บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

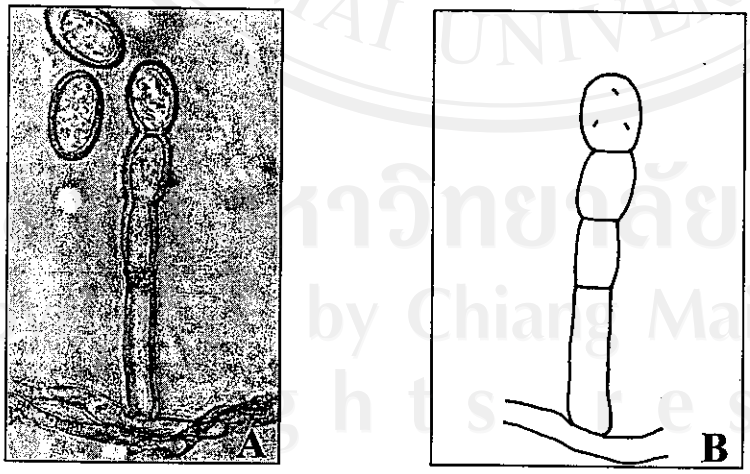
เชื้อราแป้งเป็น obligate parasite ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในการศึกษาถึงประวัติวิวัฒนาการของเชื้อราแป้ง เส้นใยเป็นแบบ ectoparasitic คือ เส้นใยเจริญอยู่เหนือผิวพืชสร้าง specialized hyphae ที่เรียกว่า haustoria (feeding organ) แทงเข้าสู่ภายใน epidermal cell ของพืชเพื่อดูดกินอาหาร แต่มีเพียง 3 speices เท่านั้นที่มีเส้นใยแบบ endoparasitic คือ เมื่อ conidia งอกจะสร้าง germ tube แทงเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ผ่านทาง stomata และสร้าง haustoria ใน parenchyma cell ของพืช เชื้อราแป้งสามารถเข้าทำลายพืช และเจริญเติบโตได้ดี ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีความชื้นต่ำเท่านั้น (Takamatsu, 2004) สำหรับการสืบพันธุ์ของเชื้อราแป้งนั้นมี 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจัดอยู่ใน class Deuteromycetes, order Moniliales, family Moniliaceae ประกอบด้วย 4 genus คือ *Ovulariopsis*, *Streptopodium*, *Oidiopsis* และ *Oidium* (Cook *et al.*, 1997) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ใน class Ascomycetes, order Erysiphales, family Erysiphaceae ประกอบด้วย 13 genus คือ *Blumeria*, *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sawadaea*, *Typhulochaeta*, *Brasiliomyces*, *Erysiphe*, *Golovinomyces*, *Arthrocladialla*, *Neoerysiphae*, *Phyllactinia*, *Leveillula* และ *Pleochaeta* (Braun and Takamatsu, 2000)

การจัดจำแนกเชื้อราแป้งเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1851 โดย Lèveillè (อ้างโดย Braun, 1987) ได้จำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เช่น ศึกษาจำนวน ascus ต่อ ascocarp และ โครงสร้างของ appendage แต่งานของเขาไม่ให้ความสำคัญต่อลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ Fresenius (1852 อ้างโดย Braun, 1987) เป็นบุคคลแรกที่ได้ศึกษาถึงลักษณะของ conidiophore ของเชื้อราแป้ง เขาได้วาดรูปลักษณะต่างๆของ conidiophore และระบุว่าเชื้อราแป้งสามารถจัดจำแนกได้ตามลักษณะของ conidiophore เนื่องจากในแต่ละ species มีลักษณะไม่เหมือนกันในทุก taxa ที่ทำการศึกษา ต่อมาในปี ค.ศ. 1861 สองพี่น้องตระกูล Tulasne (อ้างโดย Braun, 1987) เป็นบุคคลแรกที่ได้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง conidial state กับ cleistothecial state ของเชื้อราแป้ง อย่างไรก็ตาม De Bary (1863, 1870 อ้างโดย Braun, 1987) นับเป็นผู้ที่ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของเชื้อราแป้งทั้ง 2 ระยะอย่างจริงจัง รวมถึงศึกษาลักษณะของ haustorium และความสัมพันธ์กับลักษณะของ appressorium โดยชี้ให้เห็นถึงการจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งตามลักษณะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ conidia และ appressorium ในปี 1887 Zopf (อ้างโดย Braun, 1987) พบ fibrosin body ใน conidia ของเชื้อราแป้ง ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกอนุภาคที่สะท้อนแสงได้ มีขนาด 2.00-8.00 µm. และ Neger (1902 อ้างโดย Braun, 1987) ศึกษาการงอกของ conidia ของเชื้อราแป้งหลาย species เขาได้อธิบายรายละเอียดพร้อมวาดรูปประกอบ ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Braun และ Takamatsu รวบรวมผลงานการศึกษาเชื้อราแป้งในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยอาศัยผลการศึกษาของ Cook *et al.* (1997) ที่ศึกษาลักษณะของเชื้อราแป้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด Scanning Electron Microscopy (SEM) เพื่อตรวจดูลักษณะผิวของ conidia ของเชื้อราแป้ง ร่วมกับผลการศึกษาของ Takamatsu *et al.* (1999) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุล (rDNA sequence analysis) ทำให้ทราบว่าลักษณะต่างๆของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิดในระดับ genus และลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นได้ถูกลดระดับลงมาใช้ในการจัดจำแนกระดับ species แทน (ชัยวัฒน์, 2546) จึงได้เสนอแนะการจำแนกแบบใหม่ โดยใช้ข้อมูลของลักษณะการสืบพันธุ์ทั้ง 2 แบบ ร่วมกับข้อมูลทางพันธุกรรม จึงสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราแป้งออกเป็น 13 genera ตามที่กล่าวข้างต้น

