บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Colletotrichum*

เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* มีการจัดจำแนกได้ดังนี้ (Sutton, 1980)

Kingdom Mycetae

Division Eumycota

Sub-division Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Order Melanconiales

Family Melanconiaceae

Genus *Colletotrichum*

ราสกุล *Colletotrichum* มีลักษณะทั่วไปคือ สร้างเส้นใย (mycelium) เจริญดี มีการแตกกิ่งก้านและมีผนังกั้น สีของเส้นใยมีตั้งแต่ไม่มีสีถึงสีน้ำตาลเข้ม สร้าง fruiting body เพื่อให้กำเนิดโคนิเดีย (conidia) เรียกว่า conidiomata แบบ acervulus ซึ่งมีสีอ่อนถึงสีน้ำตาล acervulus จะสร้างบนผิวพืชตรงชั้นของ subcuticle, epidemal, subepidermal หรือ peridermal ของพืช โดยอาจจะสร้างขึ้นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่มีสีถึงสีน้ำตาล มีผนังกั้น ผิวเรียบแตกกิ่งก้านเฉพาะเซลล์ฐาน conidiophore เกิดจากเซลล์บนสุดของ conidiomata ในการสร้าง conidia ผนังชั้นนอกของเซลล์ที่ให้กำเนิด conidia (conidiogenous cell) จะไม่มีส่วนเกี่ยวของกับการสร้าง conidia (phialidic) conidia จะเกิดโดยผนังชั้นในของ conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง จึงเรียกเซลล์นี้ว่า enteroblastic conidiogenous cell โดย conidiogenous cell ที่สร้างจะมีลักษณะใสไม่มีสี ผนังเรียบ รูปทรงกระบอก conidia เป็นเซลล์เดียว ไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (ยกเว้นขณะ germination) ลักษณะตรงหรือโค้งงอ มีรูปร่างหลายแบบ appressoria มีสีน้ำตาล ผิวเรียบหรือขรุขระ อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือสร้างหลายอันต่อกัน เมื่อนำเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บางครั้งจะพบว่ามีการสร้าง sclerotia สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำเป็นกลุ่มอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบการสร้าง setae ใน conidiomata หรือ sclerotia โดย setae

ดังกล่าวมีสีน้ำตาล มีผนังกั้น ผิวเรียบ บริเวณโคนโป่งออก ปลายแหลม ลักษณะที่มี setae เรียกว่า setose การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในสกุลนี้จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* ใน Class Ascomycetes

เชื้อรา *Colletotrichum* มีรายงานการพบครั้งแรกโดย Tode ในปี 1790 (อ้างโดย Sutton, 1992) ซึ่งได้จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ไว้ในสกุล *Vermicularia* และได้มีการปรับเปลี่ยนชื่ออยู่หลายครั้ง จนในที่สุดจึงแยกออกมาเป็นสกุล *Colletotrichum* โดย Fries ในปี 1821 (อ้างโดย Sutton, 1992) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อราชนิดนี้ในระดับสปีชีส์ ระยะแรกทำการจัดจำแนกโดยใช้พืชอาศัย ทำให้มีรายงานการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ไว้มากถึง 900 สปีชีส์ ต่อมาพบว่าหลักเกณฑ์ดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกเนื่องจากไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อราภายในจีนัสได้ (Sutton, 1992) จึงได้มีความพยายามหาหลักเกณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนก เช่น Von Arx ในปี 1957 จัดจำแนกได้ 23 สปีชีส์ (อ้างโดย Sutton, 1992) Farr และคณะ (1989) ทำการจัดจำแนกได้ 49 สปีชีส์ (อ้างโดย Sutton, 1992) แต่การจัดจำแนกดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัด จึงทำให้ไม่ได้รับการยอมรับเท่าที่ควร โดยการจัดจำแนกที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดคือการจัดจำแนกของ Sutton (1992) ซึ่งจัดจำแนกโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้ 39 สปีชีส์ ดังนี้ *C. acutatum, C. capsici, C. caricae, C. caudatum, C. circinans, C. coccodes, C. coffeanum, C. corchori, C. crassipes, C. curvatum, C. dematiun, 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. phtllachoroides, C. psoraleae, C. spinaciae, C. sublineolum, C. trichellum, C. trifolii*, *C. trumcatum* และ *C. typhae* ซึ่งการจัดจำแนกดังกล่าวยังไม่นับว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุด อีกทั้งสภาพแวดล้อมยังมีผลต่อการแสดงออกของ gene ซึ่งควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ทำให้ลักษณะดังกล่าวมีการแสดงออกผิดไปจากเดิม ก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกยิ่งขึ้น (Freeman และคณะ, 1993)

จากข้อจำกัดในการจัดจำแนกข้างต้น ประกอบกับเชื้อรา *Colletotrichum* เป็นเชื้อราที่มีพืชอาศัยกว้าง นอกจากนี้ในพืชชนิดหนึ่งๆ สามารถถูกเข้าทำลายได้โดยเชื้อรา *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ (Bailey และคณะ, 1996) ทำให้ยากต่อการจัดจำแนกและการวางแผนป้องกันกำจัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งมีรายงานการเข้าทำลายในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง ส้ม มังคุด กล้วย องุ่น มะละกอ น้อยหน่า ลิ้นจี่ ฝรั่ง ขนุน พุทรา ขิง พริกไทย ขมิ้น เป็นต้น (เอียน, 2536)

นับว่าเป็นแหล่งที่มีความผันแปรของเชื้อรา *Colletotrichum* สูง พืชอาศัยบางชนิดไม่พบในส่วนอื่นๆ ของโลก จึงควรหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ เช่น การนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาศึกษาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อช่วยในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราในกลุ่มนี้ อันจะนำไปสู่การป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา

ในปัจจุบันนี้วิทยาการด้านอณูวิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษาและวินิจฉัยโรคพืชอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้มากขึ้นเป็นลำดับ อาทิ เช่นมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และแม่นยำ สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตลอดจนพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ความรู้ความเข้าใจโครงสร้างประชากรของเชื้อสาเหตุจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวางแผนและการควบคุมโรคที่เหมาะสม รวมทั้งการกักกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ (พัชรา, 2541) เทคนิคด้านอณูวิทยาที่นิยมนำมาใช้ในงานด้านการศึกษาและวินิจฉัยโรคพืช คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ถือเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้หาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต ได้อย่างแม่นยำและชัดเจน เนื่องจาก เป็นการตรวจสอบความแตกต่างถึงระดับพันธุกรรม ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ทำให้สามารถตรวจสอบบรรพบุรุษร่วมได้ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในชื่อที่รู้จักกันว่า "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) โดยเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้อย่างมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) การระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืชและเชื้อรา (Weising และคณะ, 1995)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายถูกนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างดังนี้ (จุลภาค, 2541)

1. การเพิ่ม หรือสูญเสียไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่

2. เกิดการแทรกเข้ามาหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะจดจำหรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่
3. จำนวนของดีเอ็นเอที่มีความซ้ำซ้อนต่อเนื่องแตกต่างกัน ตรงบริเวณระหว่างตำแหน่งที่ enzyme ตัดจำเพาะจดจำ หรือตำแหน่งที่ PCR primer มาเข้าคู่
4. การเรียงลำดับเบสบนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ 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) เป็นต้น (Weising และคณะ, 1995) โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายต่างๆ มีหลักการดังต่อไปนี้

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 ใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยนำมาใช้เป็น probe และ primer ใน hybridization fingerprinting และ RCR fingerprinting ตามลำดับ (Weising และคณะ, 1995)

2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม ได้แก่ Williams และคณะ (1990) และ Welsh และ McClelland (1990) โดยใช้ random primer (arbitrary primer) เพียงชนิดเดียวเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย primer ที่ใช้มีขนาดสั้นกว่าปกติ คือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ในกรณีที่จีโนมมีการเรียงตัวของเบส ซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ primer หลายบริเวณ ที่อยู่ไกลกันมากๆ หรือมีทิศทางเดียวกัน แม้จะมี primer เข้าไปจับ ก็จะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้า primer เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กันและมีทิศทางเข้าหากัน จะทำให้เกิดผลผลิตของ PCR เมื่อนำผลผลิตของ PCR ดังกล่าวมาแยกโดย electrophoresis ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Weising และคณะ, 1995)

3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP เป็นวิธีการศึกษาโดยทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสแบบจำเพาะโดยจะตัดในตำแหน่งจดจำ (recognition site) เท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอในบริเวณตัดจำเพาะถูกตัดออก จะทำให้ได้ชิ้นของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน และหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสในบริเวณจุดตัดจำเพาะเกิดขึ้น ไม่ว่าจะด้วยสาเหตุใดจะมีผลทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดและรูปแบบเปลี่ยนไป (Weising และคณะ, 1995)

4. DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion, transition, silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide base โดยที่ผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดสามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ หรือจาก nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Database of Japan) (Takamatsu,1998)

5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดของ genome ไม่ใหญ่และซับซ้อนมากนัก จนถึงสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความซับซ้อนของ genome สูง เช่น สัตว์ พืช คน โดยไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับ nucleotide มาก่อน (สุรศักดิ์, 2540) AFLP เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos ในปี 1993 เป็นการผสมผสานระหว่างเทคนิค RFLP และ RAPD ซึ่ง polymorphism ที่ได้จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับการเรียงตัวของเบสบริเวณที่ถูกตัดโดย enzyme ตัดจำเพาะ และ additional base เหมือนกับ RFLP และทำการตรวจสอบผลที่ได้ด้วย PCR เช่นเดียวกับ RAPD ความยาวและความ

จำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ตลอดจน condition ที่เหมาะสมของ PCR ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ โดยขั้นตอนในการทำ AFLP มี 3 ขั้นคือ (Vos และคณะ, 1995)

1. ทำการตัด genomic DNA ด้วย restiction enzyme และต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วย adapter
2. เลือก amplified ดีเอ็นเอบางชิ้นอย่างจำเพาะเจาะจงโดยใช้ primer ที่มี selection nucleotide เป็นตัวคัดเลือก
3. นำไปทำ electrophoresis วิเคราะห์ polymorphic band ที่เกิดขึ้น

Enzyme: การตัด genomic DNA ในเทคนิค AFLP นิยมใช้ restriction endonuclease 2 ชนิดในการตัดคือ ชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง (frequent cutter) และชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง (rare cutter) เนื่องจากการตัดด้วย enzyme สองชนิดจะให้ชิ้นดีเอ็นเอมากกว่าชนิดเดียว การใช้ enzyme ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 เนื่องจากการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง จะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีจำนวนมาก และมีขนาดเล็กเหมาะที่จะนำไปแยกบน polyacrylamide gel electrophoresis แต่ในกรณีที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอมากเกินไปอาจจะก่อให้เกิดความสับสนในการพิจารณาข้อมูล และอาจจะทำให้เกิด smear band ขึ้น จึงต้องใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่งเพื่อช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอให้ง่ายต่อการพิจารณาข้อมูล (Vos และคณะ, 1995)

Adapter: adapter ที่นำมาต่อกับชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดด้วย enzyme เป็น specific single-strand oligonucleotide adapter ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง เป็นเบสคู่สมกับการเรียงตัวของเบสในตำแหน่ง restriction site ของ enzyme ที่ใช้ตัด adapter จะถูกนำมาต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นตำแหน่งให้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงเข้ามาจับ การ design เบสที่จะนำมาใช้เป็น adapter จะมีความสัมพันธ์กับ condition reaction ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (Vos และคณะ, 1995)

Primer: การเลือก amplified เฉพาะบาง fragment ในเทคนิค AFLP ทำได้โดยใช้ primer ที่มี selection nucleotide เป็นตัวคัดเลือก Vos และคณะ (1995) ได้อธิบายส่วนประกอบของ AFLP-primer โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ (แสดงในภาพที่ 1)

	CORE	ENZ	EXT
***Eco*RI**	5-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3
***Mse*I**	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของ AFLP-primer

1. Core sequence (CORE) : เป็นส่วนที่อยู่ทางด้าน 5'-end ของ primer เป็นตำแหน่งที่มีเบสคู่สมกับ adapter ทำให้ primer สามารถเข้าไปจับและทีวจำนวนอย่างจำเพาะเจาะจง
2. Enzyme specific sequence (ENZ) : เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางของ primer เป็นตำแหน่งที่มีเบสคู่สมกับตำแหน่งตัดของ enzyme ที่ใช้ตัด genomic DNA
3. Selective extension (EXT) : เป็นส่วนที่อยู่ทางด้าน 3'-end ของ primer เป็นตำแหน่งที่มีการเพิ่ม selection nucleotide เพื่อเลือก amplified เฉพาะดีเอ็นเอบางชิ้น การเลือกเพิ่ม nucleotide นิยมเพิ่ม 1-3 เบส ขึ้นอยู่กับขนาดของ genome ของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยการเติม nucleotide หนึ่งตัวจะสามารถลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ 4 เท่าตัว ในกรณีที่ตัวอย่างมี genome ขนาดเล็กมาก การเติม nuclotide เพียงหนึ่งตัวในแต่ละ primer ก็เพียงพอที่จะแสดงความแตกต่างได้ แต่ในกรณีที่ตัวอย่างมี genome ขนาดใหญ่อาจต้องเพิ่ม nucleotide ถึง 3 เบส ในแต่ละ primer

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา , สัตว์ (Arthopode และ Vertebrates) และ พืช มากขึ้นเป็นลำดับ (Mueller และ Wolfenbarger, 1999) เนื่องจาก

1. AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรสูง ได้ทั้งภายใน และระหว่างสปีชีส์ (inter- and intraspecific) (Majer และคณะ 1996) ดังแสดงการเปรียบเทียบความเหมาะสมในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระดับต่างๆ ในตารางที่ 1

2. AFLP เป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือ มีความผิดพลาดน้อย เมื่อทำการทดลองซ้ำจะพบว่ามีความคลาดเคลื่อนเนื่องจาก mispriming และ scoring error น้อยกว่า 2% Jones และคณะ ในปี 1997 (อ้างโดย Muller และ Wolfenbarger, 1999) ทำการทดลองซ้ำใน 8 ห้องปฏิบัติการในประเทศแถบยุโรป พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 172 แถบ ดังนั้น AFLP marker จึงเป็นเทคนิคที่มีความผิดพลาดเนื่องจากการทดลองคนละสถานที่ (Between -laboratory error) น้อยกว่า 0.6%

3. AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างในปริมาณน้อยมาก จากการทดลองของ Rosendahl และ Taylor (1997) พบว่าสามารถใช้ดีเอ็นเอจากหนึ่ง spore ของ mycorrhizal (มีดีเอ็นเอประมาณ 0.1-0.5 ng) นำมาทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLPได้ (อ้างโดย Mueller และWolfenbarger, 1999)

4. AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการทำน้อย เนื่องจากให้ polymorphic band มากในแต่ละการทดลอง

Mueller และ Wolfenbarger (1999) แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค AFLP เปรียบเทียบกับเทคนิคทางอณูวิทยาอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเหมาะสมของเทคนิคทางอณูวิทยาในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระดับต่างๆ

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

หมายเหตุ ++ (เหมาะสมที่สุด); + (เหมาะสม); +/- (เหมาะสมบางกรณี); - (ไม่เหมาะสม)
ที่มา Weising และคณะ (1995)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพด้านต่างๆ ของเทคนิค AFLP, RAPD, SSR, RFLP และ Allozymes

Criterion	AFLP	RAPD	SSR	RFLP	Allozymes
Quantity of information	High	High	High	Low	Low
Replicability	High	Variable	High	High	High
Resolution of genetic differences	High	Moderate	High	High	Moderate
Ease of use and development	Moderate	Easy	Difficult	Difficult	Easy
Development time	Short	Short	Long	Long	Short

ที่มา Mueller และ Wolfenbarger (1999)

จากประสิทธิภาพของเทคนิคดีเอ็นเอเครื่องหมายดังที่ได้กล่าวมา จึงทำให้มีผู้นำมาใช้ในงานด้านอนุกรมวิธาน และจัดจำแนกเชื้อราอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะกับเชื้อราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อย่างชัดเจน เช่น เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* นอกจากนั้นยังนำมาใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมโรค เช่น การวางแผนในการป้องกันกำจัด และการคัดเลือกพันธ์ต้านทาน เป็นต้น (McDonald, 1997)

สำหรับรายงานการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค RAPD เช่น Johnson และคณะ (1997) ทำการศึกษา *Colletotrichum* sp. สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในต้น yellow water-lily (*Nuphar lutem* subsp. *polysepalum*) ในอเมริกา เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. nymphaeae* ที่แยกได้จาก *Nymphaea alba* และ *Nuphar luerum* ในประเทศแถบยุโรปโดยใช้เทคนิค RAPD เมื่อนำ

ข้อมูลที่ได้ ไปวิเคราะห์ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อที่เคยจัดจำแนกทั้งหมด จึงตั้งให้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *C. nupharicola* นอกจากนี้ Sicard และคณะ (1997) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. lindemuthianum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสใน *Phaseolus vulgaris* พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิดคือ Andean centre และ Mesoamerica centre โดยทั้งสองกลุ่มจะมีความสามารถในการเข้าทำลายแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกัน

รายงานการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค RFLP เช่น Sreenivasaprasad และคณะ (1993) ศึกษา ribosomal DNA (rDNA) และ mitocondria DNA (mtDNA) ของเชื้อรา *C. kahawae* สาเหตุของโรค Coffee barry diseaes ในแอฟริกา และเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากกาแฟ อโวคาโด และมะม่วง ในหลายประเทศ โดยใช้เทคนิค RFLP พบว่าเชื้อรา *C. kahawae* จากกาแฟในแอฟริกา แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกับจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากกาแฟที่แยกได้ในประเทศอื่น แต่กลับแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. gloeosporioides* จากอโวคาโดในประเทศนิวซีแลนด์ คาดว่า *C. kahawae* จากกาแฟในแอฟริกา อาจจะเกิดจากเชื้อราซึ่งเดิมเข้าทำลายพืชอาศัยชนิดอื่น และต่อมามีการปรับตัวจนกระทั่งเข้าทำลายกาแฟได้ในที่สุด ในขณะที่ Hondson และคณะ (1993) ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จาก อโวคาโด กล้วย มะละกอ และ มะม่วง ที่แยกได้ในแหล่งต่างๆ ทั่วโลก จากการนำส่วน rDNA และ mtDNA มาทำ RFLP พบว่าเชื้อราจากพืชต่างชนิดกันจะมี rDNA และ mtDNA ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้ต่างกัน และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากขึ้นในเชื้อราที่เกิดมาจากพืชเดียวกันและแหล่งเดียวกัน ยกเว้นเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอของ rDNA banding pattern เหมือนกัน และมี mtDNA banding pattern ที่คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกัน (genetically uniform) ทำให้คาดว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงทั้งหมดน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน (single source) ซึ่งต่อมาได้แพร่กระจายไปทั่วโลก

รายงานการศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* โดยใช้เทคนิค DNA sequence analysis ในการทดลองเช่น Sreenivasaprad และคณะ (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 การเข้าทำลายพืชอาศัยต่างกัน เมื่อพิจารณาจากลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้คาดว่าลักษณะความแตกต่างที่พบ

ในเชื้อราทั้งสองสปีชีส์อาจเป็นเพียงลักษณะความผันแปรภายในสปีชีส์เท่านั้น จึงทำการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ในตำแหน่งที่ 1 พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* มีการเรียงตัวต่างกันเพียง 3-7 เบส และเมื่อนำเชื้อราทั้งสองสปีชีส์ไปเปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. acutatum* พบว่ามีการเรียงตัวของเบสต่างออกไป 36-37 เบส เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ทำให้สรุปว่าเชื้อรา *C. fragariae* น่าจะถูกจัดให้เป็นเพียง subspecies หนึ่งในสปีชีส์ *C. gloeosporioides* เท่านั้น ในขณะที่ Brown และคณะ (1996) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เชื้อสาเหตุโรค แอนแทรกโนสจากส้ม ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันสามารถแยกได้ 3 กลุ่มคือ Fast-growing orange (FGG), Slow-growing orange (SGO) และ Key lime anthracnose (KLA) โดยใช้การเรียงตัวของเบสในตำแหน่ง ITS1 เปรียบเทียบกับเชื้อราอื่นๆ ในสกุล Colletotrichum พบว่า FGO ถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* SGO และ KLA ถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *C. acutatum* แตกต่างจากเดิมซึ่งได้จัดจำแนกเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มเป็น *C. gloeosporioides* ทั้งหมด

จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่าได้มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอเครื่องหมายมาใช้การศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* มากมาย แต่เทคนิคดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น เทคนิค RAPD ให้ผลไม่แน่นอน เทคนิค RFLP มีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ให้ polymorphic band น้อย เทคนิค DNA sequence ถึงแม้จะเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง แต่ในการทดลองจำเป็นต้องทราบข้อมูลของ genome ที่จะทำการศึกษา และเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาหาโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อรามากขึ้นเป็นลำดับ (Vos และคณะ, 1995) เนื่องจากมีข้อดีกว่า RFLP คือมีขั้นตอนการทำงานน้อย ไม่ยุ่งยาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำ และมีข้อดีกว่า RAPD เนื่องจากสามารถตรวจหา polymorphism ได้หลาย loci นอกจากนี้ primerของ AFLP มีขนาดยาวกว่า primer ของ RAPD ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก AFLP จึงให้ผลดีกว่า และสามารถทำซ้ำได้ผลเช่นเดิม (วิชัย, 2541)

จากข้อดีของเทคนิค AFLP ดังกล่าว จึงทำให้มีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในงานด้านโรคพืชมากขึ้นเช่น ในรายงานของ Folkestsma และคณะ 1996 ซึ่งใช้เทคนิค AFLP ตรวจสอบลักษณะประชากรของ potato cyst nematode พบว่าสามารถจำแนกได้ 987 marker loci โดยใช้ primer 12 คู่ Qi และคณะ (1999) ใช้เทคนิค AFLP ศึกษาแผนที่ gene ของข้าวบาร์เลย์สายพันธุ์ RIL ซึ่งมี gene QTL ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Puccinia horidei* isolates 1.2.1 พบว่า gene QTL3 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นกล้า และ gene QTL 5 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นโต จึงนำความรู้ที่ได้มาสร้างพืชต้านทานต่อโรค O' Neil และคณะ (1997) ใช้เทคนิค AFLP จำแนก

สปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในอัลฟัลฟ่า เนื่องจากไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เพราะมีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* พบว่า Arl-Nw และ 57RR คือ *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* ตามลำดับ และในปีเดียวกัน Gonza'lez และคณะ (1997) จำแนก *C. lindemuthianum* ในประเทศแมกซิโก โดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP เปรียบเทียบกัน พบว่า เทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพมากกว่า โดยเกิด polymorphic มากกว่า และสามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ดีกว่า เมื่อนำผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปหาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ พบว่าเชื้อที่เก็บมาจากพื้นที่เดียว และพืชอาศัยพันธุ์เดียวกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าที่เก็บมาจากต่างพื้นที่หรือจากต่างพันธุ์ สำหรับในประเทศไทย จินตนา (2543) ใช้เทคนิค AFLP ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.