3. *Oidiopsis*	-	*Leveillula*
	4. *Oidium*	*Pseudoidium*	*Erysiphe*
		Setoidium	*Cystotheca*
		Fibroidium	*Podosphaera*
		Octagoidium	*Sawadaea*
		Oidium	*Blumeria*
		Striatoidium	*Neoerysiphe*
		Graciloidium	*Arthrocladiella*
		Reticuloidium	*Golovinomyces*
		Microidium	Unknown

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนกเชื้อราแป้งในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ Cook *et al.* (1997) และ To-anun *et al.* (2002) ได้แบ่งเชื้อราแป้งออกเป็น 4 genera โดย 3 genera แรก (*Ovulariopsis*, *Streptopodium* และ *Oidiopsis*) เป็นเชื้อราแป้งพวก endophytic parasite ส่วนเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* นั้นเป็นพวก ectophytic parasite ซึ่งเชื้อราแป้งใน genus นี้ประกอบด้วย 9 subgenera โดยเชื้อราแป้งใน subgenus *Pseudoidium* นั้นเป็น subgenus เดียวที่มีการสร้าง conidia เป็นแบบเดี่ยว ส่วนอีก 8 subgenera นั้นสร้าง conidia เป็นแบบยาวต่อกันเป็นสายโซ่

สำหรับเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* นั้นมีลักษณะสำคัญคือ สร้าง conidia แบบเดี่ยวบนก้าน conidiophore ภายใน conidia ไม่มี fibrosin body บริเวณเส้นใยสร้าง appressoria แบบ lobed-shape และเมื่อ conidia งอกสร้าง germ tube แบบ polygoni type เชื้อราแป้งนี้สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้หลายชนิด ได้แก่ ธัญพืช หญ้า ผัก ผลไม้ และไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเข้าทำลายพืชอาศัยได้ตลอดทั้งปีและทุกระยะการเจริญเติบโต จึงจัดเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันจึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาเชื้อราแป้งในกลุ่มดังกล่าวอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เช่น Kashimoto *et al.* (2003) ศึกษาเชื้อราแป้งที่พบบนมะเขือเทศในประเทศญี่ปุ่นและพบว่าเชื้อราแป้งนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจัดอยู่ใน subgenus *Pseudoidium* โดย conidia มีการงอกมากกว่า 90% และสร้าง appressorium เป็นแบบ lobe หลังจากที่สร้าง haustorium แล้วเชื้อราจะสร้างเส้นใยระยะที่สองจาก appressorium และ conidia ซึ่งเส้นใยโดยทั่วไปจะเกาะติดกับผิวของพืชโดยใช้ appressorium และสร้าง conidiophore ที่มี conidia เป็นแบบเดี่ยว ในปีเดียวกัน Falacy and Glawe (2003) รายงานพบเชื้อราแป้งบนพืช *Ligustrum japanicum* (Japanese privet) เป็นครั้งแรกในอเมริกาเหนือ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Erysiphe syringae (Microsphaera syringae)* โดยในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นสร้างเส้นใยสีขาว และสร้าง conidia แบบเดี่ยวรูปทรงกระบอก ขนาด (26-)27-35(-41) x (11-)12-14(-15) µm บนก้าน conidiophore ที่มี foot cell รูปทรงกระบอกและบริเวณเส้นใยสร้าง appressorium แบบ lobe ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้จัดอยู่ใน subgenus *Pseudoidium* ส่วน Havrylenko and Takamatsu (2003) ได้ศึกษาเชื้อราแป้ง *Erysiphe patogoniaca* ซึ่งเป็น specie ใหม่จัดอยู่ใน *Erysiphe* sect. *Uncinula* ที่พบใน Patagonia ประเทศอาร์เจนตินา โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สำหรับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นพบเส้นใยเจริญอยู่บนผิวพืชและพบทั้งด้านบนใบและใต้ใบ โดยส่วนใหญ่พบด้านบนใบ เส้นใยมีสีใส ผนังบาง เมื่อนานไปเส้นใยจะสลายตัว เส้นใยมีขนาด 3-6 µm และมี appressoria เป็นแบบ nipple shaped หรือ multilobe ซึ่งจะเกิดแบบเดี่ยวหรือเกิดเป็นคู่ที่อยู่ตรงข้ามกัน มี conidiophore ตั้งตรง foot-cell ตรงเป็นรูปทรงกระบอกและมี strength cell จำนวน 2 cells conidia มีรูปร่าง ellipsoid ถึง cylindrical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาด (12-)18-29 x 8-11(-12) μm เมื่อ conidia งอกสร้าง germ tube ที่มีลักษณะเป็น lobe อยู่ตรงส่วนปลาย เขาได้จัดเชื้อราแป้งนี้อยู่ใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* และ Nomura *et al.* (2003) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้ง *Erysiphe necator* var. *necator* ที่พบบนพืช *Vitis vinifera* และ *Ampelopsis brevipedunculata* var. *heterophylla* (Vitaceae) ทั้งในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเชื้อราสร้างเส้นใยบนใบพืช ซึ่งพบทั้งด้านบนใบและใต้ใบ มี conidiophore ตั้งตรงขนาด 42-75 x 8-10 μm มี foot cell เป็นแบบบิดเกลียว 1-2 รอบ และมี strength cells 1-2 cells มี appressorium แบบ lobe สร้าง conidia แบบเดี่ยว รูปร่าง ellipsoid-ovoid ถึง doliform มีขนาด 28-40 x 15-22 μm ซึ่งจัดอยู่ใน subgenus *Pseudoidium* สำหรับในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อราแป้งที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยหลายชนิด เช่น มะขาม สัก ส้ม มะเขือเทศ และพุทรา ล้วนเป็นเชื้อราแป้งที่อยู่ใน subgenus *Pseudoidium* ทั้งสิ้น (Takamatsu, 2002; personal communicated)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อรา