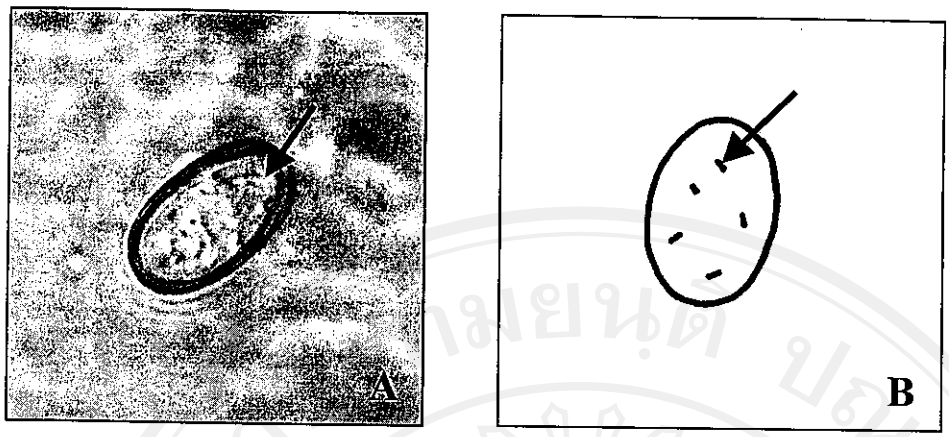
สำหรับเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Fibrodoidium* มีลักษณะสำคัญ คือ สร้าง conidia ต่อกันเป็นสายโซ่ (chain-type) (ภาพที่ 1) ภายใน conidia มี fibrosin body (ภาพที่ 2) เส้นใยสร้าง appressorium ที่มีรูปร่างไม่แตกต่างจากเส้นใยปกติ (indistinct) หรือ nipple-shaped (ภาพที่ 3) เมื่อ conidia งอกสร้าง germ tube แบบ fuliginea-type หรือ pannosa-type (ภาพที่ 4) ส่วนในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ใน genus *Podosphaera* ลักษณะสำคัญ คือ มี 2-8 ascospore ใน 1 ascus และสร้างเพียง 1 ascus ต่อ 1 ascoma และมี appendage แบบ dichotomously branch หรือ myceliod (ภาพที่ 5) (ชัยวัฒน์, 2546)



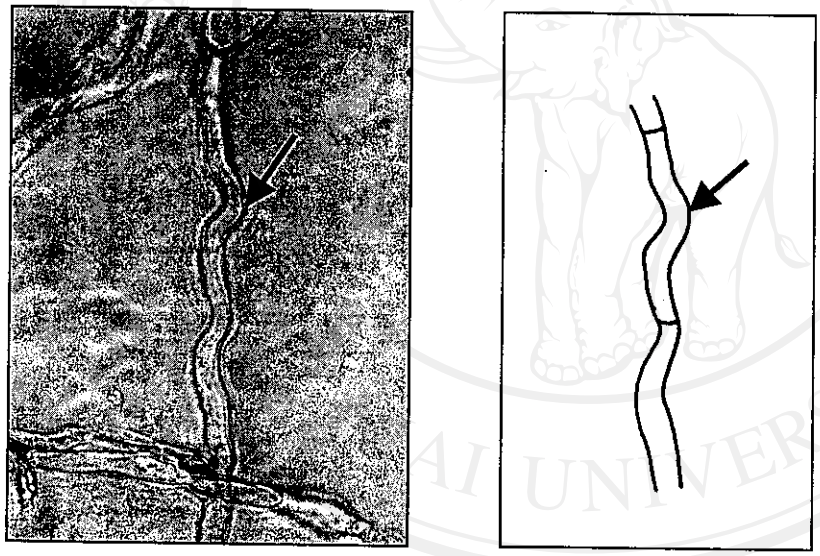
ภาพที่ 1 การสร้าง conidia ของเชื้อราแป้ง subgenus *Fibroidium* แบบ chain-type

(A: รูปภาพ, B: ภาพวาด)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



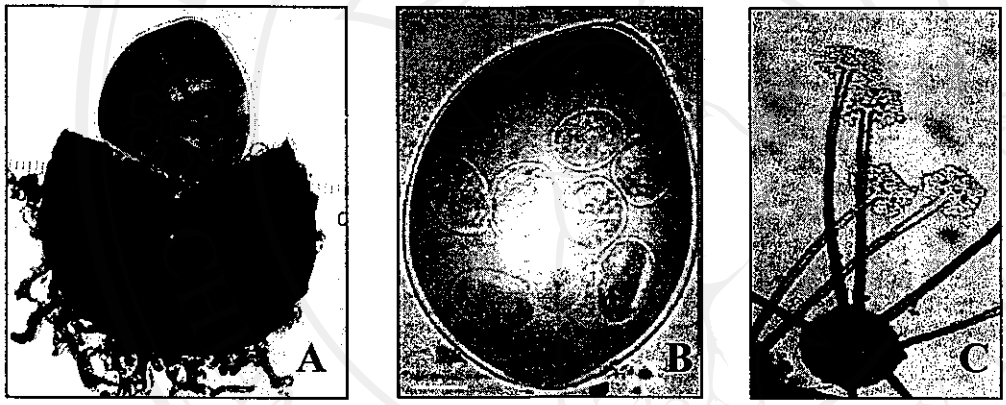
ภาพที่ 2 fibrosin body ที่พบใน conidia ของเชื้อราแป้ง subgenus *Fibroidium*
(A: รูปภาพ, B: ภาพวาด)



ภาพที่ 3 ลักษณะ appressorium ของเชื้อราแป้ง subgenus *Fibroidium*
(A: รูปภาพ, B: ภาพวาด)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 ลักษณะ germ tube ของเชื้อราแป้ง subgenus *Fibroidium*
(A: รูปภาพ, B: ภาพวาด)

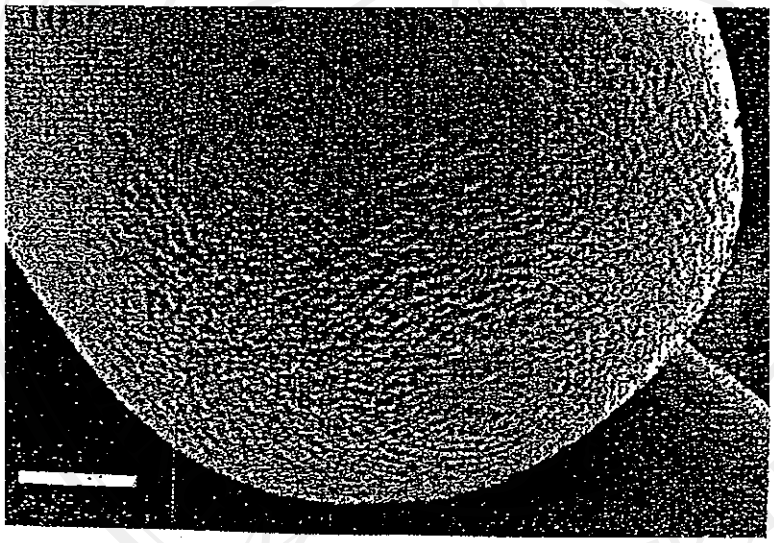


ภาพที่ 5 ลักษณะที่สำคัญของเชื้อราแป้ง genus *Podosphaera* (A: ascoma, B: ascus, C: appendage)

ซึ่งในการศึกษาเชื้อราใน subgenus นี้เริ่มในปี 1823 เมื่อ Kunze (อ้างโดย Braun, 1987) เป็นผู้ตั้งชื่อเชื้อราแป้ง genus *Podosphaera* และจากการจัดจำแนกเชื้อราแป้งตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดย Braun (1987, 1995) ทำให้เชื้อราแป้ง genus *Podosphaera* นี้จัดอยู่ใน tribe Cystotheceae ร่วมกับ genus *Cystotheca* และ *Sphaerotheca* ต่อมาในปี 1997 Cook *et al.* ได้จำแนกชนิดของเชื้อราแป้งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope และ Scanning Electron Microscope (SEM) ตรวจสอบลักษณะต่างๆของเชื้อราแป้ง พบว่าเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope เชื้อราแป้ง genus *Podosphaera* และ *Sphaerotheca* มีลักษณะหลายประการที่คล้ายกัน คือ สร้าง

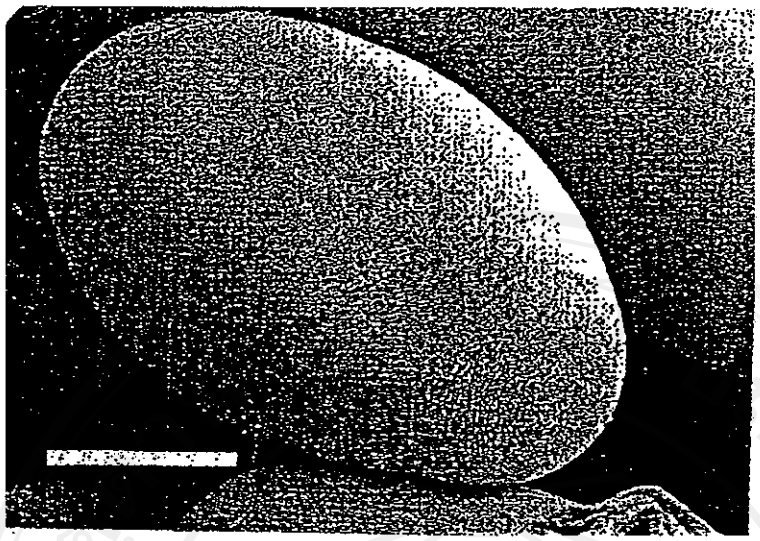
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

conidia ต่อกันเป็นสายโซ่ (chain-type) conidia ไม่มีลักษณะเฉพาะ เส้นใยเป็นแบบ ectophytic appressorium มีรูปร่างไม่แตกต่างจากเส้นใย และเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM ตรวจสอบ พบข้อมูลเพิ่มเติม คือ ผนังด้านใดด้านหนึ่งของ conidia มีลักษณะเป็นวงซ้อนกันคล้ายก้นหอย หรือเป็นสันนูนขึ้นมา มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 0.00-2.00 μm. (ภาพที่ 6) ส่วนผนังชั้นนอกของ conidia มีลักษณะเรียบ (ภาพที่ 7) แต่เมื่อ conidia เหี่ยวจะพบรอยย่นเล็กน้อย ลักษณะเป็นลูกคลื่น รูปตาข่าย หรือเป็นปุ่มนูนขึ้นมา (ภาพที่ 8) ทำให้การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง section *Podosphera* และ *Sphaerotheca* แต่โดยทั่วไปพืชอาศัยของเชื้อราแป้งใน section *Podosphera* เป็นพวกไม้เนื้อแข็ง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ใน family Rosaceae ส่วนพืชอาศัยของ section *Sphaerotheca* นั้นกระจายอยู่ในหลาย family ของพืช

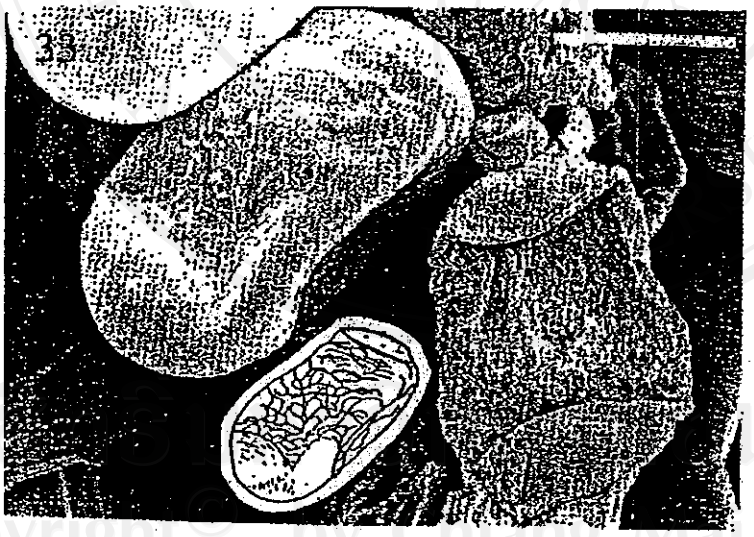


ภาพที่ 6 ผนังชั้นนอก conidia ของเชื้อราแป้ง genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* (teleomorph: genus *Podospheara* section *Sphaerotheca*) scale bar = 2 μm. (ที่มา: Cook *et al.*, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 ผนังชั้นนอก conidia ของเชื้อราแป้ง genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* (teleomorph: genus *Podospheara* section *Podospeara*) scale bar = 10 μm. (ที่มา: Cook *et al.*, 1997)



ภาพที่ 8 ผนังชั้นนอก conidia ที่เหี่ยวของเชื้อราแป้ง genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* scale bar = 22 μm. (ที่มา: Cook *et al.*, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจศึกษาเชื้อราแป้งใน subgenus นี้อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เช่น Amano (1992) ศึกษาเชื้อราแป้ง genus *Podosphaera* ซึ่งประกอบด้วย 13 species และมีพืชอาศัย 243 species ใน 12 family เชื้อราแป้งใน genus นี้มี 209 species ที่เข้าทำลายเฉพาะพืชใน family Rosaceae และอีก 34 species เข้าทำลายพืช 11 family ที่เหลือ เชื้อรา *Podosphaera* ส่วนมากพบในเขตซีกโลกเหนือ มีเพียง 26 species ที่พบในเขตร้อนและซีกโลกใต้ และเมื่อแบ่งซีกโลกเหนือออกเป็น 5 ส่วน พบว่าในเอเชียตะวันออกมีความหลากหลายของเชื้อราแป้ง และพืชอาศัยของเชื้อราแป้งนี้มากมาย และในพืชอาศัย 12 family มีเพียงพืชใน family Rosaceae ที่เป็นพืชอาศัยของทั้งเชื้อรา section *Podosphaera* และ section *Sphaerotheca* โดยใน section *Podosphaera* พบว่าพืช family Rosaceae เป็นพืชอาศัยที่คิดเป็น 86 % ของพืชอาศัยทั้งหมด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราแป้งใน section *Podosphaera* กับพืช family Rosaceae น่าจะมีความสัมพันธ์ หรือวิวัฒนาการร่วมกันมากกว่าพืชอาศัยชนิดอื่น

Adaskaveg *et al.* (2000) ศึกษาเชื้อราแป้งที่เข้าทำลายต้นท้อในรัฐแคลิฟอเนีย โดยปกติเชื้อราสาเหตุของโรคราแป้งในท้อ คือ *Podosphaera* (*Sphaerotheca*) *pannosa* โดยส่วนใหญ่เชื้อราแป้งจะเข้าทำลายเฉพาะใบ แต่ในปี ค.ศ. 2000 พบว่าเชื้อรา *Podosphaera* sp. และ *P. leucotricha* เข้าทำลายที่ใบ กิ่งอ่อน และผลท้อ ทำให้ใบที่เป็นโรคเกิดบาดแผล ใบม้วนขึ้น และร่วงหล่น ในผลเมื่อถูก *P. pannosa* เข้าทำลายจะมีรูปร่างผิดปกติ และมีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุม แต่ถ้าถูก *P. leucotricha* ทำลาย ผลจะมีสีน้ำตาล จึงรู้จักกันในชื่อ Rusty spot ซึ่งทำให้ผลผลิตไม่ได้คุณภาพและเสียหายเป็นอย่างมากมาย

Mahaffee และคณะ (2003) ศึกษาโรคราแป้งของพืชฮ็อพ (*Humulus lupulus* L.) เกิดจากเชื้อรา *Podosphaera macularis* ซึ่งโรคนี้เป็นปัญหาที่ยาวนานในการผลิตฮ็อพ (Hop) ของแถบยุโรป และประเทศที่ผลิตฮ็อพ ในปี ค.ศ. 1997 เชื้อราแป้งระบาดอยู่ในอเมริกาเหนือ และยุโรป ทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากดอก และผลเจริญไม่สมบูรณ์ คุณภาพของผลไม่ดี และมีการใช้สารเคมีในการป้องกันเพิ่มมากขึ้นใน Pacific Northwest ทำให้ในปี ค.ศ. 1999 และ 2000 ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นประมาณ 30 ล้านเหรียญสหรัฐ

Garibaldi (2004) ศึกษาเชื้อราแป้งที่ทำลายพืช *Spiraea japonica* ในอิตาลี ในฤดูร้อนปี ค.ศ. 2003 พบว่ามีการระบาดของเชื้อราแป้งมาก ซึ่งใบที่ถูกทำลายจะถูกปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีแดง และหยุดการเจริญเติบโต และพบเชื้อราแป้งบนลำต้นด้วย ซึ่งเชื้อรามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ conidia ใสไม่มีสี รูปไข่ ทรงกระบอก หรือ doliform ขนาด 21.00-38.40 x 10.80-14.40 µm. ภายในมี fibrosin body การสร้าง conidia เป็นแบบสายโซ่ (chain-type)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ อีกทั้งปลูกเชื้อกลับ (reinoculation) ลงบนใบของ *S. japonica* พบว่ามีการพัฒนาของโรคราแป้ง

Wolcan (2004) รายงานว่าพบเชื้อรา *Podosphaera balsaminae* เป็นครั้งแรกในประเทศอาร์เจนตินา และสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้งในพืช *Impatiens balsamina* และ *Impatiens* x *hawkeri* ลักษณะของเชื้อราสาเหตุ คือ บริเวณเส้นใยสร้าง appressorium แบบ indistinct, conidia มีผนังบาง เรียบ ใสไม่มีสี รูปร่างแบบกลม ทรงไข่ หรือหัวท้ายตัด สร้าง conidia แบบ chain-type ภายในมี fibrosin body conidia ของเชื้อราแป้งที่พบบน *I. balsamina* มีขนาด 27.00-45.00 x 15.00-21.00 µm. (ค่าเฉลี่ย 33.75 x 17.75 µm.) อัตราระหว่างความกว้างต่อความยาวเท่ากับ 1.87:1.00 foot cell มีขนาด 35.50-97.50 x 11.00-15.00 µm. (ค่าเฉลี่ย 60.50 x 11.60 µm.) ส่วน conidia ที่พบใน *Impatiens* x *hawkeri* มีขนาด 26.00-34.00 x 15.00-19.00 µm. (ค่าเฉลี่ย 29.25 x 16.64 µm.) อัตราส่วนความกว้างต่อความยาว เท่ากับ 1.79:1.00 foot cell มีขนาด 41.00-82.00 x 11.00-15.00 µm. (ค่าเฉลี่ย 57.39 x 12.02 µm.) และยังไม่พบระยะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในยุโรปบางประเทศ และแถบเอเชีย เคยรายงานว่าเป็นเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea*, *Sph. balsaminae* (Walr.) Kari และ *Sph. balsaminae* Kari ex U. Braun แต่จากการใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกร่วมกับข้อมูลทางอณูวิทยาได้สนับสนุนว่าเชื้อราแป้งที่พบบนพืชทั้ง 2 ชนิด คือ *P. balsaminae*

Reuveni *et al.* (2005) พบว่า *Podosphaera* (*Sphaerotheca*) *pannosa* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคราแป้งของพืช nectarine ในภาคเหนือของอิสราเอล แต่โรคราแป้งไม่เคยเกิดขึ้นในพลัม (*Prunus salicina* Lindl.) ของบริเวณนี้ และเป็นรายงานครั้งแรกที่พบเชื้อราแป้งบนต้นพลัมในภาคเหนือของอิสราเอล อาการเริ่มแรกที่สังเกตได้ เมื่อวันที่ 22 เมษายน ค.ศ. 2000 คือ พบ colony เดี่ยวๆบนผลอ่อนของพลัม และต่อมาได้ขยายใหญ่ไปทั่วทั้งผล ในผลแก่จะทำให้ผิวของพลัมมีสีน้ำตาล และน้ำตาลอมเหลือง ส่วนโรคบนใบไม่รุนแรง โดยด้านบนใบจะเกิดแผลสีเหลืองอ่อน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 5.00-10.00 mm. ด้านใต้ใบเกิด oil spot การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีสีขาว และบาง ขนาด 4.00-6.00 µm. และ conidia มีขนาด 20.00-30.00 x 10.00-20.00 µm. การสร้าง conidia เป็นแบบ chain-type ซึ่งคล้าย *P. pannosa* ที่ทำลายพืช nectarine และยังไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในฤดูการปลูกนี้ อีกทั้งพบว่าเชื้อราแป้งเข้าทำลายที่ผลมากกว่าใบ

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อราแป้งที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยหลายชนิด เช่น กุหลาบ สตอเบอรี่ งา และพืชตระกูลแตง เป็นต้น ล้วนเป็นเชื้อราแป้งที่อยู่ใน genus *Oidium* subgenus *Fibroidum* ทั้งสิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship)

เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship/history) ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นเพียงการประเมินโดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น isozyme, restriction site หรือ DNA sequence และยังได้นำเทคนิคทางอณูวิทยามาช่วยทำให้มีความสะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำยิ่งขึ้น โดยอาศัยโปรตีนและกรดนิวคลิอิคเป็นเครื่องมือในการศึกษา แต่การนำเอนเซม์ และโปรตีนมาศึกษานั้น มีข้อจำกัด คือ เอนไซม์ และโปรตีน เป็นผลจากกิจกรรมการแสดงออกของยีน ซึ่งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ผลที่ได้อาจมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดได้ จึงนิยมศึกษาหรือตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ระดับของ DNA โดยตรง (Takamatsu, 1998)

DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือ การวิเคราะห์ความแตกต่างของ DNA โดยตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส และเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้ง 4 ชนิด คือ Adenine, Guanine, Cytosine และ Thymine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ DNA ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส อาจเป็นผลมาจากการเกิด transversion, transition, silent หรือ selected ของยีน และสามารถใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide bias และเทคนิค DNA sequence analysis เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาหนึ่งที่ใช้ในตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนอกเหนือจากเทคนิค DNA/DNA hybridization, การวิเคราะห์ isozyme, electrophoreotic karyotyping และ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น (Takamatsu *et al.*, 1998)

การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequence analysis) มีหลายวิธีการด้วยกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการหาลำดับเบส ตัวอย่างเช่น DNA ต้นแบบ (template) ที่ใช้ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) การทำให้ DNA บริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส เป็นต้น และการใช้ PCR product ที่ผ่านการ clone เข้าสู่ vector ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยทั้ง 2 วิธีมีข้อดี และข้อเสียแตกต่างกัน กล่าวคือ วิธีการใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบสมีข้อดีกว่าวิธีการ clone เข้าสู่ vector คือ ลำดับเบสที่ได้จะไม่เกิดความเสียหายเนื่องจากขบวนการทางเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต และ DNA ต้นแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถเลือกใช้เฉพาะส่วนที่มีลำดับเบสที่ต้องการเท่านั้น ในขณะที่ขั้นตอนการ clone ต้องใช้ DNA ที่มีลำดับเบสมากกว่าส่วนที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

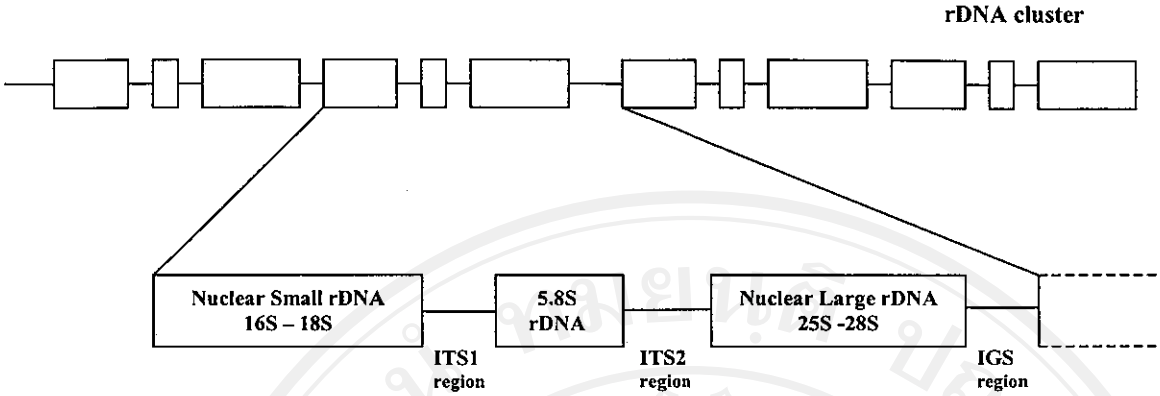
ต้องการ อย่างไรก็ตามวิธีการ clone มีความจำเป็นในการหา individual allele หรือส่วนที่แตกต่างกันของยีน ในกลุ่มที่มีตำแหน่งการเพิ่มปริมาณ DNA ตรงกัน (Gyllensten *et al.*, 1992)

สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่างๆ และผ่านทางอินเตอร์เน็ต เพราะมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของ DNA และโปรตีนที่มีรายงานการวิจัยไว้ในศูนย์เก็บข้อมูลซึ่งมีเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (nucleotide database) โดยข้อมูลลำดับเบสของ DNA ของสิ่งมีชีวิตต่างๆจะถูกเก็บรวบรวมไว้ใน 4 ศูนย์ที่สำคัญ ประกอบด้วย The DNA Databank of Japan (DDBJ), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), The GenBank และ The Genome Sequence Database (GSDB) ซึ่งทั้ง 4 ศูนย์มีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าด้วยกัน โดยผู้ที่ทำการศึกษา หรือผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ของสิ่งมีชีวิตต่างๆสามารถเข้าไปค้นหาข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบและอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งข้อมูลไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของศูนย์ได้ (Burks, 1997)

Nuclear ribosomal RNA gene (rDNA)

rDNA พบได้ใน nucleus และ mitochondria ประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable สำหรับ nuclear rRNA gene ของเชื้อรามีลักษณะเป็นหน่วยที่เรียงซ้ำๆต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งในส่วนของ subunit นี้ได้มีการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ Order และ Kingdom ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryote (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) (ภาพที่ 9) ซึ่งในส่วน spacer เหล่านี้ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ genera และ sub-species ได้ (Cook and Duncan, 1997 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 9 ไดอะแกรมแสดงหน่วยของ rDNA repeat unit (Mill *et al.*, 1992)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราแป้งจำเป็นต้องใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณของ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 เพราะเชื้อราแป้งมีคุณสมบัติเป็น obligate parasite ซึ่งไม่สามารถนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงทำให้จำนวน conidia หรือ cleistothecium ในการสกัด DNA มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำ DNA นั้นมาวิเคราะห์ได้ โดยต้องเพิ่มปริมาณ DNA เสียก่อน จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส และเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อสร้าง Phylogenetic tree

Internal transcribed spacer (ITS)

ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่ง คือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง highly conserved small subunit rRNA gene, 5.8S subunit rRNA gene และ large subunit rRNA gene พบว่ามีการนำเอาลำดับเบสในบริเวณ ITS มาทำการเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิดเนื่องจาก (Bridge และ Arora, 1998)

1. ตำแหน่งของยีนมีขนาดเล็ก (500-800 คู่เบส) และทำการเพิ่มปริมาณได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และสามารถใช้ universal primer เพียงตัวเดียวก็สามารถเพิ่มปริมาณของยีนในตำแหน่ง ITS และ conserved region ของ rRNA subunit gene ได้
2. มีอยู่หลายร้อยชุดในเซลล์ทำให้ง่ายในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยที่แม้จะมี DNA sample น้อยก็สามารถศึกษาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีความผันแปรสูงมากระหว่าง species ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ทำให้สามารถใช้ในการคาดเดาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจัดแบ่งกลุ่มรวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้
4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็ว โดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันใน species เดียวกัน และต่างกันในระหว่าง species ของเชื้อรา

การวิเคราะห์ลำดับเบสบน ribosomal DNA ในเชื้อรามีจุดประสงค์ที่สำคัญคือ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา และนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆต่อไป สำหรับเชื้อราแป้งนั้นได้มีการศึกษาดังนี้

Saenz และ Taylor (1999) ได้ศึกษาข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ของตัวอย่างเชื้อราแป้ง 45 ชนิด และ 2 outgroup species สามารถแบ่งเชื้อราแป้งได้เป็น 6 กลุ่ม โดยสอดคล้องกับข้อมูลในระยะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Erysiphe*, *Microsphaera* และ *Uncinula* (anamorph genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium*) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *E. galeopsidis*, *E. cumminsiana* (anamorph genus *Oidium* subgenus *Striatoidium*) กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Erysiphe* sp. (anamorph genus *Oidium* subgenus *Reticuloidium*) กลุ่มที่ 4 ได้แก่ *Leveillula* และ *Phyllactinia* (anamorph genus *Oidiopsis* และ *Ovulariopsis* ตามลำดับ) กลุ่มที่ 5 ได้แก่ *Sphaerotheca*, *Podosphaera* และ *Cystotheca* (anamorph genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* และ *Setoidium*) สุดท้ายกลุ่มที่ 6 ได้แก่ *Blumeria graminis* (anamorph genus *Oidium* subgenus *Oidium*)

Hirata และ Takamatsu (2001) ได้ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสหรือหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการ PCR-RFLP ตรงตำแหน่ง ITS ของ rDNA ของเชื้อราแป้ง *Podosphaera fuliginea* บนดาวกระจาย และแตงกวา มากกว่า 50 isolate และจากการศึกษาทำ cross inoculation ของเชื้อราแป้งดังกล่าวระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า isolate จากพืชทั้ง 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ monotypic และมีลำดับเบสที่ซ้ำกัน 6 nucleotide และผลจาก cross inoculation พบว่าเชื้อที่แยกได้จากดาวกระจาย ไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับแตงกวา แต่เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ เชื้อที่แยกได้จากแตงกวาสร้าง conidia บนใบของดาวกระจาย แต่ปริมาณของ conidia น้อยกว่าเชื้อราของแตงกวา ที่สร้างบนแตงกวาเองอย่างมาก แต่เมื่อทำการทดลองในแปลงปลูกนั้น เชื้อที่แยกได้จากแตงกวาไม่สามารถเข้าทำลายดาวกระจายได้ อย่างไรก็ตามเชื้อราแป้งบนดาวกระจาย และแตงกวานั้นสามารถกล่าวได้ว่ามีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และความสามารถในการทำให้โรคกับพืช ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทดลองนี้เป็นเพียงการยืนยันถึงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่าง phylogeny และ infectivity ของเชื้อราแป้งเท่านั้น

Cohen *et al.* (2004) ศึกษาการพิสูจน์ลักษณะทางกายภาพของสายพันธุ์ของเชื้อรา *Podoshaera xanthii* (Syn. *Sphaerotheca fuliginea*) ที่เป็นสาเหตุโรคราแป้งในพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) ซึ่งอยู่บนพื้นฐานของการตอบสนองที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของแตงต่อเชื้อราแป้ง เชื้อรา *P. xanthii* 8 สายพันธุ์ที่ได้มาจากประเทศสหรัฐอเมริกา แอฟริกา ยุโรป และบริเวณรอบๆทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ มาจากแตงที่ปลูกในเรือนกระจกในประเทศญี่ปุ่น โดยการที่พืชตอบสนองต่อเชื้อราแป้งอาจมีผลมาจากปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น ความเข้มของแสง อุณหภูมิ ความชื้น อายุของพืช และระดับธาตุอาหารที่พืชได้รับ เป็นต้น อีกทั้งปัจจัยเดียวกันนี้ก็ยังมีผลต่อการพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อราแป้งด้วย และเขาได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. xanthii* โดยวิธี molecular maker แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง DNA polymorphism และสายพันธุ์ของเชื้อราแป้ง เช่นเดียวกับการพิสูจน์ด้วยวิธี biological test การใช้ประโยชน์จากการพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อราแป้งถือว่าเป็นการแนะแนวทางสำหรับผู้ปลูกพืชตระกูลแตงในการคัดเลือกสายพันธุ์พืชที่เหมาะสม เพราะการเคลื่อนย้าย หรือการเปลี่ยนในประชากรของเชื้อราแป้งเป็นเรื่องปกติ เช่น อาจเป็นในระหว่างฤดูการเพาะปลูก ในระหว่างภูมิประเทศ หรือพืชอาศัย การพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อราแป้งยังเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการค้นคว้าพื้นฐานและการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชที่ต้องการความต้านทานต่อโรคราแป้ง

Cunnington *et al.* (2004) ศึกษาเชื้อราแป้งในประเทศออสเตรเลีย พบว่าเชื้อราแป้งบนพืช family Fabaceae มีเพียงระยะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อราแป้งชนิดใด จึงได้ทำการวิเคราะห์บริเวณ ITS ของ 32 ของตัวอย่างเชื้อราแป้งในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศบนพืช family Fabaceae โดยเทคนิค RFLP และตรวจการเรียงตัวของลำดับเบส จึงทำให้ทราบว่าเชื้อราแป้งในออสเตรเลียในพืช family Fabaceae แบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ *Erysiphe trifolii* และ *E. pisa* พบบนพืช *Pisam sativum* ส่วน *Oidium gardenbergiae* พบบนพืช Hardenbergia และ *Podosphaera xanthii* พบบนถั่ว Vigna และ Phaseolus ในเขตร้อนของออสเตรเลีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved