บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

โรครากเน่าของสตรอเบอรี่

โรครากเน่าของสตรอเบอรี่อาจเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน ทั้งจากการเข้าทำลายของเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอยที่ทำให้รากเป็นแผล และผลจากลักษณะทางกายภาพของดิน เช่น การระบายน้ำไม่ดี ปริมาณออกซิเจนในดินต่ำ รวมถึงสภาพอากาศที่หนาวเย็น ในส่วนของเชื้อราที่เข้าทำลายรากสตรอเบอรี่มีรายงานไว้หลายสกุลด้วยกัน ได้แก่ *Phytophthora fragariae*, *P. criticola*, *Pythium* spp., *Idriella lunata* และ *Rhizoctonia* spp. (Maas, 1998) สำหรับอาการรากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* spp. จะสังเกตได้จากระบบรากมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ ในระยะเริ่มต้นจะพบอาการแผลจุดสีน้ำตาลแดง ต่อมามีการขยายใหญ่และเปลี่ยนเป็นสีดำจึงมักเรียกอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ว่าโรครากเน่าดำ การเข้าทำลายจะจำกัดอยู่ในเนื้อเยื่อชั้น cortex ทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ เปื่อยยุ่ย และหลุดลอกได้ง่าย สำหรับรากหาอาหาร (feeder root) ที่เกิดขึ้นใหม่มักถูกเข้าทำลายบริเวณโคนรากและตายลงอย่างรวดเร็ว (Wilhelm และคณะ, 1972) วิรัชนีย์ (2544) ได้ศึกษาโรคนี้และรายงานว่า ต้นที่แสดงอาการเหี่ยวเนื่องจากการเข้าทำลายของ *Rhizoctonia* sp. จะมีระบบรากสั้นและมีสีน้ำตาลปนดำถึงสีดำ

เชื้อสาเหตุ

เชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ที่ทำให้เกิดอาการรากเน่ากับสตรอเบอรี่มีอยู่ 2 สปีชีส์ด้วยกัน คือ *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorph *Thanatephorus cucumeris*) ซึ่งรายงานโดย Van Adrichem และ Bosher ในปี 1962 (อ้างโดย Maas, 1998) และ *Rhizoctonia fragariae* (teleomorph *Ceratobasidium* sp.) ซึ่งรายงานโดย Husain และ McKeen ในปี 1963 สำหรับการศึกษาในประเทศไทย ดนัย (2520) ได้ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของสตรอเบอรี่และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า เชื้อสาเหตุหลักของโรคนี้คือ *R. fragariae* เมื่อวิธีการจำแนกราในสกุล *Rhizoctonia* ออกเป็น anastomosis group (AG) ได้รับความนิยมมากขึ้น Ogoshi และคณะ (1979) จึงได้นำวิธีการดังกล่าวมาใช้และรายงานว่าเชื้อ *R. fragariae* ที่รวบรวมไว้สามารถจำแนก

ออกได้เป็น 3 AG ด้วยกัน คือ AG-A, AG-G และ AG-I (อ้างโดย Martin, 1988) ซึ่งจากการศึกษาของ Martin (1988) และ Martin (2000) ก็พบว่า เชื้อ *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จากรากสตรอเบอรี่ส่วนใหญ่เป็น binucleate *Rhizoctonia* ที่อยู่ใน AG-A, AG-G หรือ AG-I และพบ *R. solani* ในปริมาณน้อย โดย Martin (1988) พบ 2.7 และ 3.1 เปอร์เซ็นต์ในปี 1985 และ 1986 ตามลำดับ ส่วน Martin (2000) พบเพียง 0.8 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ความถี่ในการพบเชื้อแต่ละ AG จะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่และฤดูกาล Martin (2000) รายงานว่าพบ AG-A และ AG-G ในทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง แต่พบ AG-I ใน 2 พื้นที่เท่านั้น Martin (1988) รายงานว่า ในช่วงฤดูใบไม้ผลิพบเชื้อ AG-G สูงที่สุด รองลงมาเป็น AG-A และ AG-I ตามลำดับ แต่ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงกลับพบ AG-I สูงที่สุด รองลงมาเป็น AG-G และ AG-A ผลจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า ทั้ง 3 AG สามารถทำให้เกิดโรคกับสตรอเบอรี่ได้แต่ความรุนแรงจะแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลท และอุณหภูมิขณะทำการทดลอง ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส AG-I ทำให้พืชแสดงอาการรุนแรงที่สุด ในขณะที่ LaMondia และ Martin (1989) รายงานว่าที่ 24 องศาเซลเซียส AG-G ทำให้พืชแสดงอาการรุนแรงที่สุด

นอกจากเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* ทั้ง 3 AG ที่เป็นสาเหตุของโรคแล้วยังมีรายงานว่าไส้เดือยฝอย *Pratylenchus penetrans* ซึ่งเป็นไส้เดือยฝอยที่ทำให้รากพืชเป็นแผล ยังมีส่วนส่งเสริมให้เกิดอาการรากเน่าแก่สตรอเบอรี่ด้วย LaMondia และ Martin (1989) รายงานว่า การปลูกเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* AG-A, AG-G หรือ AG-I ร่วมกับไส้เดือนฝอย *P. penetrans* จะทำให้ต้นสตรอเบอรี่มีเปอร์เซ็นต์รากเน่าสูงกว่าการปลูกเชื้อ *Rhizoctonia* เพียงอย่างเดียวและอาการจะรุนแรงขึ้นตามปริมาณไส้เดือนฝอยที่เพิ่มขึ้นด้วย

ลักษณะโดยทั่วไปของราในสกุล *Rhizoctonia*

เชื้อราในสกุล *Rhizoctonia* จัดอยู่ใน Division Eumycota Sub-Division Deuteromycotina Class Agonomycetes Order Agonomycetales (Agrios, 1997) De Candolle ค้นพบรานี้ครั้งแรกในปี 1815 (อ้างโดย Sneh และคณะ, 1991) แต่ได้อธิบายลักษณะไว้เพียงว่า เป็นราที่อาศัยอยู่กับรากพืช และสร้าง sclerotia ที่มีเส้นใยเจริญออกมา จากลักษณะดังกล่าวทำให้มีการจำแนกเชื้อที่ไม่เกี่ยวข้องเข้ามาอยู่ในสกุล *Rhizoctonia* เป็นจำนวนมาก ต่อมาจึงได้มีการปรับเปลี่ยนคำจำกัดความของราในสกุลนี้มาเรื่อย ๆ จนในปี 1975 Ogoshi (อ้างโดย Sneh และคณะ, 1991) ได้เสนอลักษณะที่จำเพาะสำหรับราในสกุล *Rhizoctonia* ไว้ดังนี้ เส้นใยมีการแตกแขนงใกล้ผนังกั้นด้านปลาย (distal septum) เกิดรอยคอด (constriction) และผนังกั้นใกล้จุดแตกแขนง ผนังกั้นเป็นแบบ dolipore และ

ไม่พบ clamp connection, conidia, rhizomorph หรือ sclerotia ใด ๆ ทั้งสิ้น เมื่ออาศัยความแตกต่างของสีเส้นใย จำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะสมบูรณ์เพศ (teleomorph) สามารถแบ่งเชื้อราในสกุล *Rhizoctonia* ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับโรคพืชออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1. กลุ่มของ *R. solani* ซึ่งมีจำนวนนิวเคลียสมากกว่า 2 (multinucleate) มีระยะสมบูรณ์เพศเป็นเชื้อ *Thanatephorus* spp. 2. กลุ่มของ *R. zeae* และ *R. oryzae* มีจำนวนนิวเคลียสมากกว่า 2 เช่นกันแต่มีระยะสมบูรณ์เพศเป็นเชื้อ *Waitea circinata* และ 3. กลุ่มของ binucleate *Rhizoctonia* มีจำนวนนิวเคลียสเท่ากับหรือน้อยกว่าสอง มีระยะสมบูรณ์เพศเป็นเชื้อ *Ceratobasidium* spp. (Vilgalys และ Cubeta, 1994)

Anastomosis Group (AG)

Anastomosis เป็นกลไกการหลอมรวมเซลล์ (fusion) ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีน (gene) และความหลากหลาย (Anderson, 1982 อ้างโดย Mccabe และคณะ, 1999) มีการนำ anastomosis มาใช้ศึกษาการแบ่งกลุ่มของราในสกุล *Rhizoctonia* เป็นครั้งแรกในปี 1937 โดย Schulz (อ้างโดย Ogoshi, 1987) และนำไปใช้ในราอื่นด้วย เช่น *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Sclerotium* spp. และ *Neurospora* spp. โดยมักเรียกว่า vegetative compatibility group (VCG) หรือ mycelial compatibility group (MCG) (Leslie, 1993) การจำแนกออกเป็น anastomosis group ทำได้โดยนำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบและเชื้อที่ทราบกลุ่มแล้ว (tester strain) มาเลี้ยงคู่กัน ห่างกันประมาณ 2-3 เซนติเมตร เมื่อเชื้อเจริญมาชนกันจึงนำไปตรวจดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาจย้อมด้วย cotton blue ใน lactophenol เพื่อให้เห็นชัดขึ้น MacNish และคณะ (1993) ได้แบ่งปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยที่เกิดขึ้นขณะทำ anastomosis group ออกเป็น 4 ลักษณะด้วยกันคือ C0 ถึง C3 โดย C0 หมายถึง เส้นใยไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน C1 หมายถึง เส้นใยเจริญมาสัมผัสกันแต่ไม่เกิดการรวมเส้นใย C2 หรือ imperfect fusion หมายถึง เส้นใยเจริญมาสัมผัสกันเกิดการรวมเส้นใย (anastomosis) และพบการตายของเซลล์ที่อยู่โดยรอบจุดรวมเส้นใย ปฏิกิริยานี้อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า somatic incompatibility และ C3 หรือ perfect fusion หมายถึง เส้นใยเจริญมาสัมผัสกันและเกิดการรวมเส้นใยโดยไม่พบการตายของเซลล์ที่อยู่โดยรอบ ปฏิกิริยานี้อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า somatic compatibility เชื้อคู่ที่มีปฏิกิริยาแบบ C0 หรือ C1 จะถือว่าเป็นเชื้อต่าง anastomosis group กัน แต่ถ้ามีปฏิกิริยาแบบ C2 หรือ C3 จะถือว่าเป็นเชื้อที่อยู่ใน anastomosis group เดียวกัน

Sneh และคณะ (1991) รายงานว่า *R. solani* แบ่งออกเป็น 11 AG ด้วยกัน (AG1-AG11) ซึ่งในบางกลุ่มยังแบ่งย่อยลงไปในระดับ intraspecific group (ISG) โดยอาศัยความถี่ในการรวมเส้นใย ความต้องการสารอาหารบางชนิด หรือความสามารถในการทำให้เกิดโรคเป็นตัวแบ่งแยก เช่นใน AG1, AG2, AG4 และ AG6 ที่มีการแบ่งออกเป็น type ต่าง ๆ ในกลุ่มของ *R. zeae* และ *R. oryzae* แบ่งออกเป็น 2 AG (WAG-Z และ WAG-O) และในกลุ่มของรา binucleate *Rhizoctonia* มีผู้ทำการศึกษาการแบ่งกลุ่มไว้ 2 ระบบด้วยกันคือ ระบบที่พัฒนาในญี่ปุ่น (Japanese group) แบ่งออกเป็น 17 AG (AG A – AG Q) และระบบที่พัฒนาในสหรัฐอเมริกา (North American group) ซึ่งแบ่งออกเป็น 7 CAG (CAG1 – CAG7) ต่อมาในปี 1983 Ogoshi และคณะ (อ้างโดย Sneh และคณะ, 1991) ได้ทำการศึกษาและพบว่า มีบางกลุ่มของ North American group สามารถรวมเส้นใยกับ Japanese group ได้ คือ CAG1 กับ AG-D, CAG2 กับ AG-A, CAG3 และ CAG6 กับ AG-E และ CAG4 กับ AG-F เหลือเพียง CAG5 และ CAG7 ที่ไม่สามารถรวมเส้นใยได้จึงตั้งเป็นกลุ่มใหม่ในระบบ Japanese group คือ AG-R และ AG-S ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 จนถึงปัจจุบัน กลไกที่ควบคุมการรวมเส้นใยของราในสกุล *Rhizoctonia* ยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก แต่จากการศึกษาของ Ogoshi (1987) พบว่า เชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันสามารถจดจำกันได้และดึงดูดซึ่งกันและกัน ซึ่งสันนิษฐานว่า ความสามารถดังกล่าวอาจเกิดจากผลของสารบางอย่างที่เชื้อขับออกมา Mccabe และคณะ (1999) ได้รายงานในทำนองเดียวกันว่า ก่อนที่เส้นใยจะมาสัมผัสกันมักพบการเปลี่ยนทิศการเจริญของเส้นใยเข้าหากัน (tropism) และในบริเวณโดยรอบยังพบการรวมเส้นใยถี่กว่าบริเวณอื่น ๆ ด้วย และได้สรุปว่า ก่อนการรวมเส้นใยเชื้อรามีการขับสารชนิดหนึ่งออกมาซึ่งเป็นแบบ localized release สารนี้มีผลในลักษณะเป็นสารดึงดูด (attractant) ให้เส้นใยรอบ ๆ เกิดการรวมเส้นใยโดยตรง หรือเป็นสารที่ไปกระตุ้นให้เส้นใยอื่น ๆ ในบริเวณใกล้เคียงสร้างสารดึงดูดขึ้นมา

ตารางที่ 1 Anastomosis group, anamorph และ teleomorph ของราในสกุล *Rhizoctonia* [1]

Anastomosis group (AG)	Anamorph	Teleomorph	Anastomosis group (AG)	Anamorph	Teleomorph
AG1-IA	*Sclerotium irregulare*	*Thanatephorus cucumeris*	AG-A (CAG2)	*R. candida* ; *R. endophytica* var.*endophytica* *R. fragariae* ; *R. ramicola*	*Ceratobasidium cornigerum* (*C. ramicola*)
AG1-IB	*Rhizoctonia microsclerotia*	*T. cucumeris*			
AG1-IC		*T. cucumeris*			
AG2-1	*R. solani* var. *brassicae*	*T. cucumeris*	AG-Ba	*R. fumigata*	*C. setariae*
			AG-Bb	*R. oryzae-sativae*	*C. oryzae-sativae*
AG2-2IIIB		*T. cucumeris*	AG-B(o)		*C. cornigerum*
AG2-2IV		*T. cucumeris*	AG-C	*R. globularis*	*C. cornigerum*
AG3	*R. solani* var. *typica*	*T. cucumeris*	AG-D(CAG-1)	*R. cerealis*	*C. graninearum*
			AG-E(CAG3;6)	*R. muneratii*	*Ceratobasidium* sp.
AG4 HG-I	*R. praticola*, *R. solani* var. *cichorii-indiviae*	*T. praticola*	AG-F(CAG4)		*Ceratobasidium* sp.
			AG-G	*R. fragariae*	*Ceratobasidium* sp.
			AG-H		*Ceratobasidium* sp.
AG4 HG-II		*T. praticola*	AG-I	*R. fragariae*	Unknown
AG5		*T. cucumeris*	AG-J		*Ceratobasidium* sp.
AG6 HG-I		*T. cucumeris*	AG-K		*Ceratobasidium* sp.
AG6-GV		*T. cucumeris*	AG-L		*Ceratobasidium* sp.
AG7		*T. cucumeris*	AG-M		*Ceratobasidium* sp.
AG8		*T. cucumeris*	AG-N		Unknown
AG9		*T. cucumeris*	AG-O		*Ceratobasidium* sp.
AG10		*T. cucumeris*	AG-P		*C. cornigerum*
AG11 (AGBI)		*T. cucumeris*	AG-Q		*C. cornigerum*
WAG-Z	*R. zeae*	*Waitea circinata*	AG-R(CAG5)		*Ceratobasidium* sp.
WAG-O	*R. oryzae*	*Waitea circinata*	AG-S(CAG7)		*Ceratobasidium* sp.

[1]ที่มา : Sneh และคณะ (1991)

การศึกษาทางด้านอณูชีวโมเลกุล

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านอณูชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาทในการศึกทางด้านโรคพืชมากขึ้น โดยพบว่าข้อมูลทางด้านความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) สามารถนำมาอธิบายถึงความผันแปรทางพันธุกรรมและการกระจายความผันแปรนั้นในประชากรของเชื้อ ตลอดจนนำมาใช้ในงานวิจัยด้านอนุกรมวิธานได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความยุ่งยากซับซ้อนในการจัดสปีชีส์ หรือมีความผันแปรทางลักษณะสัณฐานวิทยาค่อนข้างสูง (พัชรา, 2541)

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker)

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ถือเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้หาความแตกต่างหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำและชัดเจน เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างถึงระดับพันธุกรรมซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ทำให้สามารถตรวจสอบบรรพบุรุษร่วมได้ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในชื่อที่รู้จักกันว่า "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) (Weising และคณะ, 1995) Cubeta และ Vilgalys (1997) ได้รวบรวมดีเอ็นเอเครื่องหมายบางส่วนที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานในระดับต่าง ๆ ของราในสกุล *Rhizoctonia* ดังแสดงในตารางที่ 2

PCR-RFLP

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมซึ่งมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ (total DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอตัวอย่างต่อเมื่อมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นั้น ๆ อยู่ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดโดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรสิส ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้เครื่องกำเนิดแสง ultra violet (UV) ซึ่งถ้าลำดับเบสของตัวอย่างแตกต่างกันในบริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ หรือมีการแทรกเข้ามาหรือหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะมีผลทำให้ขนาดดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกัน สามารถนำมาประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ แต่โดยทั่วไปผลที่ได้จากการตัด total DNA ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน (smear) เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอมากเกินไป จึงนิยมย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลสู่

แผ่น nylon หรือ nitrocellulose membrane แล้วจึงเลือกตรวจดีเอ็นเอบางส่วนด้วยดีเอ็นเอติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยเทคนิคที่เรียกว่า Southern blotting (Mills, 1994) ภายหลังมีการนำเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองมาใช้ร่วมกับการทำ RFLP ทำให้การศึกษาด้วยเทคนิค RFLP ทำได้ง่ายขึ้น ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากลงได้มาก และมีข้อดีหลายประการด้วยกัน คือ 1. ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยลง (< 1 ไมโครกรัม) 2. สามารถตรวจผลได้โดยตรงจากการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรสิส 3. หลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะบางเอนไซม์ไม่สามารถตัด genomic DNA ที่มีหมู่เมทธิลได้ (ในสภาพธรรมชาติดีเอ็นเออาจถูกเติมหมู่เมทธิลในลำดับเบสบางตัว แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จะไม่มีหมู่เมทธิล) (Vilgalys และ Cubeta, 1994) มีการนำเทคนิค PCR-RFLP มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ผึ้งโพรง (Sihanuntavong และคณะ, 1999) ปลาคาร์พ (Gross และคณะ, 2002) และวัว (Verkaar และคณะ, 2002) นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคได้โดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อก่อน เช่นในการศึกษาของ Weiland และ Sundbak (2000) ที่ใช้ตรวจแยกเชื้อ *Aphanomyces cochlooides* ในต้น sugar beet ที่แสดงอาการ damping off

ตารางที่ 2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นำมาใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อในสกุล *Rhizoctonia* ที่ระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ [1]

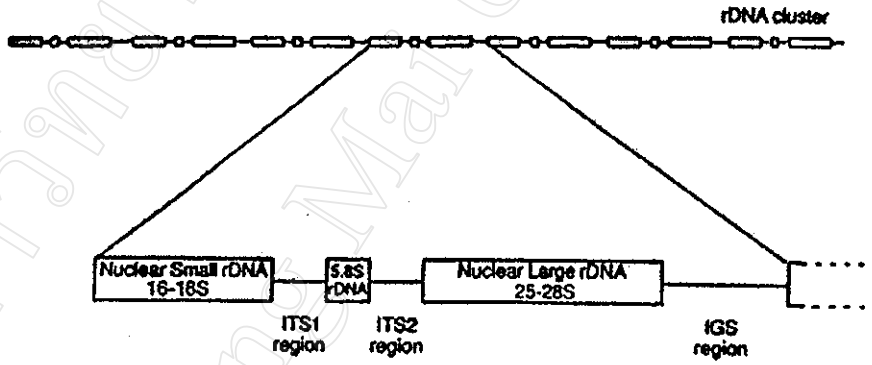
ดีเอ็นเอเครื่องหมาย[2]	ระดับอนุกรมวิธาน		
	สูงกว่าสปีชีส์	สปีชีส์/AG	ประชากร
Cellular fatty acid	X	X	-
DNA fingerprint	-	-	X
DNA/DNA hybridization	X	X	-
Electrophoretic karyotyping	-	X	X
Isozyme/Zymogram	-	X	X
RAPD	-	X	X
rDNA RFLP	X	X	-
scn DNA RFLP	-	X	X

[1] ที่มา : Cubeta และ Vilgalys (1997)

[2] RAPD = randomly amplified polymorphic DNA ; rDNA = ribosomal DNA ; RFLP = restriction fragment length polymorphism ; scn DNA = single-copy nuclear DNA

ribosomal DNA gene (rDNA)

ribosomal DNA gene (rDNA) คือลำดับเบสที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์สาย rRNA ซึ่งจะนำไปสร้างเป็น ribosome มีการนำ rDNA มาใช้ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราอย่างกว้างขวาง rDNA สามารถพบได้ทั้งในไมโตคอนเดรียและในนิวเคลียส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนอนุรักษ์ (conserve) และส่วนผันแปร (variable) ในนิวเคลียส rDNA มีลักษณะเป็นชุดของยีนที่เรียงต่อกันในจำนวนหลายร้อยชุด แต่ละชุดประกอบด้วยยีนของหน่วยย่อยต่าง ๆ คือ 18S (small subunit) 5.8S และ 28S (large subunit) และช่องว่างระหว่างยีนดังกล่าว ซึ่งเรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) นอกจากนี้ยังมีช่องว่างระหว่างยีนแต่ละชุดด้วย เรียกว่า intergenic spacer (IGS) (Bridge และ Arora, 1998) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ไดอะแกรมแสดงหน่วยย่อยต่าง ๆ ITS และ IGS ของ nuclear rDNA gene (ดัดแปลงจาก Mills และคณะ, 1992)

จากคุณสมบัติของ rDNA ในนิวเคลียสที่มีทั้งส่วนที่อนุรักษ์และผันแปร และมีจำนวนหลายร้อยชุดใน genome ทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ทำได้ง่ายโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อส่วนอนุรักษ์ ขณะเดียวกันในส่วนที่มีความผันแปรก็มีข้อมูลเพียงพอต่อการศึกษาในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ White และคณะ (1990) รายงานว่า บริเวณ ITS และ IGS มีวิวัฒนาการเร็วกว่าส่วนอื่น ๆ เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์หรือประชากร ส่วนบริเวณ 18S มีวิวัฒนาการช้ากว่า มีความเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาในระดับสูงกว่าสปีชีส์ขึ้นไป ปัจจุบันมีการศึกษาความผันแปรในส่วนต่าง ๆ ของ rDNA เพื่อประเมินความสัมพันธ์ในเชื้อราหลายชนิด แยกตามหน่วยย่อยที่นำมาศึกษาดังนี้ 18S (Liu และคณะ, 1995) 28S (Cubeta และคณะ, 1991;

Mazzola, 1997; Martin, 2000) และ ITS (Harlton และคณะ, 1995; Edel และคณะ, 1996; Wang และ White, 1997; Cooke และ Duncan, 1997; Hyakumachi และคณะ, 1998) ข้อมูลจากการศึกษาส่วนของ rDNA ยังถูกนำไปใช้ในการออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อราในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ Gardes และ Bruns (1993) ออกแบบ primer ITS1F ที่จำเพาะต่อราต่าง ๆ และ ITS4B ที่จำเพาะต่อราใน Class Basidiomycetes Larena และคณะ (1999) ออกแบบ primer ITS4-A ที่จำเพาะต่อราใน Class Ascomycetes Salazar และคณะ (2000) ออกแบบ primer Rhsp1, Rhsp2 ที่จำเพาะต่อราในสกุล *Rhizoctonia* และ primer AG21sp ที่จำเพาะต่อ *R. solani* AG2-1

การศึกษาโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลของเชื้อในสกุล *Rhizoctonia* ส่วนใหญ่กระทำในกลุ่มของ *R. solani* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นจำนวนมาก สำหรับราในกลุ่ม binucleate *Rhizoctonia* เริ่มพบรายงานการศึกษาในปี 1986 โดย Sweetingham และคณะ (อ้างโดย Masuhara และคณะ, 1994) ซึ่งทำการศึกษารูปแบบของ pectic zymogram และรายงานว่ารูปแบบของเอนไซม์ดังกล่าวอาจนำมาใช้ในการจัดกลุ่มรา binucleate *Rhizoctonia* ได้ แต่จากการศึกษาของ Masuhara และคณะ (1994) พบว่ารูปแบบของเอนไซม์ดังกล่าวมีความผันแปรค่อนข้างมาก โดยเชื้อ AG-F ที่ศึกษามีรูปแบบเอนไซม์ถึง 7 รูปแบบจากตัวอย่าง 11 ไอโซเลท และ AG-I มี 5 รูปแบบจากตัวอย่าง 12 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่า tester strain ของญี่ปุ่น (AG) และของสหรัฐอเมริกา (CAG) ที่รายงานว่าเป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกันก็มีรูปแบบเอนไซม์ต่างกันด้วย Damaj และคณะ (1993) ได้ศึกษารูปแบบ isozyme จำนวน 8 เอนไซม์ใน 12 AG และ 5 CAG พบว่า รูปแบบ isozyme ของ AG-G มีลักษณะแตกต่างจากเชื้ออื่นอย่างเห็นได้ชัด และผลการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทั้ง 8 เอนไซม์ยังพบว่า tester ของญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาบางไอโซเลทถูกจัดรวมอยู่ด้วยกันคือ AG-D รวมอยู่กับ CAG1 AG-E รวมอยู่กับ CAG3 และ AG-F รวมอยู่กับ CAG-4 ชี้ให้เห็นว่า tester จากทั้ง 2 แหล่งมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Cubeta และคณะ (1991) ที่ศึกษาดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และพบว่า tester จากทั้ง 2 แหล่งมีรูปแบบดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์เหมือนกัน นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้ primer LROR/LR7 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hha*I, *Hpa*II, *Sau*3A1 และ *Taq*I สามารถแยก tester strain ทั้งหมด 64 ไอโซเลท (21 AG) ออกเป็น 20 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 13 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อใน AG เดียวกันทั้งหมด และไม่พบความแปรปรวนของรูปแบบดีเอ็นเอภายใน AG เดียวกัน Mazzola (1997) ได้ใช้เทคนิคเดียวกันในการแยกความแตกต่างของเชื้อรา binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกจากรากและดินในสวนแอปเปิ้ล พบว่า รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I, *Hpa*II และ *Taq*I ในหลายไอโซเลทแตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอของ tester strain เช่นเดียวกับการศึกษาของ Martin (2000) ที่

ทำการศึกษาในเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากสตรอเบอรี่ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfo*I, *Msp*I, *Sau*3A1 และ *Taq*I และพบว่า รูปแบบดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลทภายใน AG เดียวกันมีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลของแต่ละเอนไซม์มาวิเคราะห์จัดกลุ่มร่วมกันแล้วนำเสนอในรูป dendrogram พบว่า แต่ละกลุ่มยังคงประกอบด้วยสมาชิกเพียง AG เดียว และได้สรุปว่าเทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่ม binucleate *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากสตรอเบอรี่เพื่อคัดเลือกตัวแทนในแต่ละกลุ่มไปทำการจำแนกแบบ AG ต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University