



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti* สาเหตุโรคใบจุด
และใบไหม้ในยูคาลิปตัส

Genetic Diversity of *Pseudoplagiostoma eucalypti* Causing Leaf Spots and Leaf Blight
Diseases on Eucalyptus

นามผู้วิจัย นายสุพจน์ เหลืองประพตฺธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์จินตนา อันอาดมั่งงาม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัตติยา พงศ์พิสุทธา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti*
สาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส

Genetic Diversity of *Pseudoplagiostoma eucalypti* Causing Leaf Spots and Leaf Blight
Disease on Eucalyptus

โดย

นายสุพจน์ เหลืองประพุก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพจน์ เหลืองประพุกที่ 2554: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์จินตนา อันอาดมิ่งาม, Ph.D 88 หน้า

โรคใบจุดและใบไหม้ เป็นปัญหาหลักในการปลูกสร้างสวนป่ายูคาลิปตัส ซึ่งเดิมมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการจัดจำแนกใหม่เป็นเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* โดยใช้ข้อมูลทางด้านอนุชีววิทยาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสด้านทานโรคใบจุดและใบไหม้สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้จากแหล่งปลูกยูคาลิปตัสใน 10 จังหวัดของประเทศไทย และนำมาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวัดอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการศึกษสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Ps. eucalypti* ซึ่งมีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะลักษณะการเจริญของโคโลนี เมื่อนำเชื้อรา *Ps. eucalypti* มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบจากทั้งหมด 178 แถบ นำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธีของ Dice และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่า เชื้อรา *Ps. eucalypti* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 10 กลุ่ม โดยมีค่า cophenetic correlation (r) = 0.955 จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ ribosomal DNA จำนวน 8 ไอโซเลตโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank (DDBJ) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench จากการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 8 ไอโซเลตนี้ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล โดยมีค่า bootstrap สูงถึง 100% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS นั้นจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Ps. eucalypti* ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ได้คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับย่อยชิ้นส่วนบริเวณ ITS เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ออกจากเชื้อราชนิดอื่น โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench จากการทดสอบเอนไซม์จำนวน 10 ชนิด พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *HinCII* สามารถแยก *Ps. eucalypti* และ *Ps. oldii* ออกจาก *Ps. variabile* ได้ ในขณะที่เอนไซม์ *Ctr10I*, *EcoRI*, *HaeII*, *HaeIII*, *HinCII*, *MseI*, *StuI* และ *TaqI* ไม่สามารถแยกเชื้อรา *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* ออกจากกันได้

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Supoch Lueangpraplut 2011: Genetic Diversity of *Pseudoplagiostoma eucalypti* Causing Leaf Spots and Leaf Blight Disease on Eucalyptus. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mrs. Jintana Unartngam, Ph.D. 88 pages.

Leaf spot and leaf blight disease is a main problem for eucalyptus forest plantations. The disease had been reported causing by fungi *Cryptosporiopsis eucalypti*. However, at present the fungi are re-identified as *Pseudoplagiostoma eucalypti* using molecular and morphological data. This study aims to identify and evaluate the genetic diversity of the fungi causing leaf spot and leaf blight disease on eucalyptus in Thailand. The data earned from the study will be useful for breeding improvement of eucalyptus resistance to leaf spot and leaf blight disease. The disease samples were surveyed and collected from eucalyptus plantations in 10 Provinces of Thailand. Fungal species were isolated and identified using morphological characteristics and colony growth measurements on synthetic media. The fungal isolates were identified as *Ps. eucalypti* which were of diverse morphologies especially for colony characteristics. The DNA fingerprint analysis of *Ps. eucalypti* was conducted using AFLP technique with 4 primer combinations. The results showed that there were 77 polymorphic bands and 178 total bands. All polymorphic bands were analyzed using NTSYS pc ver. 2.02. Program. The similarity coefficient was obtained using Dice's method. The phenogram was then generated by UPGMA method. The results showed that fungal isolates could be categorized into ten groups with cophenetic correlation of 0.955. The results also indicated that there was genetic diversity among *Ps. eucalypti* isolates. Moreover, these groups were not correlated to the localities and morphological characteristics. Sequencing analysis of internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA was conducted. Eight isolates of *Ps. eucalypti* were amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 universal primers. Eight sequences were aligned and analyzed together with the sequences obtained from GenBank (DDBJ) using the CLC Main workbench. The UPGMA clustering showed that the eight sequences were in the same group as other sequences of *Ps. eucalypti* recorded in the database supporting by 100% bootstrap value. The results indicated that the eight isolates could be identified as *Ps. eucalypti* based on ITS region analyses, which corresponding to the morphological based identification. In addition, the screening of restriction enzymes for digestion of ITS region was conducted to distinguish between *Ps. eucalypti* and other closed related species using CLC Main Workbench. The screening of 10 enzymes showed that *AluI* and *HinCII* enzymes could differentiate *Ps. eucalypti* and *Ps. oldii* from *Ps. variabile*. While, *Ctr10I* *EcoRI* *HaeII* *HaeIII* *HinCII* *MseI* *StuI* and *TaqI* enzymes could not distinguish *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* and *Ps. variabile*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ดร.จินตนา อันอาดมงาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณา มอบความรู้ การเอาใจใส่ดูแล และให้คำปรึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์สำเร็จ ลงด้วยดี ขอขอบคุณ ผศ.ดร. รัศมี พงศ์พิสุทธา และ ผศ.ดร. รัชนิ สงประยูร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ดร. สิริภัทร์ พรหมณีย์ ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร. ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ยิ่งขึ้น รวมถึงขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ของห้องปฏิบัติการ โรคพืช น้องปัทมา จันทร์เรือง และ น้องเสริมสวัสดิ์ ตูลยอนุกิจ ในการให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณ บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด ที่ให้โอกาสในการเรียน สนับสนุนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ ที่ช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และ นางสาวหুমพัฒน์ เหลือง ประพฤทธิ ภรรยาที่เป็นกำลังใจตลอดมา

สุพจน์ เหลืองประพฤทธิ

ตุลาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ (primer combination) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Selective amplification) ของเทคนิค AFLP	27
2	ไอโซเลตของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส และแหล่งที่เก็บรวบรวม	34
3	ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	38
4	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา <i>Ps. eucalypti</i> ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน และค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาวของ conidia	40
5	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total band) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์	46
6	ไอโซเลตของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> และเชื้อราอื่นจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาวิเคราะห์ข้อมูล	56
7	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อราจากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> , <i>CtrI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HaeII</i> และ <i>HaeIII</i>	64
8	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อราจากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinCII</i> , <i>HinfI</i> , <i>MseI</i> , <i>StuI</i> และ <i>TaqI</i>	65
ตารางผนวกที่		
1	ข้อมูล binary data (0/1) จากการวิเคราะห์ AFLP ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ด้วยไพรเมอร์ M+G/E+ACT	79
2	ข้อมูล binary data (0/1) จากการวิเคราะห์ AFLP ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ด้วยไพรเมอร์ M+GT/E+AC	80
3	ข้อมูล binary data (0/1) จากการวิเคราะห์ AFLP ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ด้วยไพรเมอร์ M+GT/E+AG	82
4	ข้อมูล binary data (0/1) จากการวิเคราะห์ AFLP ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ด้วยไพรเมอร์ M+GTA/E+A	83

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงตำแหน่งของ ITS ใน ribosomal DNA (rDNA) และตำแหน่งของไพรเมอร์	19
2	อาการของโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>	36
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> บนอาหาร PDA	37
4	ลักษณะ conidia ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>	39
5	Morphometry scatter plot 3D ของความยาว ความกว้างของ conidia และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>	42
6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+G/E+ACT	47
7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GT/E+AC	48
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GT/E+AG	49
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GTA/E+A	50
10	Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ด้วยเทคนิค AFLP โดยวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี Dice และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA	51
11	การกระจายตัวของข้อมูลในการจัดกลุ่มที่มีค่า cophenetic correlation 0.95 โดยการคำนวณค่า similarity และ clustering ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.02	52
12	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>	57
13	UPGMA tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA	58

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI Ctr10I EcoRI HaeII</i> และ <i>HaeIII</i>	66
15	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinCII</i> และ <i>HinFI</i>	67
16	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI StuI</i> และ <i>TaqI</i>	68
ภาพผนวกที่		
1	Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อรา <i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i> ร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นจาก GenBank	85

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti*
สาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส

Genetic Diversity of *Pseudoplagiostoma eucalypti* Causing Leaf Spots and Leaf
Blight Disease on Eucalyptus

คำนำ

ยูคาลิปตัสเป็นไม้โตเร็วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการไม้ยูคาลิปตัสประมาณ 38 ล้านตันต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ อย่างมากมาย เช่น อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ชี้นไม้สับเพื่อการส่งออก ไม้ประกอบ ไม้เสาเข็ม เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น สำหรับความต้องการภายในประเทศมีการใช้ไม้ยูคาลิปตัสประมาณ 9 ล้านตันต่อปี แต่ในขณะเดียวกันสามารถผลิตไม้ยูคาลิปตัสได้เพียง 7 ล้านตันต่อปี จึงไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นภาครัฐและเอกชนจึงได้ส่งเสริมให้ปลูกยูคาลิปตัสกันอย่างกว้างขวางมากขึ้น เพื่อลดการนำเข้าไม้จากต่างประเทศ ในขณะเดียวกันพบว่า โรคของไม้ยูคาลิปตัสกลายเป็นปัญหาและอุปสรรคในการปลูกสร้างสวนไม้ ซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ โรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในสวนไม้ได้แก่ โรคใบจุด ใบไหม้ปลายกิ่ง และยอดแห้ง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* และมีการเปลี่ยนชื่อเชื้อรานี้ใหม่เป็น *Pseudoplagiosoma eucalypti* โดย Cheewangkoon et al. (2010)

ในปี 2542 พื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสของไทยในบริเวณที่มีปริมาณน้ำฝนที่สูง มากกว่า 1,500 มิลลิเมตร เกิดการระบาดของโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในสวนป่ายูคาลิปตัสคามาลคุณซิสที่ปลูกโดยใช้สายต้น (clone) เดียว ทำให้สูญเสียพื้นที่สวนป่ายูคาลิปตัสไป 1 เพอร์เซ็นต์ (Luangviriyasaeng, 2003)

เชื้อรา *C. eucalypti* สามารถเข้าทำลายใบ ปลายกิ่งและยอดอ่อน ทำให้เกิดอาการแผลจุด ใบไหม้แห้ง เมื่ออาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง กิ่งแห้ง ต้นไม้อ่อนแอ เปิดช่องทางให้เชื้อราที่ไม่สร้างความเสียหายรุนแรง (weak pathogens) ชนิดอื่นๆ เช่น *Cytospora* sp., *Lasiodiplodia theobromae*,

Phomopsis sp. เข้าทำลายส่วนของกิ่ง และลำต้นเป็นผลให้เกิดแผลแตก ขางไหล และยอดตาย ทำให้ทรงต้นผิดปกติ คดงอ แคระแกร็น หรือรุนแรงส่งผลให้ต้นตายได้ (กฤษณา, 2542) เชื้อราแต่ละชนิดในสกุลนี้มีความแตกต่างกันน้อยมาก บางครั้งจึงจำเป็นต้องใช้ขนาดของ conidia เป็นหลักในการจำแนก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อ *C. eucalypti* ทุกไอโซเลตที่แยกได้จากแปลงสวนไม้ในจังหวัดกาญจนบุรี มีการสร้าง conidiomata และ conidia ที่เหมือนกัน แต่มีลักษณะโคโลนีและอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน รวมทั้งยังมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน (พัชราภรณ์, 2549) ซึ่งลักษณะการสร้างส่วนขยายพันธุ์ และอัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม จึงไม่สามารถจำแนกเชื้อราชนิดนี้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วย การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีได้ผลในระยะกล้าไม้เท่านั้น แต่ในแปลงสวนไม้ขนาดใหญ่การใช้สารเคมีทำได้ค่อนข้างยาก และไม่คุ้มค่ากับการลงทุน การใช้สายพันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพที่สุด การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทาน ต้องคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโรค เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคชนิดต่างๆ มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันทั้งในแง่ของลักษณะอาการโรค และระดับความรุนแรงของโรค

ในปัจจุบันเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง ได้มีการนำสายพิมพีดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ให้ปริมาณแถบดีเอ็นเอแตกต่างจำนวนมาก น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบได้ มีการนำมาใช้ศึกษาหาความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิด นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ internal transcribed spacers (ITS) ซึ่งมีลำดับเบสที่มีความผันแปรในเชื้อราแต่ละชนิด (species) ดังนั้นจึงนิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในกรณีที่มีลักษณะอื่นๆ มีข้อจำกัด การประเมินความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัส โดยอาศัยเทคนิคดังกล่าวมาเป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนพัฒนาสายพันธุ์ยูคาลิปตัสต้านทานโรคที่มีประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาโรคใบจุดและใบไหม้ใหม่ในการปลูกสร้างสวนไม้ยูคาลิปตัสต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัส ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
2. เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสโดยใช้เทคนิค AFLP
3. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA
4. เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ และเชื้อราชนิดอื่นๆ

การตรวจเอกสาร

1. ยูคาลิปตัส

1.1 ยูคาลิปตัส คามาลคูเลนซิส

ยูคาลิปตัส คามาลคูเลนซิส มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. จัดอยู่ในวงศ์ Mytaceae มีชื่อสามัญ ได้แก่ River red gum, Red gum, Murrey red gum และ River gum ยูคาลิปตัสเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลียเป็นส่วนใหญ่ (FAO, 1995) มีมากกว่า 700 ชนิด (กรมป่าไม้, 2548) *Eucalyptus camaldulensis* เป็นเพียงชนิดเดียวที่คนไทยรู้จักดีและมีบทบาทเศรษฐกิจสูงติดต่อกันมามากกว่า 20 ปี ชื่อ *camaldulensis* ตั้งขึ้นในปี พ.ศ. 2375 เพื่อเป็นเกียรติแก่ท่านคาน์แห่งเมืองคามาลโดลีผู้ประสบความสำเร็จในการนำไม้ชนิดนี้จากออสเตรเลียมาปลูกในประเทศอิตาลี จากนั้นประเทศต่าง ๆ ก็ปลูกกันอย่างกว้างขวาง (ปรัชญา, 2537; บุญวงศ์, 2549ก) ทำให้ขณะนี้ไม้เนื้อที่สวนป่ายูคาลิปตัสทั่วโลกเกือบ 120 ล้านไร่ (บุญวงศ์, 2549ก) ยูคาลิปตัสชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกประเภท ตั้งแต่พื้นที่ริมน้ำ ที่ราบน้ำท่วมถึงบางระยะในรอบปี แม้แต่ดินที่เป็นทรายและมีความแห้งแล้งติดต่อกันเป็นเวลานาน พื้นที่ดินเลวที่มีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่า 650 มิลลิเมตรต่อปี รวมทั้งพื้นที่ที่มีดินเค็ม ดินเปรี้ยว แต่ยูคาลิปตัสจะไม่สามารถทนต่อดินที่มีสภาพเป็นหินปูนสูง (เกษมสุข, 2533; ปรัชญา, 2537)

1.2 ลักษณะทั่วไป

ลำต้น เป็นไม้ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีความสูง 24-26 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เมตร ใบ เป็นคู่ตรงข้ามเรียงสลับกัน ลักษณะเป็นรูปหอก มีขนาด 2.5-12 X 0.3-0.8 นิ้ว ก้านใบยาว ใบสีเขียวอ่อนทั้งสองด้าน เส้นใบมองเห็นได้ชัด เปลือกมีลักษณะเรียบเป็นมัน มีสีเทาสลับสีขาวและน้ำตาลแดงเป็นบางแห่ง เปลือกนอกจะแตกออก ร่อนเป็นแผ่นหลุดออกจากผิวของลำต้น เมื่อแห้งจะลอกออกได้ง่าย เปลือกหนาประมาณ 1/2 เซนติเมตร เมล็ดมีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร สีเหลือง น้ำหนักเมล็ด 1 กิโลกรัมจะมีเมล็ดประมาณ 200,000 เมล็ด ช่อดอก เกิดที่ข้อต่อระหว่างกิ่งกับใบ มีก้านดอกเรียวยาว และมีก้านย่อยแยกไปอีก ออกดอกเกือบตลอดปีออกดอกปีละ 7-8 เดือน ผล มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ผิวนอกแข็ง เมื่อยังอ่อนจะมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ เมื่อผลแก่ปลายผลจะแยกออก ทำให้เมล็ดที่อยู่ภายในหล่นออกมา ลักษณะเนื้อไม้ มี

แก่นสึน้ำตาล กระพื้ น้ำตาลอ่อน กระพื้และแก่นสึแตกต่างกัน ได้ชัด เนื้อไม้แตกง่ายหลังจากตัดพื้ (กรมป่าไม้, 2548)

1.3 ประวัติการปลูกยูคาลิปตัสในประเทศไทย

ประเทศไทยได้นำไม้ยูคาลิปตัสเข้ามาปลูกครั้งแรกประมาณปี พ.ศ. 2444 ในรูปไม้ประดับ ไม้ให้ร่มเงาภายในพระที่นั่งวิมานเมฆ (บุญวงศ์, 2549ก) ต่อมาในปี พ.ศ. 2489 ดร.สอาด บุญเกิด ได้ปลูกไว้ที่สถานีวนกรรมห้วยไร่ – เขาพลึง จังหวัดแพร่ หลังจากนั้นเริ่มมีการปลูกทดสอบสายพันธุ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 ที่ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ เป็นต้นมา ปี พ.ศ. 2507 ทดลองปลูกยูคาลิปตัส 15 ชนิดในพื้นที่จังหวัด เชียงใหม่ ศรีสะเกษ สุราษฎร์ธานี และกาญจนบุรี โดยโครงการสำรวจวัตถุดิบเพื่อทำเชื้อกระดาษของกรมป่าไม้ (บุญวงศ์, 2549ข) ต่อมาในปี พ.ศ. 2516 มีการทดสอบสายพันธุ์ของยูคาลิปตัส และถินกำเนิดของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส ปรากฏว่ายูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วที่สุด และมีปริมาณการรอดตายสูงกว่าไม้ยูคาลิปตัสชนิดอื่นๆ ซึ่งในปี พ.ศ. 2521 สถานีทดลองปลูกพรรณไม้ห้วยทา จังหวัดศรีสะเกษ ได้เริ่มให้ความสนใจในแง่ของการวิจัยเพื่อการปลูกสร้างสวนป่า ต่อมาในปี พ.ศ. 2524 ได้มีการปลูกไม้ยูคาลิปตัสเพื่อการใช้สอยในครัวเรือน จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2527-2532 รัฐบาลได้มีการส่งเสริมให้เอกชนเช่าพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมทำการปลูกสร้างสวนป่าขึ้น แต่เกิดการคัดค้านจากหน่วยงานต่าง ๆ ขึ้นในปี พ.ศ. 2533 ถึงผลเสียของการปลูกยูคาลิปตัส นโยบายการส่งเสริมให้เอกชนปลูกไม้ยูคาลิปตัสหยุดชะงักลงโดยปริยาย ต่อมากรมป่าไม้จึงได้ร่วมกันพิจารณาข้อดีข้อเสีย ทั้งในแง่ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจและผลกระทบต่อทรัพยากรดิน เปรียบเทียบระหว่างการปลูกไม้ยูคาลิปตัสและการปลูกมันสำปะหลัง ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าไม่มีความน่าวิตกอย่างไร (กรมป่าไม้, ไม่ปรากฏปี) และอีกทั้งกรมป่าไม้ได้รับความร่วมมือจาก Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) ประเทศออสเตรเลีย ศึกษาศักยภาพในการปลูกยูคาลิปตัสสำหรับอุตสาหกรรมการใช้ประโยชน์ไม้พบว่า ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส เป็นไม้ที่มีศักยภาพสูง จึงทำให้หน่วยงานของรัฐและเอกชนร่วมกันส่งเสริมให้ปลูกกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุ่งกุลาร้องไห้ เนื่องจากเป็นพื้นที่ดินเค็มสูง ฝนแล้ง น้ำท่วมซ้ำซาก การปลูกยูคาลิปตัสจึงเป็นอีกทางเลือกที่ช่วยเหลือเกษตรกรและเพิ่มพื้นที่สีเขียวในภาคอีสานมากขึ้น (ปรัชญา, 2537) และในปัจจุบันพบว่ายูคาลิปตัสมีประโยชน์มากมายและมีผลต่อเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย

1.4 ประโยชน์ของไม้ยูคาลิปตัส

ใช้ในการผลิตกระดาษ เนื่องจากเยื่อไม้ยูคาลิปตัสมีคุณสมบัติเด่น คือ มีความฟูสูง และมีความทึบแสง ประกอบกับไฟเบอร์มีความแข็งแรงเหมาะต่อการใช้ทำกระดาษพิมพ์เขียนประเภทต่างๆ ได้ (ปรัชญา, 2537; มณฑิ, 2540 และ กรมป่าไม้, 2548)

ไม้ยูคาลิปตัสเมื่อนำมาแปรรูปและสับทำชิ้นไม้สับ สามารถนำไปผลิตแผ่นชิ้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด แผ่นปาร์ติเกิล และแผ่นไม้อัดซีเมนต์ นอกจากนี้ได้มีโรงงานผลิตชิ้นไม้สับ เพื่อนำส่งไปจำหน่ายให้กับโรงงานเยื่อกระดาษทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น ประเทศเกาหลี ใต้หวัน และญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งมีความต้องการสูงมาก (ปรัชญา, 2537; มณฑิ, 2540 และ กรมป่าไม้, 2548)

การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงเหลว (Bio oil) ซึ่งเป็น โครงการของ ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับ นักลงทุนจากประเทศแคนาดาในนามกลุ่ม DYNAMOTIVE ซึ่งเป็น ผู้นำทางด้านเทคโนโลยีการผลิตเชื้อเพลิงเหลวระดับโลก โดยเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จะสามารถใช้แทนถ่านหิน-น้ำมันเตาในการผลิตกระแสไฟฟ้า หรือใช้แทนน้ำมันดีเซลหมุนซ้ำ ที่ใช้ในจักรกลการเกษตร-เรือประมง และอาจลดการใช้ น้ำมันดีเซลหมุนเร็วที่ใช้กับรถยนต์-รถบรรทุก (บุญวงศ์, 2549ก)

การผลิตเฟอร์นิเจอร์ เครื่องเรือน ทำรั้ว ทำคอกปศุสัตว์ ทำเสา ใช้ในการก่อสร้างต่างๆ ทำพื้น ถ่าน ถ่านไม้ยูคาลิปตัสใช้เป็นเชื้อเพลิงดีไฟได้ดีและมีเข็ถ่านน้อย (ปรัชญา, 2537; มณฑิ, 2540 และ กรมป่าไม้, 2548)

1.5 บทบาททางเศรษฐกิจของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย

บทบาททางเศรษฐกิจที่โดดเด่นของไม้ยูคาลิปตัส คือการใช้เป็นวัตถุดิบในรูปของอุตสาหกรรมชิ้นไม้สับสำหรับอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ส่วนการใช้ประโยชน์อื่นๆ มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ของประเทศไทย มีการพัฒนาเติบโตอย่างต่อเนื่อง คาดว่าจะต้องใช้ไม้ยูคาลิปตัสจาก 5 ล้านตันต่อปี เป็น 10 ล้านตันต่อปี ภายในเวลา 3-4 ปีข้างหน้า ประเทศไทยสามารถผลิตไม้ยูคาลิปตัสได้ประมาณ 7 ล้านตันต่อปี (supply side) แต่มีความต้องการใช้ไม้เพื่ออุตสาหกรรมภายในประเทศ และชิ้นไม้สับเพื่อส่งออกประมาณ 38

ล้านต้นต่อปี ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาความต้องการไม้มีมากกว่ากำลังการผลิต จึงเป็นผลให้มีการปลักต้นไม้ให้ราคาซื้อขายไม้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (บุญวงศ์, 2549ก)

2. เชื้อราสาเหตุโรคยูคาลิปตัส

จากรายงานการศึกษาของ กฤษณา (2548) โรคต่างๆ ของไม้ยูคาลิปตัสที่ปลูกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบัน พบว่ามีเชื้อรามากกว่า 28 ชนิด สามารถเข้าทำลายไม้ยูคาลิปตัสได้ตั้งแต่ระยะเมล็ด กิ่งชำ กล้าไม้ และต้นไม้ในแปลงปลูก โดยระดับความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันขึ้นกับ ชนิดของเชื้อสาเหตุโรค ความต้านทานโรคของยูคาลิปตัสแต่ละสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อม ในขณะนั้น สาเหตุโรคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อราเข้าทำลาย ทำให้เกิดอาการเน่า (rot หรือ damping off) แผลจุด (spot) แผลไหม้ (blight) กิ่งแห้ง (shoot-blight) ขอดตาย (die-back) ขางไหล (gummosis) แผลแตกตามกิ่ง ลำต้น และเนื้อเยื่อเจริญของลำต้นมีลักษณะเป็นสะเก็ด (canker) พบโรคที่เกิดจากแบคทีเรียบ้างเล็กน้อย

โรคทางใบและลำต้นของยูคาลิปตัสที่สำคัญ และทำให้เกิดความเสียหายมากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Cylindrocladium quinquesepatum*, *Phaeophleospora destructans* และ *C. eucalypti* ซึ่งก่อให้เกิดโรคขอดไหม้และใบไหม้ (Old, 2002; Old and Mohammed, 2003)

สำหรับประเทศไทยได้มีการสำรวจเชื้อราที่เข้าทำลายยูคาลิปตัสในแปลงปลูกพบว่า มีเชื้อรามากกว่า 15 ชนิด ที่สามารถเข้าทำลายใบ ขอด กิ่ง และลำต้น ทำให้เกิดโรคแผลจุด แผลไหม้ กิ่งแห้ง แคนเกอร์ และขอดตาย ด้วยระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน โดยโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora* sp., *Coniella* spp., *Cercospora* sp., *Mycotribulus* sp., *Mycosphaerella* sp. พบว่าทำให้เกิดความเสียหายไม่รุนแรงมาก แต่เชื้อรา *C. eucalypti* และ *Cylindrocladium quinquesepatum* สามารถเข้าทำลายใบปลายกิ่งและขอดอ่อน ทำให้เกิดแผลจุดไหม้รุนแรง ใบร่วง กิ่งแห้ง ต้นไม้อ่อนแอ เปิดช่องทางให้เชื้อราที่ไม่สร้าง ความเสียหายรุนแรง (weak pathogen) ชนิดอื่นๆ เช่น *Cytospora* sp., *Lasiodiplotia theobromae*, *Phomopsis* sp. เข้าทำลายส่วนของกิ่ง และลำต้น เกิดโรคแผลแตก ขางไหล และขอดตาย ทำให้รูปร่างผิดปกติ คดงอ แคระแกร็น หรือรุนแรงถึงกับทำให้ต้นตายได้ (กฤษณา, 2542) โดยทั่วไปสวนป่ายูคาลิปตัสในเวียดนามและไทยพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cylindrocladium quinquesepatum* และ *C. eucalypti* ค่อนข้างมาก แต่การหลุดร่วงของใบและอาการขอดไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในยูคาลิปตัสคามาล

คุณลักษณะสร้างความเสียหายและมีแพร่กระจายกว้างขวางกว่าการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cylindrocladium quinqueseptatum* (กฤษณา, 2542; Old *et al.*, 2002) จากการสำรวจในแปลง ทดสอบ Chon Thanh ในเวียดนาม ระหว่างปี 1997 - 1998 พบว่า ความสมบูรณ์ของเรือนยอดต้น ยูคาลิปตัสได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* โดยเฉพาะอาการยอดไหม้ (shoot blight) อย่างมาก หลังจากอายุ 2 ปี ขึ้นไป นอกจากนี้ จากการประเมินโรคในปี 1998 พบว่า ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสแสดงอาการโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 8.34 - 96.8 เปอร์เซ็นต์ และถิ่นกำเนิดของ *E. camaldulensis* var. *simulata* เช่น ถิ่นกำเนิด Laura River และ Kennedy Creek จาก Queensland ตอนเหนือ มีสัดส่วนของต้นที่ต้านทานสูงกว่า *E. camaldulensis* var. *obtusata* เช่น ถิ่นกำเนิด Petford จาก Queensland และ Katherine จาก Northern Territory (Old *et al.*, 2002) ในปี 1999 พื้นที่ปลูก ยูคาลิปตัสของไทยในบริเวณที่มีปริมาณน้ำฝนที่สูง (มากกว่า 1500 มิลลิเมตร) เกิดการระบาดของโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในสวนป่า ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสที่ปลูกโดยใช้สายต้น (clone) เดียวทำให้สูญเสียพื้นที่สวนป่ายูคาลิปตัส ไป 1 เปอร์เซ็นต์ และน่าจะเป็นไปได้ว่าแหล่งที่มาของสายต้นที่ใช้ปลูกมาจากถิ่นกำเนิด Petford เนื่องจากผลการทดสอบช่วงแรกในแปลงแสดงให้เห็นว่าเป็นถิ่นกำเนิดที่เหมาะสมในด้านการเจริญเติบโตและรูปทรงดี (Luangviriyasaeng, 2003)

3. *Cryptosporiopsis eucalypti*

เชื้อรา *C. eucalypti* ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัสพบครั้งแรกในปี 1986 โดย Old ซึ่งไม่มีการตีพิมพ์ พบในตอนกลางของ Honshu ประเทศญี่ปุ่น (Old *et al.*, 2002) ต่อมา ใน พ.ศ. 2542 กฤษณา ได้พบว่าเชื้อรานี้พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้ แต่จากการรายงานของ Sankaran *et al.* (1995) ได้บรรยายลักษณะและความสามารถในการก่อเกิดโรคของเชื้อราชนิดนี้ไว้

เชื้อรา *C. eucalypti* เป็นสาเหตุของโรคใบจุด (leaf spot) และใบไหม้ (leaf blight) แคงเกอร์ (canker) และยอดแห้งตาย (shoot blight) ของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ซึ่งพบในหลายๆ ประเทศ ได้แก่ บราซิล อินโดนีเซีย ไทย เวียดนาม และ ญี่ปุ่น

3.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ซึ่งจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้
(Sutton, 1980)

Division Eumycota

Subdivision Deuteromycotina

Class Blastodeuteromycetes

Order Phalidales

Suborder Phialostromatineae

Genus *Cryptosporiopsis*

Species *eucalypti*

Verkley (1999) ใ้รับรองว่าจำนวนสปีชีส์ในเชื้อราสกุล *Cryptosporiopsis* มีอย่างน้อย 23 ชนิด โดยมี teleomorphs อยู่ในสกุล *Pezicula* หรือในสกุล *Neofabraea* ลักษณะที่ใช้กำหนดเชื้อราในสกุลตามที่ Sankaran *et al.* (1995) กล่าวไว้จะใช้ลักษณะร่วมกันของกลุ่มเส้นใยที่รวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ (conidiomata) รูปร่างทางสัณฐานวิทยาและขนาดของ *Conidia* ขอบเขตของสกุล (genus) และวงศ์ (family) ของฟิซอซัย ในขณะเดียวกัน Sutton (1980) กล่าวว่า เชื้อราในสกุลนี้แตกต่างกันน้อยมากในแต่ละสปีชีส์ ในการจำแนกบางครั้งจะใช้ขนาดของ *conidia* เป็นหลัก

3.2 ลักษณะของเชื้อรา *C. eucalypti*

ลักษณะเชื้อรา *C. eucalypti* สร้าง mycelium สีน้ำตาลอ่อน แตกกิ่งก้าน เส้นใยมีผนังกั้น ความกว้าง 2-3.5 ไมโครเมตร conidiomata เป็นแบบ pycnidia ถึง acervular ส่วนมากรูปร่างกลม (globose) อยู่ใต้ชั้นคิวติเคิลถึงเนื้อเยื่อชั้นผิวของพืช สีน้ำตาลอ่อน ประกอบด้วย *textura angularis* 2-3 ชั้น ซึ่งผนังชั้นบนจะเข้มและในผนังชั้นฐานจะอ่อน ความกว้างประมาณ 170 ไมโครเมตร และความลึกประมาณ 110 ไมโครเมตร dehiscence จะไม่สม่ำเสมอ ใก้ๆ จะมีการแตกออกของเนื้อเยื่อฟิซอซัยที่อยู่ชั้นบน ก้านชู *conidia* จะไม่มีหรืออาจประกอบด้วย 1-2 supporting cell ส่วน conidiogenous cells อาจจะไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกับก้านชู *conidia* หรือเป็นอันหนึ่งอันเดียวกับก้านชู *conidia* ทรงกระบอก ใ้ไม่มีใ้ อาจตรงหรือโค้งเล็กน้อย เรียบ ขนาด 4-13.5 X 2-3 ไมโครเมตร สร้างเป็นเซลล์แทรกภายในหรืออยู่บนผนังของ conidiomata *conidia* เกิดแบบ มีการสร้างรูปร่างสปอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงมี septum ตัดแยกออกจากเส้นใย และมีผนังชั้นนอกและ

ชั้นในของ conidia ต่อเนื่องกับเส้นใยที่ให้กำเนิด (holoblastic) ไม่มีสี มีลักษณะเป็นหยดน้ำมันอยู่ภายในเซลล์ (guttulate) เรียบ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งมีผนังกัน 1 ผนัง รูปรี ปลายมน (obtuse) ฐานแหลมจนถึงรอยแผล (scar) ผนังหนา 0.5-1 ไมโครเมตร ขนาด 11-20 X 4.5-8 ไมโครเมตร ส่วน conidiogenous cells เจริญแบบไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ (enteroblastic) โดย conidia แยกตัวออกที่ระดับเดียวกันหรือที่ระดับที่สูงกว่า (1-2 annellations) ไม่มีลักษณะปลายบานออก (collar) เกิดการหนาขึ้นตามแนวผนังเล็กน้อย (periclinal thickening) ช่องว่างของไซโทพลาสซึมกว้าง (cytoplasmic channel) (Sankaran *et al.*, 1995)

3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. eucalypti*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เลี้ยงบน potato dextrose agar (PDA) เริ่มแรกจะมีสีน้ำตาล เมื่ออายุ 4-6 วัน จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2.5 เซนติเมตร ในวันที่ 7 จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลค่อนข้างดำ มีกลิ่นคล้ายละมุดฝรั่ง (*Achras sapota*) ที่สุก กลุ่มของเส้นใยเจริญติดกับอาหาร (adpressed) เส้นใยสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกัน (septate) แตกกิ่งก้าน กว้าง 2-3.5 ไมโครเมตร conidiomata เป็นแบบ acervulus โดย conidia เกิดบน pulvinate masses ของ conidiogenous cells ปรากฏให้เห็นได้ประมาณ 2 สัปดาห์ ไม่มี stromatic tissue มีการขับ exudates เป็นหยดเล็กๆ สีน้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเหลืองและมี conidia ลอยอยู่ ไม่มีก้านชู conidia conidiogenous cells สีไม่มีสี เป็นทรงกระบอกหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งมีผนังกัน 1-2 ผนัง ปลายมน (obtuse) ฐานแหลมจนถึงรอยแผลที่เกิดจากการหลุดออก ผนังหนา 0.5-1 ไมโครเมตร ขนาด 11-22.5(25) X 5-9 ไมโครเมตร (Sankaran *et al.*, 1995)

3.4 ลักษณะอาการของโรค

เชื้อรา *C. eucalypti* สามารถเข้าทำลายใบและบางครั้งอาจทำลายกิ่งของยูคาลิปตัสได้ ลักษณะอาการที่เกิดกับใบจะทำให้เกิดจุดขึ้นทั้ง 2 ด้านของแผ่นใบ มีขนาด รูปร่าง และสีแตกต่างกันไปตามสปีชีส์และพันธุ์ของยูคาลิปตัส โดย Sankaran *et al.* (1995) ได้บรรยายลักษณะอาการโรคไว้ดังนี้ อาการใบจุดที่พบใน *E. grandis* ใน Hawaii มีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ เส้นผ่าศูนย์กลางเล็กสุด 1 เซนติเมตร จุดขยายเป็นพื้นที่กว้างบนใบ ตรงกลางมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนด้านหลังมีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ ต่างจากอาการใบจุดที่พบใน *E. grandis* ใน Kerala ที่เป็นจุดแยกกัน ส่วนมากจะไม่ต่อเนื่องกัน (discrete) รูปร่างวงกลมถึงไม่สม่ำเสมอ สีน้ำตาลอ่อน เป็นแผ่นยกขึ้นเล็กน้อย ในใบแก่ขอบมีสีทึบเข้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร ส่วน Ciesla *et al.* (1996) ได้แบ่งชนิด

และรูปแบบของบาดแผลโดยทั่วไปออกเป็น 4 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 จุดแบบวงกลม (circular spots) มีสีน้ำตาลอ่อนถึงค่อนข้างดำ ไม่ต่อเนื่องกัน เป็นวงกลมหรือเกือบกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร แบบที่ 2 จุดไหม้ขนาดใหญ่ (large blight spots) มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล บาดแผลมีเซลล์ตายขยายออกกว้าง แบบที่ 3 จุดไม่สม่ำเสมอขนาดเล็ก (small irregular spots) มีสีเทา น้ำตาล ถึงน้ำตาลดำ บางครั้งขอบมีสีดำ จุดไม่สม่ำเสมอหรือค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ไม่ต่อเนื่องกัน มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร แบบที่ 4 จุดสีสนิมไม่สม่ำเสมอ (irregular rusty spots) มีสีสนิม พื้นผิวขรุขระ ไม่สม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่องกัน หรืออยู่เป็นกลุ่มตามเส้นแขนงใบ การเข้าทำลาย ใบสามารถขยายไปยังกิ่งขนาดเล็ก บาดแผลที่เซลล์ตายจะเปลี่ยนสีไปเพราะ fruiting bodies ที่มีสีอ่อนเกิดขึ้นบนกิ่ง fruiting bodies จะกระจัดกระจายไม่สม่ำเสมอบนจุดและปรากฏเป็นตุ่ม (pustules) ที่ผิว เมื่อแก่จะแตกออกหรือเป็นรู กลุ่มของ conidia (conidial mass) มีสีครีมอยู่ด้านบนของตุ่มในสภาพความชื้นสูง

เชื้อรา *Cryptosporiopsis* ที่พบสามารถจัดจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งพบว่าลักษณะส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันในส่วนขนาด conidia ดังนั้น จึงมีการใช้ขนาด conidia ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Cryptosporiopsis* (Sutton, 1980) พัทธราภรณ์ (2549) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. eucalypti* จำนวน 11 ไอโซเลต พบว่ามีการสร้าง conidiomata และ conidia เหมือนกันทุกไอโซเลต แต่มีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราอาจจะผันแปรตามสภาพแวดล้อมได้ (McDonald, 1997) ซึ่งยากต่อการจำแนก

3.5 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานใหม่ของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* โดยอาศัยข้อมูลทางอณูชีววิทยา (Cheewangkoon *et al.*, 2010)

Cheewangkoon *et al.* (2010) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *C. eucalypti* ใหม่ โดยเก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ยูคาลิปตัส จาก 10 ประเทศในเขตหนาว และเขตอบอุ่น นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of 28S ribosomal DNA, internal transcribed spacer (ITS) และ beta-tubulin gene ซึ่งพบที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในสกุล (genus) *Plagiostoma* จึงได้จัดตั้งสกุลใหม่เป็น *Pseudoplagiostoma* และเปลี่ยนชื่อเชื้อรา *C. eucalypti* เป็น *Pseudoplagiostoma eucalypti*

4. *Pseudoplagiostoma eucalypti*

4.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ซึ่งจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้
(Cheewangkoon *et al.*, 2010)

Division Ascomycota

Subdivision Pezizomycotina

Class Sordariomycetes

Subclass Sordariomycetidae

Order Diaporthales

Family Pseudoplagiostomataceae

Genus *Pseudoplagiostoma*

Species *eucalypti*

4.2 ลักษณะของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

ลักษณะทางด้าน Anamorph เหมือนกับที่ Sankaran *et al.* (1995) ได้บรรยายไว้ ต่อมา Cheewangkoon *et al.* (2010) ได้พบลักษณะทาง Telomorph และอธิบายดังนี้

เชื้อราจีนัส *Pseudoplagiostoma* มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกับจีนัส *Plagiostoma* คือมีรูปร่าง oblate perithecia แบบ single neck แต่ไม่มี cypeus ผนัง ascus บาง และมี apical ring เหนือชั้นประกอบด้วยผนัง 1 ชั้นของ ascospore แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ ระวังค์ (appendage) ทั้ง 2 ข้างของ ascospore Ascomata มีลักษณะกึ่งฝังอยู่ในชั้นผิวของพืช มองเห็นเป็นจุดของช่องเปิด (ostiole) กลมหรือรูปไข่ กว้าง 90-170 ไมโครเมตร สูง 120-190 ไมโครเมตร สีสน้ำตาลดำถึงดำ มีช่องเปิดด้านข้าง คอ กว้าง 50-70 ไมครอน ยาว 195 ไมครอน ผนัง periphysis ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2-4 ชั้นสีน้ำตาลเข้ม Ascus เป็นแบบ aparaphysis แบบเดี่ยวๆ ภายในมี 8 ascospores รูปร่างกลม กึ่งทรงกระบอกถึงรูปไข่ยาว sessile โค้งเล็กน้อยไม่มีหยดไขมัน (guttules) ขนาด 60-80 X 10-14 ไมโครเมตร ascospore รูปร่างวงรีเรียวลงปลายโค้งมน ส่วนที่มีผนังกั้นจะกว้างสุด ไม่มีสี มีหยดไขมันใหญ่ 1-2 หยดต่อเซลล์ ผนังบางตรง ขนาด 15-21 X 5-7 ไมโครเมตร ไม่มีสี มีระวังค์ (appendage) ทรงทรงกระบอก ที่ปลายทั้ง 2 ด้านเมื่อแก่มีการขยายตัวที่ฐานและเรียวไปที่ปลาย ขนาด 5.5-7 X 8-30 ไมโครเมตร

4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ps. eucalypti*

เมื่อนำเชื้อรา *Ps. eucalypti* มาเลี้ยงในอาหาร oatmeal agar (OA), 2% potato-dextrose agar (PDA) และ pine needle agar (PNA) พบว่ามีลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อรา *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* แต่สามารถแยกความแตกต่างได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร malt extract agar (MEA) โดย conidia ของ *Ps. oldii* มีรูปร่าง subglobose และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีอายุมากขึ้น conidia ของ *Ps. eucalypti* รูปร่าง ellipsoid ไม่มีสี และ conidia ของ *Ps. variabile* มีรูปร่างหลากหลาย ตั้งแต่ subglobose ถึง bean-shape ไม่มีสี โคโลนีของ *Ps. variabile* เจริญช้ากว่า *Ps. eucalypti* และ *Ps. oldii*

4.4 ลักษณะอาการของโรค

ลักษณะของบาดแผล จุดกลมถึงเหลี่ยมสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-20 มิลลิเมตร รอบบาดแผลถูกล้อมรอบด้วยสีน้ำตาลม่วงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม กลุ่มเส้นใยมีลักษณะเรียบ มีผนังกัน แดงกึ่งก้าน สีน้ำตาลอ่อน กว้าง 2-3.5 ไมโครเมตร

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรม ได้แก่ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) การพัฒนาแท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ซึ่งในทางด้านโรคพืชได้นำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อการตรวจสอบที่รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ ในกรณีที่มีข้อจำกัดในการใช้ลักษณะอย่างอื่น เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นต้น จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ขึ้นมา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์หรือภายในสปีชีส์ ความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุ รวมถึงการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมหรือพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Bridge, 2002; Hawksworth, 2004; McDonald, 1997; Rossman and Palm-Hernandez, 2008; Weising *et al.*, 1995)

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการจัดจำแนกหรือศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ที่เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) มีอยู่หลายเทคนิคด้วยกันซึ่งได้มีการ

พัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมาจำนวนมาก ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์หรือความเหมาะสมของสิ่งที่ต้องการศึกษา เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (McDonald, 1997), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (McDonald, 1997), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) เป็นต้น โดยทั่วไปจะแบ่งเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 2 แบบ คือ Hybridization based fingerprint และ PCR based fingerprint ซึ่งแบบแรกนั้นได้มีการพัฒนาขึ้นมาก่อนที่จะมีการพัฒนาเทคนิค PCR โดยเทคนิคแรกที่ใช้คือเทคนิค RFLP เกิดจากการย่อยจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis จากนั้นตรวจสอบ polymorphic band โดยการใช้ DNA สายสั้นที่เรียกว่า probe ที่มีการติดฉลาก ซึ่งจะจับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน (Weising *et al.*, 1995) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ขึ้นมาโดย Mullis (1990) ทำให้ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอขึ้นมามากมาย ดังเช่น

5.1 RAPD เป็นเทคนิคทาง PCR พัฒนาโดย Williams *et al.* (1990) และ Welsh and McClelland (1990) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) เพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบส ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นกว่าปกติ คือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ในจีโนมอาจมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์ไปจับใกล้เคียงกันมากๆ หรือทิศทางเดียวกัน จะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้าไปจับได้ในบริเวณที่ใกล้กัน และมีทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตของ PCR ขึ้น

5.2 RFLP เป็นเทคนิคที่แสดงให้เห็นความแตกต่างหรือความหลากหลายของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 ถึง 8 bp ดังนั้น ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอด้วย ถ้าดีเอ็นเอมาจากแหล่งที่ต่างกันหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Weising *et al.*, 1995)

5.3 AFLP เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้น โดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งเทคนิคนี้ใช้สำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ช่วยในการแสดงความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกหรือหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Vos and Kuiper, 1997) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อยคือ

การทำ pre-selective amplification และ selective amplification ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adaptor มาจับ โดยมีเบสคัดเลือกเพิ่มมาจำนวน 1 และ 3 เบส ตามลำดับ (Vos *et al.*, 1995) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำอิล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel บันทึกผลโดยการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในตำแหน่งนั้นๆ ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากการเกิดมิวเทชัน ที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จากนั้นจึงนำไปคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมและสร้างเป็น phylogenetic tree (สุรินทร์, 2542)

5.4 ISSR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาโดยสร้างไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอในส่วนซ้ำที่เรียกว่า simple sequence repeat เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างส่วนซ้ำนั้นๆ โดยเทคนิคนี้ใช้ไพรเมอร์ชุดเดียว มีขนาดประมาณ 15-20 เบส เช่น (CA)₈ (GAT)₅ (CTC)₅ เป็นต้น การตรวจสอบผลสามารถทำได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis และบันทึกผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏในตำแหน่งนั้นๆ (Powell *et al.*, 1996; Weising *et al.*, 1995; Zietkiewicz *et al.*, 1994)

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่มีการพัฒนาขึ้นตามวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ได้แก่ Sequence -related amplified polymorphism (SRAP), Target region amplification polymorphism (TRAP), Selective amplification of microsatellite polymorphism (SAMPL), Random amplified microsatellite polymorphism (RAMPO), Sequence characterized amplified region (SCAR), Single strand conformational polymorphism (SSCP) และ Cleaved amplified polymorphism sequence (CAPS)

เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสยังไม่มีรายงานการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Ps. eucalypti* เนื่องจากข้อดีของเทคนิค AFLP คือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อน ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากและมีขนาดหลากหลาย นอกจากนี้เป็นการตรวจสอบจากข้อมูลดีเอ็นเอทั้งจีโนม และสามารถตรวจสอบผลได้ (reproducible) ใ้ไรก็ตาม มีเชื้อราหลายชนิดที่ได้นำเทคนิค AFLP มาศึกษาในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม

Kothera *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Didymella bryoniae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคต้นแตกยางไหลในพืชตระกูลแตงที่พบทั่วโลก ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างจาก 10 รัฐ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ California, Delaware, Florida, Georgia,

Indiana, Maryland, Michigan, Oklahoma, South Carolina และ Texas จำนวน 120 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค AFLP และใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ ผลการศึกษา ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 450 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 134 แถบ (30 %) สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มใหญ่ ได้จำนวน 2 กลุ่ม จากทั้ง 2 กลุ่ม สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่ม ไอโซเลตที่มีความรุนแรงพบใน muskmelon และ watermelon ในการจัดกลุ่มนี้ไม่สัมพันธ์กับระดับความรุนแรง แต่อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มสอดคล้องกับแหล่งที่มา คือสามารถแยกไอโซเลตจากอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ได้

Klenova *et al.* (2010) ได้ทดสอบความรุนแรงและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Puccinia coronate* f. sp. *avenae* จำนวน 40 ไอโซเลต ที่เข้าทำลายข้าวโอ๊ต 18 สายพันธุ์ ในแถบยุโรปและอิสราเอล จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP และใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 501 แถบ ทุกไอโซเลตมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ของเชื้อราชนิดนี้ในข้าวโอ๊ต จากเซอร์เบีย ออสเตรีย และสาธารณรัฐเช็ก แสดงให้เห็นว่าสปอร์ของเชื้อแพร่กระจายไปยังพื้นที่เฉพาะ และยังพบว่าการจัดกลุ่มนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวน virulence gene โดยไอโซเลตที่มีจำนวน virulence gene น้อย (0-4) แบ่งได้ 2 กลุ่ม ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ จะมีจำนวน virulence gene อยู่ระหว่าง 4-7 ยีน

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือดีเอ็นเอเป็นการตรวจหาการเรียงลำดับของเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของเส้นดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิด deletion insertion transversion หรือ transition มีการใช้เทคนิค DNA sequencing ในการจำแนกชนิด รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราหลายๆ ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาหรือ ตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอโดยตรงซึ่งให้ผลการตรวจสอบหรือการศึกษาใกล้เคียงกับความจริงมากที่สุด โดยไม่มีปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมมามีผลกระทบ เนื่องจากการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างกว้างขวาง จึงทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบหรือวินิจฉัยชนิดของเชื้อราได้รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น นั่นคือการพัฒนา แท่งรหัสดีเอ็นเอ หรือ DNA barcode

แท่งรหัสดีเอ็นเอ หรือ DNA barcode มาจากแนวคิด ที่จะนำแท่งรหัสสินค้า หรือบาร์โค้ด (barcode) ที่ติดอยู่ข้างกล่องสินค้า หรือบนป้ายบอกราคา ระบบนี้ช่วยลดความผิดพลาด และเพิ่มความรวดเร็วในการบันทึกข้อมูล ทำให้มีการเสนอ แท่งรหัสสินค้า มาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะทำได้ง่ายต่อการจำแนก ตรวจสอบ ติดตามและศึกษาถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต บาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตต้องเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น สามารถจำแนกได้ในทุกระยะของพัฒนาการชีวิต เช่น กรณีเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เป็นอุปสรรคในการจำแนกชนิดของเชื้อได้ แต่การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอซึ่งเป็นดีเอ็นเอชุดเดียวกันนั้น ทำให้การจำแนกชนิดง่ายและแม่นยำขึ้น แท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จึงได้พัฒนาขึ้นโดยเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นของบางยีน ที่มีลำดับเบสของยีนที่แตกต่างกันมากพอ ที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ออกจากกันได้ แต่จะมีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมาก หรือ ไม่มีเลย นอกจากนี้ยังต้องมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequences region) ซึ่งจะช่วยให้สามารถใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นแท่งรหัสดีเอ็นเอ ในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (species identification) ข้อมูลลำดับเบสบางส่วนของยีนบางชนิดต้องมีความคงตัว (uniform locality) บนจีโนม โดยพบว่าสามารถใช้ลำดับเบสประมาณ 650 bp ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (*Cox1*) ในไมโทคอนเดรียมาใช้จัดจำแนกชนิด (species) ของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้ เช่นปลา แมลง ผีเสื้อ นก อย่างมีประสิทธิภาพรวดเร็วเชื่อถือได้และที่สำคัญคือ ไม่แพง มีการร่วมกันจัดตั้งองค์กรระหว่างประเทศที่ชื่อว่า Consortium for the Barcode of Life (CBOL) โดยความร่วมมือจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ที่ใฝ่ฝันศึกษาเก็บรวบรวมข้อมูลบาร์โค้ด ดีเอ็นเอ ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชนิดทั้งหมดประมาณ 1,800,000 ชนิด ตั้งแต่ เห็ด รา แมลง ปลา สัตว์ และพืชต่างๆ และจัดทำเป็นระบบเพื่อให้สามารถตรวจสอบค้นหา ติดตามจำแนกได้ (Hebert *et al.*, 2003)

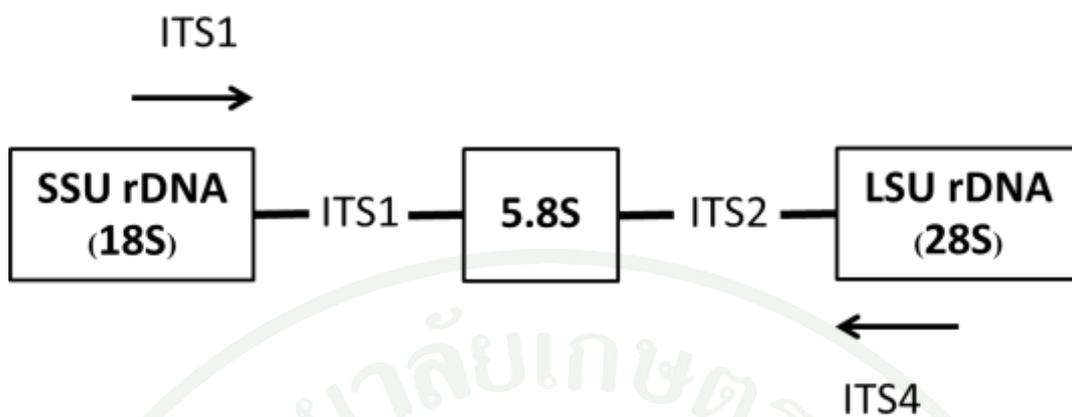
สำหรับเชื้อรามีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากหลายส่วน บางชนิดใช้เพียงส่วนเดียว สามารถจำแนกความแตกต่างได้ แต่บางชนิดต้องใช้มากกว่า 1 ยีน (multiple genes) rDNA ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรงซึ่งลำดับเบสของ DNA ได้นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา กลุ่มของ ribosomal RNA gene พบได้ในนิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็นส่วนอนุรักษ์ และส่วนผันแปร ribosomal DNA ของเชื้อรามีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงต่อกันเกิดขึ้นซ้ำๆ ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นส่วนอนุรักษ์ คือตำแหน่ง 28S หรือ large subunit (LSU) 18S หรือ small subunit (SSU) และ 5.8S ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์หลายๆ อย่างระหว่างเชื้อราที่มีความใกล้เคียงกัน (close related species) ตำแหน่ง ระหว่าง subunits จะเรียกว่า

internal transcribed spacer (ITS) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ITS1 และ ITS 2 ซึ่งทั้ง 2 ส่วนนี้จะคั่นด้วยส่วนของ 5.8S ที่จัดเป็นส่วนอนุรักษ์ (ภาพที่ 1) สำหรับส่วนที่อยู่ระหว่างกลุ่มยีน (gene clusters) นั้นเรียกว่า intergenic spacer (IGS) และนอกจากนี้ mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunits ซึ่งได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ (Bridge and Arora, 1998) และระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ เช่น β -tubulin gene เป็นต้น (Hirata and Takamatsu, 1996; White *et al.*, 1990; Peterson, 1991)

ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่งซึ่งจะพบในหน่วยที่ซ้ำๆ กันของ rRNA โดยพบอยู่ระหว่าง 18S 5.8S และ 28S พบว่ามีการนำเอาลำดับเบสในบริเวณ ITS มาทำการเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิดเนื่องจาก

1. ตำแหน่งยีนมีขนาดเล็ก (500-800 bp) และทำการเพิ่มได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และสามารถใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน (universal primer) ระหว่างเชื้อราต่างชนิดกันได้ เนื่องจากตำแหน่งของไพรเมอร์ คือส่วนที่เป็นส่วนอนุรักษ์
2. ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย เนื่องจากมีอยู่จำนวนหลายร้อยชุดในจีโนม ทำให้เพิ่มปริมาณได้ง่ายและรวดเร็ว
3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีการผันแปรที่สูงมากระหว่างสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันทำให้สามารถใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดแบ่งกลุ่มรวมโดยการวิเคราะห์ phylogeny
4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้โดยเร็วโดยไม่จำเป็นต้องมี chromosome library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน และต่างกันในช่วงสปีชีส์ของเชื้อรา

บริเวณ ITS ของ ribosomal DNA (rDNA) ของเชื้อรามีความผันแปร (Diverse) ในเชื้อราแต่ละชนิด ดังนั้นการใช้เทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence analysis) ในตำแหน่งนี้สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ ซึ่งในปัจจุบันได้ใช้เทคนิคนี้อย่างแพร่หลาย โดยจะใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน of ITS1 ITS2 และ 5.8S สร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราได้ (Fernandez *et al.*, 2001)



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงตำแหน่งของ ITS1-5.8S-ITS2 ใน ribosomal DNA (rDNA) และตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS1 / ITS4 บน rDNA (SSU = Small subunit; LSU = Large subunit)

Ospina *et al.* (1998) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ของ *Trichoderma* spp. จำนวน 15 สายพันธุ์ ซึ่งมี 6 สายพันธุ์ที่ศึกษาเป็น *T. harzianum* จาก 4 biotypes (Th1, Th2, Th3 และ Th4) จากการศึกษาค้นพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกัน กลุ่มแรกประกอบด้วย biotype Th1, Th2 และ Th4 ขณะที่อีกกลุ่มประกอบด้วย biotype Th3 และสายพันธุ์อื่นของ *T. harzianum* / *atroviride* (sect. *Trichoderma*) จากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก Th3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. harzianum* / *atroviride* ซึ่งสองสปีชีส์นี้เมื่อดูจากลักษณะของ conidia แล้ว *T. atroviride* และ *T. harzianum* มีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้จำแนกผิดพลาดเสมอจากการวิเคราะห์ข้อมูลระดับโมเลกุลแล้ว biotype Th3 ควรจัดอยู่ใน *T. atroviride* มากกว่าที่จะเป็น *T. harzianum*

Skouboe *et al.* (1999) ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ใน 52 สายพันธุ์ของ 29 terverticillate taxa ในเชื้อ *Penicillium* ที่ทำการเก็บมาจากแหล่งต่างๆ เพื่อใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงไว้ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ rDNA โดยใช้เทคนิค PCR และนำไปวิเคราะห์ หาลำดับเบสพบว่าเชื้อราทั้ง 29 terverticillate taxa มีความแปรผันสูงมากในเชื้อ *P. roqueforti* และมีความผันแปรน้อยในเชื้อ *P. aurantiogriseum* และเชื้อราในกลุ่ม terverticillate เป็นระยะ perfect stage (telemorph) ของเชื้อ *Eupenicillium*

Jeewon *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษา phylogeny ของเชื้อราใน genus *Pestalotiopsis* โดยทำการศึกษาร่วมกับเชื้อราจำนวน 32 species จาก 7 genus โดยการวิเคราะห์ผลและประเมินผลร่วมกันกับฐานข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ทาง phylogeny โดยใช้การวิเคราะห์จากลำดับเบสในบริเวณ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 และ LSU ซึ่งการศึกษานี้พบว่าเชื้อรา *Bartalinia*, *Pestalotiopsis*, *Seimatosporium* และ *Seiridium* จัดเป็น monophyletic group ซึ่งสนับสนุนด้วยค่า bootstrap ที่สูง ส่วน *Truncatella* species เป็น paraphyletic กับ *Bartalinia* ส่วน species *Pestalotia* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pestalotiopsis*

Michaelsen *et al.* (2004) ทำการศึกษาวงศ์ที่เหมาะสมต่อการจัดจำแนกเชื้อราที่ขึ้นบนกระดาษโดยใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 และใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันในการทำการทดลองโดยหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS แล้วได้นำมาวิเคราะห์โดยวิธี denaturing gradients gel electrophoresis (DGGE) การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานเช่นแรงดันไฟฟ้า และเวลาในการทำงาน ที่เหมาะสม

เพื่อให้การแยกเชื้อราออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ชิ้น DNA ที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำการศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อรา และเพื่อให้ได้เชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับการศึกษาและเปรียบเทียบเชื้อราที่ขึ้นบนกระดาษหรือหนังสือที่มีความเก่าแก่ได้

Pandey *et al.* (2010) ได้พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *Cylindrocladium quinqueseptatum* เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคใบและกล้าใหม่ในยุคลิปตัส ซึ่งพบการระบาดมากในทางตอนเหนือของอินเดีย และทำให้ต้นกล้ายุคลิปตัสตายเป็นจำนวนมาก การใช้เทคนิค Nested PCR ช่วยให้สามารถตรวจสอบโรคนี้ได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการทำ PCR 2 รอบ รอบแรกใช้ universal primer คือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาด 492 bp ซึ่งการใช้ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อราที่เข้าทำลายยุคลิปตัสได้หลายชนิดและยังสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Cylindrocladium* ชนิดอื่นได้อีกด้วย ในการศึกษาข้างต้นจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *C. quinqueseptatum* โดยออกแบบจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ โดยใช้ universal primer ในครั้งแรก ซึ่งได้ออกแบบตรงส่วนที่มีลำดับเบสที่แตกต่างมากที่สุดจากเชื้อราชนิดอื่น ได้แก่ ไพรเมอร์ ITSFCQ-1f (5'ATCTCTTGGTTCTGGCATGC3') และ ITSFCQ-1r (5'GAGACTCCAGAGCGAGGTGT3') ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาด 245 bp ในการศึกษาพบว่าการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITSFCQ-1f และ ITSFCQ-1r สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. quinqueseptatum* ที่ได้ทำการปลูกเชื้อลงในยุคลิปตัสเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งยังไม่แสดงอาการของโรค และยังสามารถตรวจสอบในดินและในเนื้อเยื่อพืชที่มีการติดเชื้อราชนิดนี้ได้เช่นกัน การทำ PCR ในรอบที่ 1 เป็นการเพิ่ม DNA เป้าหมายของเชื้อราให้มีปริมาณมากพอเพื่อไปใช้ในการทำ PCR รอบที่ 2 เพื่อตรวจสอบเชื้อรา *C. quinqueseptatum*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้

1.1 เก็บใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้จากสวนป่า ในเขตพื้นที่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก รวม 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา นครปฐม เพชรบูรณ์ ราชบุรี หนองบัวลำภู อุดรธานี ปราจีนบุรี และอุทัยธานี ทำการตัดเป็นชิ้นให้พอดีกับจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีกระดาษกรอง และใส่น้ำกลั่นพอประมาณ ปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วพันด้วยพลาสติกเพื่อให้เกิดสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-3 วัน ใบยูคาลิปตัสจะเกิดกลุ่มของ conidia (conidial masses) ที่จับออกมา ทำการแยกกลุ่ม conidia ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ โดยใช้เข็มเย็บเยื่อที่ผ่านการเผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว แตะกลุ่ม conidia แล้วนำไปวางบนอาหาร Water agar (WA) (ยูทธนา, 2549)

1.2 การแยก conidia เดี่ยว (single conidial isolation) โดยใช้เข็มเย็บเยื่อ กระจายกลุ่มของ conidia บนผิวหน้าของอาหาร WA ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ บ่มจานเลี้ยงเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เมื่อ conidia งอกเป็นเส้นใยตัดชิ้นวันที่มี conidia ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ของบริษัท Difco บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

นำเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 การทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ไว้ในข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA แล้วย้ายมาวางบนอาหาร PDA ใหม่ บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD: completely

randomized design) จำนวน 5 ซ้ำ (1 งานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ 1 ซ้ำ) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป R (version 2.7.0)

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลต ตรวจสอบการสร้าง conidia ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ เมื่อเชื้อรามีการสร้าง conidia เชื้อ conidia มาทำสไลด์กึ่งถาวรด้วย lactophenol ย้อมสี conidia ด้วยสี cotton blue วัดขนาดความกว้างและความยาวของ conidia ด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดจำนวน 30 ซ้ำ (ทีละหนึ่ง conidia) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป R (version 2.7.0) จากนั้นหาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำค่าเฉลี่ยของความกว้าง ความยาว ของ conidia และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของทุกไอโซเลต มาหาความสัมพันธ์แบบ Scatter plot 3D โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.02 (Rohlf, 1993)

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

3.1 การเตรียมเชื้อ (strain and culture preparation)

นำเชื้อราที่แยกสปอร์เดี่ยวแล้วจากข้อ 1. มาทำสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยการเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อลงบนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดที่ผิวหน้าอาหารเบา ๆ แล้วดูดสารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้โดยเขย่าบน rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เก็บเส้นใยโดยนำมากรองบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 300 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Lyophilizer เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมดีเอ็นเอ (DNA preparation)

นำเส้นใยแห้งน้ำหนัก 0.05 กรัม มาบดใน โกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวและใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (200 mM Tris HCl, pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA และ 0.5% SDS) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

30 นาที จากนั้นเติม phenol และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) อย่างละ 250 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสข้างบนย้ายลงหลอดใหม่ เติม RnaseA (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) 25 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า และหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสข้างบนย้ายลงหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม absolute alcohol ปริมาตร 2 เท่า นำไปไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายตะกอนด้วย TE (10 mM Tris HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอบน 0.8% agarose gel ด้วยวิธี electrophoresis คัดแปลงจากวิธีการของ Zimand *et al.* (1994)

3.3 การย่อยและเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Digestion and Ligation)

นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 500 นาโนกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoRI* (5 units) และ *MseI* (5 units) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ *EcoRI* adapter (5 pmole) และ *MseI* adapter (20 pmole) เติม T4 DNA ligase (1 ยูนิต) 1 mM ATP และ 10X bufferA แล้วนำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นตัวเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

EcoRI adapter 5' -CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter 5' -GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5'

3.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP นั้นโดยทำ PCR 2 รอบ จากการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ของยูคาลิปตัส ด้วยเทคนิค AFLP โดย สุพจน์ (2553) พบว่า

ไพรเมอร์ M+GTA / E+A , M+GT/E+AG และ M+GT/E+AC เหมาะสมสำหรับนำมาศึกษา เนื่องจาก ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนมาก ดังนั้น รอบแรก (pre-amplification) จะทำโดยการใช้ primer 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 เบส โดยนำดีเอ็นเอที่ย่อยแล้ว 5 ไมโครลิตรมาเป็นต้นแบบ เติมไพรเมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 5 pmole 10X buffer 2 mM dNTP 1 ยูนิต *Taq* polymerase และ 25 mM MgCl₂ ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที PCR product ที่ได้จะนำมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อและใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง (selective amplification) โดยการใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเหมือนไพรเมอร์ คู่ที่ใช้ใน PCR ครั้งแรก แต่มีความยาวเพิ่มขึ้น 1-2 เบส (ตารางที่ 1) ปฏิกิริยา PCR จะเริ่มต้นที่ 1 รอบของ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจะปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียส ในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบ (Vos *et al.*, 1995)

3.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นมาทำความสะอาดโดยเช็ดด้วย alcohol 95% 3 ครั้งให้ทั่วทั้งแผ่น เช็ดกระจกแผ่นเล็กด้วย clear view แล้วเช็ดด้วย alcohol 95% อีก 3 ครั้ง เช็ดกระจกแผ่นใหญ่ด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95% 500 ไมโครลิตร) แล้วเช็ดด้วย alcohol 95% อีก 3 ครั้ง นำกระจกทั้ง 2 แผ่นประกบกันโดยหันด้านที่เช็ดด้วยสารแล้วเข้าหากัน และคั่นด้วย spacer ทั้ง 2 ข้าง ใช้คลิปหนีบกระจกบนส่วนของ spacer ทั้ง 2 ด้าน หลังจากนั้นทำการเตรียมเจล (acrylamide : bisacrylamide 19:1, 7.5 M urea) 4.5% denaturing polyacrylamide gel (30% acrylamide (19:1), 10x TBE, Urea, dH₂O) ก่อนเทเจลเติม 10% APS (Ammonium persulfate) 300 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) 50 ไมโครลิตร เพื่อให้แต่ละโมเลกุลของ acrylamide เชื่อมต่อกันเป็น polyacrylamide ค่อยๆ เทยาให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน เทเจลลงในช่องว่างของแผ่นกระจก ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในกระจก เมื่อเจลไหลลงจนสุดขอบกระจกด้านล่างจึงหยุดเท และนำหวี (Comp) เสียบเข้าด้านบนตรงที่เทเจล โดยหันด้านที่ตรงข้ามกับพื้นฉลอมเสียบเข้าก่อน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำความสะอาดไล่เจลและยูเรียส่วนเกินบริเวณด้านบนของกระจกด้วยน้ำกลั่น นำกระจกประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เดิมบัพเฟอร์ 1xTBE ลงในช่องด้านบน 400 มิลลิลิตร

และช่องด้านล่าง 600 มิลลิลิตร ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ทำการ pre-run ที่ 45 วัตต์ จนกระทั่งอุณหภูมิที่กระจกประมาณ 50 องศาเซลเซียส หรือเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ปิดเครื่องใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาไล่เศษเจลและยูเรียส่วนเกินออกอีกครั้ง แล้วจึงเสียบหัวด้านปลายกลตาม โดยให้ส่วนปลายแหลมของหัวเสียบเข้าไปในเนื้อเจลเล็กน้อย

นำ PCR product มาเติม formamide loading buffer 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 98% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% bromophenol blue และ 0.1% xylene cyanol แล้วนำไปบ่มที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรในแต่ละช่องเจล พร้อมทั้ง DNA marker อีก 1 ช่อง เปิดเครื่องที่ 45 วัตต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี silver staining

3.6 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining

นำ gel มาแช่ใน 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำมาย้อมด้วย silver solution (AgNO_3 1 กรัม formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร) ล้างผ่านน้ำ 1 ครั้ง แล้วนำมาเติม developer (sodium carbonate 30 กรัม sodium thiosulphate 0.01 กรัม formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 ลิตร) 2 ลิตร จนกระทั่งแถบดีเอ็นเอปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid และล้างน้ำ 2 นาที โดยเขย่าบน rotary shaker ทุกขั้นตอน (ทุกขั้นตอนใช้สารปริมาณ 2 ลิตร)

3.7 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection and data analysis)

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy system (NTSYS) version 2.0e (Rohlf, 1993) โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี DICE (Dice's similarity coefficient) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) แล้วแสดงผลการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ phylogenetic tree และวิเคราะห์ค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ (primer combination) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Selective amplification) ของเทคนิค AFLP

<i>MseI</i>	<i>EcoRI</i>
5'-GATGAGTCCTGTAGTAG- 3'	5' -GACTGCGTACCAATTCACT- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTAGT- 3'	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTAGT- 3'	5' -GACTGCGTACCAATTCAG- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTAGTA- 3'	5' -GACTGCGTACCAATTCA- 3'

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS

4.1 การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา *Ps. eucalypti* จากข้อ 3.2 มาเพิ่มปริมาณในส่วนของ ITS (ภาพที่ 1) โดยการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') และ ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990) อย่างละ 0.2 pmole, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP และ 1 unit *Taq* DNA polymerase (Takara) โดยทำปฏิกิริยา ตั้งเครื่องดีเอ็นเอที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ต่อจากนั้นที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ เครื่อง DNA thermal cycle (Biometra รุ่น: T-Gradient)

4.2 การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product)

ผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) จากปฏิกิริยา PCR ที่ได้นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% และเติม gel star 0.1% เมื่อเจลแข็งตัวนำมา ตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

4.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ส่งตัวอย่าง PCR product ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นอย่างน้อย 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ให้กับบริษัท ไบโอดีไซน์ จำกัด เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Blast N (DDBJ) และใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5) ในการเทียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple alignment) และทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA และ รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank (DDBJ: DNA Database of Japan)

5. การวิเคราะห์แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิค virtual PCR-RFLP

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานอยู่ก่อนแล้ว มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP แบบเสมือนจริงหรือ *In silico* ด้วยโปรแกรม CLC Main workbench (version 5.5) โดยคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถนำมาใช้แยกชนิดของเชื้อรา เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค



ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้

จากการเก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ยูคาลิปตัสจาก 10 จังหวัด จำนวน 36 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) พบว่าใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุดและใบไหม้ ในระยะแรกของการเข้าทำลาย ตรวจพบแผลเป็นจุดกลมๆ เล็กๆ สีเหลือง กระจายอยู่ทั่วบนใบ จุดแผลจะมีการขยายออกตามการเจริญของเชื้อรา และในบริเวณตรงกลางของแผลมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำเนื่องจากเซลล์ตาย มีวงสีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cheewangkoon *et al.* (2010) ที่ได้บรรยายลักษณะอาการของโรคนี้ไว้ บางครั้งยังพบแผลไหม้ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล มีการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง (ภาพที่ 2 ก) เมื่อนำใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้มาบ่ม ในที่มีความชื้นสูงประมาณ 2-3 วัน พบว่าเชื้อราสร้างกลุ่มของ conidia ออกมาจำนวนมาก (ภาพที่ 2 ข-ค) ลักษณะของ conidia จะมีรูปร่างรี ปลายมน ฐานมนหรือเรียวยาวแหลมด้านใดด้านหนึ่ง (ภาพที่ 2 ง) ซึ่งจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* หรือที่จัดจำแนกใหม่โดย Cheewangkoon *et al.* (2010) เป็นเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

2. การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 การทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกเส้นใยเชื้อราจะมีสีขาว เมื่อมีอายุ 3-4 วัน จะเปลี่ยนเป็นสีครีม หลังจากนั้นสีของเส้นใยเชื้อราจะเข้มขึ้น โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลปนดำหรือดำ ตามลำดับ โคโลนีเชื้อราเจริญติดไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (adpressed) การเจริญเติบโตบนอาหาร PDA จนเต็มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาประมาณ 21 วัน การสร้าง conidia จะเริ่มจากโคโลนีมีการขับของเหลวข้น (exudates) ที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำใสหรือสีครีมใสออกมาจาก conidia ที่เชื้อราสร้างขึ้น หยดของเหลวข้นจำนวนมากจนท่วมผิวหน้าของโคโลนี (ภาพที่ 3) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา 36 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) ระหว่าง 3.72-7.38 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ยุทธนา (2549) โดยเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เก็บได้จากสวนป่ายูคาลิปตัส 9 ไอโซเลต

มีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต โดยเชื้อราที่เก็บได้จากสวนป่าจังหวัดราชบุรีและจังหวัดกาญจนบุรีมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในแต่ละไอโซเลต ส่วนไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา สำหรับการทดลองนี้ พบว่าไอโซเลตจากจังหวัดหนองบัวลำภู (NON2) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนียาวที่สุด (7.38 เซนติเมตร) และไอโซเลตจากจังหวัดอุดรธานี (AUD4) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่สั้นที่สุด (3.72 เซนติเมตร) (ตารางที่ 3)

จากนั้นจึงประเมินลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากวัดขนาดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแล้ว โดยดูจากลักษณะที่มองเห็น ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

1. ลักษณะผิวหน้าโคโลนี แบ่งเป็น 4 แบบ

- เรียบ
- ขรุขระ
- เป็นวงแหวน
- ผิวหน้าย่น

2. ขอบโคโลนี แบ่งเป็น 3 แบบ

- ขอบเกลี้ยง
- ขอบหยักเล็กน้อยขอบหยัก

ดังนั้นจากการประเมินลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony type) ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* พบว่า สามารถแบ่งได้ 8 กลุ่ม (ภาพที่ 3) (ตารางที่ 3) โดย

Type I มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง ประกอบด้วย 14 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี 3 ไอโซเลต (KAN2, KAN5 และ KAN6) จังหวัดขอนแก่น 3 ไอโซเลต (KHO1, KHO3 และ KHO4) จังหวัดเพชรบูรณ์ 2 ไอโซเลต (PHE1 และ PHE3) จังหวัดหนองบัวลำภู 2 ไอโซเลต (NON1 และ NON3) จังหวัดอุดรธานี 2 ไอโซเลต (AUD1 และ AUD4) จังหวัดปราจีนบุรี 1 ไอโซเลต (PHA1) และจังหวัดอุทัยธานี 1 ไอโซเลต (AUT1)

Type II มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ไอโซเลต (KAN1) และจังหวัดปราจีนบุรี 1 ไอโซเลต (PHA2)

Type III มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเกลี้ยง ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 ไอโซเลต (CHA4) และจังหวัดหนองบัวลำภู 1 ไอโซเลต (NON5)

Type IV มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย ประกอบด้วย 7 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ไอโซเลต (KAN4) จังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ไอโซเลต (CHA2 และ CHA3) จังหวัดนครปฐม 1 ไอโซเลต (NAK1) จังหวัดราชบุรี 1 ไอโซเลต (RAT1) จังหวัดอุดรธานี 1 ไอโซเลต (AUD3) และจังหวัดอุทัยธานี 1 ไอโซเลต (AUT2)

Type V มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยัก ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี (KAN3)

Type VI มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีแบบวงแหวน ขอบโคโลนีเกลี้ยง ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดขอนแก่น 1 ไอโซเลต (KHO2) และจังหวัดหนองบัวลำภู 1 ไอโซเลต (NON4)

Type VII มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย ประกอบด้วย 3 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ไอโซเลต (CHA1 และ CHA5) และจังหวัดนครปฐม 1 ไอโซเลต (NAK2)

Type VIII มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยัก ประกอบด้วย 5 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม 1 ไอโซเลต (NAK3) จังหวัดเพชรบูรณ์ 1 ไอโซเลต (PHE2) จังหวัดหนองบัวลำภู 2 ไอโซเลต (NON2 และ NON6) และจังหวัดอุดรธานี 1 ไอโซเลต (AUD1)

จากผลการทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อรา *Ps. eucalypti* มีความผันแปรทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างสูงซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ถึง 8 กลุ่ม โดยสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ ยุทธนา (2549) ศึกษาลักษณะ โคลโลนีของเชื้อรา *C. eucalypti* ทั้ง 9 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีความผันแปรของ ลักษณะขอบ โคลโลนี และการเกาะกันของเส้นใยในแต่ละไอโซเลตค่อนข้างสูง นอกจากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลานาน ลักษณะ โคลโลนีของแต่ละไอโซเลตจะมีการเปลี่ยนแปลงไป คือ โคลโลนีเชื้อราจะสร้างเส้นใยที่มีสีขาว เส้นใยสานกันหลวมๆ พูขึ้นเล็กน้อย เส้นใยลักษณะเช่นนี้จะเกิดขึ้นเป็นกระจุก หรือทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อ ไม่มีการสร้างของเหลวชั้นและโคนิเดีย

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

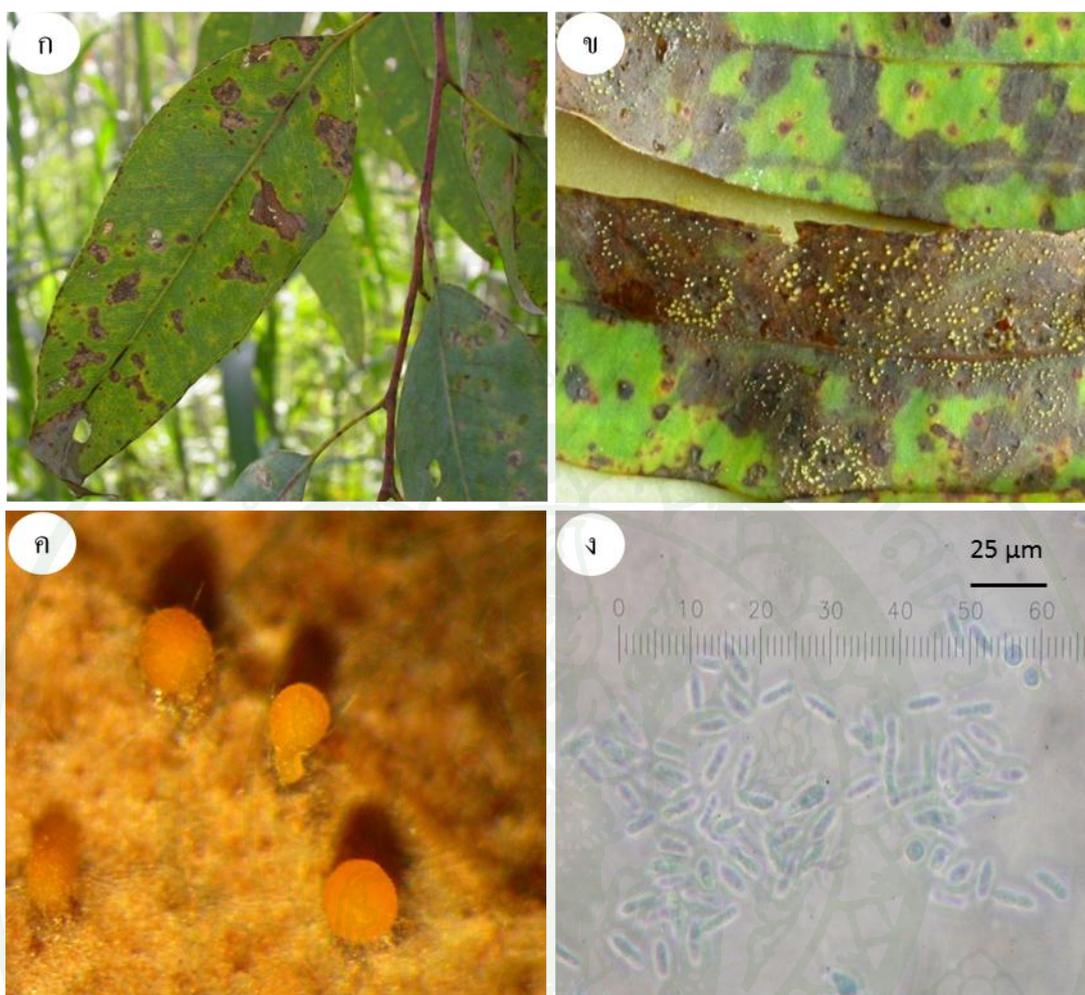
หลังจากศึกษาลักษณะ โคลโลนีของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ซึ่งมีความผันแปรของลักษณะ โคลโลนี เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดมาศึกษาลักษณะต่างๆ ได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะ conidia ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* แต่ละไอโซเลตมีรูปร่างของ conidia เหมือนกันคือ รูปร่างทรงกระบอกหรือรูปรี ปลายมน ฐานมนหรือเรียวแหลม ขนาดของ conidia ของเชื้อรา 36 ไอโซเลต มีค่าอยู่ระหว่าง 4.63-6.71 x 13.33-20.96 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4) ซึ่งมีลักษณะดังที่ Cheewnagkoon *et al.* (2010) ได้อธิบายไว้ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความกว้างและความยาวพบว่า ทั้งความกว้างและความยาวมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) โดยเชื้อราไอโซเลตจากจังหวัดกาญจนบุรี (KAN6) มีขนาดความกว้างสูงสุด 6.71 ไมโครเมตร ไอโซเลตจากจังหวัดอุดรธานี (AUD1) มีขนาดความกว้างน้อยสุด 4.63 ไมโครเมตร ส่วนไอโซเลตจากจังหวัดกาญจนบุรี (KAN4) มีขนาดความยาว สูงสุด 20.96 ไมโครเมตร และไอโซเลตจากจังหวัดปราจีนบุรี (PHA2) มีขนาดความยาวน้อยสุด 13.33 ไมโครเมตร เมื่อนำค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาวของ conidia และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โคลโลนีของทุกไอโซเลต มาหาความสัมพันธ์โดยวิธี Scatter plot 3D พบว่ามีการกระจายตัวของไอโซเลต ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อรามีความหลากหลายหรือมีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ conidia หรือ ขนาด โคลโลนี (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงออกมา (phenotype) ที่สามารถประเมินด้วยสายตา ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ หรือจีโนไทป์ (genotype) เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมอีกครั้ง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP และการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มาช่วยในการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วย เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 2 ไอโซเลตของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส และแหล่งที่เก็บรวบรวม

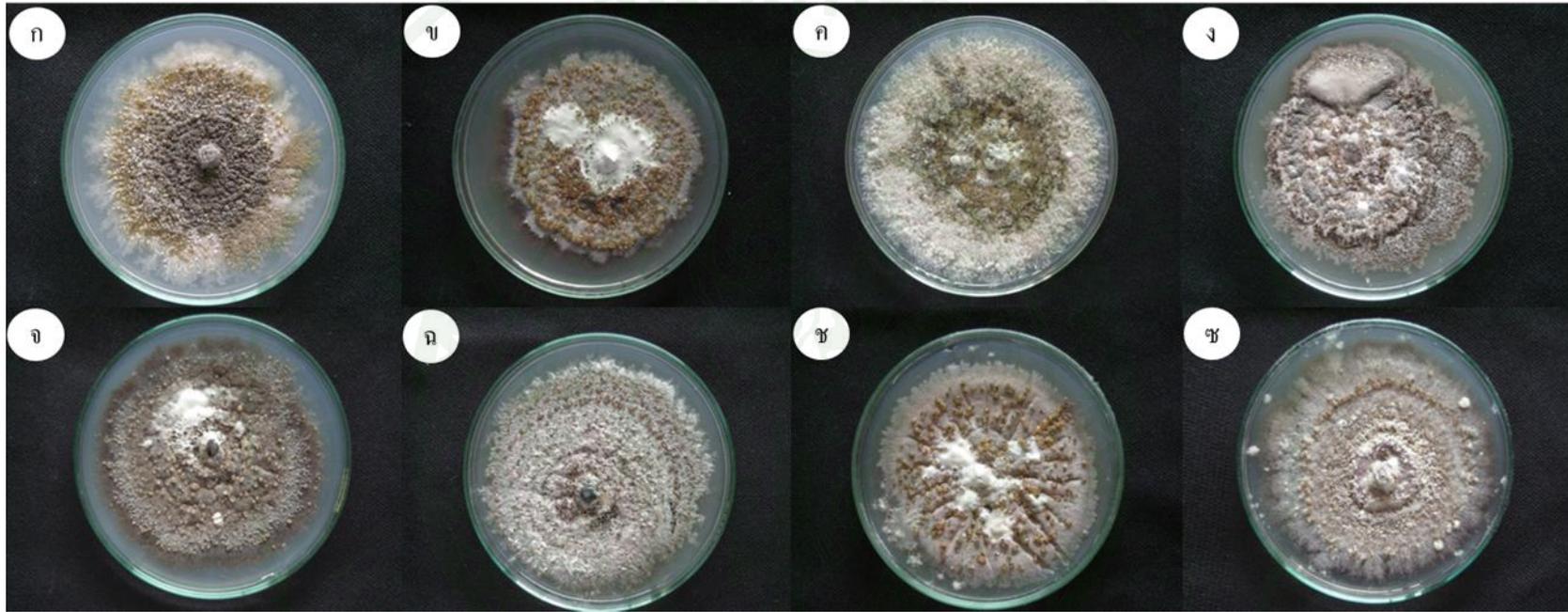
Isolate No.	Location	Isolate Code
1	อ. เมือง จ. กาญจนบุรี	KAN1
2	อ. เมือง จ. กาญจนบุรี	KAN2
3	อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี	KAN3
4	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี	KAN4
5	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี	KAN5
6	อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี	KAN6
7	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	KHO1
8	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	KHO2
9	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	KHO3
10	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	KHO4
11	อ. สันามชัยเขต จ. ฉะเชิงเทรา	CHA1
12	อ. สันามชัยเขต จ. ฉะเชิงเทรา	CHA2
13	อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา	CHA3
14	อ. ท่าตะเกียบ จ. ฉะเชิงเทรา	CHA4
15	อ. ท่าตะเกียบ จ. ฉะเชิงเทรา	CHA5
16	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	NAK1
17	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	NAK2
18	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	NAK3

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolate No.	Location	Isolate Code
19	อ. ศรีเทพ จ. เพชรบูรณ์	PHE1
20	อ. ศรีเทพ จ. เพชรบูรณ์	PHE2
21	อ. ศรีเทพ จ. เพชรบูรณ์	PHE3
22	อ. บ้านคา จ. ราชบุรี	RAT1
23	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON1
24	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON2
25	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON3
26	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON4
27	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON5
28	อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู	NON6
29	อ. สร้างคอม จ. อุดรธานี	AUD1
30	อ. สร้างคอม จ. อุดรธานี	AUD2
31	อ. สร้างคอม จ. อุดรธานี	AUD3
32	อ. สร้างคอม จ. อุดรธานี	AUD4
33	อ. กบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	PHA1
34	อ. กบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	PHA2
35	อ. สว่างอารมณ์ จ. อุทัยธานี	AUT1
36	อ. สว่างอารมณ์ จ. อุทัยธานี	AUT2



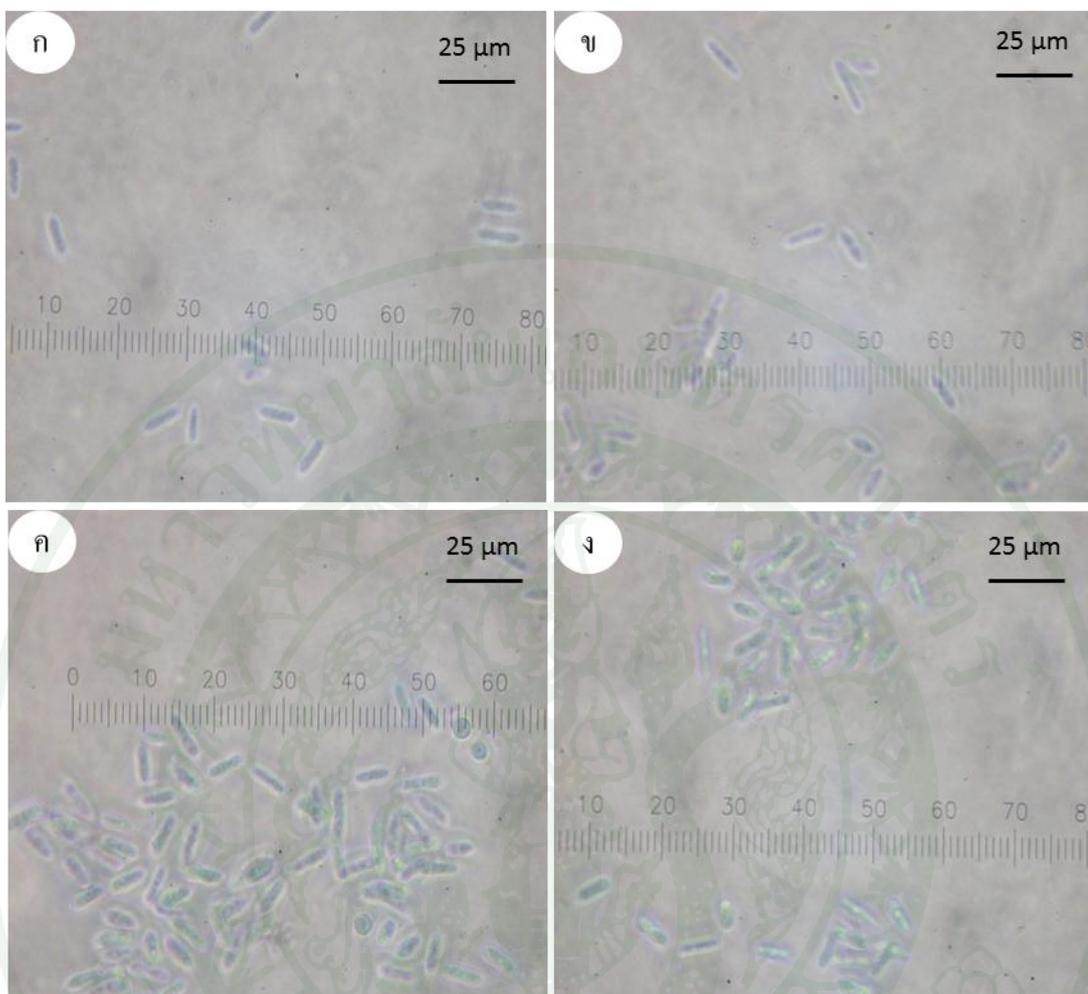
ภาพที่ 2 อาการของโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ก. อาการโรคใบจุดใบไหม้ของยูคาลิปตัส ข. กลุ่มของ conidia บนผิวใบยูคาลิปตัส ค. กลุ่มของ conidia บนผิวใบยูคาลิปตัสภายใต้กล้องสเตอริโอ (10X) ง. ลักษณะของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X)



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* บนอาหาร PDA ก. ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง (Type I) ข. ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (Type II) ค. ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเกลี้ยง (Type III) ง. ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (Type IV) จ. ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยัก (Type V) ฉ. ผิวหน้าโคโลนีแบบวงแหวน ขอบโคโลนีเกลี้ยง (Type VI) ช. ผิวหน้าโคโลนีย่น ขอบโคโลนีเรียบ (Type VII) ซ. ผิวหน้าโคโลนีย่น ขอบโคโลนีหยัก (Type VIII)

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

Type	ผิวหน้าโคโลนี	ขอบโคโลนี	Isolate Code										
I	เรียบ	ขอบเกลี้ยง	KAN2	KAN5	KAN6	KHO1	KHO3	KHO4	PHE1	PHE3	NON1	NON3	AUD1
			AUD4	PHA1	AUT1								
II	เรียบ	ขอบหยักเล็กน้อย	KAN1	PHA2									
III	ขรุขระ	ขอบเกลี้ยง	CHA4	NON5									
IV	ขรุขระ	ขอบหยักเล็กน้อย	KAN4	CHA2	CHA3	NAK1	RAT1	AUD3	AUT2				
V	ขรุขระ	ขอบหยัก	KAN3										
VI	เป็นวงแหวน	ขอบเกลี้ยง	KHO2	NON4									
VII	ผิวหน้าขุ่น	ขอบเกลี้ยง	CHA1	CHA5	NAK2								
VIII	ผิวหน้าขุ่น	ขอบหยักเล็กน้อย	NAK3	PHE2	NON2	NON6	AUD2						



ภาพที่ 4 ลักษณะ conidia ของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X) ก. ไอโซเลตที่เก็บจาก อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี (KAN4) ข. ไอโซเลตที่เก็บจาก อ. สว่างคอม จ. อุตรธานี (AUD1) ค. ไอโซเลตที่เก็บจาก อ. กบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี (PHA2) ง. ไอโซเลตที่เก็บจาก อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี (KAN6)

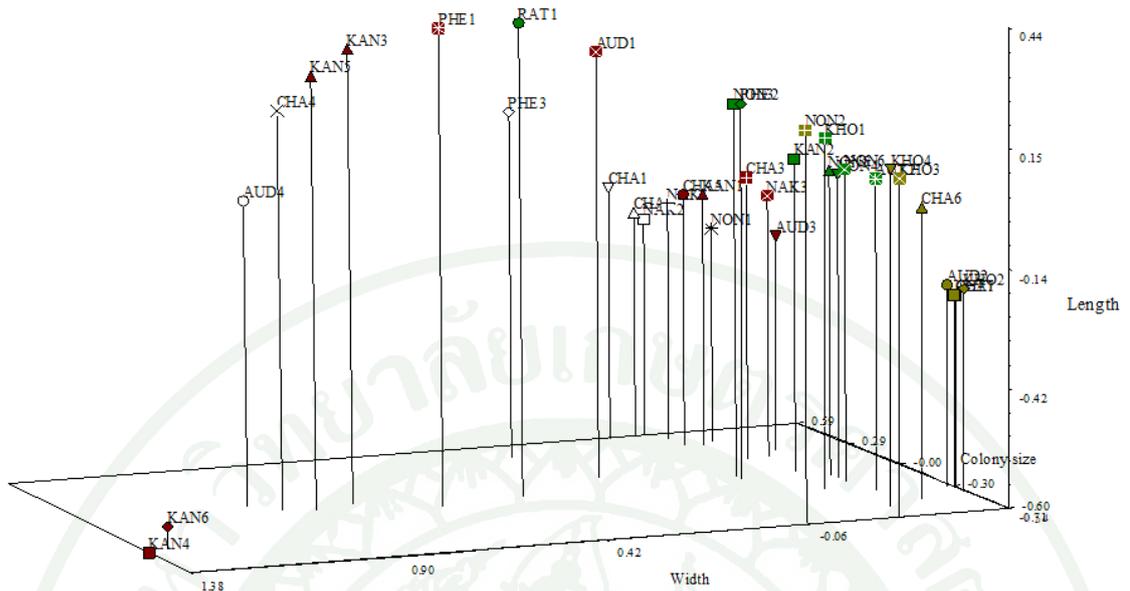
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน และค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาวของ conidia

Isolate Code	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.)	ขนาดโคโคนีเดีย (ไมโครเมตร)	
		ความกว้าง	ความยาว
KAN1	4.78 fg	5.00 de	14.50 ef
KAN2	5.55 cd	5.08 de	14.63 ef
KAN3	4.78 fg	5.00 de	17.38 bc
KAN4	4.74 fg	6.29 b	20.96 a
KAN5	4.78 fg	5.00 de	17.75 b
KAN6	4.77 fg	6.71 a	20.38 a
KHO1	6.00 bc	5.00 de	14.79 ef
KHO2	6.40 ab	5.00 de	13.46 jk
KHO3	7.22 ab	5.13 de	14.63 ef
KHO4	6.73 ab	5.08 de	14.63 ef
CHA1	4.15 ij	5.00 de	14.75 ef
CHA2	4.12 jk	5.00 de	14.46 fg
CHA3	5.17 de	5.17 de	14.58 ef
CHA4	4.44 hi	5.00 de	17.96 b
CHA5	4.70 fg	5.25 d	14.58 ef
NAK1	4.50 gh	5.04 de	14.50 ef
NAK2	4.08 kl	4.88 ef	14.33 gh
NAK3	5.16 de	5.00 de	14.38 gh

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate Code	เส้นผ่านศูนย์กลาง	ขนาดโคนินเดีย (ไมโครเมตร)	
	โคโลนี (ชม.)	ความกว้าง	ความยาว
PHE1	5.42 cd	5.00 de	17.04 bc
PHE2	5.61 cd	5.00 de	15.08 ef
PHE3	4.11 jk	5.00 de	15.67 de
RAT1	5.45 cd	5.00 de	16.46 cg
NON1	4.58 gh	5.00 de	14.17 gh
NON2	7.38 a	4.96 de	15.46 de
NON3	5.55 cd	4.96 de	15.08 ef
NON4	5.73 cd	5.00 de	14.46 fg
NON5	5.70 cd	5.00 de	14.50 ef
NON6	5.83 cd	5.00 de	14.50 ef
AUD1	5.16 de	4.63 g	15.75 de
AUD2	6.15 ab	5.00 de	13.54 ij
AUD3	4.96 ef	5.00 de	14.00 hi
AUD4	3.72 l	5.58 c	18.13 b
PHA1	6.48 ab	4.83 fg	14.21 gh
PHA2	6.20 ab	4.83 fg	13.33 k
AUT1	6.20 ab	5.04 de	13.42 k
AUT2	6.13 cd	5.04 de	14.46 fg
ค่า C.V. (%)	15.30	4.02	5.42

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 Morphometry scatter plot 3D ของความยาว ความกว้างของ conidia และ
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

3. การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ps. eucalypti* จำนวน 33 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer 4 คู่ ได้แก่ M+G/E+ACT, M+GT/E+AC, M+GT/E+AG และ M+GTA/E+A เกิดแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 178 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบ คิดเป็น 43.25% (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 6-9) เมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธีการของ Dice (Dice's similarity) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA ในโปรแกรม NTSYS พบว่าเชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลต ที่นำมาวิเคราะห์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เมื่อแบ่งกลุ่มที่ค่า similarity coefficient 0.45 และค่า cophenetic correlation (matrix correlation) 0.955 แบ่งได้ 10 กลุ่ม (ภาพที่ 10-11) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อรา 22 ไอโซเลตคือ จากจังหวัดกาญจนบุรี 5 ไอโซเลต (KAN2, KAN3, KAN4, KAN5 และ KAN6) ฉะเชิงเทรา 5 ไอโซเลต (CHA1, CHA2, CHA3, CHA4 และ CHA5) นครปฐม 1 ไอโซเลต (NAK1) อุตรธานี 2 ไอโซเลต (AUD3 และ AUD4) ขอนแก่น 3 ไอโซเลต (KHO1, KHO2 และ KHO3) เพชรบูรณ์ 3 ไอโซเลต (PHE1, PHE2 และ PHE3) ราชบุรี 1 ไอโซเลต (RAT1) และหนองบัวลำภู 2 ไอโซเลต (NON1 และ NON6) โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่หลากหลายประกอบด้วย 7 Type ได้แก่ Type I (ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง) Type III (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเกลี้ยง) Type IV (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย) Type V (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยัก) Type VI (ผิวหน้าโคโลนีแบบวงแหวน ขอบโคโลนีเกลี้ยง) Type VII (ผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย) และ Type VIII (ผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยัก)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต จากจังหวัดนครสวรรค์ (NAK3) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type VIII (ผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยัก)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต จากจังหวัดนครปฐม (NAK2) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type VII (ผิวหน้าโคโลนีขุ่น ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลตจากจังหวัดหนองบัวลำภู (NON3 และ NON4) มีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คนละแบบ คือ Type I (ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง) และ Type VI (ผิวหน้าโคโลนีแบบวงแหวน ขอบโคโลนีเกลี้ยง)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลตจากจังหวัดหนองบัวลำภู (NON2) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type VIII (ผิวหน้าโคโลนีเย้น ขอบโคโลนีหยัก)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลตจากจังหวัดขอนแก่น (KHO4) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type I (ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง)

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลตจากจังหวัดอุทัยธานี (AUT2) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type IV (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย)

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลตจากจังหวัดปราจีนบุรี (PHA2) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type II (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย)

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลตจากจังหวัด หนองบัวลำภู 1 ไอโซเลต (NON5) และจังหวัดอุตรธานี 1 ไอโซเลต (AUD2) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คนละแบบ คือ Type III (ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเกลี้ยง) และ Type VIII (ผิวหน้าโคโลนีเย้น ขอบโคโลนีหยัก)

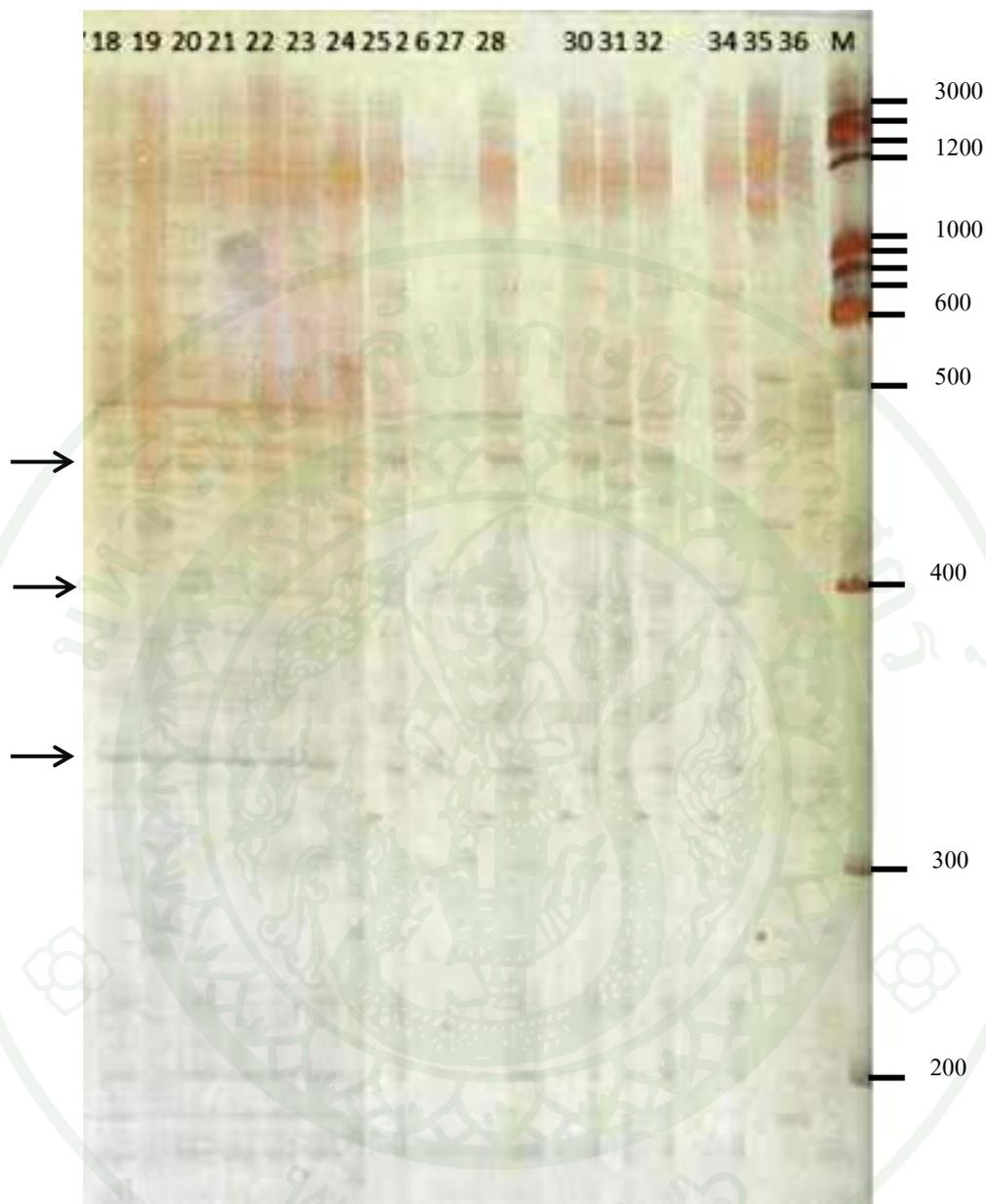
กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลตจากจังหวัดอุทัยธานี (AUT1) ซึ่งมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นแบบ Type I (ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง)

จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีความหลากหลายทางจีโนไทป์ นอกจากนี้การกระจายตัวของตัวอย่างในกลุ่มต่างๆ แสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มไม่มีความสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บรวบรวมเชื้อ และลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลตของเชื้อราที่มาจากคนละจังหวัด และมีลักษณะโคโลนีหลายแบบ ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อรามีการแพร่ระบาดไปยังแหล่งต่างๆ ได้ เช่น ติดไปกับต้นกล้ายูคาลิปตัส และเชื้อราชนิดนี้มีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ทำให้มีการสร้างสปอร์จำนวนมากที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน จึงทำให้เชื้อราที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ รวมกลุ่มกันโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP ซึ่งทำให้ในแต่ละแหล่งอาจพบเชื้อรานี้มากกว่า 1 สายพันธุ์ สำหรับเชื้อราชนิดนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่กว้างขวางมากนัก แต่มีรายงานของเชื้อราในกลุ่มเดียวกันที่ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน El-Khalifeh *et al.* (2009) ได้ใช้เทคนิค AFLP ในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) ของเชื้อรา *Fusarium* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในข้าว

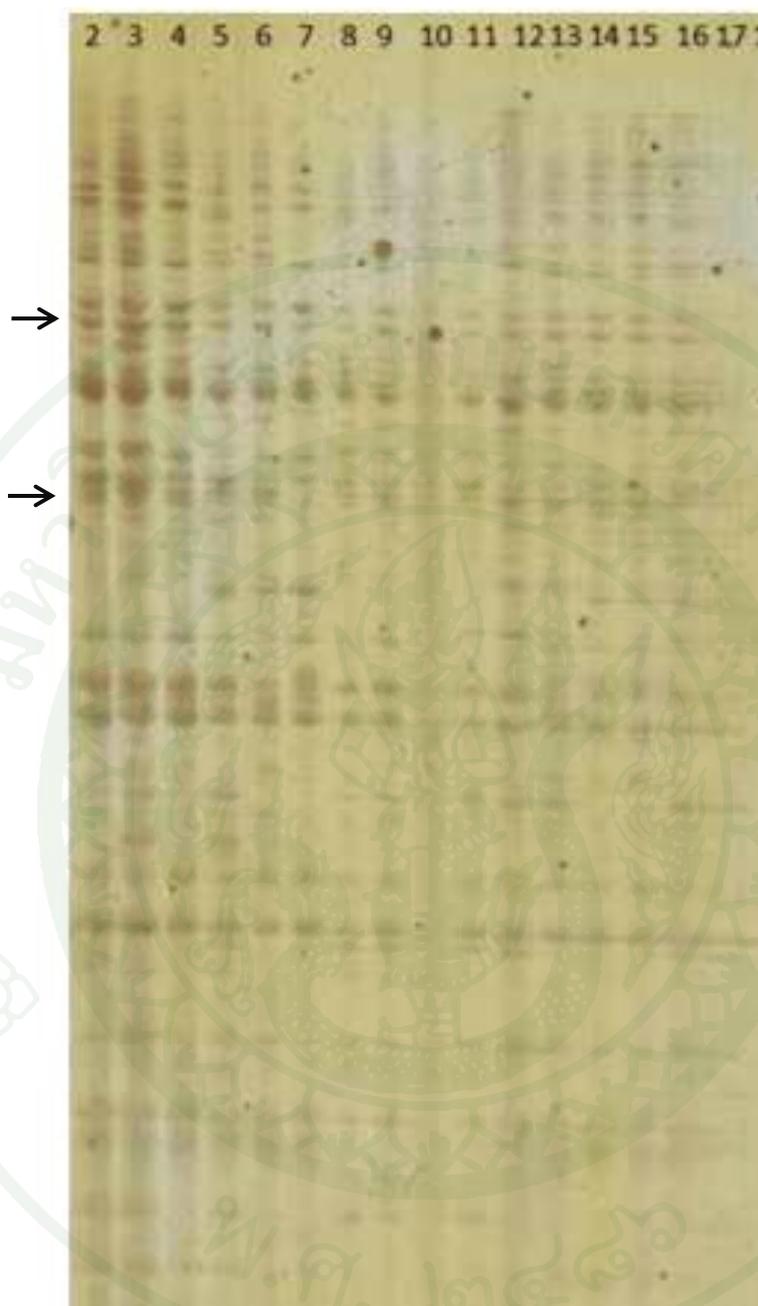
durum wheat (*Triticum turgidum* L.var.durum) พบว่า จากการวิเคราะห์ข้อมูลจาก AFLP สามารถแยกไอโซเลตเชื้อรา *Fusarium* ได้เป็น 2 กลุ่ม แม้ว่าทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางลักษณะสัณฐานวิทยา นอกจากนี้การแบ่งกลุ่มด้วยข้อมูล AFLP ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งมาที่ของเชื้อรา หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* หรือในรายงานฉบับอื่นที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรครากับพืชชนิดต่างๆ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่า เมื่อวิเคราะห์เชื้อราทั้ง 18 formae specialis ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR นั้น การจัดกลุ่มของเชื้อราไม่สอดคล้องกับพืชอาศัย และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเชื้อราชนิดนี้อาจจะไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มใน Phylogenetic tree เสมอไป (Bogale *et al.*, 2006) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *Ps. eucalypti* มีสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างไอโซเลตค่อนข้างต่ำ โดยมีไอโซเลตที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่ำกว่า 35% 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตจากจังหวัดอุทัยธานี (AUT1), จังหวัดหนองบัวลำภู(NON5), จังหวัดอุดรธานี (AUD2) และจังหวัดปราจีนบุรี (PHA2) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ ใดๆก็ตามมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP โดย Baayen *et al.* (2000) พบว่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตของเชื้อรา *F. proliferatum* ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่ำถึง 40% หรือในเชื้อราชนิดอื่นเช่น *Ganoderma* spp. เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตด้วยเทคนิค AFLP พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 33-75% เช่นกัน ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่มีค่าต่ำ อาจเนื่องจากเชื้อรามีความหลากหลายค่อนข้างสูง ทำให้ลักษณะที่แสดงออกหรือฟีโนไทป์ และจีโนไทป์มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราได้ อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดของเชื้อรานอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วสามารถใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ร่วมด้วย เพื่อให้การจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) และจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total band) จากการวิเคราะห์ AFLP ด้วย 4 คู่ไพรเมอร์ (primer combination)

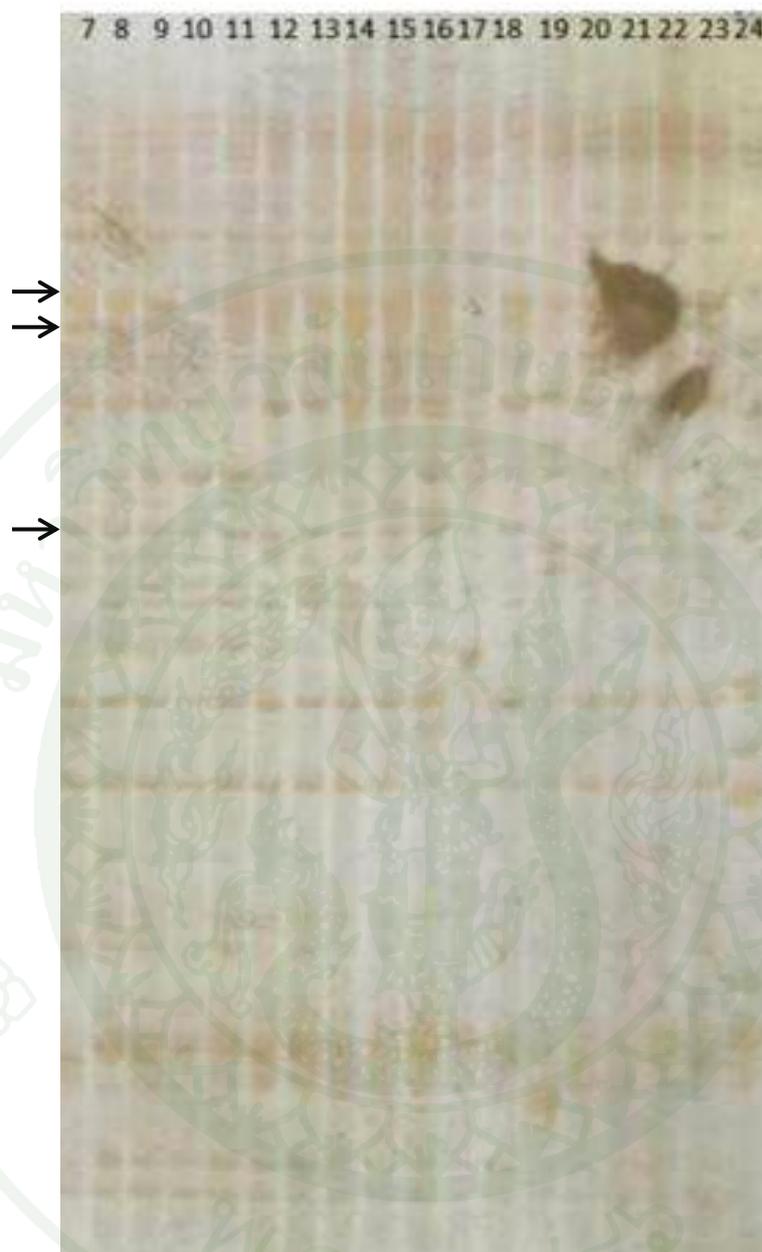
primer combination	total band	polymorphic band
M+G/E+ACT	40	12
M+GT/E+AC	57	31
M+GT/E+AG	31	15
M+GTA/E+A	50	19



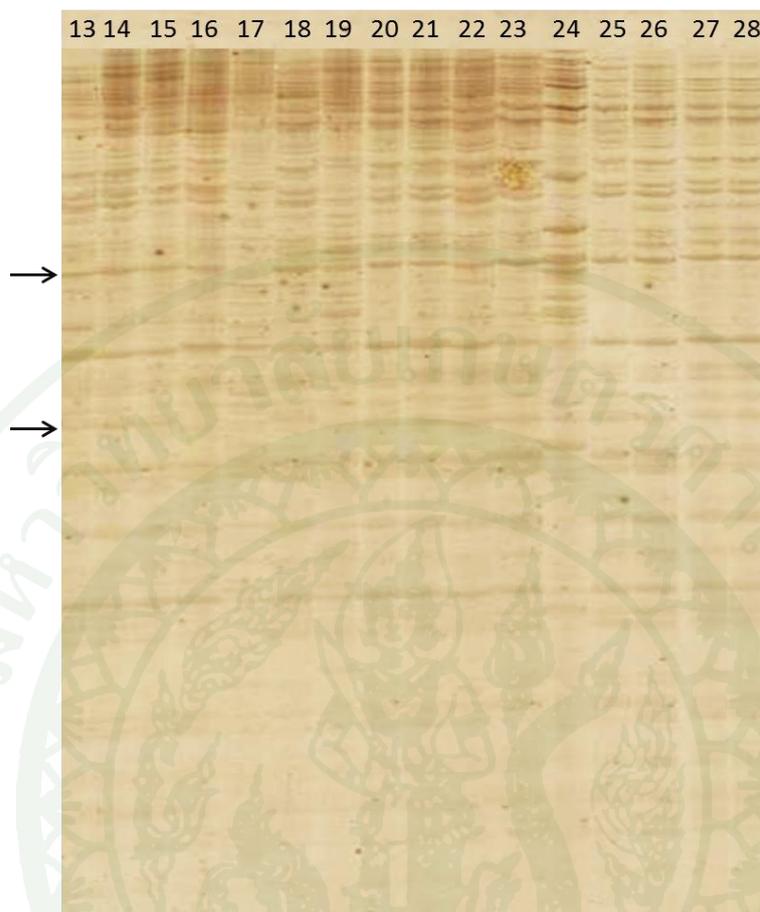
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+G/E+ACT บริเวณที่ถูกครีซี คือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง ตัวเลขด้านบนแปล คือ Isolate No. ของเชื้อราดังที่ปรากฏในตารางที่ 2 M = 100 bp Plus DNA Ladder



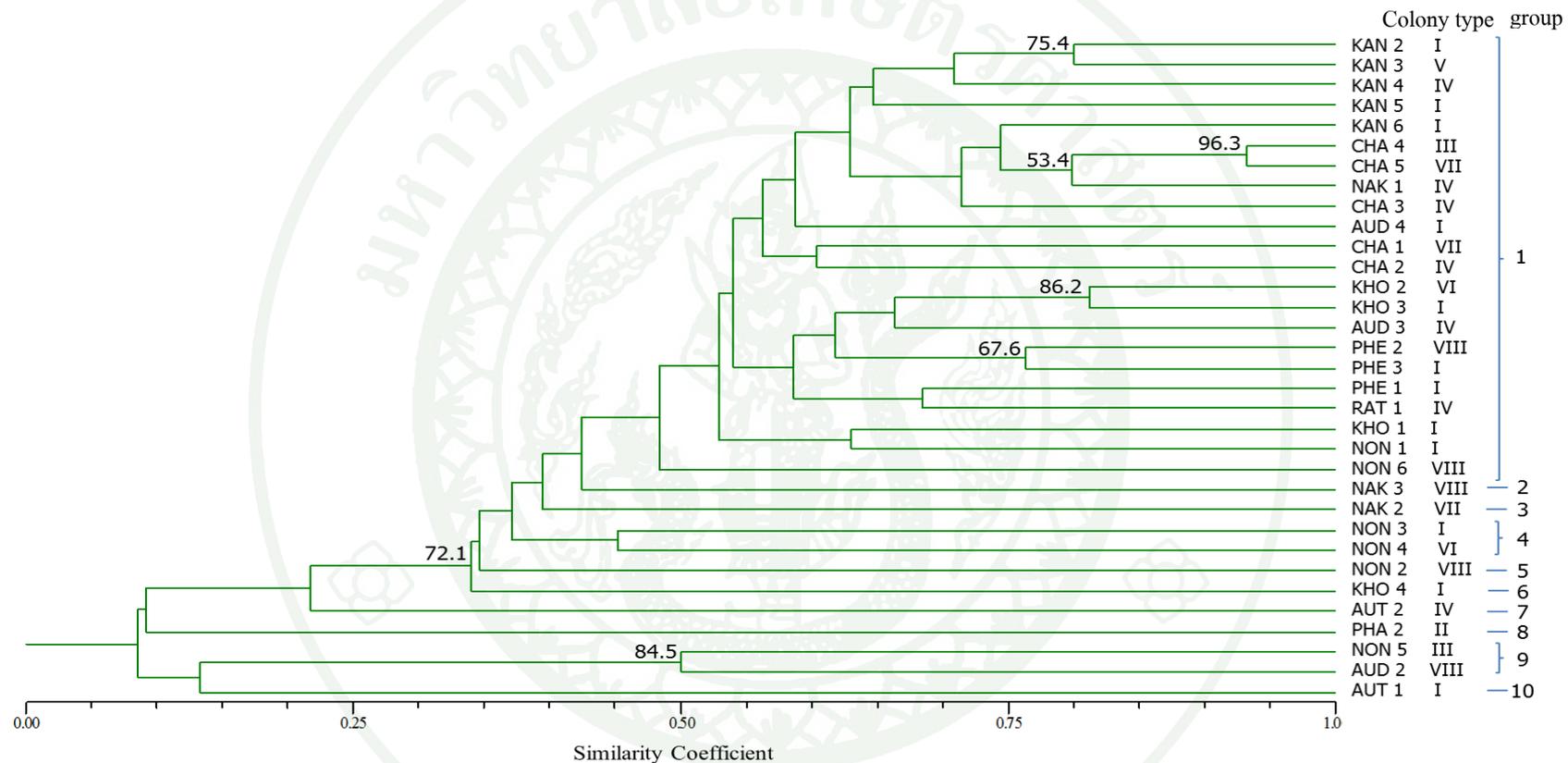
ภาพที่ 7 ไลบรารีดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GT/E+AC บริเวณที่ถูกครีซ คือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง ตัวเลขด้านบนแถบ คือ Isolate No. ของเชื้อราดังที่ปรากฏในตารางที่ 2



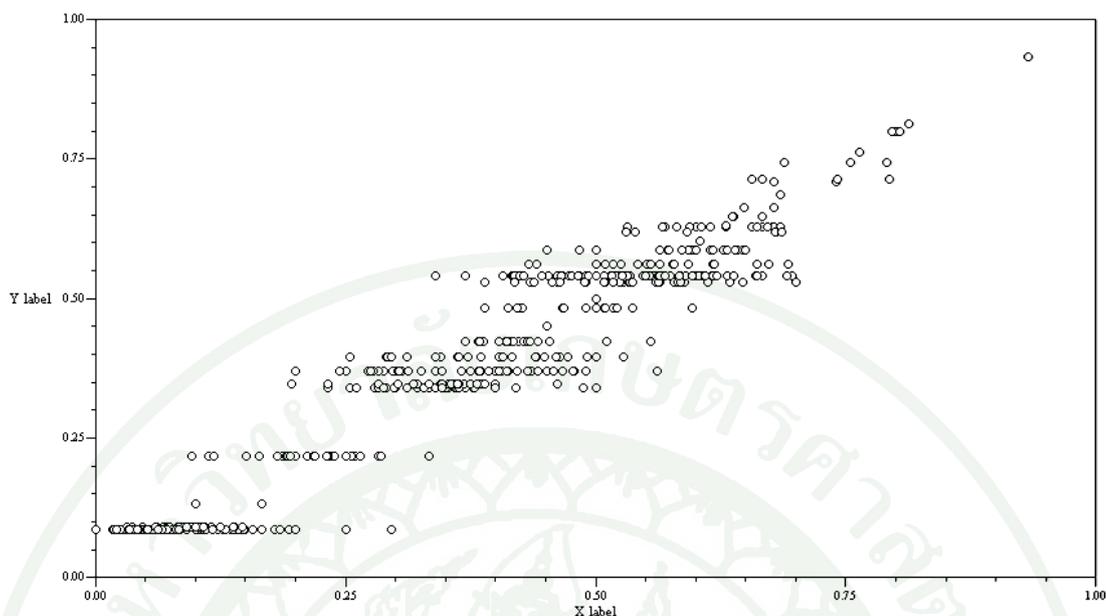
ภาพที่ 8 ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GT/E+AG บริเวณที่ลูกศรชี้ คือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ตัวเลขด้านบนเจล คือ Isolate No. ของเชื้อราดังที่ปรากฏในตารางที่ 2



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ M+GTA/E+A บริเวณที่ถูกครีซคือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง ตัวเลขด้านบนเจลคือ Isolate No. ของเชื้อราดังที่ปรากฏในตารางที่ 2



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 33 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค AFLP โดยวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 77 polymorphic bands ด้วยวิธี Dice และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.02 ค่าที่แสดงบนกิ่งคือค่า bootstrap ที่คำนวณจาก 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม Winboot I-VII = colony type บนอาหาร PDA ดังที่อธิบายไว้ในตารางที่ 3



ภาพที่ 11 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มที่มีค่า cophenetic correlation 0.955

โดยการคำนวณค่า similarity และ clustering ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.02

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* โดยการสุ่มจากการจัดกลุ่มลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา 5 type ได้แก่ type III ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเกลี้ยง (CHA4) type IV ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (CHA3 และ NAK1) type V ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีหยัก (KAN3) type VI ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีแบบวงแหวน ขอบโคโลนีเกลี้ยง (KHO2) และ type VII ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีขยับ ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (CHA1, CHA2 และ NAK2) ได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 566 – 582 bp จากนั้นรายงานเข้าสู่ฐานข้อมูลของ GeneBank และได้รับ Accession number รวม 8 ไอโซเลต ดังนี้ AB627948 (KAN3), AB630954 (KHO2), AB630955 (CHA1), AB630956 (CHA2), AB630957 (CHA3), AB630958 (CHA4), AB630959 (NAK1) และ AB630960 (NAK2) (ตารางที่ 6) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์โดยเริ่ม Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* (GU973532, GU973530, GU973529, GU973519, GU973518 และ GU973515) เชื้อรา *Plagiostoma devexum* (EU255001) และ *Gnomonia rhododendri* (EU255044) ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเมื่อทำ alignment แล้วได้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับวิเคราะห์ทั้งหมด 503-514 bp จากนั้นนำข้อมูล alignment ทั้งหมดมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน พบว่าเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลตมีความเหมือนคล้ายกัน 89.58 – 99.03% และเหมือนคล้ายกับเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่มีรายงานอยู่แล้ว 95.16 - 98.83% (ภาพที่ 12) เมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนแล้วนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่า bootstrap (%) จำนวน 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า เชื้อรา *Ps. eucalypti* ทั้งหมดแยกกลุ่มออกจากเชื้อราชนิดอื่น (out group) ด้วยค่า bootstrap สูงสุด 100% (ภาพที่ 13) อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของเชื้อรา *Ps. eucalypti* นั้นสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (sub group) ได้แก่ subgroup 1 ประกอบด้วย AB630959 (NAK1), AB630957 (CHA3), GU973530, GU973532, GU973515, GU973518, GU973529, GU973519, AB630956 (CHA2), AB630958 (CHA4) และ AB627948 (KAN3) ซึ่งสนับสนุนด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 87.6% subgroup 2, 3 และ 4 มีเพียงตัวอย่างเดียวคือ AB630955 (CHA1), AB630954 (KHO2) และ AB630960 (NAK2) ตามลำดับ ซึ่งแยกออกจาก subgroup 1 ด้วยค่า bootstrap ระหว่าง 95 – 100% จากการวิเคราะห์ข้อมูลนี้ได้ใช้ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่ Cheewangkoon *et al.* (2010) ได้รายงานไว้ใน GenBank เพียงชนิดเดียวไม่ได้้นำเชื้อรา *Pseudoplagiostoma* ชนิดอื่น ได้แก่ *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* มาวิเคราะห์ด้วย เนื่องจาก Cheewangkoon ได้รายงานไว้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ large subunit (LSU) ไม่สามารถ

แยกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อรา *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* ออกจากกันได้ แต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อราได้ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ beta-tubulin gene (TUB) ร่วมกัน และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* พบว่ามีความเหมือนกันมาก เมื่อเลี้ยงในอาหาร OA และ PDA แต่สามารถที่จะแยกความแตกต่างของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร MEA โดยที่เชื้อรา *Ps. oldii* จะมีผนังของ conidia เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ และมีขนาด (11-14) – (17-20) X (6-7) – (9-11) ไมโครเมตร อัตราส่วน (1.9-2.3) - 2.5 : 1 (l:w) เชื้อรา *Ps. eucalypti* มี conidia รูปร่าง ellipsoid สีใส ขนาด (14-16) – (19-22) X (6-7) – (9-11) ไมโครเมตร อัตราส่วน 2.1:1 (l:w) เชื้อรา *Ps. variabile* มี conidia รูปร่างหลากหลายตั้งแต่ subglobose ถึง bean-shaped สีใส ขนาด (6.5-15.5) – (17-19) X (6.5-7.5) – (9-10.5) ไมโครเมตร อัตราส่วน 2:1 (l:w) โคลนินของเชื้อรา *Ps. variabile* เจริญเติบโตในอาหาร MEA ซ้ำกว่า เชื้อรา *Ps. eucalypti* และ *Ps. oldii* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดกลุ่มเพื่อสร้าง phylogenetic tree พบว่าไอโซเลตของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถแยกกลุ่มจากกันได้ 4 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มโดยการวิเคราะห์ AFLP ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลตได้จำนวนหลายกลุ่มเช่นกัน จากผลการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีการแบ่งที่ต่ำกว่าระดับสปีชีส์ได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความหลากหลายของสายพันธุ์ยูคาลิปตัสที่มีการพัฒนาขึ้นอย่างมากมาย จึงทำให้เชื้อรามีการพัฒนาสายพันธุ์ตามพืชอาศัย (กฤษณา, 2542)

การพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อรานอกจากอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใดส่วนหนึ่งหรือยีนเดี่ยว (single gene) ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ การใช้หลายยีน (multiple gene) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง อย่างเช่น Cheewangkoon *et al.* (2010) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 ยีน ได้แก่ ITS และ β -tubulin ในการจำแนกชนิดของ *Ps. eucalypti* ออกจากชนิดอื่นๆ นอกจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ยังมีการพัฒนาไพรเมอร์ที่เรียกว่า nested primer ที่จำเพาะต่อเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังเช่น การศึกษาของ Pandey *et al.* (2010) ซึ่งได้พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *Cylindrocladium quinqueseptatum* เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคใบและกล้าไหม้ในยูคาลิปตัส การใช้ nested PCR ช่วยให้สามารถตรวจสอบโรคนี้ได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการทำให้ PCR 2 รอบ รอบแรกใช้ universal primer คือ ITS1 และ ITS4 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาด 492 bp ซึ่งการใช้ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS ของเชื้อราที่เข้าทำลายยูคาลิปตัสได้หลายชนิดและยังสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Cylindrocladium* ชนิดอื่นได้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *C. quinqueseptatum* โดยออกแบบจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ universal primer ในครั้งแรก ซึ่งได้ออกแบบตรงส่วนที่มีลำดับเบสที่แตกต่างมากที่สุดจากเชื้อราชนิดอื่น ได้แก่ ไพรเมอร์ ITSFCQ-1f

(5'ATCTCTTGGTTCTGGCATGC3') และ ITSFCQ-1r (5'GAGACTCCAGAGCGAGGTGT3') ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาด 245 bp นอกจากนี้ในการศึกษานี้ พบว่าการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITSFCQ-1f และ ITSFCQ-1r สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. quinqueseptatum* ที่ได้ทำการปลูกเชื้อลงในยูคาลิปตัสเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งยังไม่แสดงอาการของโรค และยังสามารถตรวจสอบในดินและในเนื้อเยื่อพืชที่มีการติดเชื้อราชนิดนี้ได้เช่นกัน การทำ PCR ในรอบที่ 1 เป็นการเพิ่ม DNA เป้าหมายของเชื้อราให้มีปริมาณมากพอเพื่อใช้ในการทำ PCR รอบที่ 2 สำหรับตรวจสอบเชื้อรา *C. quinqueseptatum*

นอกจากการพัฒนาที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการใช้เทคนิคที่เรียกว่า RFLP โดยการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นส่วนหนึ่ง เช่น ITS แล้วสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หรือชนิดของเชื้อราได้จากรูปแบบ (pattern) ที่เอนไซม์นั้นไปย่อยชิ้นส่วนดังกล่าวในการศึกษานี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และที่มีรายงานใน GenBank ร่วมกับสปีชีส์อื่นๆ มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อราชนิดนี้ได้

ตารางที่ 6 ไอโซเลตของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* และเชื้อราอื่นจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาวิเคราะห์ข้อมูล

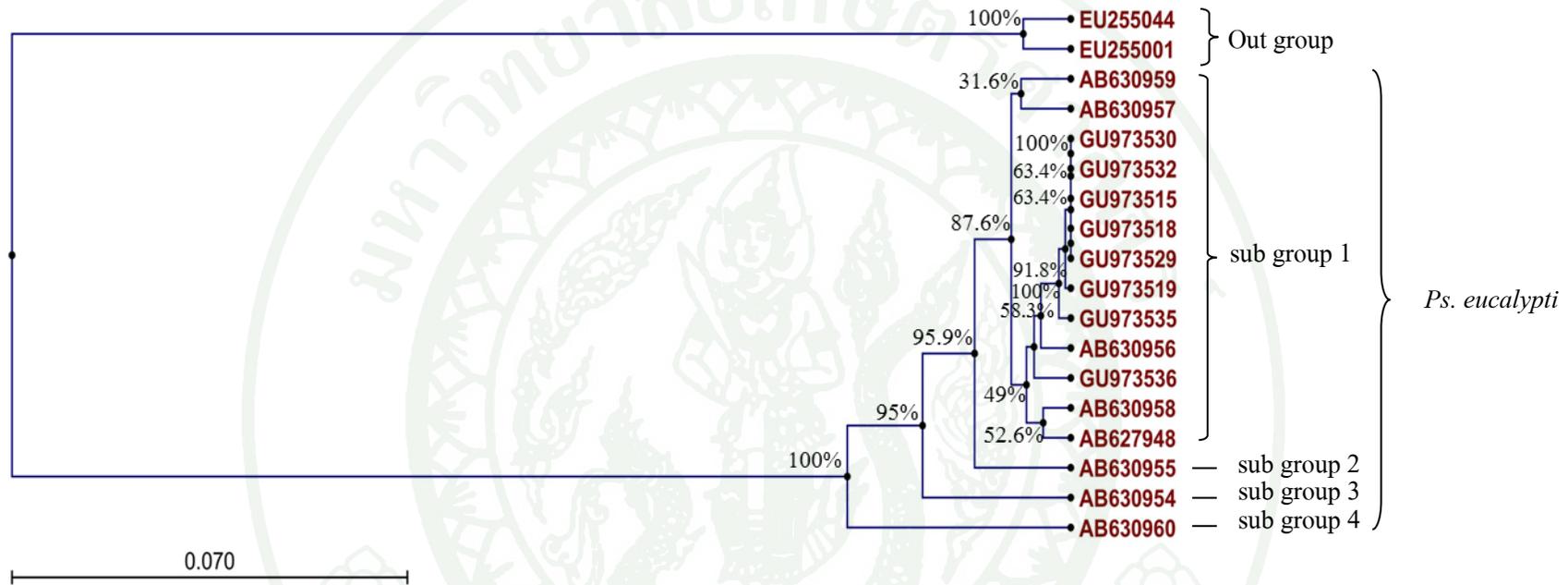
ไอโซเลต	Location	GenBank accession number	ชื่อเชื้อรา
KAN3	Thailand	AB627948	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
KHO2	Thailand	AB630954	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CHA1	Thailand	AB630955	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CHA2	Thailand	AB630956	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CHA3	Thailand	AB630957	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CHA4	Thailand	AB630958	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
NAK1	Thailand	AB630959	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
NAK2	Thailand	AB630960	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CBS115722	Australia	GU973535 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma oldii</i>
CBS113067	Uruguay	GU973536 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma variabile</i>
CBS115788	Thailand	GU973532 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CPC13473	Thailand	GU973530 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CPC13471	Thailand	GU973529 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CPC14075	China	GU973519 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CPC14163	Uruguay	GU973518 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
CPC12292	Bhutan	GU973515 ^{1/}	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>
		EU255001 ^{1/}	<i>Plagiostoma devexum</i>
		EU255044 ^{1/}	<i>Gnomonia rhododendri</i>

หมายเหตุ ^{1/} มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

EU255001, EU255044 คือ Out group เพื่อเปรียบเทียบในการวิเคราะห์ข้อมูล

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
GU973532	1		100.00	100.00	100.00	100.00	99.81	98.83	98.45	98.06	98.07	99.03	97.09	92.86	95.35	71.26	71.07
GU973530	2	100.00		100.00	100.00	100.00	99.81	98.83	98.45	98.06	98.07	99.03	97.09	92.86	95.35	71.26	71.07
GU973529	3	100.00	100.00		100.00	100.00	99.81	98.83	98.45	98.06	98.07	99.03	97.09	92.86	95.35	71.26	71.07
GU973518	4	100.00	100.00	100.00		100.00	99.81	98.83	98.45	98.06	98.07	99.03	97.09	92.86	95.35	71.26	71.07
GU973515	5	100.00	100.00	100.00	100.00		99.81	98.83	98.45	98.06	98.07	99.03	97.09	92.86	95.35	71.26	71.07
GU973519	6	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81		99.03	98.25	97.87	97.87	98.83	96.89	92.66	95.16	71.07	70.88
AB627948	7	98.83	98.83	98.83	98.83	98.83	99.03		99.03	98.45	98.45	98.64	96.70	93.24	94.96	70.36	70.17
AB630958	8	98.45	98.45	98.45	98.45	98.45	98.25	99.03		98.06	98.07	98.25	96.31	92.86	94.57	70.96	70.77
AB630957	9	98.06	98.06	98.06	98.06	98.06	97.87	98.45	98.06		98.26	97.87	95.93	93.63	94.38	70.55	70.36
AB630959	10	98.07	98.07	98.07	98.07	98.07	97.87	98.45	98.07	98.26		97.87	95.94	93.44	94.39	70.36	70.17
AB630956	11	99.03	99.03	99.03	99.03	99.03	98.83	98.64	98.25	97.87	97.87		96.89	92.66	95.16	70.94	70.75
AB630955	12	97.09	97.09	97.09	97.09	97.09	96.89	96.70	96.31	95.93	95.94	96.89		90.93	94.54	68.83	68.64
AB630960	13	92.86	92.86	92.86	92.86	92.86	92.66	93.24	92.86	93.63	93.44	92.66	90.93		89.58	69.67	68.91
AB630954	14	95.35	95.35	95.35	95.35	95.35	95.16	94.96	94.57	94.38	94.39	95.16	94.54	89.58		68.83	68.64
EU255001	15	71.26	71.26	71.26	71.26	71.26	71.07	70.36	70.96	70.55	70.36	70.94	68.83	69.67	68.83		98.34
EU255044	16	71.07	71.07	71.07	71.07	71.07	70.88	70.17	70.77	70.36	70.17	70.75	68.64	68.91	68.64	98.34	

ภาพที่ 12 เปรี่เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*



ภาพที่ 13 UPGMA tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* เชื้อรา *Gnomonia rhododendri* (EU255044) และ *Plagiostoma devexum* (EU255001) ด้วยวิธี UPGMA และ ค่าที่แสดงบนกิ่ง คือค่า bootstrap ที่คำนวณจาก 1,000 ซ้ำ โดยโปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5)

5. การวิเคราะห์แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค virtual PCR-RFLP

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* จำนวน 8 ไอโซเลต (AB 627948, AB63095, AB630955, AB630956, AB630957, AB630958, AB63095 และ AB630960) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่มีรายงานอยู่ก่อนหน้านี้ใน GenBank (DDBJ) ได้แก่ เชื้อรา *Ps. eucalypti* (GU973532, GU973530, GU973529, GU973519, GU973518 และ GU973515) เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) (ตารางที่ 6) มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 ชนิด ด้วยโปรแกรม CLC main workbench (version 5.5) ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ *AluI*, *Ctrl0I*, *EcoRI*, *HaeII*, *HaeIII*, *HincII*, *HinfI*, *MseI*, *StuI* และ *TaqI* พบว่าแบบแผน RFLP จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะย่อยได้แบบแผนดังนี้ (ตารางที่ 7)

AluI ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 3 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 503 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB603960) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 163 และ 349 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 165 และ 349 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) ขนาด 166 และ 343 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 162 และ 345 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 166 และ 350 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 167 และ 350 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 165 และ 348 เบส คือเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) แบบที่ 3 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 66, 99 และ 349 เบส คือเชื้อรา *Ps. variabile* GU973536 (ภาพที่ 14)

Ctrl0I ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 1 แบบ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 4, 108 และ 400 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 4, 108 และ 402 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 4, 102 และ 403 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 4, 104 และ 399 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 4, 109 และ 403 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 4, 109 และ 404 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 4, 103 และ 386 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 4, 107 และ 402 เบส คือเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 14)

EcoRI ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 1 แบบ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 254 และ 258 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 258 และ 258 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti*

(AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และ เชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 252 และ 257 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 253 และ 254 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 257 และ 259 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 258 และ 259 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 247 และ 256 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 256 และ 257 เบส คือ เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 14)

HaeII ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 2 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 509 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 63 และ 449 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 63 และ 451 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 59 และ 448 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 64 และ 452 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 64 และ 453 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 63 และ 440 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 63 และ 450 เบส คือ เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 14)

HaeIII ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 2 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาด 7, 106, 120 และ 276 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาด 7, 28, 84, 117 และ 276 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956, AB630958, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 7, 28, 84, 120 และ 275 เบส คือเชื้อรา (AB627948) ขนาด 7, 28, 80, 116 และ 276 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 7, 28, 85, 120 และ 276 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 7, 28, 85, 120 และ 227 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 7, 26, 81, 121 และ 268 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 7, 27, 84, 119 และ 276 เบส คือ เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 14)

HinCII ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 3 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 514 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) ขนาด 513 เบส คือเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 9 และ 503 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956) ขนาด 9 และ 505 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948) ขนาด 9 และ 500 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 9 และ

498 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 9 และ 507 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 6 และ 506 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630958) ขนาด 10 และ 493 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB603960) ขนาด 32 และ 482 เบส คือเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) แบบที่ 3 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 9 151 และ 357 คือ เชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) (ภาพที่ 15)

*Hinf*I ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 1 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาด 8, 88, 92, 149 และ 175 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956, AB630958, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 8, 91, 92, 148 และ 175 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948) ขนาด 8, 91, 92, 149 และ 169 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 8, 87, 92, 149 และ 171 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 8, 91, 92, 149 และ 176 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 8, 91, 95, 150 และ 176 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 8, 90, 92, 147 และ 166 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 8, 90, 92, 149 และ 174 เบส คือ เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 15)

*Mse*I ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 2 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 505 เบส คือ เชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 31 และ 481 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 34 และ 480 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948) ขนาด 34 และ 475 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 34 และ 482 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 34 และ 483 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 35 และ 468 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 33 และ 481 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 33 และ 480 เบส คือ เชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 16)

*Stu*I ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 2 แบบ โดยที่แบบที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 509 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) แบบที่ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 84 และ 428 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 84 และ 430 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 80 และ 427 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955)

ขนาด 85 และ 431 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 85 และ 432 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 81 และ 422 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 84 และ 429 เบส คือเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 16)

TaqI ได้แบบแผนดีเอ็นเอ 1 แบบ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาด 53, 59, 186 และ 214 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630956 และ AB630958) ขนาด 53, 59, 188 และ 214 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB627948, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) และเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ขนาด 53, 59, 189 และ 208 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630954) ขนาด 53, 59, 185 และ 210 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630955) ขนาด 53, 59, 189 และ 215 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630957) ขนาด 53, 59, 190 และ 215 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630959) ขนาด 53, 58, 188 และ 204 เบส คือเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB630960) ขนาด 53, 59, 188 และ 213 เบส คือเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) (ภาพที่ 16)

จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HinCII* สามารถแยกเชื้อรา *Ps. variabile* (GU973536) ออกจากเชื้อรา *Ps. oldii* (GU973535) และเชื้อรา *Ps. eucalypti* (AB603956, AB627948, AB630954, AB630955, AB630957, AB630958, AB630959, AB630960, GU973515, GU973518, GU973519, GU973529, GU973530 และ GU973532) ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 14, 15) ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ctrl0I*, *EcoRI*, *HaeII*, *HaeIII*, *HinI*, *MseI*, *StuI* และ *TaqI* ไม่สามารถแยกไอโซเลตต่างๆ ของเชื้อรา *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* ออกจากกันได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Maharaj and Rampersad (2011) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเท่านั้นที่สามารถแยกเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* และ *C. truncatum* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ และพริกได้ โดยทำการจำแนกเชื้อรา *Collectotrichum* จำนวน 48 ไอโซเลต โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS1, 5.8S และ ITS2 หลังจากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิดพบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *HaeIII*, *PvuII*, *RsaI* และ *Sau3A* สามารถแยก *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ในมะละกอออกจากกันได้ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *ApaI*, *PvuII*, *RsaI* และ *SmaI* สามารถแยก *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ในพริกออกจากกันได้ หรือในการศึกษาของ Krupa (1999) ได้จำแนกเชื้อรา เอกโตไมคอร์ไรซา โดยใช้เทคนิค PCR-RFLC พบว่า การย่อยชิ้นส่วนบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *BsuRI*, *HinI*, *HpaII* และ *TaqI* มีรูปแบบที่เฉพาะสำหรับเชื้อ *Hebeloma crustuliniforme* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญมาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีดังกล่าวจึงใช้ได้ผลกับเชื้อรา *H. crustuliniforme*

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ในเชื้อราบางชนิดเท่านั้น แต่สำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกมา 10 ชนิดนี้ ยังไม่สามารถนำมาใช้ได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ multiple gene เช่นเดียวกับ Cheewangkoon *et al.* (2010) หรือการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์นี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Ps. eucalypti*



ตารางที่ 7 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อรา

Pseudoplagiostoma eucalypti จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *Ctr10I*, *EcoRI*, *HaeII* และ *HaeIII*

GeneBank Accession number	ขนาดชิ้นส่วน (bp)				
	<i>AluI</i>	<i>Ctr10I</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HaeII</i>	<i>HaeIII</i>
AB630956	163, 349	4, 108, 400	254, 258	63, 449	7, 28, 84, 117, 276
AB627948	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 120, 275
AB630954	166, 343	4, 102, 403	252, 257	509	7, 106, 120, 276
AB630955	162, 345	4, 104, 399	253, 254	59, 448	7, 28, 80, 116, 276
AB630957	166, 350	4, 109, 403	257, 259	64, 452	7, 28, 85, 120, 276
AB630958	163, 349	4, 108, 400	254, 258	63, 449	7, 28, 84, 117, 276
AB630959	167, 350	4, 109, 404	258, 259	64, 453	7, 28, 85, 120, 277
AB630960	503	14, 103, 386	247, 256	63, 440	7, 26, 81, 121, 268
EU255001 ^{1/}	148, 332	4, 95, 381	240, 240	6, 474	7, 39, 60, 373
EU255044 ^{1/}	481	4, 96, 381	240, 241	6, 475	7, 39, 61, 374
GU973515 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973518 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973519 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973529 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973530 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973532 ^{1/}	165, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276
GU973535 ^{1/}	165, 348	4, 107, 402	256, 257	63, 450	7, 27, 84, 119, 276
GU973536 ^{1/}	66, 99, 349	4, 108, 402	256, 258	63, 451	7, 28, 84, 119, 276

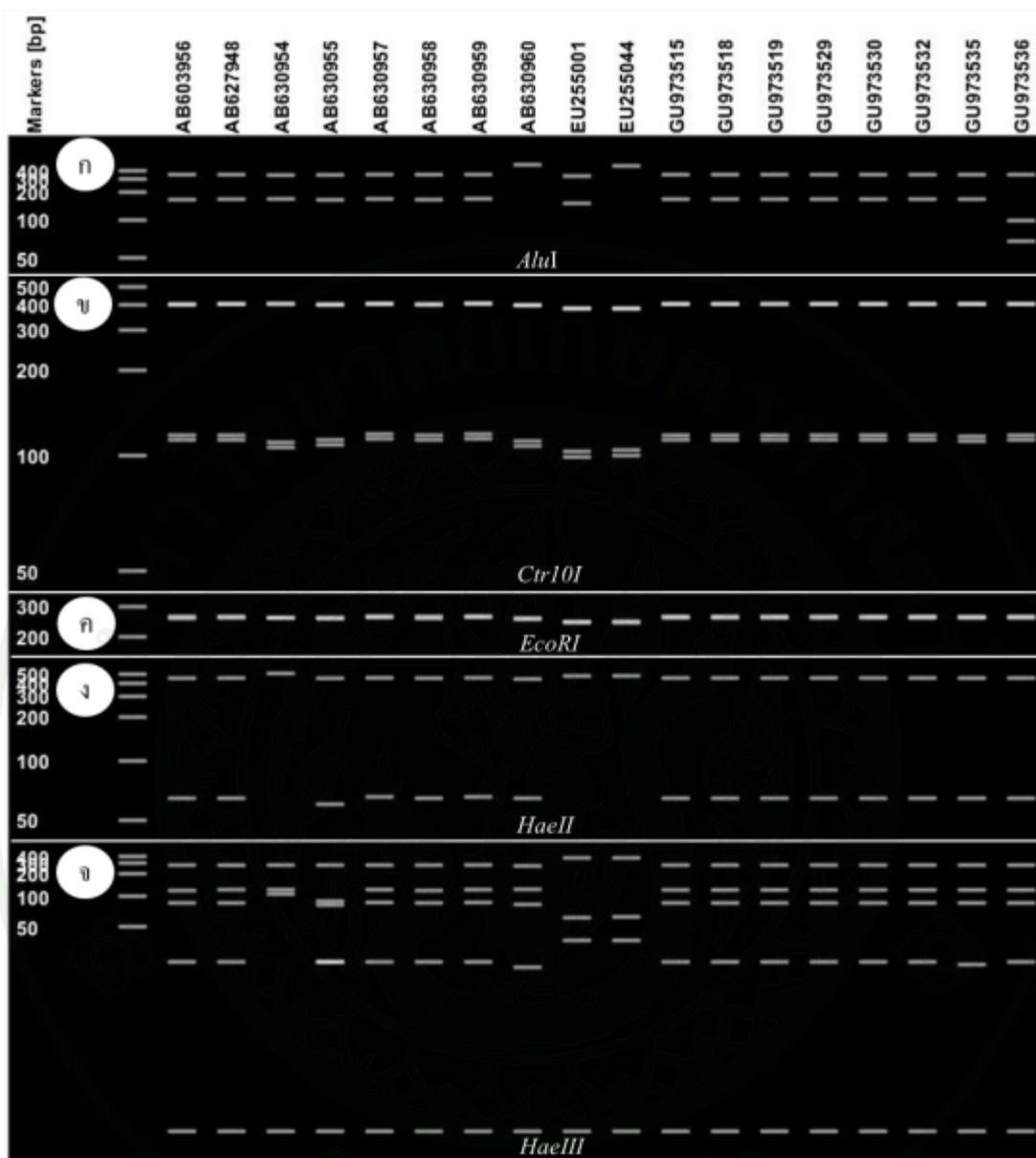
หมายเหตุ ^{1/} มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 8 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อรา

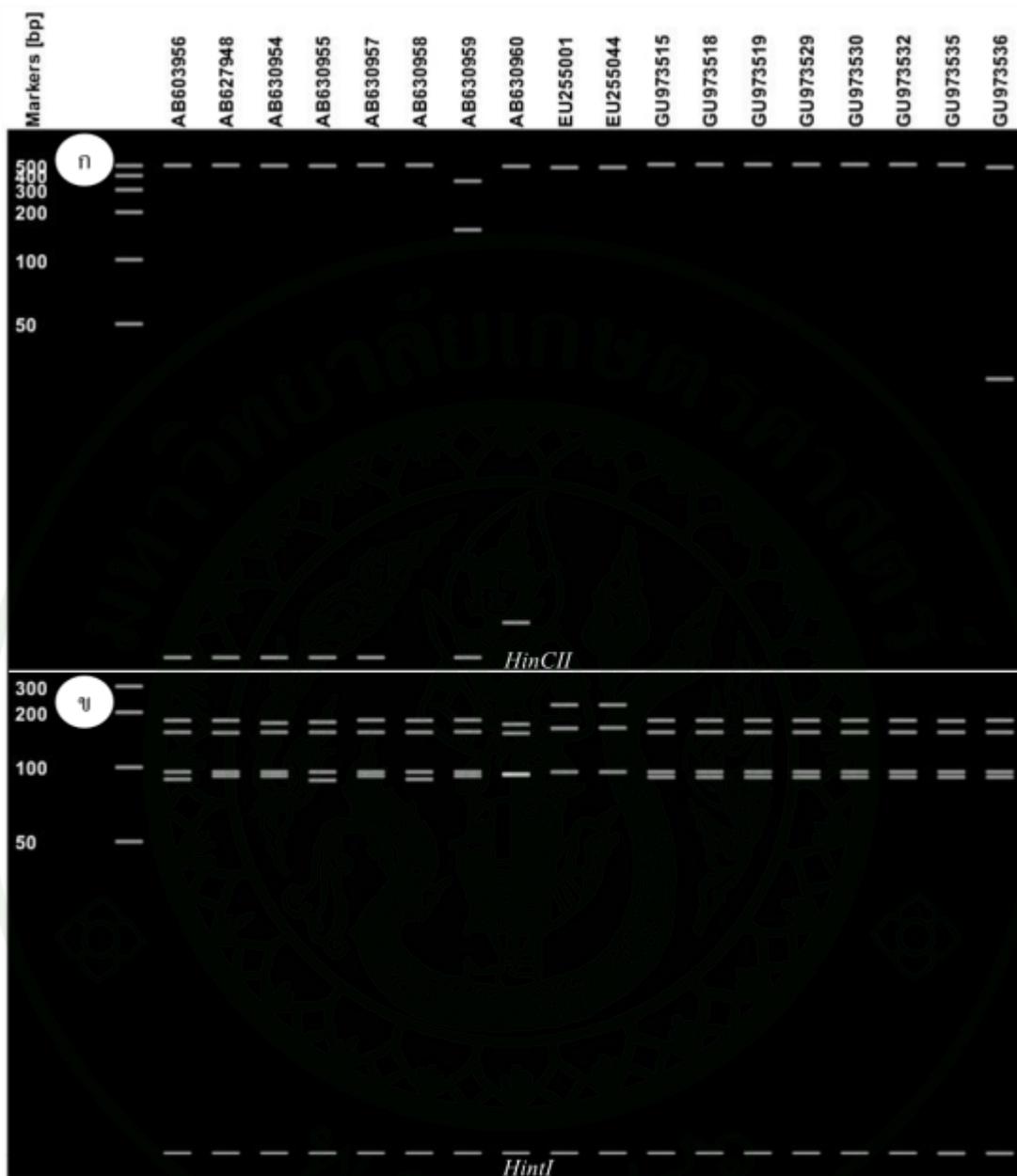
Pseudoplagiostoma eucalypti จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinCII*, *HinfI*, *MseI*, *StuI* และ *TaqI*

GeneBank Accession number	ขนาดชิ้นส่วน (bp)				
	<i>HinCII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MseI</i>	<i>StuI</i>	<i>TaqI</i>
AB630956	9, 503	8, 88, 92, 149, 175	31, 481	84, 428	53, 59, 186, 214
AB627948	9, 505	8, 91, 92, 148, 175	34, 480	84, 430	53, 59, 188, 214
AB630954	9, 500	8, 91, 92, 149, 169	34, 475	509	53, 59, 189, 208
AB630955	9, 498	8, 87, 92, 149, 171	507	80, 427	53, 59, 185, 210
AB630957	9, 507	8, 91, 92, 149, 176	34, 482	85, 431	53, 59, 189, 215
AB630958	6, 506	8, 88, 92, 149, 175	31, 381	84, 428	53, 59, 186, 214
AB630959	9, 151, 357	8, 91, 92 150, 176	34, 483	85, 432	53, 59, 190, 215
AB630960	10, 493	8, 90, 92, 147, 166	35, 468	81, 422	53, 58, 188, 204
EU255001 ^{1/}	480	8, 92, 157, 223	46, 434	480	53, 59, 172, 196
EU255044 ^{1/}	481	8, 92, 158, 223	46, 49, 386	481	53, 59, 172, 197
GU973515 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973518 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973519 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973529 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973530 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973532 ^{1/}	514	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214
GU973535 ^{1/}	513	8, 90, 92, 149, 174	33, 480	84, 429	53, 59, 188, 213
GU973536 ^{1/}	32, 482	8, 90, 92, 149, 175	33, 481	84, 430	53, 59, 188, 214

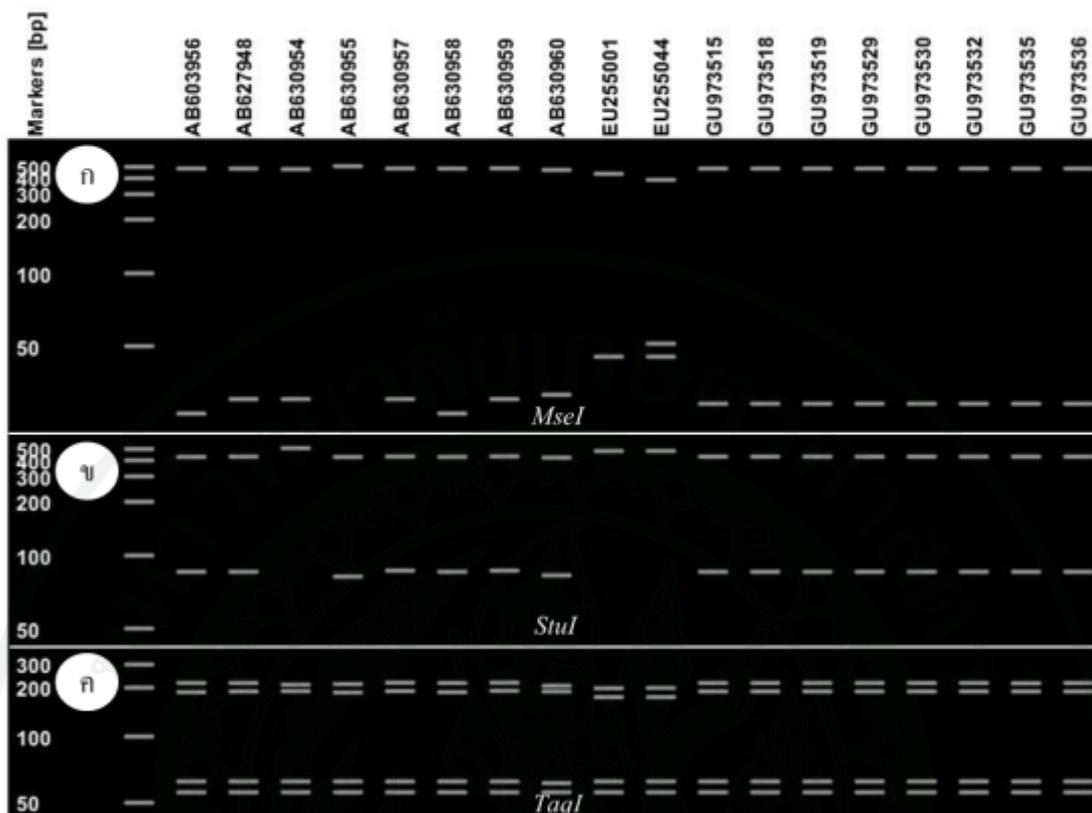
หมายเหตุ ^{1/} มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 14 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank โดยวิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* (ก.) *Ctr10I* (ข.) *EcoRI* (ค.) *HaeII* (ง.) และ *HaeIII* (จ.) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5)



ภาพที่ 15 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank โดยวิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinCII* (ก.) และ *HinfI* (ข.) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5)



ภาพที่ 16 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* เปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีรายงานอยู่ใน GenBank โดยวิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (ก.) *StuI* (ข.) และ *TaqI* (ค.) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 5.5)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ps. eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ในยูคาลิปตัส ที่เก็บรวบรวมจาก 10 จังหวัด จำนวน 36 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งได้ 8 แบบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อายุ 14 วัน อยู่ระหว่าง 3.72 – 7.38 เซนติเมตร ขนาดความกว้าง และความยาวของ conidia มีขนาด 4.63 - 6.71 X 13.33 - 20.96 ไมโครเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยเชื้อราไอโซเลตจากจังหวัดหนองบัวลำภู (NON2) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงสุด ไอโซเลตจากจังหวัดกาญจนบุรี (KAN6) มีขนาดความกว้างของ conidia สูงสุด และ ไอโซเลตจังหวัดกาญจนบุรี (KAN4) มีขนาดความยาวของ conidia สูงสุด

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ด้วยเทคนิค AFLP แล้วพบว่า เชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลต มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบ หรือคิดเป็น 43.25% จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด และแบ่งกลุ่มได้ 10 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับแหล่งที่เก็บรวบรวมเชื้อราหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยภายในกลุ่มประกอบด้วยเชื้อราที่เก็บรวบรวมมาได้จากจังหวัดต่างๆ แต่มีลักษณะทางจีโนมที่คล้ายกันหรือในกลุ่มเดียวกัน ประกอบด้วยเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่มี colony type ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อรามีการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่ต่างๆ ได้ และสามารถขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศและสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเดียวกันในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าในแต่ละจังหวัดอาจมีเชื้อรา *Ps. eucalypti* มากกว่า 1 สายพันธุ์

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* 8 ไอโซเลต พบว่า มีขนาดประมาณ 566 – 582 bp มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 89.58 – 99.03% และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่มีรายงานอยู่แล้วมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 92.66 - 98.83% เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าเชื้อรา *Ps. eucalypti* ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แยกจากตัวอย่างเชื้อราอื่น (out group) โดยสนับสนุนด้วยค่า bootstrap สูงสุด 100% อย่างไรก็ตาม ภายในกลุ่มนี้สามารถแยกกลุ่มย่อยได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่ง

สอดคล้องกับการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงว่าเชื้อ *Ps. eucalypti* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และแบ่งแยกได้หลายสายพันธุ์

4. จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Ps. eucalypti* แล้วการทดลองต่อมาคือ การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม สำหรับการจำแนกชนิดของ *Ps. eucalypti* ออกจากเชื้อราชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน (close related species) โดยทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 ชนิด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่า จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HinCII* สามารถแยก *Ps. eucalypti* และ *Ps. oldii* ออกจาก *Ps. variabile* ได้อย่างชัดเจน ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ctr10I*, *EcoRI*, *HaeII*, *HaeIII*, *HinI*, *MseI*, *StuI* และ *TaqI* ไม่สามารถแยกไอโซเลต ของ *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variabile* ออกจากกันได้

ข้อเสนอแนะ

1. การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Ps. eucalypti* ที่มีความหลากหลายสูงนั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดของเชื้อราชนิดนี้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้นอาจทำให้การจำแนกชนิดคลาดเคลื่อนได้ จึงควรใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยีนเดี่ยวที่ตำแหน่งอื่นนอกจาก ITS หรือมากกว่า 1 ยีน (multiple genes)

2. การพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Ps. eucalypti* เป็นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไป เนื่องจากเป็นสาเหตุโรคที่มีความสำคัญและใช้สำหรับการตรวจสอบการระบาดของเชื้อราโรคระหว่างประเทศได้ เช่นการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะต่อสปีชีส์ หรือ nested primer หรือ การพัฒนาแท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) สำหรับตรวจสอบเชื้อรา *Ps. eucalypti*

3. จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *Ps. eucalypti* มีความหลากหลายสูงเมื่อประเมินจากข้อมูลต่างๆ ดังนั้นหากมีการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสเพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ ผู้วิจัยควรคำนึงถึงเชื้อราที่นำมาทดสอบโรค ซึ่งจำเป็นต้องใช้เชื้อรามากกว่า 1 สายพันธุ์ เพื่อให้ได้ต้นยูคาลิปตัสต้านทานต่อเชื้อราที่มาจากแหล่งต่างๆ ได้ และควรมีการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อรา และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อรา

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษณา พงษ์พานิช. 2542. โรคของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย และแนวทางในการลดผลกระทบ, น. 101-106. ใน รายงานการประชุมวิชาการอรัญญาพิชแห่งชาติ ครั้งที่ 4. โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี จอมเทียน พัทยา, ชลบุรี
- กฤษณา พงษ์พานิช. 2548. โรคของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย. กลุ่มงานกีฏวิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
- กรมป่าไม้. 2548. ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. เอกสารเผยแพร่ โดยส่วนปลูกป่าภาคเอกชน, สำนักส่งเสริมการปลูกป่า, กรมป่าไม้: กรุงเทพฯ. 37 หน้า.
- กรมป่าไม้. ม. ม. ป. ผลกระทบของการปลูกไม้ยูคาลิปตัส และมันสำปะหลัง ต่อดิน ระบบนิเวศ และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ. โดยคณะทำงานศึกษาทางวิชาการเกี่ยวกับการปลูกไม้ยูคาลิปตัสและมันสำปะหลัง. เอกสารเผยแพร่ โดยส่วนปลูกป่าภาคเอกชน, สำนักส่งเสริมการปลูกป่า, กรมป่าไม้: กรุงเทพฯ. 39 หน้า.
- เกษมสุข เกษสกุล. 2533. ยูคาลิปตัส พันธุ์ไม้เศรษฐกิจที่มีค่าทั้งปัจจุบันและอนาคต. ฝ่ายส่งเสริมและเผยแพร่กองอนุรักษ์ต้นน้ำ. กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตร และสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 61 น.
- บุญวงศ์ ไทยอุดสำห. 2549 ก. การปลูกไม้ยูคาในนาข้าว, น. 1-3. ในเอกสารประกอบสัมมนา เรื่อง “โรคและแมลงในสวนป่ายูคาลิปตัส: จากโรคเข็รรา ถึง แตนปมฝอย”. ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบริษัท ฟอรัเชอร์ฟ จำกัด, กรุงเทพฯ ฯ.
- บุญวงศ์ ไทยอุดสำห. 2549 ข. ไม้ยูคาลิปตัส ความรู้ทั่วไปและการจัดการสวนป่าเศรษฐกิจ. การฝึกอบรมเกษตรกรการปลูกไม้ยูคาลิปตัส บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด, คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537. การปลูกและดูแลรักษาสวนป่ายูคาลิปตัส ไม้เศรษฐกิจทำเงิน.

บริษัท สำนักพิมพ์ เพชรกระรัต, กรุงเทพฯ.

พัชราภรณ์ ปลื้มคิด. 2549. การศึกษาเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้บนสายต้นยูคาลิปตัส

คามาลดูเลนซิส. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภูวนารถ มณีโชติ. 2553. ความหลากหลายทางชีวภาพของ Cucumber mosaic virus ที่แยกจาก

แตงกวาในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณทิ โพธิ์ทัย. 2540. คู่มือการปลูก ยูคาลิปตัส. เม็ดทรายพรีนติ้ง, กรุงเทพฯ.

ยุทธนา สิงห์ชะงู. 2549. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี sequence – tagged site เพื่อ

ตรวจสอบสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ *Cryptosporiopsis eucalypti*.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพจน์ เหลืองประพุกทธี. 2553. การคัดเลือกกลุ่มไพรเมอร์ สำหรับการศึกษความผันแปรของเชื้อรา

Cryptosporiopsis eucalypti ด้วยเทคนิค AFLP. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2542. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการงานเทคนิค AFLP แบบปลอดภัย.

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Baayen, R.P., P.H.J.F. van den Boogert, P.J.M. Bonants, J.T.K. Poll, W.J. Blok and C. Waalwijk.

2000. *Fusarium redolens* f.sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot

and spear rot. **European J. of Plant Patho.** 106: 907-912.

Bogale, M., D.W. Brenda, J.W. Michael and T.S. Emma. 2006. Characterization of *Fusarium*

oxysporum isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses.

Fungal Diversity. 23: 51-66.

Bridge, P.D. 2002. The history and application of molecular mycology. **Mycol.** 16: 90-98

_____ and D.K. Arora. 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. *In* **Application of PCR in mycology**. Eds, Bridge, P. D., D. K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander. CAB International, Wallingford, UK, pp. 63-84.

Cheewangkoon, R., J.Z. Groenewald, G.J.M. Verkley, K.D. Hyde, M.J. Wingfield, M.

Gryzenhout, B.A. Summerell, S. Denman, C. Toanun and P.W. Crous. 2010. Re-evaluation of *Cryptosporiopsis eucalypti* and *Cryptosporiopsis*-like species occurring on *Eucalyptus* leaves. **Fungal Diversity.** 44 (1): 89-91.

Ciesla, W.M., M. Diekman, C.A.J. Putter. 1996. **FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm, No. 17, *Eucalyptus* spp.** FAO-IPGRI, Rome. 62 p.

El-Khalifeh, M., A. El-Ahmed, A. Al-Saleh and M. Nachit. 2009. Use of AFLPs to differentiate between *Fusarium* species causing root rot disease on durum wheat (*Triticum turgidum* L.var. *durum*). **African J. of Biotechnology.** 8 (18): 4347-4352.

FAO. 1995. **Eucalyptus for planting.** Rome, Italy.

Fernandez A., T. Garcia, L. Asensio, M.Á. Rodríguez, I. González, P.E. Hernández and R. Martín. 2001. PCR-RFLP Analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region for Identification of 3 Clam Species. **J. of food sci.** 66: 657-651.

Hawksworth, D. L. 2004. Fungal diversity and its implication for genetic resource collections. **Stud. Mycol.** 50: 9-18.

Hebert, P.D.N., A. Cywinska, B.N. Ball and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Biol. Sci. SerB.** 270: 313-321.

- Hirata T. and S. Takamatsu. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. **Mycosci.** 37: 283–288.
- Jeewon, R., E.C.Y. Liew and K. D. Hyde. (2002). Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolut.** 25: 378-392.
- Klenova-Jirakova, H., L. Leišova-Svobodova, A. Hanzalova and L. Kučera. 2010. Diversity of oat crownrust (*Puccinia coronata* f.sp. *avenae*) isolates detected by virulence and AFLP analyses. **Plant Protect. Sci.** 48: 98–106.
- Kothera, R.T., A.T. Keinath, R.A. Dean and M.W. Farnham. 2003. AFLP analysis of a worldwide collection of *Didymella bryoniae*. **Mycol. Res.** 107 (3): 297–304.
- Krupa, P. 1999. Identification by PCR-RFLP of a Fungus Isolated from Mycorrhizal Roots of a Distinguishable Birch Growing in Areas Disturbed by Industry. **J. of environmental studies.** 8 (8): 161-163.
- Luangviriyasaeng, V. 2003. Eucalypt planting in Thailand, pp. 28-31. In J.W. Turnbull ed. Eucalypts in Asia, **Proceedings of an International Conference Held in Zhanjiang, Guangdong, People's Republic of China, 7–11 April 2003.** Elect Printing, Canberra.
- Maharaj, A. and S. N. Rampersad. 2011. Genetic Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* Associated with Anthracnose Disease of Papaya (*Carica papaya* L.) and Bell Pepper (*Capsium annuum* L.) Based on ITS PCR-RFLP Fingerprinting. **Mol. Biotechnol.**
- McDonald, B.C. 1997. The Population Genetics of fungi: Tools and Techniques. **Phytopathol.** 87: 448-453.

Michaelsen, L. K., A.B. Knight and L.D. Fink. 2004. **Team-based learning: A transformative use of small groups in college teaching.** Sterling,VA: Stylus Publishing.

Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scient. Amer.** April 56-65.

Old, K.M. 2002. Shared tree species -shared tree pathogens, pp. 14-17. In **Heartrots in Plantation Hardwoods in Indonesia and Australia**, ACIAR Technical Reports No. 51e.

_____ and C. Mohammed. 2003. Managing Diseases of Eucalypts in Southeast Asia, p. 253. In J.W. Turnbull ed. **Eucalypts in Asia, Proceedings of an international conference held in Zhanjiang, Guangdong, People's Republic of China, 7-11 April 2003.** Elect Printing, Canberra.

_____, M.J. Dudzinski, K. Pongpanich, Z.Q. Yuan, Q.T. Pham and T. N. Nguyen. 2002. *Cryptosporiopsis* leaf spot and shoot blight of eucalypts. **Australasian Plant Patho.** 3: 337-344.

Ospina-Giraldo, M.D. 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* form world-wide sources. **Mycologia** 90: 76-81.

Pandey, A., P.S. Mohanty and P. Arya. 2010. Development of species specific primer for the early detection of *Cylindrocladium quinqueseptatum* causing leaf and seedling blight in Eucalyptus. **Agric. Biol. J. N.** 1 (6): 1253-1259

Peterson, S.W. 1991. Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequence comparisons. **Phytopathol.** 81: 1051-1054.

- Powell, W., M. Morgante, C. Ander, M. Hanafey and J. Vogel. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Mol Breed.** 2: 225-238.
- Rohlf, F.J. 1993. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System.** Exeter Software, New York. 206 p.
- Rossman, A.Y. and M. E. Palm-Hernandez. 2008. Systematics of plant pathogenic fungi - why it matters. **Plant Disease.** 92: 1376-1386.
- Sankaran, K. V., B. C. Sutton and M. Balasundaran. 1995. *Cryptosporiopsis eucalypti* sp. nov., causing leaf spots of eucalypts in Australia, India and USA. **Mycol. Res.** 99: 827-830.
- Skouboe, P., J.C. Frisvad, J.W. Taylor, D. Lauritsen, M. Boysen and L. Rossen. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. **Mycol. Res.** 103: 837-881.
- Sutton, B.C. 1980. **The Coelomycetes.** Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, U.K.
- Verkley, G.J.M. 1999. A monograph of genus *Pezizula* and its anamorphs. **Studies in Mycol.** 44: 1-180.
- Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP Analysis, pp. 115-131. In Caetano-Anolles and Gresshoff (eds) **DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews.** Wiley-Liss, Inc. New York.
- _____, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

- Weising K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. **DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications** CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- _____, _____, _____ and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Queensland. 320 p.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18: 7213-7218.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. *In* M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, Inc., N.Y.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18: 6531-6535.
- Yap, I. and R.J. Nelson. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-based Dendrograms. **IRRI Discussion Paper Series 14**. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. **Mycol. Res.** 98: 531-534.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 Binary data (0/1) จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ด้วยโปรแกรม M+G/E+ACT

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0			
0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1			
0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1			
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1			
0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1			
1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			

ตารางผนวกที่ 2 Binary data (0/1) จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ด้วยโปรแกรม M+GT/E+AC

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0			
1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1			
0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1			
1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1			

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0			
0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0			
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1			
1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0			
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1			
0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1			

ตารางผนวกที่ 3 Binary data (0/1) จากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ด้วยโปรแกรม M+GT/E+AG

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0			
1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			

ตารางผนวกที่ 4 Binary data (0/1) จากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ด้วยไพรเมอร์ M+GTA/E+A

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0			
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0			
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0			
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0				

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Isolate No.																																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	34	35	36			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0			
1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0				
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0				
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			

		20		40	
GU973532	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
GU973530	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
GU973529	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
GU973518	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
GU973515	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
GU973519	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
AB627948	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
AB630958	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
AB630957	CGGCGC - ACC	CAGAAACCTT	TTGTGAACCT	ATACCCTTTC	TGTTGCCTCG 49
AB630959	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTTTC	TGTTGCCTCG 49
AB630956	CGGCGC - ACC	CAGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 48
AB630955	- - - GC - GCC	CCGATACCCCT	TTGTGAACCT	ATACCCTT - C	TGTTGCCTCG 44
AB630960	AGGCGC - ACC	CAGAAACCTT	TTGTGAAC - T	ATACCCTTTC	TGTTGCCTCG 48
AB630954	- - - CGT - ATC	C - GATACGCC	TTGAGA - CCG	ATACACTTA -	TGTTGCCTCG 43
EU255001	AGGCGCTACC	CATAAACCCCT	TTGTGAATAC	TACCTA - AAA	TGTTGCCTCG 49
EU255044	AGGCGCTACC	CATAAACCCCT	TTGTGAATAC	TACCTAAAAA	TGTTGCCTCG 50
	60		80		100
GU973532	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
GU973530	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
GU973529	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
GU973518	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
GU973515	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
GU973519	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
AB627948	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
AB630958	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
AB630957	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 99
AB630959	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 99
AB630956	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 98
AB630955	GCGCAGGCTG	GGCGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAGGCCTC	AACCCCTGT 94
AB630960	GCGCAGGCTG	GGCGCTACCA	CGC - - - CTTA	CGCAGGCCTC	AACTCTTG - 94
AB630954	CCG - AGGAGG	AACGCTTCCA	CACGCCCCCA	CGCAAGCCTC	AACCCCTGA 92
EU255001	GCATTGGTTG	GCCTCTTTGA	- - - - -	- - - - GGTCCC	TTCTTTAGGG 85
EU255044	GCATTGGTTG	GCCTCTTTGA	- - - - -	- - - - GGTCCC	TTCTCTAGGG 86
	120		140		
GU973532	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
GU973530	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
GU973529	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
GU973518	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
GU973515	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
GU973519	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
AB627948	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
AB630958	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 149
AB630957	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 149
AB630959	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 148
AB630956	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 144
AB630955	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 141
AB630960	- CGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCC - CAACC	AAACTCTCGT	TTT - ACAACC 141
AB630954	GCGGAGCCAG	CCGGCCGGTG	GCCCCAACCC	AAACTCTTGT	TTTTACAACC 142
EU255001	AAGGAGCAGA	CCGGCCGGTG	GCCCTA - - - T	AAACTCTTGT	TTTTGTAATA 132
EU255044	AAGGAGCAGA	CCGGCCGGTG	GCCCTA - - - T	AAATTCTTGT	TTTTGTAATA 133
	160		180		200
GU973532	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973530	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973529	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973518	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973515	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973519	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB627948	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630958	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630957	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 198
AB630959	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 198
AB630956	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630955	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 193
AB630960	CGTCTCT - TG	AGCAAC - CAA	AACAA - TGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 188
AB630954	CGTCTCTCTG	AGCAAC - CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 191
EU255001	T - - - CATCTG	AGTAAAACAA	CTAAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 179
EU255044	T - - - CATCTG	AGTAAAACAA	CTAAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 180

ภาพผนวกที่ 1 Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของเชื้อ

Pseudoplagiostoma eucalypti ร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นจาก GenBank ด้วยโปรแกรม

CLC Main Workbench (version 5.5)

	150		180		200
GU973532	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973530	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973529	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973518	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973515	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
GU973519	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB627948	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630958	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630957	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 198
AB630959	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 198
AB630956	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 197
AB630955	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 193
AB630960	CGTCTCT -TG	AGCAAC -CAA	AACAA -TGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 188
AB630954	CGTCTCTCTG	AGCAAC -CAA	AACAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 191
EU255001	T - - -CATCTG	AGTAAAACAA	CTAAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 179
EU255044	T - - -CATCTG	AGTAAAACAA	CTAAAATGAA	TCAAAACTTT	CAACAACGGA 180
		220		240	
GU973532	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
GU973530	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
GU973529	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
GU973518	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
GU973515	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
GU973519	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
AB627948	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
AB630958	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
AB630957	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 248
AB630959	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 248
AB630956	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 247
AB630955	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 243
AB630960	TCTCTTGGTA	-TGGCATCGA	TGAAGAA -GC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 236
AB630954	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 241
EU255001	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 229
EU255044	TCTCTTGGTT	CTGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT 230
	260		280		300
GU973532	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
GU973530	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
GU973529	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
GU973518	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
GU973515	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
GU973519	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
AB627948	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
AB630958	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
AB630957	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 298
AB630959	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 298
AB630956	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 297
AB630955	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 293
AB630960	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 286
AB630954	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 291
EU255001	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 279
EU255044	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACATTGCGC 280
		320		340	
GU973532	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
GU973530	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
GU973529	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
GU973518	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
GU973515	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
GU973519	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
AB627948	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
AB630958	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
AB630957	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 348
AB630959	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 348
AB630956	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 347
AB630955	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 343
AB630960	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 336
AB630954	CCGCTGGTAT	TCCAGCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCACCCCTCA 341
EU255001	CCGGTGGTAT	TCCACCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCAACCCTCA 329
EU255044	CCGGTGGTAT	TCCACCGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCAACCCTCA 330

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

	380		390		400	
GU973532	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
GU973530	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
GU973529	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
GU973518	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
GU973515	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
GU973519	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
AB627948	AGCTCC - -GT	TGG - -TGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	393
AB630958	AGCTCC - -GT	TGG -ATGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
AB630957	AGCTCC - -TT	GGT -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	395
AB630959	AGCTCC - -GT	TGACGGGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	396
AB630956	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	394
AB630955	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	390
AB630960	AGT - -C - -GT	TGGGGT -TTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	381
AB630954	AGCTCC - -GC	TTG -GTGTTG	GGGCACTGCC	GCGCCGCTTC	GGCGAGGCAG	388
EU255001	AAGCTCCGGC	TTTGGTGTG	GAGGAATACC	CTG - - - -TA	AAAAGGGTAC	374
EU255044	AAGCCCTGGC	TTTGGTGTG	GAGGAATACC	CTG - - - -TA	AAACGGGTAC	375
		420		440		
GU973532	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
GU973530	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
GU973529	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
GU973518	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
GU973515	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
GU973519	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
AB627948	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	443
AB630958	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
AB630957	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	445
AB630959	GCCAACAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	446
AB630956	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	444
AB630955	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	440
AB630960	GCCACCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	431
AB630954	GCCCCCAAAT	GCAGTGGCGG	GCTCGCCAGG	ACTCCGAGCG	TAGTAGTTAT	438
EU255001	CCTCTGAAAT	TTAGTGGCGG	GCTCGCTAGA	ATTTTGAGCG	TAGTAATT - -	422
EU255044	CCTCTGAAAT	TTAATGGCGG	GCTCGCTAGA	ATTTTGAGCG	TAGTAATT - -	423
	460		480		500	
GU973532	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
GU973530	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
GU973529	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
GU973518	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
GU973515	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
GU973519	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
AB627948	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	491
AB630958	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
AB630957	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	493
AB630959	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	494
AB630956	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	492
AB630955	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - - - - -GTT	CAAGGCCCCA	484
AB630960	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	479
AB630954	TCACCTCGCT	ATGGACGGAC	TGGCGGTGCT	T - -TGCCGTT	AAACCCCCCA	486
EU255001	TTACCTCGTT	TTTAA -AGAC	TAGCGGGACT	TCTTGCCGTA	AAACCCCCCA	471
EU255044	TTACCTCGTT	TTTAA -AGAC	TAGTGGGACT	TCTTGCCGTA	AAACCCCCCA	472
		520				
GU973532	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
GU973530	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
GU973529	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
GU973518	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
GU973515	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
GU973519	ATTTCTGAAA	AGT -GACCTC	-GGG	514		
AB627948	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	-GGA	514		
AB630958	ATTTCTGAAA	AGTTGAC - -	-GGA	512		
AB630957	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	-GGA	516		
AB630959	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	-GGA	517		
AB630956	ATT - - -GAAA	AGTTGACCTC	-GGA	512		
AB630955	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	-GGA	507		
AB630960	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	CGGA	503		
AB630954	ATTTCTGAAA	AGTTGACCTC	-GGA	509		
EU255001	ACTTTCTGA -	- - - - - - - -	- - - -	480		
EU255044	ACTTTCTGA -	- - - - - - - -	- - - -	481		

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายสุพจน์ เหลืองประพุกษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 พฤษภาคม 2522
สถานที่เกิด	10/3 หมู่ 5 ตำบลลำเถลุ่ม อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้จัดการแผนกผลิตกล้าไม้ บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด (SCG Paper)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด อำเภอท่าม่วง จังหวัด กาญจนบุรี
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนัก พัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