Phylogeny หมายถึงความสัมพันธ์และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เป็นเพียงการประเมิน (estimate) โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยาหรือข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme หรือ restriction sites หรือ DNA sequence โดยนำมาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ภายในหรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ สำหรับเชื้อราเทคนิคทางอณูวิทยามีส่วนช่วยทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ phylogeny ของเชื้อราดังกล่าวสะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยโปรตีน และกรดนิวคลิอิคเป็นเครื่องมือในการศึกษา (Takamatsu, 1998) แต่การนำเอนเซม์และโปรตีนมาใช้ในการศึกษาพบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากเอนไซม์และโปรตีนเป็นผลจากการแสดงกิจกรรมของยีน ซึ่งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้รับมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง จึงนิยมทำการศึกษาหรือตรวจสอบที่ระดับของดีเอ็นเอโดยตรง

Phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากลำดับเบสของยีนหนึ่ง ๆ สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตภายใน specie และสามารถตอบคำถามเกี่ยวกับระยะเวลาที่เกิดการวิวัฒนาการและปัญหาทางนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นได้ (Page and Holmes, 1996) โดย phylogenetic distance ระหว่างสิ่งมีชีวิต สามารถคำนวณได้จากจำนวนการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นในยีน ซึ่งมีรหัสในการสร้างโปรตีนหรือ ribonucleic acid (RNA) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะปรากฏในลำดับนิวคลีโอไทด์ (ลำดับเบส) ของยีน (Watson *et al.*, 1987)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DNA sequence analysis

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

การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) มีหลายวิธีการด้วยกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการหาลำดับเบส ตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่ใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส เป็นต้น และการใช้ PCR product ที่ผ่านการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยทั้งสองวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันกล่าวคือ วิธีการใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบสมีข้อดีกว่า วิธีการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ คือ ลำดับเบสที่ได้จะไม่เกิดความเสียหายอันเนื่องจากขบวนการทางเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต และดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถเลือกใช้เฉพาะส่วนที่มีลำดับเบสที่ต้องการเท่านั้น ในขณะที่ขั้นตอนการ cloning ต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสมากกว่าส่วนที่ต้องการ อย่างไรก็ตามวิธีการ clone มีความจำเป็นในการหา individual alleles หรือส่วนที่แตกต่างกันของยีน ในกลุ่มที่มีตำแหน่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงกัน (coamplified) (Gyllensten *et al.*, 1992)

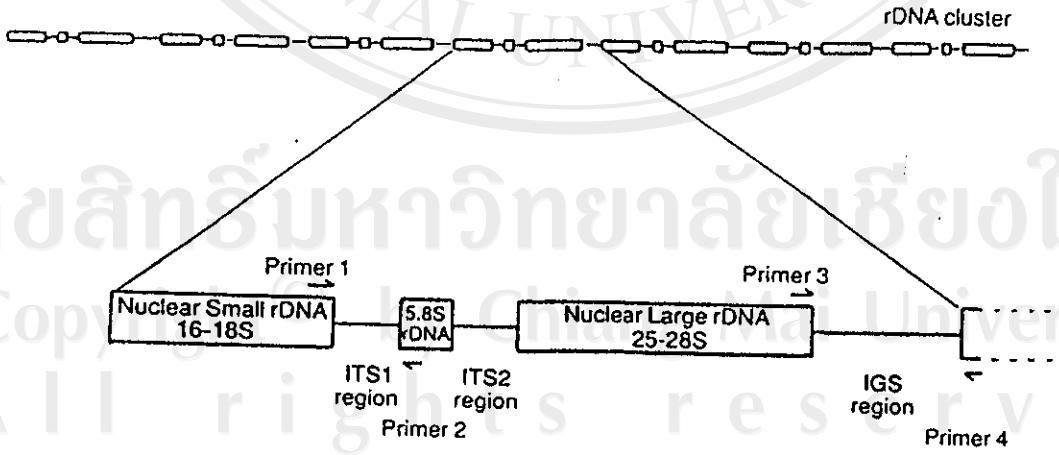
สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ และผ่านทางอินเตอร์เน็ต เนื่องจากในปัจจุบันมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอและโปรตีน ที่มีรายงานการวิจัยไว้ในศูนย์เก็บข้อมูลซึ่งมีเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (nucleotide database) โดยข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในสี่ศูนย์ที่สำคัญ ประกอบด้วย The DNA Databank of Japan (DDBJ), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), The GenBank และ The Genome Sequence Database (GSDB) ซึ่งทั้งสี่ศูนย์นี้จะมีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าด้วยกัน โดยผู้ที่ทำการศึกษาหรือผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สามารถเข้าไปค้นหาข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบและอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งข้อมูลไปเก็บไว้ในฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อมูลของศูนย์ได้ (Burks, 1997) (ข้อมูลที่ตั้ง และที่อยู่ทางอินเตอร์เน็ตของศูนย์ทั้งสี่ แสดงไว้ในภาคผนวก)

Nuclear ribosomal RNA gene (rDNA)

ลำดับเบสของ nuclear rRNA genes (rDNA) ใช้ในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่พบโดยทั่วไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทสำคัญในเซลล์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน rDNA อาจเป็นผลที่เกิดจากการวิวัฒนาการของจีโนมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต (Edel, 1997) กลุ่มของ rDNA พบได้ใน nucleus และ mitochondria ประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable สำหรับ nuclear rRNA gene ของเชื้อรามีลักษณะเป็นหน่วยที่เรียงซ้ำ ๆ ต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งในส่วนของ subunit นี้ได้มีการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ Order และ Kingdom ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes (Van der Auwera *et al.*, 1994 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998) และลำดับเบสส่วนที่มีความผันแปรคือ ตำแหน่ง spacer region ซึ่งส่วนที่อยู่ระหว่าง subunit จะเรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) และที่อยู่ระหว่างกลุ่มยีน (gene cluster) จะเรียกว่า Intergenic Spacer (IGS) (ดังแสดงในภาพที่ 1) ซึ่งในส่วน spacer เหล่านี้ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ genera และ sub-species ได้ (Cooke and Duncan, 1997 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998)



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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลลำดับเบสของ rDNA ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธานและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิดเช่น *Neurospora*, *Fusarium*, *Colletotrichum* รวมทั้ง powdery mildew โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า polymerase chain reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณของ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสและเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunit และได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง specie และ/หรือระหว่างประชากรภายใน specie

Internal transcribed spacer (ITS)

ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะพบอยู่ในหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของ rRNA (ดังภาพที่ 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)) และทำการเพิ่มปริมาณได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และสามารถใช้ universal primer เพียงตัวเดียวก็สามารถเพิ่มปริมาณของยีนในตำแหน่ง ITS และ conserved region ของ rRNA subunits gene ได้
2. มีอยู่หลายร้อยชุดในเซลล์ทำให้ง่ายในการ amplify โดยที่แม้จะมี DNA sample น้อยก็สามารถศึกษาได้
3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีความผันแปรสูงมาก ระหว่าง specie ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ทำให้สามารถใช้ในการคาดเดา (estimate) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดแบ่งกลุ่มรวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้
4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็ว โดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันใน specie เดียวกัน และต่างกันในระหว่าง specie ของเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ลำดับเบสบน ribosomal DNA ในเชื้อรามีจุดประสงค์ที่สำคัญคือ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา และนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ต่อไป สำหรับเชื้อราแป้งนั้นได้มีการศึกษาดังนี้

Sato *et al.* (1998) ได้ศึกษาเชื้อรา *Microsphaera pulchro* บนพืช *Cornus* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาระดับโมเลกุลโดยวิธี PCR-RFLP ในบริเวณ rDNA ITS จากการศึกษาสามารถแยก *M. pulchro* ออกเป็น 2 species หรือ 2 variety โดยอาศัยลักษณะของ conidia และลักษณะของ germ tube และยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ rDNA ITS โดยวิธี PCR-RFLP

Hirata and Takamatsu (2001) ได้ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสหรือหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการ PCR-RFLP ตรงตำแหน่ง ITS ของ rDNA ของเชื้อราแป้ง (*Podosphaera fuliginea*) บนดาวกระจายและแตงกวา มากกว่า 50 isolate และจากการศึกษาทำ cross inoculation ของเชื้อราแป้งดังกล่าวระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า isolate จากพืชทั้ง 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ monotypic และมีลำดับเบสที่ซ้ำกัน 6 nucleotide และผลจากการ cross inoculated พบว่า isolate จากดาวกระจาย ไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับแตงกวา แต่ isolate จากแตงกวานั้นสร้าง conidia บนใบของดาวกระจาย เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ แต่ปริมาณของ conidia จะน้อยกว่าเชื้อราของแตงกวา ที่สร้างบนแตงกวาเองอย่างมาก แต่เมื่อทำการทดลองในแปลงปลูกนั้น isolate จากแตงกวาไม่สามารถเข้าทำลายดาวกระจายได้ อย่างไรก็ตามเชื้อราแป้งบนดาวกระจายและแตงกวานั้นสามารถกล่าวได้ว่ามีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และความสามารถในการทำให้โรคกับพืช ซึ่งในการทดลองนี้เป็นเพียงการยืนยันถึงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่าง phylogeny และ infectivity ของเชื้อราแป้งเท่านั้น

Jones *et al.* (2001) ได้ศึกษาเชื้อราแป้งที่พบบนมะเขือเทศ (*Oidium neolycopersici*) โดยใช้ตำแหน่ง ITS ของ nuclear rRNA ในปี ค.ศ. 2000 พบว่า *O. (neo)lycopersici* นั้นแตกต่างจาก *E. orontii* และ *E. cichoracearum* และยังพบว่า *O. (neo)lycopersici* เป็น sister taxon ของ *E. aquilegia* var. *ranunculi* ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่า *O. lycopersicum* นั้นเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *E. orontii* หรือ *E. cichoracearum* หรือ *Erysiphe* sp. ที่พบในออสเตรเลีย แต่ยังมีการสับสนในการจัดจำแนกทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาอยู่ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2001 Kiss *et al.* ยังได้ศึกษาราแป้งมะเขือเทศในยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และเอเชีย พบว่าการแพร่กระจายของโรคนี้ที่อยู่นอกเหนือจากออสเตรเลียนั้นเป็นเชื้อราที่สร้าง conidia แบบ single หรือสร้างเป็น pseudo-chain 2-6 conidia และได้ตั้งชื่อให้เป็น specie ใหม่ว่า *O. neolycopersici* ส่วน isolate ที่พบในออสเตรเลียนั้นจะสร้าง conidia เป็น chain ต่อกันเป็นสายโซ่ซึ่งจัดเป็นเชื้อราคนละชนิดกับ *O. lycopersici*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Okamato *et al.* (2002) ได้ศึกษาเชื้อราแป้งที่พบบนพืช Prairie Gentain (*Eustoma grandiflorum*) โดยใช้รูปร่างลักษณะของเชื้อ melecular phylogeny และความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าสามารถจัดอยู่ใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* [teleomorph : *Erysiphe sensu* Braun and Takamatsu (2000)] แต่ไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จากการใช้ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเชื้อรานี้ เปรียบเทียบกับลำดับเบสจาก DNA database พบว่าสามารถจัดไว้ในกลุ่มของเชื้อราแป้งที่พบบนพืช garden four o'clock (*Milabilis jalapa*) และถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) จากการปลูกเชื้อราแป้งของพืช garden four o'clock ลงบนพืช Prairie Gentain และถั่วปากอ้า พบว่าราแป้งบนพืช Prairie Gentain มีจุดกำเนิดมาจากพืช garden four o'clock หรือถั่วปากอ้า และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าเชื้อราแป้งนี้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *E. baeumleri* บนพืช *Vicia* spp. และ *E. trifolii* บนพืช *Trifolium pratense* จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า เชื้อราแป้งบนพืช Prairie Gentain นี้เป็นเชื้อราที่อยู่ในกลุ่มของปรสิตของพืชในตระกูล Fabaceae

Takamatsu *et al.* (2002) ได้ศึกษาเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* ที่พบบนถั่วเหลือง (*Glycine max*) ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้าง ascomata ที่มี appendage เป็นแบบ myceloid และจากการศึกษาโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งใช้ลำดับเบสจากบริเวณ ITS ของถั่วเหลือง 13 isolate และ *Glycine soja* ที่เก็บจากประเทศญี่ปุ่น เกาหลี เวียดนาม และสหรัฐอเมริกา มาเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับ DNA database พบว่าเชื้อราดังกล่าวจัดอยู่ใน *Erysiphe* แบ่งออกได้เป็น 2 species โดยใน specie แรกที่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น จัดเป็น *Erysiphe glycines* โดยใช้ ITS sequence และลักษณะของ ascomata ส่วนอีก specie ซึ่งยังไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น จัดเป็น *E. diffusa* (=*Microsphaera diffusa*) แต่อย่างไรก็ตามในการจัดหมวดหมู่นั้น ยังคงต้องใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในการยืนยันการตั้งชื่อของ specie นี้อยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved