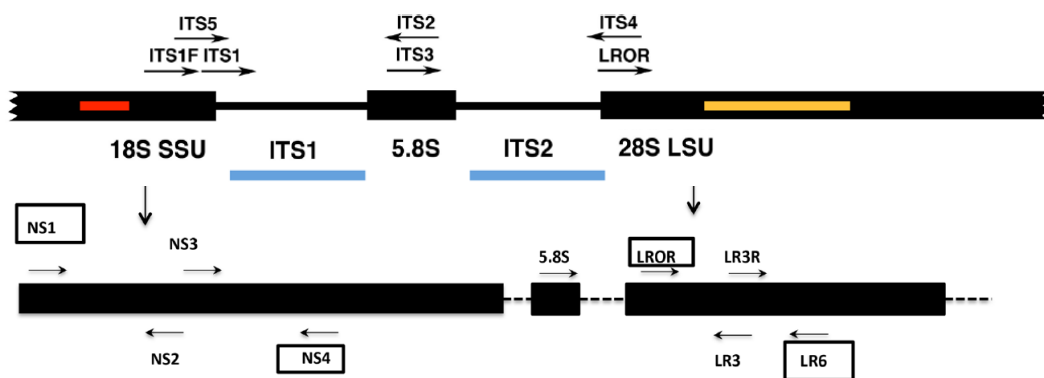


การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของเชื้อรา

จันทร์แรม รูปจำ
นักวิจัยชำนาญการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อราเป็นยูคาริโอตกลุ่มใหญ่ที่สุดมีอยู่ประมาณ 1.5 ล้านชนิด ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศ ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ พืช สัตว์ สิ่งแวดล้อม และการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และยังมีอีกหลายชนิดที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งในปัจจุบันมีข้อมูลอยู่ประมาณ 5% ที่สามารถระบุชนิดได้และข้อมูลที่เหลือกว่า 95% ยังต้องรอการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ซึ่งการระบุชนิดเป็นเรื่องที่ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนิเวศวิทยา ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาข้อมูลด้านพันธุศาสตร์มีความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราทำให้มีข้อมูลของเชื้อราเพิ่มมากขึ้น เพราะเป็นวิธีที่รวดเร็ว แม่นยำและเชื่อถือได้มากกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งการจำแนกและระบุชนิดของเชื้อราแบบดั้งเดิมจะดูจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) ร่วมกับการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลาและแรงงานมากและต้องอาศัยความรู้ทางอนุกรมวิธานของผู้ที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญสูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของวิธีแบบดั้งเดิม ปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับโมเลกุลที่ดูลักษณะของยีนภายใน (genotype) การวิเคราะห์ที่ได้ผลรวดเร็ว แม่นยำและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งวิธีการตรวจสอบในระดับโมเลกุลมีวิธีหลากหลายสามารถนำมาเป็นเครื่องมือในการระบุและจัดจำแนกชนิดของเชื้อราได้ (Aslam et al 2017)

จากข้อมูลดีเอ็นเอในปัจจุบันมีการนำดีเอ็นเอจากยีนบริเวณต่างๆ มาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา เช่นข้อมูลของดีเอ็นเอบริเวณยีน *ITS*, *LSU*, *SSU*, *COX1*, *RPB1*, *RPB2*, β -*tubulin*, *MCM7*, *TEF1- α* , γ -*actin*, *ATP6* และยีน *CaM* ข้อมูลจากยีนเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นรหัสดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเชื้อราส่วนใหญ่จะใช้ข้อมูลบริเวณ internal transcribed spacer (*ITS*) (ภาพ 1) เพราะความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ ทำให้การจำแนกมีข้อจำกัด เช่นเชื้อราในจีนัส *Ascomycota* ส่วนใหญ่เช่น *Penicillium*, *Aspergillus* และ *Fusarium* ใช้ข้อมูลของยีน *TEF1- α* , *RPB1*, *RPB2*, β -*tubulin* และ *CaM* เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ข้อมูลการวิจัยที่มีการศึกษาและรวบรวมมาเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของเชื้อราดังแสดงใน ตารางที่ 1 (Tekpinar and Kalmer 2019)



ภาพ 1 The ribosomal RNA genes (rDNA) and internal transcribed spacer (ITS) region of fungi
ดัดแปลงจาก Raja et al. (2017)

นอกจากนี้ยังสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูล GeneBank บนเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โปรตีน และข้อมูลอื่นทางด้านชีวโมเลกุล การใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในการระบุชนิดของเชื้อราแล้วยังใช้ข้อมูลจากดีเอ็นเอจากยีนบริเวณอื่นๆ ร่วมด้วยซึ่งการใช้ข้อมูลจากยีนบริเวณอื่นๆ มากกว่าหนึ่งบริเวณจะทำให้การระบุชนิดของสายพันธุ์ มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

ตารางที่ 1 DNA sequence for fungal DNA barcodes.

Locus	Lineage	Primer Sequence 5'-3'
Internal Transcribed Spacer region of the rRNA (ITS)	All Fungi	ITS1 - TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS1F - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA ITS4 - TCCTCCGCTTATTGATATGC
Large Subunit of the rRNA (LSU, 28S)	All Fungi	LROR - ACCCGCTGAACCTAAGC LR6 - CGCCAGTTCTGCTTACC
Small Subunit of the rRNA (SSU, 18S)	All Fungi	NS1 - GTAGTCATATGCTTGTCTC NS4 - CTTCCGTC AATTCCTTTAAG
Cytochrome oxidase subunit I (COX1, COI)	Agaricomycota, Pezizomycotina	Ucox1 - TCTACTAATGCTAAAGATATTGG Ucox2 - ATGATTTTCTTTATGGTTATGCC
	Penicillium	PenF1 - GACAAGAAAGGTGATTTTTATCTTC PenR1 - GGTAAGATAATAATAAACACTGCTG
RNA polymerase II subunit 1 (RPB1)	All Fungi	RPB1af - GARTGYCCDGGDCAYTTYGG RPB1cr - CCNGCDATNCRTRTRCCATRTR
Second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2)	All Fungi	RPB2-5f - GAYGAYMGWGATCAYTTYGG RPB2-7cR - CCCATRGCTTGYYTRCCCAT
Beta-tubulin (β -tub)	All Fungi	Bt2a - GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b - ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
Mini chromosome maintenance protein (MCM7)	All Fungi	Mcm7-709for - ACIMGIGTITCVGAYGTHAARCC Mcm7-1348rev - GAYTTDGCACICIGGRTCWCCCAT Mcm7-1447rev - CATIACIGCIGCIGTRAGRCC
Translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α)	All Fungi	EF1-1018F - GAYTTCATCAAGAACATGAT EF1-1620R - GACGTTGAADCCRACRTTGTC
γ -actin	Sordariomycetes, Dothideomycetes, Plant pathogenic fungi	act-512F - ATGTGCAAGGCCGGTTTTCGC act-783R - TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
Sixth subunit of ATP synthase (ATP6)	All Fungi	ATP6-1 - ATTAATTSWCCWTTAGAWCAATT ATP6-2 - TAATTCTANWGCATCTTTAATRTR ATP6-3 - TCTCCTTTAGAACAATTTGA ATP6-4 - AAGTACGAAWACWTGWGMTTG
Calmodulin (CaM)	All Fungi	CMD5 - CCGAGTACAAGGAGGCCTTC CMD6 - CCGATAGAGGTCATAACGTGG

แหล่งที่มา: Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny (Tekpinar and Kalmer 2019)

เอกสารอ้างอิง

- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Tekpinar, A. D., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 109(1-2), 187-224.