

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี sequence-tagged site เพื่อตรวจสอบสายต้น ยูคาลิปตัสที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

DNA Markers for *Cryptosporiopsis eucalypti* Resistant/Susceptible Eucalypt Clone Selection using Sequence-Tagged Site Technique

คำนำ

การคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัสเพื่อปลูกสร้างสวนป่าในช่วงแรกจะคำนึงถึงการเจริญเติบโต และรูปทรงที่เปลาตรงเป็นหลัก แต่ไม่ได้พิจารณาถึงความทนทานต่อความเครียดด้านต่างๆ รวมไปถึงความต้านทานโรค จึงทำให้ผลผลิตของสวนป่ายูคาลิปตัสเกิดความเสียหายจากโรคทางใบ โดยเชื้อสาเหตุโรคทางใบซึ่งเป็นปัญหามากที่สุดในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประกอบด้วยเชื้อรา *Cylindrocladium quinqueseptatum*, *Phaeophleospora destructans* และ *Cryptosporiopsis eucalypti* แต่ในประเทศไทยมีเชื้อรา *C. eucalypti* กระจายอยู่อย่างกว้างขวางและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตของสวนป่ายูคาลิปตัสมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในบริเวณภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ระบาดมากในช่วงฤดูฝนและทำให้เกิดโรครอยไหมในยูคาลิปตัสที่มีอายุ 2-4 ปี โดยเฉพาะยูคาลิปตัสคามาลดูลินซิส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) ที่อ่อนแอต่อเชื้อราชนิดนี้มากกว่าสปีชีส์อื่นๆ แต่ก็ยังเป็นสปีชีส์ที่เจริญเติบโตดีและใช้ปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยสายต้นที่โตดีซึ่งได้มีการคัดเลือกเพื่อใช้เป็นแม่พันธุ์บางสายต้นจึงมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *C. eucalypti* ค่อนข้างมาก นอกจากนั้นระบบการปลูกยูคาลิปตัสที่ใช้สายต้นเดียวในหนึ่งแปลงทำให้มีโอกาสเกิดความเสียหายจากโรคได้มาก โดยเฉพาะเมื่อใช้สายต้นที่โตดีแต่อ่อนแอไปปลูกในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมก ประกอบกับในบางพื้นที่ต้นยูคาลิปตัสยังได้รับผลกระทบจากความเครียดที่มาจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม จึงทำให้ต้นยูคาลิปตัสเกิดความอ่อนแอและง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อรายิ่งขึ้น การคัดเลือกสายต้นที่ต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการป้องกันหรือการลดความเสียหายจากโรคและเป็นข้อมูลในการวางแผนเลือกใช้สายต้นในการปลูกให้เหมาะสมกับพื้นที่ การประเมินโรคที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* ในสภาพแปลงทำได้ค่อนข้างลำบากเนื่องจากการเกิดโรคขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในแต่ละปี ทำให้ข้อมูลความต้านทานโรคของสายต้นในแต่ละปีไม่ตรงกัน ประกอบกับมีสายต้นยูคาลิปตัสจำนวนมากทำให้คัดเลือกในสภาพแปลงได้ลำบาก จึงต้องหาวิธีการอื่นที่มี

ประสิทธิภาพเข้ามาช่วย การปลูกเชื้อในเรือนเพาะชำหรือห้องปฏิบัติการและการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก จึงเป็นทางเลือกที่ช่วยให้การคัดเลือกทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกจะไม่มีอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้แยกระหว่างพืชที่ต้านทานและพืชที่อ่อนแอจะอาศัยความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอระหว่างกัน โดยยีนที่น่าจะมีโอกาสพบความแตกต่างได้มากจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานโรคต่างๆ ซึ่งยีนที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อราคือ ยีนในกลุ่ม pathogenesis-related (PR) proteins ยีนต้านทานโรคของพืช และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันต่างๆ ยีนเหล่านี้จะนำมาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด sequence-tagged site (STS) เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายต้นต้านทานและอ่อนแอ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้อาศัยส่วนอนุรักษ์ในสายนิวคลีโอไทด์แต่ละยีนมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อติดตามชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีนเหล่านี้ในจีโนม และหาแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกกลุ่มระหว่างสายต้นต้านทานและสายต้นอ่อนแอ ในการทดลองครั้งนี้จะได้ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อรา *C. eucalypti* ของยูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำและห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการปลูกเชื้อ และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS เพื่อใช้คัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัส

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดและใบไหม้
2. เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด sequence-tagged site ที่ใช้ตรวจสอบสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของยูคาลิปตัสคามาลดูลেনซิส

ยูคาลิปตัสคามาลดูลেনซิส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) มีชื่อสามัญคือ red gum, river gum, Murray red gum และ red river gum โดยจัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae ยูคาลิปตัสคามาลดูลেনซิสเป็นไม้พื้นเมืองออสเตรเลียโดยกระจายอยู่ระหว่างเส้นรุ้ง 12.5-38 องศาใต้ และลองจิจูด 112-152 องศาตะวันตก พบมากตอนเหนือของออสเตรเลีย ที่ระดับความสูง 20-700 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 27-40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายปี 250-625 มิลลิเมตร (Boland *et al.*, 1997)

ยูคาลิปตัสคามาลดูลেনซิสเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ มีความสูง 25-30 เมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางที่ระดับอก 0.9-2.1 เมตร เปลือกเรียบสีชมพู สีขาว หรือสีครีม ลอกเป็นแผ่นกว้างๆ ใบเป็นใบเดี่ยว ใบในช่วงกล้าไม้เรียงตัวแบบตรงกันข้ามพอโตขึ้นจะเรียงตัวแบบสลับ ในต้นกล้าใบเป็นรูปไข่หรือรูปหอกกว้างพอโตขึ้นจะเป็นรูปรียาวหรือรูปหอก ขนาดของใบ 10-13 x 1.8-3 เซนติเมตร ใบมักจะห้อยลง ดอกเกิดเป็นช่อตามซอกใบ ดอกเป็นรูปกระสวยโดยส่วนล่างเป็นรูปถ้วย มีฝักปิด สีขาวหรือสีครีม ออกดอกเกือบตลอดทั้งปี ผลเป็นรูปถ้วยมีขนาด 0.5-0.7 x 0.5-0.7 เซนติเมตร ผลแห้งแตก เมล็ดมีสีน้ำตาลหรือสีเหลืองยาว 0.1 เซนติเมตร (Food and Agriculture Organization [FAO], 1979)

2. ความเป็นมาของการปลูกยูคาลิปตัส

ประเทศไทยได้นำยูคาลิปตัสเข้ามาทดลองปลูกเพื่อทดสอบสปีชีส์ (species) และถิ่นกำเนิดตั้งแต่ปี 2508 ภายใต้โครงการสำรวจวัตถุดิบเพื่อผลิตเยื่อกระดาษระหว่างปี 2508-2512 โดยความร่วมมือของกรมป่าไม้และ UNDP/FAO (United Nation Development Project) ได้นำเมล็ดยูคาลิปตัสจากประเทศออสเตรเลียจำนวน 15 ชนิด ปลูกทดลองเพื่อคัดเลือกสปีชีส์และถิ่นกำเนิด (กรมป่าไม้, ม.ป.ป.; Pousajja, 1993) ต่อมาในปี 2512 โดยความร่วมมือของกรมป่าไม้และ DANIDA (Danish International Development Agency) จากประเทศเดนมาร์กได้จัดตั้งโครงการบำรุงพันธุ์ไม้สนและไม้โตเร็ว มีการส่งเมล็ดพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัสจากประเทศออสเตรเลียและประเทศแซมเบียมาปลูกทดลองในปี 2516 โดยเฉพาะยูคาลิปตัสคามาลดูลেনซิสที่มีอัตราการเจริญและมี

ปริมาณการรอดตายสูงกว่ายูคาลิปตัสปีชี้อื่นๆ จากการคัดเลือกสปีชีส์ของยูคาลิปตัส Luangviriyasaeng (2003) ได้สรุปไว้ดังนี้ สปีชีส์ที่เหมาะสมในการปลูกในพื้นที่แห้งแล้งที่มีปริมาณฝนเฉลี่ยรายปี 1,000-1,200 มิลลิเมตร คือ *E. brassiana*, *E. camaldulensis*, *E. citriodora* และ *E. tereticornis* สปีชีส์ที่เหมาะสมในการปลูกในพื้นที่ชุ่มชื้นที่มีปริมาณฝนเฉลี่ยรายปี 1,500 มิลลิเมตร คือ *E. urophylla* และสปีชีส์ที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่สูงคือ *E. grandis* และ *E. saligna* นอกจากนั้น กรมป่าไม้ (2533) พบว่า เมล็ดพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสจากถิ่นกำเนิดเพทฟอร์ด (Petford), กลุ่มแม่น้ำแมรี (Marry River), กลุ่มแม่น้ำกิบ (Gibb River), แคทเธอริน (Katherine), และกลุ่มแม่น้ำเออร์วิน (Irvine) มีความเหมาะสมที่จะนำมาปลูกในประเทศไทยโดยเฉพาะถิ่นกำเนิดเพทฟอร์ดสามารถปรับตัวได้ดีที่สุด จึงได้ใช้พันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยไว้ขยายพันธุ์เพื่อปลูกต่อไป ในปี 2519-2520 กรมป่าไม้และองค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ได้เริ่มต้นปลูกสร้างสวนป่ายูคาลิปตัส และภายหลังจากนั้นเกษตรกรและภาคเอกชนก็ได้ให้ความสนใจที่จะปลูกสวนป่ายูคาลิปตัสในเชิงเศรษฐกิจ (Pousajja, 1993)

3. การใช้ประโยชน์ของไม้ยูคาลิปตัส

การใช้ประโยชน์ไม้ยูคาลิปตัสเกือบทั้งหมดใช้ในภาคอุตสาหกรรม ส่วนการใช้ประโยชน์อื่นๆ มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยในปี 2003 Laemsak ได้กล่าวไว้ใน Luangviriyasaeng (2003) ว่า ผลผลิตของไม้ยูคาลิปตัสที่ป้อนเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทยมีประมาณ 7.6 ล้านตัน แบ่งเป็นอุตสาหกรรมเยื่อ 4.2 ล้านตัน (55 เปอร์เซ็นต์) โรงงานขึ้นไม้สับ 2.1 ล้านตัน (28 เปอร์เซ็นต์) โรงงานแผ่นใยไม้อัด 1.1 ล้านตัน (15 เปอร์เซ็นต์) และการใช้ประโยชน์รูปแบบอื่นๆ เช่น ไม้แปรรูป ไม้ค้ำยัน เป็นต้น 0.14 ล้านตัน (2 เปอร์เซ็นต์)

การใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรม ไม้ยูคาลิปตัสจะป้อนเข้าสู่โรงงานขึ้นไม้สับ โดยไม้ท่อนยูคาลิปตัส 2.2 ตัน นำมาผลิตเป็นขึ้นไม้สับได้ 1 ตัน สำหรับขึ้นไม้สับที่ได้จะนำไปผลิตแผ่นขึ้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด แผ่นปาร์ติเกิล แผ่นไม้อัดซีเมนต์ และอุตสาหกรรมเยื่อ โดยเยื่อที่ผลิตได้จากไม้ยูคาลิปตัสเป็นเยื่อสั้น ซึ่งทัศนีย์ และคณะ (2525) ได้ศึกษาการผลิตเยื่อจากไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสอายุ 10 ปี และ 15 ปี โดยวิธีซัลเฟตพบว่า ในอายุ 10 ปี ให้ผลผลิตเยื่อสูงกว่าอายุ 15 ปี โดยลักษณะเส้นใยที่ได้มีความยาวของเส้นใยอยู่ในช่วงของไม้เนื้อแข็งทั่วไปคือ เป็นเยื่อสั้นผนังเซลล์ของเส้นใยบาง มีแนวโน้มที่จะให้เส้นใยยึดติดกันได้ดี ทำให้แรงจับยึดระหว่างเส้นใยสูง เมื่อผลิตเป็นกระดาษจะได้กระดาษที่แข็งแรง เยื่อไม้ยูคาลิปตัสมีคุณสมบัติเด่นคือ มีความฟูสูง และ

มีความทึบแสง ประกอบกับไฟเบอร์มีความแข็งแรงเหมาะต่อการใช้ทำกระดาษพิมพ์เขียวประเภทต่างๆ ได้ สำหรับอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษส่วนหนึ่งจะใช้ภายในประเทศและส่วนที่เหลือจะส่งออกไปต่างประเทศ โดยกระทรวงพาณิชย์ (2545) ได้รายงานว่า ในปี 2543 ประเทศไทยการส่งออกกระดาษและเยื่อกระดาษมีมูลค่า 24,878.04 ล้านบาท และในปี 2544 มีมูลค่า 27,055.70 ล้านบาท ขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 13.44 และ 13.35 ตามลำดับ โดยมีตลาดส่งออกสำคัญคือ มาเลเซีย ฮองกง ไต้หวัน จีน สิงคโปร์ และเบลเยียม

การใช้ประโยชน์ทั่วไปได้แก่ ใช้ในการก่อสร้างต่างๆ เช่น ทำเฟอร์นิเจอร์ เครื่องเรือน ทำรั้ว ทำคอกปลูสดัก ทำเสา ใช้เป็นส่วนประกอบของอาคารบ้านเรือนได้ แต่ควรจะได้ทำการอบนํ้ายารักษาน้ำเนื้อไม้ไว้ก่อน จึงจะยืดอายุการใช้งานได้นาน จากการศึกษาของสุชาติ (2528) พบว่าเนื้อไม้ยูคาลิปตัสสามารถทนชื้นมีแก่นสีน้ำตาล เนื้อไม้ค่อนข้างละเอียด เสี้ยนสน มีความถ่วงจำเพาะประมาณ 0.9-1 ในสภาพแห้ง เป็นไม้ที่มีน้ำหนักสูง มีค่าความแข็งแรงในการตัดหรือความสามารถในการรับน้ำหนักในสภาพแห้ง 1,344 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ซึ่งเท่ากับไม้เนื้อแข็งโดยทั่วไป เช่น เต็ง รัง เป็นต้น มีความแข็งแรงสูงถึง 868 กิโลกรัม จึงทำให้แปรรูปและตกแต่งได้ยาก การแปรรูปส่วนใหญ่จะเหมาะแปรรูปเป็นไม้หน้าแคบ เนื่องจากไม้หน้ากว้างจะบิดงอแตกร้าว และการแปรรูปต้องรีบกระทำในขณะสดหลังจากการตัดฟันเพราะหากปล่อยทิ้งไว้จะแตกร้าว นอกจากนั้นยังใช้ทำเชื้อเพลิงในรูปฟืนหรือถ่านไม้ ยูคาลิปตัสใช้เป็นเชื้อเพลิงดีไฟได้ดีและมีจีเ้าน้อย ซึ่ง อรุณ และ วินัย (2528) ได้ทดลองการผลิตถ่านจากไม้ยูคาลิปตัสพบว่า ไม้ยูคาลิปตัสมีศักยภาพเพื่อใช้เป็นพลังงานโดยเฉพาะสำหรับการผลิตถ่านจำหน่ายในการหุงต้ม และถ้าใช้ลำต้นที่มีขนาดเล็กซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 3-6 นิ้ว จะสามารถผลิตเป็นถ่านแท่งให้มีคุณลักษณะและคุณภาพคล้ายคลึงกับถ่านไม้โกงกาง

4. ประวัติและความสำคัญของโรคใบจุด

การพบเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดในยูคาลิปตัสพบครั้งแรกในปี 1986 โดย Old ซึ่งไม่มีการตีพิมพ์เป็นเอกสารออกมาโดยพบในตอนกลางของ Honshu ประเทศญี่ปุ่น (Old et al., 2002) ต่อมาในระหว่างช่วงต้นทศวรรษ 1990 Pongpanich ได้พบว่าเชื้อรานี้พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้ใน *Eucalyptus camaldulensis* ซึ่งได้รายงานใน Ciesla et al. (1996) แต่การรายงาน การบรรยายลักษณะและการทดสอบความสามารถในการก่อเกิดโรคของเชื้อราได้ศึกษาโดย Sankaran et al. (1995) ซึ่งพบเชื้อรา *C. eucalypti* ทำให้

เกิดโรคใบจุดของ *E. globulus*, *E. nicholii*, *E. microcorys* และสปีชีส์อื่นของยูคาลิปตัสในออสเตรเลีย, โรคของใบใน *E. grandis* และ *E. robusta* ในฮาวาย และโรคใบจุดใน *E. grandis*, *E. tereticornis* และ *E. rostrata* ในอินเดีย โดยเฉพาะในอินเดียตอนใต้พบโรคใบจุดได้ทั่วไปในสวนป่า *E. grandis* ที่เจริญในพื้นที่สูง 850-1500 เมตร จากระดับน้ำทะเล ในช่วงฤดูฝน นอกจากนั้นยังพบว่าสวนป่า *E. grandis* ที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลไม่มากจะไม่พบโรค และพบได้น้อยใน *E. grandis* และ *E. rostrata* ต่อมา Ferreira *et al.* (1998) ได้รายงานว่าการนี้ เป็นสาเหตุโรคใบจุดในสวนป่า *E. grandis* และ *E. saligna* ในบราซิล และต่อมา Gadgil and Dick (1999) ได้พบอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อราใน *Eucalyptus* และ *Corymbia* spp. โดยมีการกระจายอย่างกว้างขวางในนิวซีแลนด์

โรคทางใบและลำต้นของยูคาลิปตัสที่สำคัญ และทำให้เกิดความเสียหายมากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เกิดจากเชื้อรา *Cylindrocladium quinqueseptatum*, *Phaeophleospora destructans* และ *C. eucalypti* ซึ่งทำให้เกิดโรคยอดไหม้และใบไหม้ (Old, 2002; Old and Mohammed, 2003) ในประเทศไทยได้มีการสำรวจเชื้อราที่เข้าทำลายยูคาลิปตัสในแปลงปลูกพบเชื้อรามากกว่า 15 ชนิด ที่สามารถเข้าทำลายใบ ยอด กิ่ง และลำต้น ทำให้เกิดโรคแผลจุด แผลไหม้ กิ่งแห้ง แคงเกอร์ และยอดตาย ด้วยระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน โดยโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora* sp., *Coniella* spp., *Cercospora* sp., *Mycotribulus* sp., *Mycosphaerella* sp. ไม่พบว่าทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงแต่พบเชื้อรา *C. eucalypti* และ *C. quinqueseptatum* สามารถเข้าทำลายใบปลายกิ่งและยอดอ่อน ทำให้เกิดแผลจุดไหม้รุนแรง ใบร่วง กิ่งแห้ง ต้นไม้อ่อนแอ เปิดช่องทางให้เชื้อราที่ไม่สร้างความเสียหายรุนแรง (weak pathogen) ชนิดอื่นๆ เช่น *Cytospora* sp., *Lasiodiplotia theobromae*, *Phomopsis* sp. เข้าทำลายส่วนของกิ่ง และลำต้น เกิดโรคแผลแตก ขางไหล และยอดตาย ทำให้รูปร่างผิดปกติ คดงอ แคระแกรน หรือรุนแรงถึงกับทำให้ต้นตายได้ (กฤษณา, 2542) โดยทั่วไปสวนป่ายูคาลิปตัสในเวียดนามและไทยจะพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. quinqueseptatum* และ *C. eucalypti* ค่อนข้างมาก แต่การหลุดร่วงของใบและอาการยอดไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสสร้างความเสียหายและมีกระจายกว้างขวางกว่าการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. quinqueseptatum* (กฤษณา, 2542; Old *et al.*, 2002) จากการสำรวจในแปลงทดสอบ Chon Thanh ในเวียดนามระหว่างปี 1997-1998 พบว่า ความสมบูรณ์ของเรือนยอดต้นยูคาลิปตัสได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* โดยเฉพาะอาการยอดไหม้ (shoot blight) อย่างมาก หลังจากอายุ 2 ปี ขึ้นไป นอกจากนั้นจากการประเมินโรคในปี 1998 พบว่า ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสแสดงอาการ

โรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *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. *obtusa* เช่น ถิ่นกำเนิด Petford จาก Queensland และ Katherine จาก Northern Territory (Old *et al.*, 2002) ในปี 1999 พื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสของไทยในบริเวณที่มีปริมาณน้ำฝนที่สูง (มากกว่า 1500 มิลลิเมตร) เกิดการระบาดของโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในสวนป่ายูคาลิปตัสความลาดชันที่ปลูกโดยใช้สายต้น (clone) เดียวทำให้สูญเสียพื้นที่สวนป่ายูคาลิปตัสไป 1 เปอร์เซ็นต์ และน่าจะเป็นไปได้ว่าแหล่งที่มาของสายต้นที่ใช้ปลูกมาจากถิ่นกำเนิด Petford เนื่องจากผลการทดสอบช่วงแรกในแปลงแสดงให้เห็นว่าเป็นถิ่นกำเนิดที่เหมาะสมในด้านการเจริญเติบโตและรูปทรงดี (Luangviriyasaeng, 2003)

5. อนุกรมวิธานของรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

เชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* Sankaran & Sutton เป็นสาเหตุของโรคใบจุด (leaf spot) ใบไหม้ (leaf blight) แคงเกอร์ (canker) และยอดแห้งตาย (shoot blight) ของยูคาลิปตัส จัดหมวดหมู่ได้ ดังนี้ (Sutton, 1980)

Division Eumycotina

Subdivision Deuteromycotina

Class Blastodeuteromycetes

Order Plialostromatineae

Genus *Cryptosporiopsis*

Species *C. eucalypti*

Verkley (1999) ได้รับรองว่าจำนวนสปีชีส์ในเชื้อราสกุล *Cryptosporiopsis* มีอย่างน้อย 23 ชนิด โดยมี teleomorphs อยู่ในสกุล *Pezicula* หรือใน *Neofabraea* ลักษณะที่ใช้กำหนดเชื้อราในสกุลตามที่ Sankaran *et al.* (1995) กล่าวไว้จะใช้ลักษณะร่วมกันของโครงสร้าง conidiomata รูปร่างทางสัณฐานวิทยาและขนาดของโคนิเดีย ขอบเขตของสกุล (genus) และวงศ์ (family) ของฟิชอาซัย

ในขณะเดียวกัน Sutton (1980) กล่าวว่า เชื้อราในสกุลนี้แตกต่างกันน้อยมากในแต่ละสปีชีส์ ในการจำแนกบางครั้งจะใช้ขนาดของโคนิดีเป็นหลัก

6. ลักษณะอาการโรคและเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

6.1 ลักษณะอาการโรค

เชื้อรา *C. eucalypti* สามารถเข้าทำลายใบและบางครั้งทำลายกิ่งของยูคาลิปตัสได้ 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 ใบแก่ขอบมีสีทึบไหม้เข้ม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร ส่วน Ciesla *et al.* (1996) ได้แบ่งชนิดและรูปแบบของบาดแผลโดยทั่วไปออกเป็น 4 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 จุดแบบวงกลม (circular spots) มีสีน้ำตาลอ่อนถึงค่อนข้างดำ ไม่ต่อเนื่องกัน เป็นวงกลมหรือเกือบกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร แบบที่ 2 จุดไหม้ขนาดใหญ่ (large blight spots) มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล บาดแผลมีเซลล์ตายขยายออกกว้าง แบบที่ 3 จุดไม่สม่ำเสมอขนาดเล็ก (small irregular spots) มีสีเทา น้ำตาลถึงน้ำตาลดำ บางครั้งขอบมีสีดำ จุดไม่สม่ำเสมอหรือค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ไม่ต่อเนื่องกัน มีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร แบบที่ 4 จุดสีสนิมไม่สม่ำเสมอ (irregular rusty spots) มีสีสนิม พื้นผิวขรุขระ ไม่สม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่องกัน หรืออยู่เป็นกลุ่มตามเส้นแขนงใบ การเข้าทำลายใบสามารถขยายไปยังกิ่งขนาดเล็ก บาดแผลที่เซลล์ตายจะเปลี่ยนสีไปเพราะ fruiting bodies ที่มีสีอ่อนเกิดขึ้นบนกิ่ง fruiting bodies จะกระจัดกระจายไม่สม่ำเสมอบนจุดและปรากฏเป็นตุ่ม (pustules) ที่ผิว เมื่อแก่จะแตกออกหรือเป็นรู กลุ่มของโคนิดี (conidial mass) มีสีครีมอยู่ด้านบนของตุ่มในสภาพความชื้นสูง

6.2 ลักษณะของเชื้อรา

Sankaran *et al.* (1995) ได้การบรรยายลักษณะเชื้อราไว้ดังนี้ mycelium ที่ฝังในบาดแผลเป็นสีน้ำตาลอ่อน แตกกิ่งก้าน hyphae มีผนังกัน ความกว้าง 2-3.5 ไมโครเมตร conidiomata เป็นแบบ pycnidial ถึง acervular ส่วนมากรูปร่างกลม (globose) อยู่ใต้ชั้นคิวติเคิลถึงเนื้อเยื่อชั้นผิว สีน้ำตาลอ่อน แยก (separate) ประกอบด้วย textura angularis 2-3 ชั้น ซึ่งผนังชั้นบน (overlying wall) จะเข้มและในผนังชั้นฐานจะอ่อน (basal wall) ความกว้างประมาณ 170 ไมโครเมตร และความลึกประมาณ 110 ไมโครเมตร dehiscence จะไม่สม่ำเสมอ ใกล้เคียงๆ จะมีการแตกออกของเนื้อเยื่อพืชอาศัยที่อยู่ชั้นบน ก้านชูโคนิเดีย (conidiophores) จะไม่มีหรืออาจประกอบด้วย 1-2 supporting cell ส่วน conidiogenous cells อาจจะไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกับก้านชูโคนิเดียหรือเป็นอันหนึ่งอันเดียวกับก้านชูโคนิเดีย ทรงกระบอก หายากที่เป็น dolliform ใสไม่มีสี อาจตรงหรือโค้งเล็กน้อย เรียบ indeterminate ขนาด 4-13.5 X 2-3 ไมโครเมตร สร้างเป็นเซลล์แทรกภายในหรืออยู่บนผนังของ conidiomata โคนิเดีย (conidia) เกิดแบบ holoblastic ใสไม่มีสี มีลักษณะเป็นหยดน้ำมันอยู่ภายในเซลล์ (guttulate) เรียบ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งมีผนังกัน 1 ผนัง รูปรี ปลายมน (obtus) ฐานแหลมอย่างตันที่ทันใจจนถึงรอยแผล (scar) ผนังหนา 0.5-1 ไมโครเมตร ขนาด 11-20 X 4.5-8 ไมโครเมตร โคนิเดียจะเกิดแบบ holoblastic ซึ่งจะสร้างยื่นออกจากผนังส่วนบน (apical wall) แล้วสร้างผนังมากขึ้นแล้วหลุดออกแบบ schizolytic ส่วน conidiogenous cells เจริญแบบ enteroblastic และ percurrent โดยโคนิเดียแยกตัวออกที่ระดับเดียวกันหรือที่ระดับที่สูงกว่า (1-2 annellations) ไม่มีลักษณะปลายบานออก (collarete) เกิดการหนาขึ้นตามแนวผนังเล็กน้อย (periclinal thickening) ช่องว่างของไซโทพลาสกว้าง (cytoplasmic channel)

ระยะไมโครโคนิเดีย (microconidial stage) จะมี microconidiogenous cells ใสไม่มีสี รูปร่างทรงกระบอก ไม่ต่อเนื่องกัน อาจจะไม่ integrate หรือไม่ก็ได้ indeterminate ขนาด 6-9.5 X 2-3 ไมโครเมตร ไมโครโคนิเดีย (microconidia) จะเกิดขึ้นแบบ holoblastic ซึ่งจะสร้างยื่นออกจากผนังตรงปลายแล้วมีการสร้างผนังมากขึ้นและหลุดออกแบบ schizolytic การเกิด conidiogenous cells เป็นแบบ enteroblastic ไม่มีลักษณะปลายบานออก (collarete) เกิดการหนาขึ้นตามแนวผนังชัดเจน (periclinal thickening) ช่องว่างของไซโทพลาสแคบ (cytoplasmic channel) (Sankaran *et al.*, 1995)

7. ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

โคโลนีของเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เลี้ยงบน potato dextrose agar (PDA) เริ่มแรกจะสีน้ำตาลเมื่ออายุ 4-6 วัน จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 2.5 เซนติเมตร ในวันที่ 7 จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลค่อนข้างดำ มีกลิ่นคล้ายละมุดฝรั่ง (*Achras sapota*) ที่สุก กลุ่มของเส้นใยเจริญติดกับอาหาร (adpressed) เส้นใยสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกัน (septate) แตกกิ่งก้าน กว้าง 2-3.5 ไมโครเมตร conidiomata เป็นแบบอะเซอร์วูลัส (acervulus) โดยโคนิเดียเกิดบน pulvinate masses ของ conidiogenous cells ปรากฏให้เห็นได้ประมาณ 2 สัปดาห์ ไม่มี stromatic tissue มีการขับของเหลวขึ้น (exudates) เป็นหยดเล็กๆ สีน้ำตาลแดงเรื่อยๆ หรือน้ำตาลเหลืองและมีโคนิเดียลอยอยู่ ไม่พบก้านชูโคนิเดีย conidiogenous cells จะ discrete และ indeterminate ใสไม่มีสีเขียว เป็นทรงกระบอกหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งมีผนังกัน 1-2 ผนัง ปลายมน (obtuse) ฐานแหลมตันที่จนถึงรอยแผลที่เกิดจากการหลุดออก ผนังหนา 0.5-1 ไมโครเมตร ขนาด 11-22.5(25) X 5-9 ไมโครเมตร (Sankaran *et al.*, 1995)

8. การก่อเกิดโรค

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *C. eucalypti* บนใบของต้นกล้า *E. grandis* และ *E. tereticornis* อายุ 6 เดือน โดยใช้การหยดหยดเล็กๆ ของ conidia และ mycelium suspension ลงบนด้านหน้าใบและหลังใบ และมีการเปรียบเทียบระหว่างการทำแผลและไม่ทำแผล พบว่า อาการใบจุดเกิดขึ้นภายหลังจากปลูกเชื้อ 4-5 วัน ในทั้งสองด้านของแผ่นใบและการทำหรือไม่ทำแผลจะให้ผลเช่นเดียวกัน (Sankaran *et al.*, 1995) ต่อมาทำการทดลองปลูกเชื้อราชนิดนี้ โดยใช้ความเข้มข้นของ spore suspension เท่ากับ 5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในกล้า *E. camaldulensis* var. *obtusa*, *E. camaldulensis* var. *camaldulensis*, *E. amplifolia* และ *E. blakelyi* อายุ 2 เดือนโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกจำนวน 6 บล็อก ภายหลังจากปลูกเชื้อเก็บข้อมูลของจำนวนใบที่มีโรคใบจุดในต้นและจำนวนจุดต่อใบพบว่า อาการของโรคที่เกิดขึ้นเหมือนกับอาการของโรคที่พบในสภาพแปลงของต้นอ่อนแอโดย *E. camaldulensis* และ *E. blakelyi* เกิดใบจุดเฉลี่ยประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์ของใบที่ปลูกเชื้อ และ *E. amplifolia* จะถูกเข้าทำลายประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ (Old *et al.*, 2002)

ชีววิทยาของเชื้อสาเหตุนี้รู้เพียงเล็กน้อย โดยการเข้าทำลายของเชื้อ *C. eucalypti* จะเข้าทั้งปากใบและบาดแผลขนาดเล็ก การเกิดโรคจะแสดงอาการให้เห็นใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ (เกิดมากน้อยกว่า 4-5 วัน) และต้องการความชื้น โรคจะระบาดมากในระหว่างฤดูฝน ฝนและลมनाจะ เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องในการกระจายของเชื้อรา การกระจายระหว่างประเทศส่วนใหญ่ น่าจะ กระจายผ่านทางเมล็ดหรือเปลือกเมล็ด แต่การเข้าทำลายเมล็ดยังไม่มีเอกสารยืนยัน (Ciesla *et al.*, 1996)

9. ปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อสาเหตุโรค

ในระหว่างที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายพืชอาศัยอาจจะไม่แสดงอาการโรคออกมาให้เห็น หรือจะแสดงอาการโรคออกมาในระดับต่างๆ กัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อ สาเหตุโรคนั้นๆ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ปฏิกริยา คือ compatible interaction เป็นปฏิกริยาที่พืช อาศัยและเชื้อสาเหตุโรคอาศัยอยู่ร่วมกันได้ในช่วงแรก แต่เชื้อสาเหตุโรคจะทำลายพืชอาศัยทำให้ แสดงอาการโรคออกมาในเวลาต่อมา ส่วนอีกปฏิกริยาคือ incompatible interaction เป็นปฏิกริยาที่ พืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรคอาศัยอยู่ร่วมกันไม่ได้เป็นผลให้ไม่แสดงอาการโรคออกมาโดยใน ปฏิกริยานี้เป็นไปได้ว่าในส่วนของเชื้ออาจจะเป็นเชื้อที่อ่อนแอทำให้ไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ดี หรือในส่วนของพืชอาจจะเป็นพืชที่ต้านทานมีกลไกที่ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งความ ต้านทานของพืชสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นความต้านทานที่มีอยู่แล้วตาม ธรรมชาติก่อนที่เชื้อจะเข้าทำลายที่เรียกว่า constitutive resistance หรือ passive resistance ซึ่ง เกี่ยวข้องกับลักษณะทางโครงสร้างของพืช เช่น ลักษณะใบ จำนวนและการเปิดปิดของปากใบ หรือ เกี่ยวข้องกับสารเคมีต่างๆ ที่สะสมในพืช แบบที่ 2 เป็นความต้านทานที่เกิดขึ้นเพื่อตอบโต้การเข้า ทำลายของเชื้อที่เรียกว่า inducible resistance หรือ active resistance ซึ่งกระบวนการป้องกัน (defense responses) ที่สร้างขึ้นจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ โดย Buchanan *et al.* (2000) แบ่งกระบวนการป้องกันเป็น 3 ช่วง คือ (1) การตอบสนองทันทีทันใดของเซลล์ที่ถูกบุก ได้แก่ การสร้าง reactive oxygen species, การเปลี่ยนแปลงไอออนภายในเซลล์ (ion fluxes), การ เติบโตหรือตัดหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน, cytoskeletal rearrangement, การตายอย่างรวดเร็วของเซลล์ (hypersensitive cell death) (2) การตอบสนองและกระตุ้นการทำงานของยีนเฉพาะแห่ง ได้แก่ การ สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenesis-related (PR) proteins), การสร้าง phytoalexins, peroxidase, phenylpropanoid pathways, การเสริมสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์

(3) การตอบสนองและกระตุ้นการทำงานของยีนทั่วทั้งต้นได้แก่ การสร้าง 1,3-β-glucanases, chitinase และ PR protein อื่นๆ

9.1 การเปลี่ยนแปลงของไอออนและแคลเซียมไอออน

การเปลี่ยนแปลงของไอออนต่างๆ ภายในเซลล์เป็นเหตุการณ์แรกๆ ที่เกิดขึ้นในหลายปฏิกิริยาของเชื้อสาเหตุโรคและพืชอาศัย โดยเฉพาะการเกิดการไหลเข้าของแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณลำดับถัดๆ ไป เพื่อไปกระตุ้นกระบวนการป้องกันต่างๆ จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและโปรโตพลาสมของแครอท (*Daucus carota*) พบว่า มีการตอบสนองต่อ elicitor ที่ได้จากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมกันของการไหลเข้าของแคลเซียมไอออนและการไหลออกของโพแทสเซียมไอออนจะมีผลต่อการถ่ายทอดสัญญาณจากเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปยังนิวเคลียส และนอกจากนั้นยังมีการปล่อย 4-hydroxy-benzoic acid ออกมาในอาหาร (Bach *et al.*, 1993) สัญญาณจากแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} signal) เป็นสิ่งจำเป็นในการกระตุ้นกระบวนการป้องกันในพืชอย่างหนึ่งแต่กระบวนการส่งสัญญาณลำดับถัดๆ ไปยังคงระบุไม่ได้ชัดเจน ซึ่ง Heo *et al.* (1999) พบว่า เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อหรือ elicitor ที่ได้จากเชื้อจะเกิดการกระตุ้นเซลล์ให้มีระดับของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้สร้าง calmodulin (CaM) isoforms ที่เฉพาะเจาะจงขึ้นภายใน 30 นาที ซึ่งเป็นการตอบสนองเพื่อความต้านทานโรคของพืช

9.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช โดย Bolwell *et al.* (1998) ได้เลี้ยงเซลล์กุหลาบ (*Rosa damascena*) และเติม elicitor จาก *Phytophthora* spp. และการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) ที่เติม elicitor ที่ได้จากผนังเซลล์ของเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* พบว่า มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์กุหลาบสร้างจาก plasma membrane NAD(P)H oxidase (superoxide synthase) ในขณะที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์ถั่ว ได้จากการทำงานของ peroxidases ในผนังเซลล์ โดยผ่านการ alkalization ภายนอกเซลล์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีสองบทบาทในพืชคือ ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำจะเป็นโมเลกุลถ่ายทอดสัญญาณ เพื่อกระตุ้นทำให้เกิดความทนทานต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ จากการศึกษาของ

Pellinen *et al.* (2002) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน birch (*Betula pendula*) มีหน้าที่เป็นโมเลกุลสำหรับถ่ายทอดสัญญาณ (signal molecule) ควบคุมการแสดงออกของยีน และการตายของเซลล์ที่ถูกชักนำจากความเครียดจากภายนอก โอโซน และเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Pss) ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นมาในระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิด programmed cell death เช่น ในการศึกษาการตายอย่างรวดเร็วของเซลล์ (hypersensitive cell death) ของเซลล์ยาสูบ BY-2 โดยกระตุ้นด้วย INF1 ที่เป็น elicitor ซึ่งปล่อยจากเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่เป็นสาเหตุโรค late blight พบว่า INF1 elicitor จะชักนำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างรวดเร็วเพื่อทำให้เกิด oxidative burst (Sasabe *et al.*, 2000)

9.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ที่มีหน่วยย่อยเป็นอะโรมาติก ที่ได้จากฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โดยลิกนินจะเกิดเป็นเมทริกซ์ (matrix) รอบส่วนประกอบที่เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์พืช ช่วยเพิ่มแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ ช่วยในการ facilitate water transport เซลล์ที่มีการสะสมลิกนินเช่น เซลล์ไซเลม (xylem element) และสเกลอเรนจิม่า (sclerenchyma) และพบได้บ่อยที่เป็นการดัดแปลงผนังเซลล์อื่นๆ เช่น เกิดการหนาของผนังเซลล์ชั้นที่สอง (secondary cell wall thickenings) นอกจากนั้นการสะสมลิกนินสามารถถูกชักนำโดยโรคหรือบาดแผลในเซลล์หลายชนิด ซึ่งกระบวนการสร้างลิกนิน (lignification) ประกอบด้วยการสังเคราะห์โมนอลิกนอล (monolignols) การเคลื่อนย้ายโมนอลิกนอลไปยังผนังเซลล์ และการเกิดพอลิเมอร์ไปเป็นลิกนิน (Whetten and Sederoff, 1995) โดยลิกนินนั้นได้จากการเกิดพอลิเมอร์ของโมนอลิกนอลโดย peroxidase (Polle *et al.*, 1994)

10. Pathogenesis-related (PR) proteins

พืชจะมีการสร้าง PR-protein เพื่อใช้ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ รวมทั้งเชื้อรา ซึ่ง PR-protein นี้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา โดย Van Loon and Van Strien (1999) แบ่ง PR-protein ออกเป็น 14 กลุ่ม (families) คือ PR1, PR2 (β -1,3-glucanase), PR3 (chitinase type I, II, IV, V, VI, และ VII), PR4 (chitinase type I, II), PR5 (thaumatin-like), PR6 (proteinase-inhibitor), PR7 (endoproteinase), PR8 (chitinase type III), PR9 (peroxidase), PR10 (ribonuclease-like), PR11 (chitinase type I), PR12 (defensin), PR13 (thionin), PR14 (lipid-

transfer protein) แต่ยังสามารถแยก PR-protein กลุ่มใหม่ได้อีกคือ PR15 (oxalate oxidase), PR16 (oxalate oxidase-like), PR17 (Tobacco PRp27) คุณสมบัติของ PR-protein จะมีความแตกต่างกันไป แต่คุณสมบัติของยีนบางกลุ่มก็ยังไม่ชัดเจนเช่น PR1 ยังไม่ทราบคุณสมบัติที่แน่นอนแต่มีผลทำให้เชื้อราตายได้ chitinase จะย่อย chitin ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราโดยเฉพาะบริเวณปลายของเส้นใย ทำให้ไปขัดขวางการเจริญเติบโตและเป็นการปล่อย oligosaccharide elicitor ขนาดเล็กออกมาโดยจะไปกระตุ้นกระบวนการตอบสนองในพืช glucanase (PR2), proteinases (PR7) และ RNases (PR10) มีบทบาทคล้ายกับ hydrolytic enzyme ทำให้เกิดความต้านทานต่อ oomycetes และแบคทีเรีย peroxidases (PR9) จะเกี่ยวข้องกับการทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงขึ้น thaumatin-like protein (PR5) มีความเหมือนกับ permatins ที่จะ permeabilise ผนังเซลล์เชื้อรา defensin (PR12) และ thionin (PR13) มีความเหมือนกับสารประกอบที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม lipid transfer proteins (PR14) บทบาทเกี่ยวกับการป้องกันยังไม่ชัดเจน (Dickinson, 2003)

PR-protein กลุ่มต่างๆ สามารถแยกได้จากหลายการทดลองและมีความแตกต่างกันออกไปตามแต่ปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรคดังนี้ โปรตีน P14a, P14b และ P14c ที่มีขนาด 14 kD ซึ่งแยกได้จากใบมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Baby) ที่ถูกเข้าทำลายโดย *Phytophthora infestans* โปรตีนทั้งหมดมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อราโดยจะยับยั้งการงอกของซุโอสปอร์ (zoospore) และลดการเข้าทำลายบริเวณผิวใบ นอกจากนั้นลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 3 จะอยู่ในกลุ่มของ PR1 (Niderman *et al.*, 1995)

โปรตีนขนาด 19, 16 และ 15 kD ที่แยกได้จากของเหลวระหว่างเซลล์ในใบบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) ที่ได้รับผลกระทบจากความเครียด ซึ่งโปรตีนขนาด 19 kD จะมีความเหมือนกับโปรตีน BP-R ที่ได้จากเมล็ดและมีความคล้ายคลึงกับ thaumatin-like (TL) permatins ส่วนโปรตีนขนาด 16 kD จะมีความเหมือนกับ TL proteins ในขณะที่โปรตีนขนาด 15 kD จะมีความเหมือนกับ pathogenesis-related Hv-1 TL protein (Trudel *et al.*, 1998)

โปรตีน IWF4 ที่พบในส่วนของเหลวระหว่างเซลล์ของใบบีท (*Beta vulgaris* L.) สามารถที่จะต่อต้านเชื้อรา *Cercospora beticola* (Sacc.) ซึ่งโปรตีนนี้มีความคล้ายคลึงกับ chitin-binding (hevein) domain ของ chitin-binding proteins ที่เป็น chitinases ที่อยู่ใน class 1 และ 4 (Nielsen *et al.*, 1997) โปรตีน C1, C2, C3 และ C4 ที่มี chitin binding domain ซึ่งแยกได้จากชิ้นส่วนของ European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) โดยโปรตีน C2, C3 และ C4 มีคุณสมบัติ

เป็น chitinase และจากการทดสอบการต่อต้านเชื้อราแสดงให้เห็นว่าโปรตีน C1, C3 และ C4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cryphonectria parasitica* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ของ chestnut (Vannini *et al.*, 1999) cDNA ที่ encode ให้ chitinase สามารถแยกได้จากข้าวโพด ซึ่งมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนอย่างมากกับ chitinases ใน class II ของ PR-4 เมื่อทำการกระตุ้นต้นข้าวโพดด้วย elicitors ของเชื้อราหรือใช้ moniliformin ซึ่งเป็น mycotoxin ที่สร้างจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* พบว่ามีการเพิ่มของระดับ *ZmPR4* mRNA (Bravo *et al.*, 2003)

โปรตีน Rs-AFP1 และ Rs-AFP2 แยกได้จากเมล็ด radish โดยโปรตีนเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กประมาณ 5-kDa และมี cysteine จำนวนมาก โดยโปรตีน Rs-AFPs มีความสามารถต่อต้านเชื้อราได้หลายชนิดและมีประสิทธิภาพมาก (Terras *et al.*, 1992) โปรตีน So-D1-7 ที่แยกได้จากการเตรียม crude cell wall ของใบ spinach (*Spinacia oleracea* cv. *Matador*) เมื่อทำการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า โปรตีนทั้ง 6 โปรตีน ได้แก่ So-D2-7 จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 4 ของ defensins ในพืช ซึ่งมีโครงสร้างแบบใหม่ และสามารถต่อต้านแบคทีเรียสาเหตุโรคแกรมบวก เช่น *Clavibacter michiganensis* และแกรมลบ เช่น *Ralstonia solanacearum* นอกจากนั้นยังสามารถต่อต้านเชื้อราได้ เช่น *Fusarium culmorum*, *F. solani*, *Bipolaris maydis* และ *Colletotrichum lagenarium* (Segura *et al.*, 1998) โปรตีนขนาดเล็กที่มี cysteine จำนวนมากสามารถแยกได้จากเมล็ดพืชผัก (Phytolacca americana) โปรตีนนี้สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราเส้นสายและแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด และลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีนจะคล้ายกับ antimicrobial protein (AMP) จากต้นบานเย็น (*Mirabilis jalapa*) (Liu *et al.*, 2000) จากการแยก TSW12 ซึ่งเป็น full-length cDNA clone ของมะเขือเทศ ซึ่ง TSW12 mRNA มีการสะสมในระหว่างการงอกของเมล็ดมะเขือเทศและจะมีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเติม NaCl หรือทำ heat shock เมื่อกำหนดลำดับกรดอะมิโนที่อาจเป็นไปได้ (deduced amino acid sequence) ของ TSW12 พบว่ามีความเหมือนอย่างมากกับ lipid transfer proteins ที่มีการรายงานไว้จึงสรุปว่า TSW12 จะ encode ให้ lipid transfer protein (Torres-Schumann *et al.*, 1992) โปรตีน LTP-a1 และ LTP-a2 ที่แยกได้จาก crude cell-wall preparation ของใบ *Arabidopsis* โดยโปรตีนทั้งสองสามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* และลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีนทั้งสองมีความเหมือนกับ lipid transfer proteins (Segura *et al.*, 1993)

การเข้าทำลายต้นกล้าข้าวสาลีโดย *Fusarium culmorum* จะทำให้เกิดการสร้าง wheatwaxins (PR4) และพบกิจกรรมของ peroxidase (PR9) เพิ่มขึ้น ซึ่งการชักนำให้สร้าง PR-proteins หลายๆ ชนิดเพิ่มขึ้นด้วยกลไกที่ต่างกันนี้เป็นส่วนหนึ่งของกลยุทธในการป้องกันเพื่อจำกัดการ colonization ของเชื้อรา (Caruso *et al.*, 1999) การตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวฟ่าง (sorghum) เมื่อถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* จากบาดแผลที่เกิดจากเพลี้ย และจากการทำบาดแผล พบว่า chitinases และ β -1,3-glucanase จะถูกชักนำให้สร้างเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อพืชของทุก inbreds แต่ในแต่ละ inbreds จะมีการตอบสนองที่ต่างกันทั้งในช่วงระยะเวลาที่มีการชักนำและความยาวของระยะเวลา โดยทั่วไปใน inbreds ที่อ่อนแอและด้านทานจะมีระดับเอนไซม์ที่สูง (Krishnaveni *et al.*, 1999) การแสดงออกของ PR-1a และ PR-10 จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นจาก glucan elicitor (WGE) ที่ได้จากผนังเซลล์ของ *Phytophthora sojae* โดยการแสดงออกจะจำกัดอยู่ในบริเวณเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกับจุดที่มีการกระตุ้น ซึ่งต่างจากการแสดงออกของ elicitor-releasing endoglucanase (GLU, PR-2), WIN-like protein (WIN, PR-4) และ Kunitz trypsin inhibitor (KTI, PR-6) จะเกิดขึ้นทั้งในบริเวณเซลล์ใกล้เคียง เซลล์รอบๆ และเซลล์ที่อยู่ไกลออกไปจากจุดที่มีการกระตุ้น (Graham *et al.*, 2003)

11. ยีนด้านทานโรคของพืช

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรคโดยเฉพาะ biotrophic parasites จะพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนในพืชอาศัยและยีนในเชื้อสาเหตุโรคอย่างเฉพาะเจาะจง สามารถอธิบายได้จาก gene-for-gene hypothesis ซึ่งเสนอโดย Flor (1971) จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างป่าน (flax) และราสนิมของป่าน (flax rust) พบว่า ยีนด้านทาน (Resistance gene; R gene) ในพืชจะตอบสนองอย่างเฉพาะเจาะจงกับโปรตีนของ avirulence genes (avr gene) ในเชื้อสาเหตุโรค ถ้ายีนด้านทานในพืชอาศัยและ avr gene ในเชื้อสาเหตุโรคมีความสัมพันธ์กันจะทำให้เกิดความต้านทานโรคขึ้นได้ แต่ถ้ายีนทั้งสองไม่ทำงานหรือไม่มีความสัมพันธ์กันก็จะทำให้เกิดโรคขึ้นได้ เมื่อเกิดการจดจำระหว่างทั้งสองยีนดังกล่าวขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในเซลล์พืชและกระตุ้นการตอบสนองเพื่อป้องกัน โดยเกิดการไหลเข้าออกของแคลเซียมไอออนและไอออนต่างๆ ภายในเซลล์ เกิด oxidative burst และ transcriptional reprogramming ภายในและรอบๆ บริเวณที่ถูกเข้าทำลาย แต่ส่วนมากแล้วจะเกิด programmed cell death ของเซลล์ในบริเวณนั้น เป็นการตายอย่างรวดเร็วของเซลล์ในบริเวณที่ถูกเข้าทำลายโดยเรียกลักษณะการตายนี้ว่า hypersensitive response (HR) (Greenberg and Vinatzer, 2003) ในกรณีที่ไม่มี การจดจำที่เฉพาะเจาะจง กระบวนการตอบสนอง

เพื่อการป้องกันพื้นฐาน (basal defense response) ยังคงเกิดขึ้น ซึ่งกระบวนการตอบสนองเพื่อการป้องกันพื้นฐานนั้นมีความคาบเกี่ยวกับกระบวนการป้องกันที่มีโปรตีนจากยีนด้านทานโรคเป็นสื่อ (R-protein-mediated defense) แต่การตอบสนองเพื่อการป้องกันพื้นฐานจะเกิดได้ช้า มีระดับสัญญาณต่ำ และไม่ยับยั้งการ colonization ของเชื้อสาเหตุโรคเพียงแต่จะจำกัดขอบเขตของการบุกรุกไว้เท่านั้น (Glazebrook *et al.*, 1997)

ยีนด้านทานโรคของพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (class) ใหญ่ๆ ตามโครงสร้างของโปรตีน ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย nucleotide binding site (NBS), leucine-rich repeat (LRR) และ Toll interleukin receptor (TIR-NBS-LRR) ได้แก่ ยีน *N* ของยาสูบ และ *L6* ของป่าน หรือประกอบด้วย coiled-coil (CC) motif (CC-NBS-LRR) ได้แก่ ยีน *RPS2* ของ *Arabidopsis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย extracellular LRR และ transmembrane (LRR-TM) ได้แก่ ยีน *Cf-9* ของมะเขือเทศ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย intracellular serine/threonine protein kinase ได้แก่ ยีน *Pto* ของมะเขือเทศ กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย extracellular LRR, transmembrane (TM) และ cytoplasmic kinase domain (LRR-TM-Kinase) ได้แก่ ยีน *Xa21* ของข้าว กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย toxin reductase ได้แก่ ยีน *Hm1* ของข้าวโพด (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Martin *et al.*, 2003) โดยยีนด้านทานโรคที่โคลนได้ส่วนมากจะอยู่ในกลุ่ม NBS-LRR, eLRR หรือ LRR-Kinase การแยกยีนด้านทานในกลุ่มเหล่านี้ของมะเขือเทศ ยาสูบ และ *Arabidopsis* สามารถแยกได้ด้วยวิธี map-based cloning หรือ transposon tagging โดยเทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัยตำแหน่งของยีนบนแผนที่โครโมโซม แต่สำหรับพืชไร่หลายชนิดรวมทั้งพันธุ์ป่าไม่สามารถที่จะหาข้อมูลเหล่านี้ได้ แต่ก็สามารถแยกยีนด้านทานโรคโดยใช้เทคนิค resistance gene analogs (RGA) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายโดยอาศัยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น ในส่วน NBS และ core residues ของ LRRs ซึ่งมีลำดับอนุรักษ์ระหว่างยีนด้านทานโรคของพืชต่างๆ เพื่อนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ ผลผลิตที่ได้จาก PCR จะเรียกว่า RGA โดยจากการศึกษาทางจีโนมแสดงให้เห็นว่า NBS-LRR, eLRR และ LRR-Kinase มีอยู่แพร่หลายทั่วไปในพืช และสามารถโคลน RGA ด้วยปฏิกิริยา PCR (McDowell and Woffenden, 2003) เทคนิค resistance gene-analog polymorphism (RGAP) อาจจะใช้เป็นเครื่องมือสำหรับวางแผนที่ยีนด้านทานโรคเชิงคุณภาพและปริมาณได้ โดยในโรค stripe rust โรคราสนิม และ Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) ที่เป็นโรคที่สำคัญของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) จากข้อมูลลักษณะของฟีโนไทป์ที่เกี่ยวกับโรคดังกล่าวและ marker linkage map ที่สร้างจาก doubled-haploid lines ของการผสมระหว่าง Shyri x Galena จึงได้มีการกำหนดจำนวนของยีน ตำแหน่งในจีโนม และผลจากยีนที่ให้ความต้านทานโรคทั้ง 3 โรค โดยทำการวางตำแหน่ง RGAP ลงในประชากรดังกล่าว

พบว่า ความต้านทานต่อโรคราสนิมมาจากยีน 1 ยีน บนโครโมโซมที่ 1 (7H), QTL บนโครโมโซมที่ 2 (2H), 3 (3H), 5 (1H) และ 6 (6H) เป็นตัวกำหนดความต้านทานต่อโรค stripe rust และความต้านทานต่อ BYDV ใน serotypes ที่ MAV และ PAV ถูกระบุโดย coincident QTL อยู่บนโครโมโซมที่ 1 (7H), 4 (4H) และ 5 (1H) แต่ QTL interactions ไม่มีความสัมพันธ์กับความต้านทาน (Toojinda *et al.*, 2000)

12. เทคนิค sequence-tagged sites (STS)

แนวคิดของ sequence-tagged sites (STS) ได้เสนอโดย Olson *et al.* (1989) มีแนวคิดอยู่ว่า จากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ทราบและมีเพียง 1 ชุด บนตำแหน่งแผนที่ยีน น่าจะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งของยีนที่สำคัญนั้นบนโครโมโซม ถ้าจะทำให้จีโนมของมนุษย์มีเครื่องหมายโมเลกุลเพียงพอเพื่อใช้ศึกษาจะต้องใช้ห้องสมุดดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มาก ว่าเป็นที่เก็บเพิ่มจำนวน ตรวจสอบผล และกระจายไปให้นักวิจัยที่สนใจ แต่ถ้าใช้บางส่วนของลำดับเบสของโคลนเหล่านี้ก็จะเพียงพอที่จะให้ข้อมูลสำหรับนำมาใช้ใหม่ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลด้วยการทำ PCR ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ก็จะสามารถเก็บวัสดุทางชีวภาพในรูปข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ทำให้สะดวกต่อการใช้งานและเผยแพร่ เครื่องหมายโมเลกุลที่เก็บแบบอิเล็กทรอนิกส์จะเรียกว่า sequence-tagged sites (STS) มีการใช้ประโยชน์ของ STS ในการพัฒนาแผนที่ทางกายภาพจากแผนที่ยีนในโครงการจีโนมของมนุษย์

เทคนิค STS เป็นการติดตามยีนหรือสายนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนนั้นๆ มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อใช้ศึกษาต่อไป และสามารถจะใช้ STS มาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS สามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและง่าย ใช้ดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ต้องการได้เสมอ ส่วนข้อจำกัดหลักของการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS คือ มีค่าใช้จ่ายมากและต้องใช้แรงงานเพื่อหาข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอในการสร้างและสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง และอาจต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการจำแนกความหลากหลาย (Skiba *et al.*, 2003) การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS ได้มีการศึกษาในหลายการทดลองดังนี้ การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS จากยีนต้านทานโรค yellow rust โดยยีน *YrMoro* พบในข้าวสาลีพันธุ์ Moro เป็นยีนเดี่ยวและเป็นยีนเด่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS ได้มาจากแถบดีเอ็นเอของ amplified fragment length polymorphism (AFLP) ที่มีการกระจายตัวร่วมกับยีน *YrMoro* และได้ทำการ

ออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ให้ชื่อว่าคู่ไพรเมอร์ S26M47 ซึ่งออกแบบโดยอาศัยลำดับเบสที่ใช้คัดเลือกของไพรเมอร์ AFLP รวมกับลำดับเบสที่ต่อเข้าไปในแถบดีเอ็นเอของ AFLP เมื่อนำคู่ไพรเมอร์นี้ไปทำปฏิกิริยา PCR จะเกิดเป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 151 คู่เบสที่จะพบในพันธุ์ Moro และ resistant bulks และไม่พบแถบดีเอ็นเอนี้ในพันธุ์ Lemhi และ susceptible bulk (Smith *et al.*, 2002) ความแตกต่างของสายพันธุ์คล้าย (near-isogenic lines; NILs) และสายพันธุ์ผู้ให้ (donor parent) กับสายพันธุ์ผู้รับ (recurrent parent) ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม (leaf rust) สามารถแยกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ random amplified polymorphic DNA (RAPD) เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในสายพันธุ์ด้านทานที่มียีน *Lr28* ของข้าวสาลีไปทำการโคลนและหาลำดับ ทำการออกแบบไพรเมอร์ STS จากลำดับเบสที่ได้และมีความเฉพาะเจาะจงกับยีน *Lr28* แล้วนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด STS ไปตรวจสอบโดยทำ bulk segregation ของประชากรรุ่น F3 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้พบได้เฉพาะใน NILs, F3 bulk ที่ด้านทาน, และ F3 lines ที่ด้านทาน แต่ไม่พบในสายพันธุ์ผู้รับ F3 bulk ที่อ่อนแอ และ F3 lines ที่อ่อนแอ (Naik *et al.*, 1998)

Radwan *et al.* (2004) ได้โคลนยีนและทำแผนที่ยีนของ resistance gene analogs (RGA) ที่มีความยาวสมบูรณ์ 2 ยีน ซึ่งอยู่ในกลุ่ม CC-NBC-LRR ของยีนด้านทานของพืช แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาพัฒนาได้เป็น STS จำนวน 14 ชนิด ที่อยู่ภายในตำแหน่ง P15/P18 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ความต้านทานต่อเชื้อ *Plasmopara halstedii* ใน races ต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคราน้ำค้างในทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) และสามารถใช่ STS นี้ในโปรแกรม marker-assisted selection

Mano *et al.* (1999) ได้จำแนก STS ที่เหมาะกับ recombinant inbred lines ของข้าวบาร์เลย์พันธุ์ Azumamugi x Kanto Nakate Gold โดยสร้างไพรเมอร์ STS จำนวน 43 คู่ จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายของ restriction fragment length polymorphism (RFLP) clones เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ไปทำปฏิกิริยา PCR พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 41 คู่ ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในปฏิกิริยา PCR ได้ มีไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดต่างกันระหว่าง Azumamugi และ Kanto Nakate Gold และมีไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ เมื่อนำผลผลิตจาก PCR ของไพรเมอร์ที่เหลือ 37 คู่ ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 46 เอนไซม์ พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 15 คู่ จะให้โพลิมอร์ฟิซึม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นกล้ายูคาลิปตัสอายุ 6-8 เดือน และใบจากต้นยูคาลิปตัสในสายต้น SF01, SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF18, SF36, SF70, SF86, SF94 และ SF98
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้แยกเชื้อ เชื้อเชื้อ และศึกษาพื้นฐานวิทยาของเชื้อราและการปลูกเชื้อ
3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค sequence-tagged sites

วิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

นำใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู และนำไปแยกเชื้อด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting

นำใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร โดยตัดผ่ากลางใบและให้มีเนื้อเยื่อใบที่ยังไม่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อรา *C. eucalypti* รวมอยู่ด้วย นำชิ้นส่วนใบใส่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochloride) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปวางบนอาหาร PDA (มันฝรั่ง 200 กรัม, น้ำตาล dextrose 20 กรัม, วุ้น 15 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) จานละ 4-5 ชิ้น บ่มเชื้อไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-4 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโตออกมาบนอาหาร หลังจากนั้นย้ายเชื้อราลงในอาหาร PDA จานใหม่

1.2 การแยกเชื้อจากกลุ่มของโคนิเดียโดยตรง

พับกระดาษทิชชูที่นำมาเชื้อมาวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อ เทน้ำกลั่นที่นำมาเชื้อใส่พอชุ่ม ตัดใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดหรือใบไหม้ให้พอดีกับจานเลี้ยงเชื้อ วางลงในจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาใช้พลาสติกพันเพื่อให้เกิดสภาพที่มีความชื้นสูง บ่มไว้เป็นเวลา 2-3 วัน จะเกิดกลุ่มของโคนิเดีย (conidial masses) ที่ขับออกมาจาก conidiomata ใช้เข็มเย็บเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแตะกลุ่มของโคนิเดียนำไปเลี้ยงบนวุ้น (water agar: วุ้น 15 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) บ่มเชื้อไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-4 วัน ย้ายเชื้อราลงในอาหาร PDA จานใหม่

เมื่อเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เจริญบนอาหาร PDA สร้างโคนิเดียแล้ว นำมาแยกโคนิเดียเดี่ยว (single conidial isolation) โดยใช้เข็มเย็บแตะกลุ่มของโคนิเดียมากระจายบนผิวหน้าของวุ้น (water agar) ด้วยน้ำกลั่นที่นำมาเชื้อ บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เมื่อโคนิเดียออกเป็นเส้นใยตัดขึ้นวุ้นที่มีโคนิเดียเดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

2. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารของเชื้อราแต่ละไอโซเลท

2.1 ความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน บันทึกลักษณะโคโลนีและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) จำนวน 4 ซ้ำ จัดให้เชื้อราแต่ละไอโซเลทเป็นทรีทเมนต์ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS

2.2 ขนาดและรูปร่างของโคนิเดีย

เลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทบนอาหาร PDA นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อราสร้างโคนิเดีย นำโคนิเดียมาทำสไลด์ชั่วคราวด้วย lactophenol บันทึกลักษณะรูปร่างโคนิเดีย วัดขนาดความกว้างและความยาวด้วย ocular micrometer

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด จำนวน 50 ซ้ำ จัดให้เชื้อราแต่ละไอโซเลทเป็นทรีทเมนต์ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS

3. การคัดเลือกสายพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอของยูคาลิปตัสด้วยการปลูกเชื้อ

3.1 การเตรียม conidial suspension

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA นำไปป่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน เก็บโคนิเดียโดยใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อเพื่อล้างโคนิเดียออกจากผิวหน้าอาหารใช้แท่งแก้วชุบเบาๆ นับจำนวนโคนิเดียด้วย haemocytometer และเจือจางลงด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อจนได้ความเข้มข้นของโคนิเดียประมาณ $1-5 \times 10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

3.2 การปลูกเชื้อโดยตรงในต้นกล้า (Intact seedling inoculation)

ต้นกล้ายูคาลิปตัสอายุประมาณ 6-8 เดือน ที่มีใบเจริญเติบโตเต็มที่ประมาณ 6-8 ใบ ใช้เป็นหน่วยทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 3×8 แฟกทอเรียลที่ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (3×8 factorial experiment in completely randomized design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดให้ทรีทเมนต์ที่ 1 คือ ไอโซเลทของเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ทรีทเมนต์ที่ 2 คือ สายต้นยูคาลิปตัสจำนวน 8 สายต้น ได้แก่ SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF36, SF70 และ SF86 ปลูกเชื้อโดยพ่น conidial suspension ลงบนใบของต้นกล้ายูคาลิปตัส ในช่วงเวลา 18.00-19.00 น. ย้ายต้นกล้าไปป่มไว้ในกล่องขึ้นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิประมาณ 25-32 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลพื้นที่ใบที่เป็นโรคและพื้นที่ใบทั้งหมดในวันที่ 7-14 วัน หลังจากปลูกเชื้อ

3.3 การปลูกเชื้อด้วยวิธีการ detached leaf technique

การปลูกเชื้อด้วยวิธีการ detached leaf technique แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 (detached leaf technique 1) วางแผนการทดลองแบบ 3×6 แฟกทอเรียลที่ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดให้ทรีทเมนต์ที่ 1 คือ ไอโซเลทของเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ทรีทเมนต์ที่ 2 คือ สายต้นยูคาลิปตัสจำนวน 6 สายต้น ได้แก่ SF03, SF07, SF01, SF06,

SF18, และ SF94 ส่วนการทดลองที่ 2 (detached leaf technique 2) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด จำนวน 4 ซ้ำ โดยจัดให้ทรีทเมนต์คือ สายต้นยูคาลิปตัสจำนวน 11 สายต้น ได้แก่ SF01, SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF18, SF36, SF70, SF94 และ SF98

ยอดยูคาลิปตัสที่มีใบเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจำนวน 3 ใบต่อยอดใช้เป็นหน่วยทดลอง 1 หน่วย ล้างด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเช็ดด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อให้แห้ง นำก้านของยอดยูคาลิปตัสใส่ลงในถุงน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นรัดด้วยหนังยางผูกเชือกโดยการพันด้วย conidial suspension ในช่วงเวลา 18.00-19.00 น. แล้วย้ายยอดยูคาลิปตัสไปบ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เก็บข้อมูลพื้นที่ใบที่เป็นโรคและพื้นที่ใบทั้งหมดในวันที่ 7-14 หลังจากปลูกเชื้อ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพื้นที่ใบที่เป็นโรคและพื้นที่ใบทั้งหมดในแต่ละทรีทเมนต์ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{พื้นที่ใบที่เป็นโรค (ตร.ซม.)}}{\text{พื้นที่ใบทั้งหมด (ตร.ซม.)}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในแต่ละทรีทเมนต์ที่ได้จะวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS และจัดแบ่งปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ตามค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 4 ระดับ คือ ต้านทาน (Resistance: R), ค่อนข้างต้านทาน (Moderately Resistance: MR), ค่อนข้างอ่อนแอ (Moderately Susceptibility: MS) และอ่อนแอ (Susceptible: S)

4. การสกัดดีเอ็นเอยูคาลิปตัส

สกัดดีเอ็นเอยูคาลิปตัสสายต้นต่างๆ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตัดใบยูคาลิปตัส (ใช้ใบอ่อนที่โตพอสมควร) เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโถงประมาณ 1 กรัม เติมน้ำโตรเจนเหลวให้ท่วม บดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนระเหยไปจนหมด

ถ่ายผลลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี 2X CTAB (4% hexadecylmethyl ammonium bromide, 2.8 M NaCl, 20 mM EDTA, 200 mM Tris HCl pH8.0) 10 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 10 นาที จากนั้นนำหลอดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน (ปรับปริมาตรของหลอดเซนตริฟิวจ์ให้เท่ากับด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์) ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ และเติมไอโซโพรพานอล 2/3 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำทิ้ง เติม washing buffer (10 mM sodium acetate, 70% ethanol) 10 มิลลิลิตร เคา่ข้างหลอดเบาๆ เพื่อละลายเกลือออกจากดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศ ละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris HCl pH8.0, 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่ยังคงเหลืออยู่ด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 450 ไมโครลิตร 1-2 ครั้ง เพื่อกำจัดฟีนอลที่อาจติดอยู่ออกไป เนื่องจากฟีนอลมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดเช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ DNA polymerase เป็นต้น ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 1/10 เท่าของปริมาตรของเหลว และ absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอเข้า เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (หรือเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งไป คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้ง หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน TE buffer (10

mM Tris HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

5. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ วัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer และวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

5.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

การตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance: A หรือ optical density: OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร มีขั้นตอนดังนี้ เจือจางดีเอ็นเอลง 50 เท่า โดยใช้ดีเอ็นเอ 6 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 294 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่ละลายไปวัดปริมาณและคุณภาพ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่า OD₂₆₀ มาคำนวณความเข้มข้นตามสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ค่า OD₂₆₀ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ ส่วนค่า OD₂₈₀ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน จากค่าทั้งสองทำให้ทราบคุณภาพดีเอ็นเอโดยดูจากอัตราส่วนของค่า OD_{260/280} ถ้าเป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนเท่ากับ 1.8 ถ้ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารเคมีในกระบวนการสกัดอัตราส่วนจะต่ำกว่า 1.6 แต่ถ้าอัตราส่วนมากกว่า 2.0 จะหมายถึงมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

5.2 การวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรส เจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของ

ดีเอ็นเอ และตรวจสอบโดยการมองผ่านแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอได้ในระดับนาโนกรัม และตรวจสอบคุณภาพโดยดูการแตกหักของดีเอ็นเอ การปนเปื้อนของโปรตีน และอาร์เอ็นเอได้

5.3 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรสเจล 0.8 กรัม ใส่ลงใน 1X TAE buffer (4.84 g Tris-acetate, 1.15 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 หรือ 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และหลอมอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ 1-2 นาที ปล่อยให้สารละลายอะกาโรสให้เย็นลง จนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดเจลที่มีหัวเสียบอยู่ปลายด้านบนของถาดให้เจลมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-45 นาที ดึงหัวออกอย่างระมัดระวัง นำถาดเจลไปใส่ใน chamber อิเล็กโทรโฟรีซิส ให้ด้านที่มีหลุมอยู่ทางซ้าย และเติม 1X TAE buffer ให้สูงท่วมแผ่นเจลประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารลงในหลุมของอะกาโรสเจล ปิดฝาเครื่อง และเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากซ้ายไปขวา โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโพลีดีคิงบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เหมาะสม นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที นำแผ่นเจลไปแช่ในถาดน้ำไหลผ่านเบาๆ ประมาณ 10 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ค้างอยู่ในเจล นำแผ่นเจลไปดูในเครื่องดูเจล (gel document) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพเก็บไว้

6. การออกแบบไพรเมอร์

ทำการค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PR-protein, ยีนต้านทานโรคของพืช, และยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันของพืชจากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของกลุ่มสายดีเอ็นเอของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม ClustalW1.82 ใน <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> เพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในช่วงลำดับอนุรักษ์โดยใช้โปรแกรม

Primer3 ใน http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi แล้วตั้งสังเคราะห์ไพรเมอร์

7. การทำปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10X PCR buffer (มีแมกนีเซียมไอออน 20 มิลลิโมลาร์) 1 เท่า, forward primer และ reverse primer อย่างละ 5 พิโคโมล, *YEA* DNA Polymerase 0.5 ยูนิต และปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denature) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, ขั้นที่ 2 ประกอบด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, การทำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิตามความเหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์ นาน 1 นาที และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35-40 รอบ, ขั้นสุดท้ายการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

8. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

8.1 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิต PCR ของไพรเมอร์คู่ต่างๆ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีวิธีทำดังแสดงในข้อ 5.3

8.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

8.2.1 การเตรียม denaturing polyacrylamide gel

ล้างกระจกหุกระต่ายและกระจกธรรมดาขนาด 15 x 17 ตารางเซนติเมตร ด้วยน้ำให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง เช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เช็ดกระจกธรรมดาด้วย blind silane mix (blind silane 1 μ l, glacial acetic 2.5 μ l, 95% ethanol 500 μ l)

ให้ทั่วแผ่นและแห้ง เช็ดกระจกหุกระต่ายด้วย repel silane 150-200 ไมโครลิตร กระดาษที่เช็ด repel silane เสร็จแล้วให้ใช้เช็ดที่ spacer และหิวีเลียบเจลด้วย นำกระจกทั้งสองแผ่นที่เช็ดไว้ประกบเข้าด้วยกันโดยวาง spacer กั้นทั้ง 2 แผ่นไว้ที่ริมด้านข้างของกระจก ใช้คลิปติดกระจกเข้าไว้ด้วยกันแล้วใช้กระดาษกาวติดขอบของกระจกทั้ง 2 แผ่นยกเว้นด้านบนของกระจก

การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ทำได้โดยชั่งยูเรีย 6.75 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เดิม 5X TBE buffer (5.4 g Tris base, 2.75 g boric acid, 2 ml 500 mM EDTA pH8.0) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปอุ่นไฟอ่อนๆ ให้ละลาย จากนั้นนำบีกเกอร์มาแช่น้ำให้เย็น เดิมอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แกว่งให้เข้ากัน เดิม APS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แกว่งให้เข้ากัน และเติม TEMED ปริมาตร 7.5-10 ไมโครลิตร แกว่งให้เข้ากัน เทเจลใส่ในกระจกที่เตรียมไว้ อย่าให้มีฟองอากาศแล้วเสียบหิวีลระหว่างกระจกทั้งสองแผ่น ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

นำกระจกที่มีเจลที่เตรียมไว้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แะกระดาษกาวและดึงหิวีออก ทำการ pre-run ที่ 300 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เตรียมดีเอ็นเอโดยผสม สารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร กับ loading buffer (10 ml formamide, 10 mg xylene cyanol, 10 mg bromphenol blue, 200 μ l 0.5 M EDTA pH8.0) 2.5 ไมโครลิตร ลงในหลอดเตรียมโดยผสม 25 bp. DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 4 ไมโครลิตร และ loading buffer 2.5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอและ DNA marker ไปแยกให้เป็นสายเดี่ยว (denature) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที ใช้เข็มฉีดยาคูด บัฟเฟอร์มาไลยูเรียตามช่องหิวีของเจลออก ดูดสารละลายดีเอ็นเอและ 25 bp. DNA marker ใส่ลงไปในช่องหิวีของเจล เปิดเครื่องรันที่ 300 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปิดเครื่อง นำกระจกมาล้างด้วยน้ำประปา ดึง spacer ออกแล้วแกะกระจกหุกระต่ายออก

8.2.2 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

นำกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่น้ำกลั่นนาน 10 นาที เขย่าที่ประมาณ 120 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่าเตรียม CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.25 g CTAB, น้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร) ใส่แท่งแม่เหล็กแล้วนำไปปั่นให้ละลาย นำกระจกมาแช่นาน 30 นาที เขย่าที่ประมาณ

90 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่าเตรียมแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซนต์ (750 μ l conc. ammonia, น้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร) ใส่ในถาดสำหรับแช่กระจก เขย่าให้เข้ากัน นำกระจกมาแช่นาน 15 นาที เขย่าที่ประมาณ 90 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า เตรียมสารละลายซิลเวอร์ (0.4 g AgNO_3 , น้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร, 333 μ l 3 M NaOH, 960 μ l ammonia; แอมโมเนียจะเติมลงทีละหยดจนได้สารละลายใส (ประมาณ 960 ไมโครลิตร) แล้วเติมเพิ่มไปอีก 2 หยด นำกระจกมาแช่นาน 20 นาที เขย่าที่ประมาณ 90 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นนำกระจกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปใส่ใน developer (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, น้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร) ซึ่งได้เตรียมและแช่เย็นไว้ก่อน เขย่าบนเครื่องเขย่าจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นชัดเจน นำกระจกมาจุ่มในน้ำกลั่นเขย่าประมาณ 2-3 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำกระจกมาผึ่งให้แห้งในอากาศ

9. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสจากคูโพรเมอร์ทั้งหมด ถ้ามีแถบดีเอ็นเอกำหนดเป็น “1” ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอกำหนดเป็น “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.01e (Rohlf, 1993) เพื่อหาค่าดัชนีความเหมือน และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method of average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) ซึ่งจะแสดงผลในรูปแบบของ dendrogram

10. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกแยะระหว่างกลุ่มสายต้นด้านทานและอ่อนแอหลังจากแยกขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งบนอะกาโรสและโพลีอะครีลาไมด์เจลจะนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

10.1 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลจะใช้ชุดสารละลาย QIA quick gel extraction kit (QIAGEN) ด้วยวิธีการที่บริษัทระบุไว้ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ แยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการ

ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ตามวิธีในข้อ 5.3 เมื่อเชื่อมด้วยเอทีเคียมโบรไมด์นำมาส่องภายใต้ UV transilluminator แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ QG ลงไป 3 เท่าของปริมาณเจล โดยเทียบน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ สังเกตสีของสารละลายในหลอดถ้าเป็นสีเหลืองและเจลดกลายจนหมด เติมไอโซโพรพานอลปริมาตรเป็น 1 เท่าของน้ำหนักเจล (100 มิลลิกรัม ~ 100 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอดขนาดเล็กที่มีชั้นกรองสำหรับแยกดีเอ็นเอออกจากสารละลายและมีหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร รองอยู่ด้านล่าง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายในหลอดล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายในหลอดล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2.5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำนาน 1 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีบัฟเฟอร์ PE เหลือค้างอยู่ หลังจากนั้นเทสารละลายในหลอดล่างทิ้ง ย้ายหลอดขนาดเล็กที่มีชั้นกรองมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติม elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดีเอ็นเอจะถูกชะล้างลงมายู่ข้างล่าง ดึงหลอดที่มีชั้นกรองทิ้งไป เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T ต่อไป

10.2 การสกัดดีเอ็นเอจากโพลีอะครีลาไมด์เจล

แยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดผ่าตัด นำมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่มีน้ำกลั่นที่นำมาเชื่อมปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดออกมาได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และใช้คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณแล้วให้แถบดีเอ็นเอดังกล่าว เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T ต่อไป

11. การโคลนแถบดีเอ็นเอ

11.1 การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM-T

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้สกัดออกจากเจลไว้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทระบุไว้ โดยใช้ 2X T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM-T vector (50 ng) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR (1 µg/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (3 weiss unit/µl) และเติมน้ำกลั่น นิ่งมาเพื่อให้ครบปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำหลอดปฏิกิริยาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

11.2 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth (tryptone 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, NaCl 10 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150-250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ดูอาหาร LB broth มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขวดใหม่ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150-250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จะได้เชื้อแบคทีเรียอยู่ช่วงกลาง log phase เทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารใส่ส่วนบนทิ้งไป เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร (50 mM CaCl₂) ที่เย็นจัดลงไป 20 มิลลิลิตร ค่อยๆ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้พาสเจอร์ปีเปตต์ดูดขึ้นลงเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายในส่วนบนทิ้งไป ทำซ้ำโดยเริ่มจากการเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้พาสเจอร์ปีเปตต์ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แบ่งสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปใช้ในการ transformation ได้ทันที

11.3 การนำพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

การนำพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์โดยใช้เทคนิค heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) ทำได้ดังต่อไปนี้ ผสมสารละลายพลาสมิดที่ได้จากข้อ 11.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที นำมาทำ heat shock โดยจุ่มลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหาร SOC (2% tryptone (g/ml), 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร โดยทำในตู้ laminar flow ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดสารละลายผสมระหว่าง X-gal กับ IPTG (30 ng/ml X-gal 30 μ l, 0.1 M IPTG 30 μ l) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร LB agar (tryptone 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, NaCl 10 กรัม, วุ้น 15 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) ที่มีแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โคลนที่เกิดขึ้นเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการ transformation โดยโคลนีสีขาวจะมี pGEM vector และชิ้น insert จิมโคลนีสีขาวด้วยไม้จิ้มฟันที่นิ่งมาเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 30 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบชิ้น insert ใน pGEM vector อีกครั้งด้วยการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วให้ชิ้น insert นั้น ตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการหรือไม่ เมื่อได้โคลนที่ต้องการนำหลอดที่มีโคลนที่ต้องการมาเติมน้ำอาหาร LB Broth ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยทำในตู้ laminar flow บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการสกัดพลาสมิดจะดูดโคลนของแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาประมาณ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงต่อในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และสกัดพลาสมิดต่อไป

12. การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิดจะใช้ชุดสารละลาย QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN) ตามวิธีการที่บริษัทระบุไว้ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวชั้นบนทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยบัฟเฟอร์ P1

ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วย้ายสารละลายลงสู่หลอด (ก่อนใช้บัฟเฟอร์ P1 ให้ตรวจว่าเติม RNaseA แล้วหรือไม่) เติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันทีอย่างเบาๆ 4-6 ครั้ง จะสังเกตเห็นสารละลายในหลอดขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายใส ส่วนบนใส่ใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์โดยเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีบัฟเฟอร์ PE ค้างอยู่ในคอลัมน์ แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB (10mM Tris.Cl, pH8.5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อละลายพลาสมิด ออกจากคอลัมน์โดยใส่ลงตรงกลางของคอลัมน์ตั้งพักไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

13. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

พลาสมิดที่ได้จะนำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

14. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และเรือนเพาะชำ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตบางเขน กรุงเทพฯ

15. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองเริ่มทำในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 และสิ้นสุดการทดลองในเดือนธันวาคม พ.ศ.

ผล

1. อาการของโรคใบจุดและใบไหม้ และการแยกเชื้อ

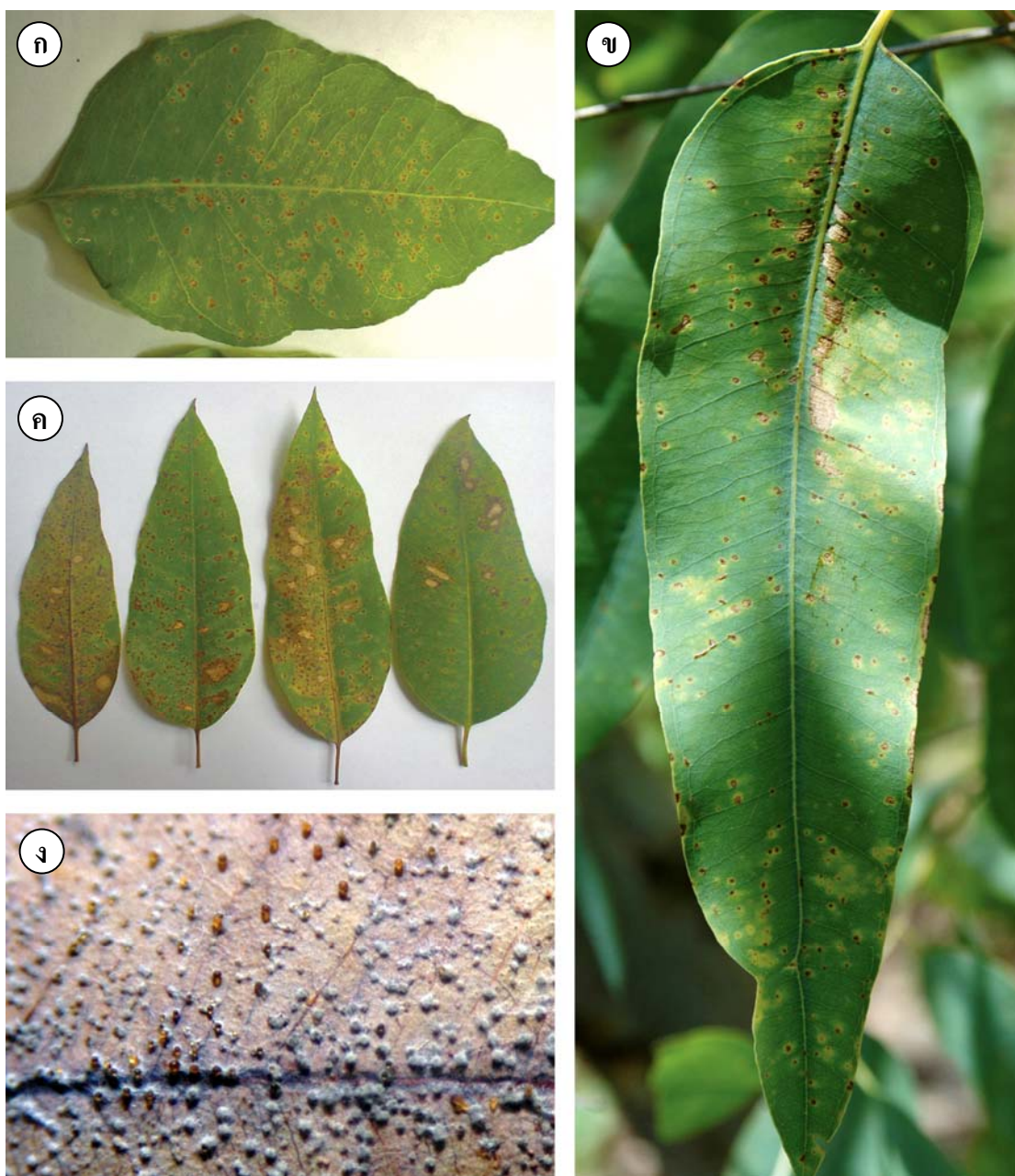
เชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* สามารถแยกได้จากใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุดและใบไหม้ อาการของโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัสสามารถดูเลนซิสโดยทั่วไปในระยะแรกของการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้จะเห็นบาดแผลเป็นจุดกลมๆ สีเหลือง ขนาดเล็ก มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร กระจายอยู่เดี่ยวๆ บนใบ บาดแผลจะมีการขยายออกตามการเจริญของเชื้อรา และในบริเวณตรงกลางของบาดแผลจะมีการตายของเซลล์ใบทำให้เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำอยู่ภายในวงสีเหลือง (ภาพที่ 1ก และ 1ข) ในบางครั้งบาดแผลที่อยู่ใกล้กันจะขยายออกเป็นวงกว้างมาเชื่อมต่อกันทำให้เห็นเป็นจุดไม่สม่ำเสมอ รูปร่างไม่แน่นอน นอกจากบาดแผลในลักษณะดังกล่าวยังพบแผลไหม้ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล บาดแผลมีการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง (ภาพที่ 1ค) เมื่อนำใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้จากเชื้อรา *C. eucalypti* บ่มในที่ที่มีความชื้นสูงประมาณ 3-5 วัน พบว่าเชื้อรามีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีน้ำตาลใต้อันน้ำตาแดงออกมาจำนวนมาก (ภาพที่ 1ง) เมื่อนำใบนั้นตัดตามขวางผ่านกลุ่มของโคนิเดียจะพบ conidiomata แบบอะเซอร์วูลัส (acervulus) (ภาพที่ 2ก-ง) มีรูปร่างกลม แทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) และอาจมีบางส่วนเล็ดเข้าไปอยู่ในชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) ของใบยูคาลิปตัส อะเซอร์วูลัสจะดันคิวทิเคิล (cuticle) ให้แตกออก โดยมีช่องเปิดที่ด้านบนของอะเซอร์วูลัสเพื่อปล่อยโคนิเดียออกมาสู่บริเวณผิวใบ ภายในอะเซอร์วูลัสจะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างโคนิเดียที่เรียกว่า conidiogenous cell มีก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) โคนิเดียมีการเกิดแบบ holoblastic โดยมีการยืดอกของผนังด้านปลายเพื่อสร้างเป็นผนังของโคนิเดียแล้วจึงมีการสร้างผนังกั้น (septum) และในที่สุดจะหลุดออกมาบริเวณช่องว่างตรงกลางของอะเซอร์วูลัสก่อนจะปล่อยออกมาสู่ผิวใบ ลักษณะของโคนิเดียจะมีรูปร่างเป็นรูปรีหรือทรงกระบอก ปลายมน ฐานมน หรือเรียวยาวแหลมอย่างตันที่โคนจนถึงรอยแผลที่เกิดจากการหลุดออก ผนังโคนิเดียหนาและใสเห็นได้ชัดเจน ในบางครั้งภายในโคนิเดียจะเห็นเป็นลักษณะหยดน้ำมัน (guttulate) ไม่มีผนังกั้น ขนาดโคนิเดียอยู่ระหว่าง 5.5-6 x 13.18-13.68 ไมโครเมตร

ไอโซเลทของเชื้อรา *C. eucalypti* สามารถแยกโดยใช้วิธี tissue transplanting และแยกจากกลุ่มของโคนิเดียโดยตรงได้ทั้งหมดจำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งแบ่งออกได้เป็นไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างใบยูคาลิปตัสตามาดูเลนซิสที่มีอาการโรคใบจุดและใบไหม้ โดยเก็บมาจากสวนป่า

ยูคาลิปตัสในท้องที่บ้านทุ่งแฝก ตำบลแก้มอัน อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี จำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท R001, R002 และ R003 ในท้องที่บ้านหนองปากคง ตำบลด่านมะขามเตี้ย อำเภอด่านมะขามเตี้ย จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท K001 ในท้องที่บ้านหนองกลางเนิน ตำบลบ้านใหม่ อำเภอกำแพง จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท K002 และในท้องที่บ้านทุ่งสำย ตำบลคลองตะเกรา อำเภอกำแพง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C001, C002, C003 และ C004 (ภาพที่ 3ก-ณ)

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารของเชื้อราแต่ละไอโซเลท

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกเส้นใยเชื้อราจะมีสีขาว เส้นใยที่มีอายุ 3-4 วันจะเปลี่ยนเป็นสีครีม หลังจากนั้นสีของเส้นใยเชื้อราจะเข้มขึ้นโดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลปนดำหรือดำ ตามลำดับ โคโลนีเชื้อราเจริญติดไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (adpressed) นอกจากนั้นประมาณ 10-12 วัน โคโลนีเชื้อราจะส่งกลิ่นออกมาคล้ายกับผลของตะมุตะม่วง การเจริญเติบโตบนอาหาร PDA จนเต็มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาประมาณ 20-25 วัน โดยเชื้อราที่แยกได้ครั้งแรกจากใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคจะสร้างโคนิเดียค่อนข้างช้าโดยใช้เวลาประมาณ 2 เดือน การสร้างโคนิเดียจะเริ่มจากโคโลนีมีการขับของเหลวชั้น (exudates) ที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำใสหรือสีน้ำตาลใสออกมาหลังจากนั้นเส้นใยบริเวณใต้หยดของเหลวชั้นนี้จะพัฒนาไปเป็น conidiogenous cell โดยมีลักษณะเซลล์ที่ต่างจากเส้นใยปกติคือ ขนาดความกว้างมากกว่าเซลล์เส้นใยปกติ conidiogenous cell มีขนาด 6-8 x 4-5 ไมโครเมตร รูปร่างค่อนข้างกลมถึงรูปรีแต่หัวท้ายตัดหรืออาจเป็นทรงกระบอกที่พองออกด้านข้างผนังเซลล์หนาใส สามารถเห็นผนังเซลล์ได้ชัดเจน (ภาพที่ 4ก-ข) conidiogenous cell บางส่วนจะลอยอยู่กับโคนิเดียที่เชื้อราสร้างขึ้นบนหยดของเหลวชั้น เชื้อรา *C. eucalypti* ที่ผ่านการแยกโคนิเดียเดี่ยวหลายๆ ครั้ง พบว่า ประมาณ 2-3 วัน หลังจากเปลี่ยนอาหารใหม่จะมีการสร้างของเหลวชั้นออกมาที่ผิวหน้าอาหารและสร้างออกมาจำนวนมากจนท่วมผิวหน้าของโคโลนี (ภาพที่ 3จ-ฎ)



ภาพที่ 1 อาการโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา

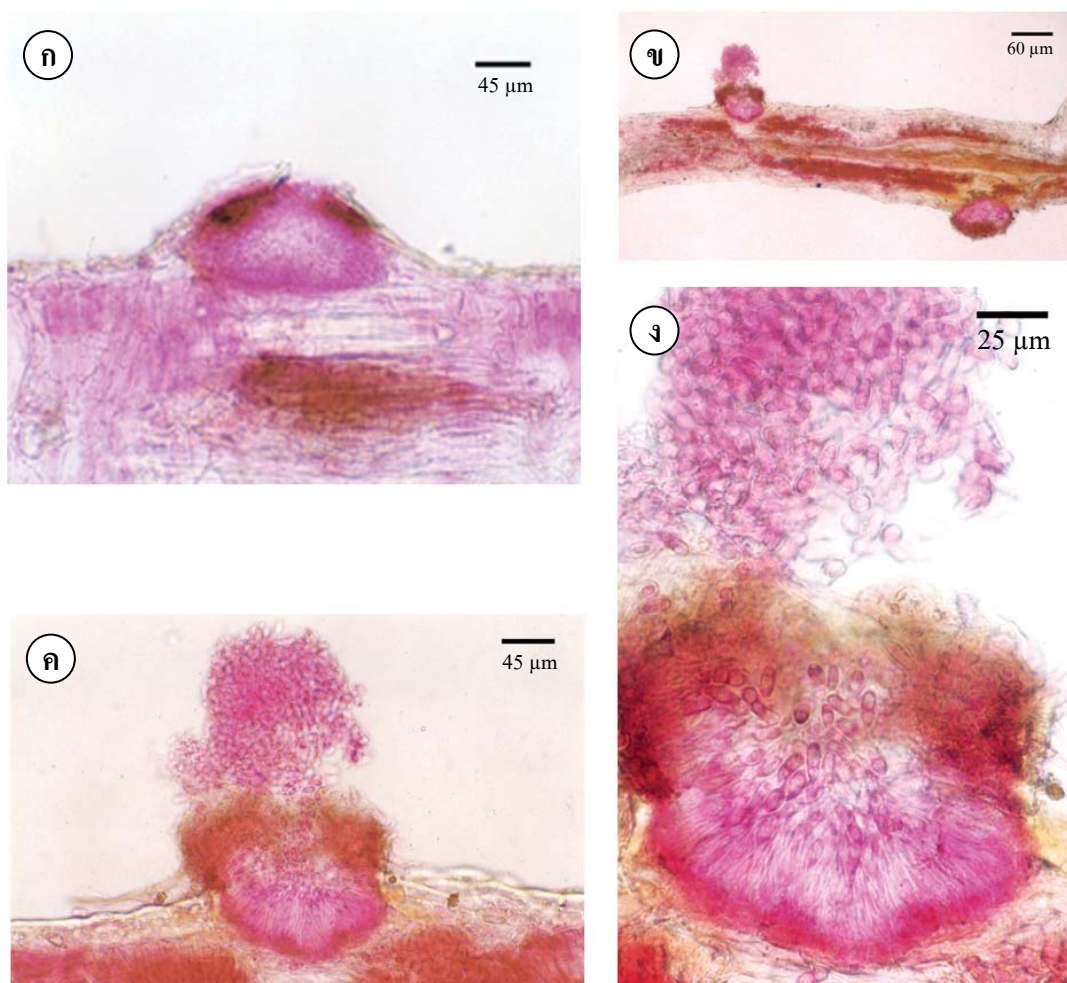
Cryptosporiopsis eucalypti

ก อาการโรคใบจุดของยูคาลิปตัส

ข อาการโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัส

ค อาการโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส

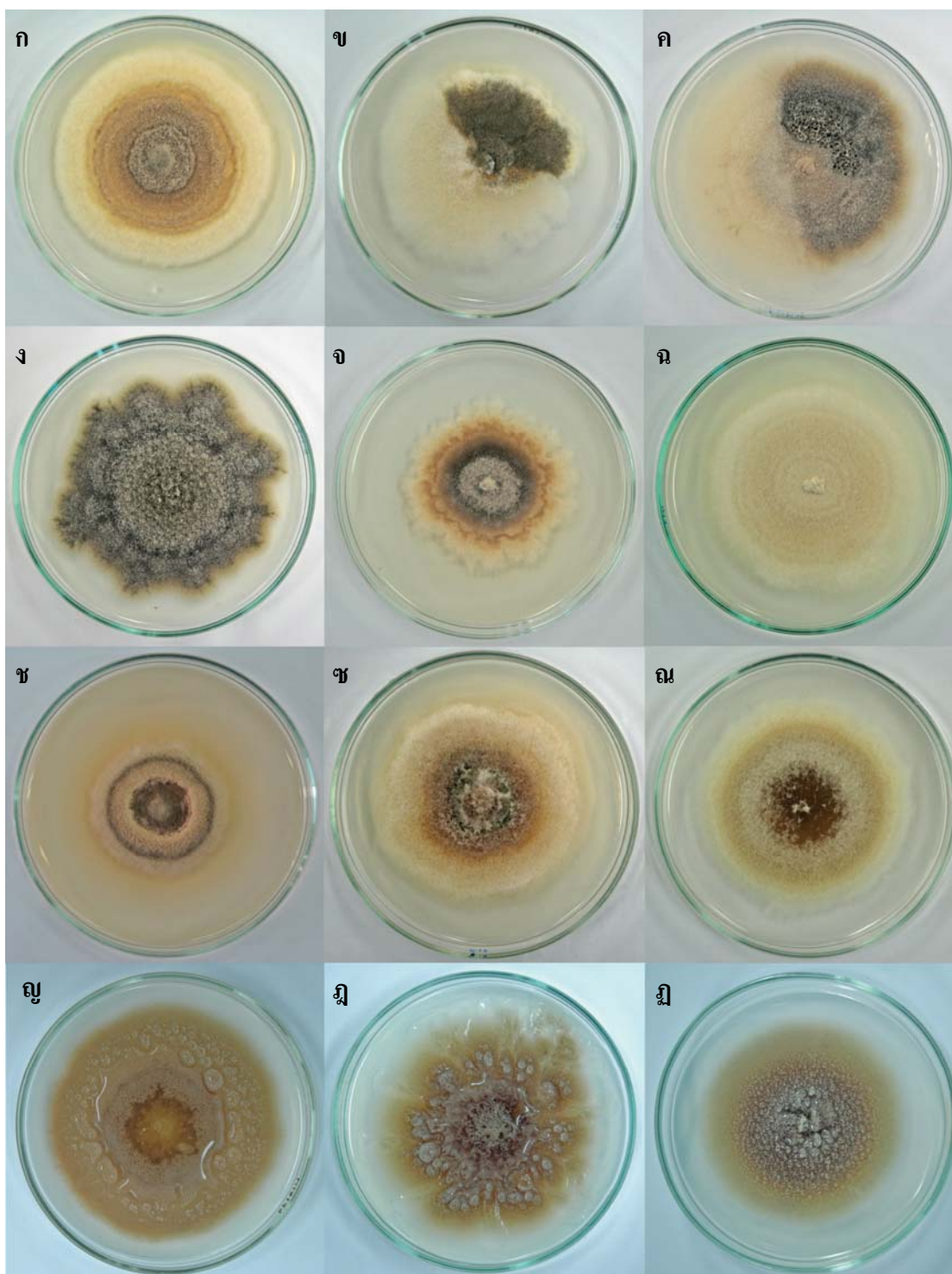
ง กลุ่มของโคนิเดียบนผิวใบยูคาลิปตัส



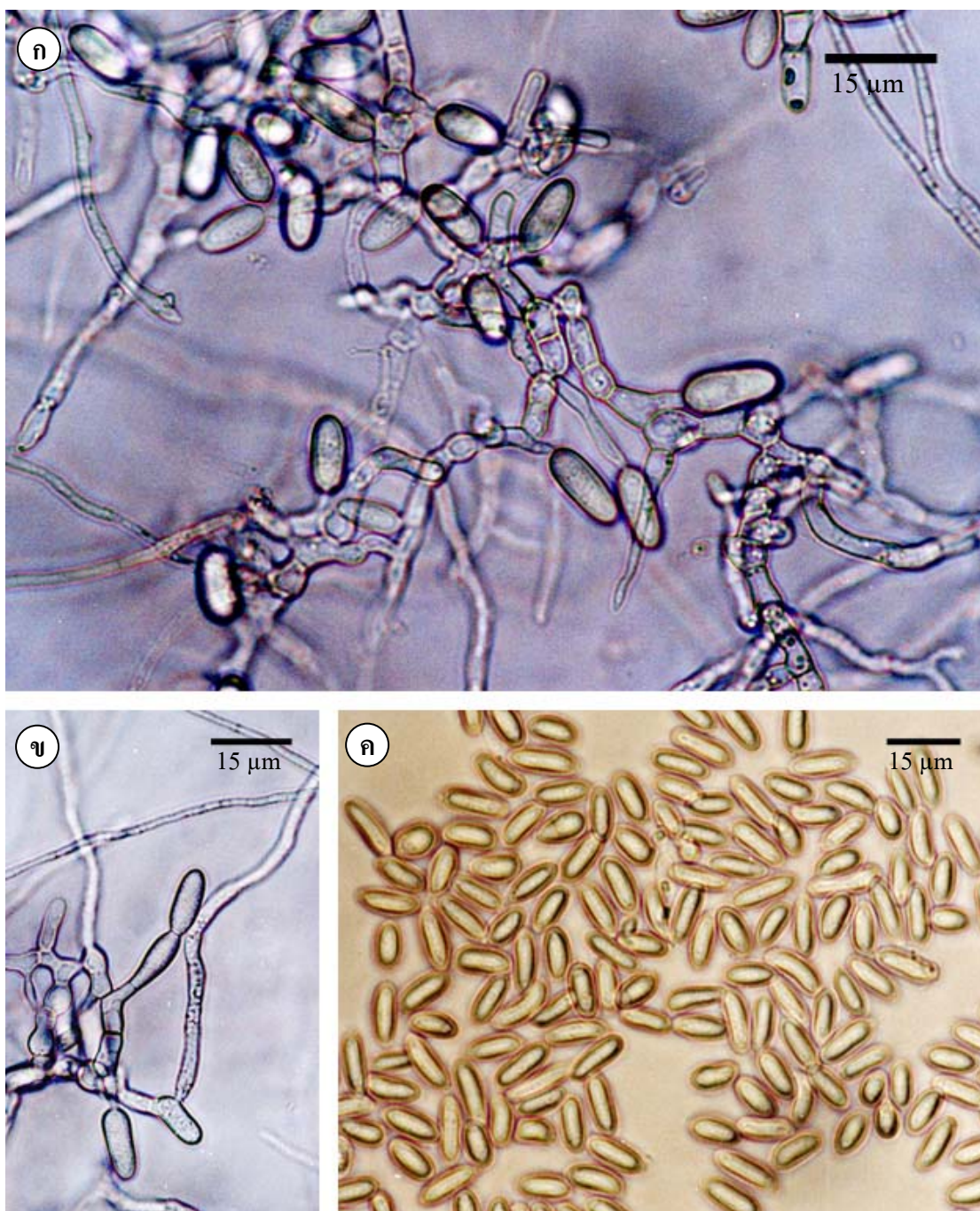
ภาพที่ 2 ลักษณะ conidiomata ของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ที่สร้างขึ้นบนใบยูคาลิปตัส โดยมีการสร้างโคนิเดียอยู่ภายใน

ก ลักษณะอะเชอร์วูลัสที่กำลังพัฒนา

ข-ง ลักษณะและรูปร่างอะเชอร์วูลัสและกลุ่มของโคนิเดียที่ปล่อยออกจากอะเชอร์วูลัส



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในแต่ละไอโซเลทบนอาหาร PDA
 ก-ฅ ไอโซเลท R001, R002, R003, K001, K002, C001, C002, C003 และ C004
 ญ-ฎ ไอโซเลท R001, K001 และ C001 ที่มีการสร้างของเหลวชั้นออกมาจำนวนมาก



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* บนอาหาร PDA

ก-ข ลักษณะ conidiogenous cell และการพัฒนาของโคนิเดีย

ค รูปร่างโคนิเดีย

2.1 ความสามารถในการเจริญบนอาหาร

อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. eucalypti* ทั้งหมด 9 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบ่มเชื้อไว้ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P = 0.0001$) (ตารางผนวกที่ 1) โดยไอโซเลท C004 มีการเจริญเติบโตเร็วที่สุด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 6.6 เซนติเมตร รองลงมาเป็นไอโซเลท K001, K002, C003, R002, R001, R003 และ C001 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 6, 5.7, 5.6, 5.5, 5.2, 4.6 และ 4.1 เซนติเมตร ตามลำดับ และไอโซเลท C002 มีการเจริญเติบโตช้าที่สุด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 3.6 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีแต่ละไอโซเลทสามารถจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT ได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท C004 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท K001, K002, C003 และ R002 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยไอโซเลท R001 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยไอโซเลท R003 กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยไอโซเลท C001 กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยไอโซเลท C002 (ตารางที่ 1) นอกจากนั้นในไอโซเลทที่แยกจากใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้ซึ่งเก็บมาจากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดราชบุรีคือ ไอโซเลท R001, R002 และ R003 พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับในไอโซเลทที่เก็บมาจากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดกาญจนบุรีคือ ไอโซเลท K001 และ K002 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันเช่นกัน แต่ในไอโซเลทที่เก็บจากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดฉะเชิงเทรา กลับพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตต่างกัน โดยเฉพาะระหว่างไอโซเลท C004 กับไอโซเลท C002 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีแตกต่างกันถึง 3 เซนติเมตร และลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. eucalypti* ทั้ง 9 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีความผันแปรของสีโคโลนี ลักษณะขอบโคโลนี และการเกาะกันของเส้นใยในแต่ละไอโซเลทค่อนข้างสูง นอกจากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลานาน ลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลทจะมีการเปลี่ยนแปลงไปคือ โคโลนีเชื้อราจะสร้างเส้นใยที่มีสีขาว เส้นใยสานกันหลวมๆ ฟูขึ้นเล็กน้อย เส้นใยลักษณะเช่นนี้จะเกิดขึ้นเป็นกระจุก หรือทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อ ไม่มีการสร้างของเหลวชั้นและโคนเดียว

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยเฉลี่ยของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)
C004	6.6 ^a
K001	6.0 ^{ab}
K002	5.7 ^{bc}
C003	5.6 ^{bc}
R002	5.5 ^{bc}
R001	5.2 ^{cd}
R003	4.6 ^{de}
C001	4.1 ^{ef}
C002	3.6 ^f

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2.2 รูปร่างและขนาดของโคโคนิเดีย

ลักษณะของโคโคนิเดียของเชื้อรา *C. eucalypti* พบว่า รูปร่างของโคโคนิเดียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะเหมือนกันคือ รูปร่างเป็นทรงกระบอกหรือรูปรี ปลายมน ฐานมนหรือเรียวแหลมอย่างทันทีทันใดจนถึงรอยแผลที่เกิดจากการหลุดออก ผ่นังหนาและใส เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4ค) ขนาดของโคโคนิเดียของเชื้อรา 4 ไอโซเลท คือ R001, K001, C001 และ C002 มีค่าดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความกว้างและความยาวพบว่า ทั้งความกว้างและความยาวไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 ขนาดของโคนิเดียโดยเฉลี่ยของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

ไอโซเลท	ขนาดของโคนิเดีย (ไมโครเมตร)	
	ความกว้าง	ความยาว
R001	$5.98^a \pm 1.01$	$13.68^a \pm 1.70$
K001	$5.50^{ab} \pm 0.87$	$13.18^a \pm 1.46$
C001	$5.58^{ab} \pm 0.91$	$13.63^a \pm 1.51$
C002	$5.73^{ab} \pm 1.03$	$13.48^a \pm 2.13$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอของยูคาลิปตัสด้วยการปลูกเชื้อ

การทดสอบความต้านทานโรคของสายพันธุ์ยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* แบ่งออกเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 เป็นการปลูกเชื้อโดยตรงบนต้นกล้า (intact seedling inoculation) ด้วยไอโซเลท C001, R001 และ K001 บนต้นกล้ายูคาลิปตัสที่มีอายุระหว่าง 6-8 เดือนจำนวนทั้งหมด 8 สายพันธุ์ คือ SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF36, SF70 และ SF86 การทดลองที่ 2 เป็นการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf (detached leaf inoculation 1) ด้วยไอโซเลท C001, R001 และ K001 บนใบที่สมบูรณ์ซึ่งตัดจากต้นยูคาลิปตัส จำนวนทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ SF01, SF03, SF06, SF07, SF18 และ SF94 และการทดลองที่ 3 เป็นการทดลองปลูกด้วยเทคนิค detached leaf (detached leaf inoculation 2) ด้วยไอโซเลท R001 บนใบที่สมบูรณ์ซึ่งตัดจากต้นยูคาลิปตัสจำนวนทั้งหมด 11 สายพันธุ์ คือ SF01, SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF18, SF36, SF70, SF94 และ SF98

3.1 การทดลองปลูกเชื้อโดยตรงบนต้นกล้า (intact seedling inoculation)

อาการของโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* สามารถสังเกตเห็นได้หลังปลูกเชื้อ 3-4 วัน ใบแผลมีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการตายของเซลล์ใบ

บาดแผลมีการขยายขนาดขึ้นตามความอ่อนแอของแต่ละสายต้น ใบอ่อนมีความอ่อนแอต่อเชื้อค่อนข้างมาก โดยในวันที่ 9 หลังจากปลูกเชื้อพบว่า สายต้น SF03, SF07, SF14, SF16, SF70 และ SF86 มีระดับอาการของโรคไม่แตกต่างกันมากนัก บาดแผลส่วนใหญ่จะเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาล มีบาดแผลขนาดใหญ่เพียงเล็กน้อย ใบที่เป็นโรคบางใบจะเกิดการเหี่ยว บางใบมีการตายของเส้นกลางใบ เนื่องจากเชื้อรามีการเจริญไปตามท่อลำเลียงทำให้เซลล์ท่อลำเลียงถูกทำลาย นอกจากนั้นในสายต้น SF03 จะมีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อที่ต่างจากสายต้นอื่นๆ คือ ใบจะเหี่ยวและหลุดร่วงค่อนข้างมากแม้ว่ามีจำนวนบาดแผลไม่มาก ส่วนสายต้น SF36 และ SF06 พบบาดแผลน้อยมาก (ภาพที่ 5) อุณหภูมิของกล่องขึ้นในเรือนเพาะชำที่ใช้บ่มต้นกล้าที่ปลูกเชื้อแล้วมีความผันแปรและมีระดับค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในช่วงบ่าย มีค่าอยู่ระหว่าง 24-33 องศาเซลเซียส การเก็บข้อมูลพื้นที่ใบทั้งหมดและพื้นที่ใบที่เป็นโรคในการทดลองนี้ทำในวันที่ 9 หลังจากปลูกเชื้อ เมื่อบ่มต้นกล้าที่เก็บข้อมูลแล้วไว้ในกล่องขึ้นต่อไปอีกระยะหนึ่งพบว่าอาการโรคจะไม่พัฒนามากขึ้นแต่เกิดการร่วงของใบที่ถูกเข้าทำลาย

การทดลองปลูกเชื้อโดยตรงในต้นกล้ายูคาลิปตัสจำนวน 8 สายต้น พบว่า การทดลองเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำแทน conidial suspension ไม่พบอาการโรคใบจุดและใบไหม้ในทุกการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งระหว่างไอโซเลทเชื้อรา ($P = 0.0001$) สายต้นยูคาลิปตัส ($P = 0.0003$) และปฏิกริยาร่วมระหว่างไอโซเลทเชื้อราและสายต้นยูคาลิปตัส ($P = 0.003$) (ตารางผนวกที่ 4) สำหรับความรุนแรงของเชื้อราแต่ละไอโซเลทสามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยเมื่อจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท C001 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 2.97 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท R001 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 1.90 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยไอโซเลท K001 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.87 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าความสามารถในการเข้าทำลายยูคาลิปตัสในสายต้น SF03, SF06, SF07, SF14, SF16, SF36, SF70 และ SF86 ของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทมีความแตกต่างกัน โดยไอโซเลท C001 มีความรุนแรงมากที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลท R001 และไอโซเลท K001 มีความรุนแรงน้อยสุด (ตารางที่ 3) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 8 สายต้นสามารถจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้น SF07, SF14, SF86, SF70, SF16 และ SF03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 2.87, 2.49, 2.44, 2.41, 2.04 และ 2.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้น SF36 และ SF06 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.63 และ 0.39 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

ปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในการทดลองปลูกเชื้อโดยตรงในต้นกล้าแบ่งได้เป็น 4 ระดับ ตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ดังนี้ ด้านทานมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนข้างด้านทานมีค่า 1.1-2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนข้างอ่อนแอมีค่า 2.1-3 เปอร์เซ็นต์ และอ่อนแอมีค่ามากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถจัดสายต้นยูคาลิปตัสได้เพียง 2 ระดับ คือ ระดับก่อนข้างอ่อนแอประกอบด้วยสายต้น SF07, SF14, SF86, SF70, SF16 และ SF03 และระดับด้านทานประกอบด้วยสายต้น SF36 และ SF06 (ตารางที่ 4) ซึ่งการจัดกลุ่มสายต้นตามวิธีการทางสถิติและตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นของยูคาลิปตัสมีความสอดคล้องกัน

ตารางที่ 3 ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* บนยูคาลิปตัส 8 สายต้น ในการทดลอง intact seedling inoculation

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
C001	2.97 ^a
R001	1.90 ^b
K001	0.87 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยและปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้น
ยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในการทดลอง intact
seedling inoculation

สายต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	ปฏิกิริยาความต้านทานโรค
SF07	2.87 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF14	2.49 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF86	2.44 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF70	2.41 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF16	2.04 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF03	2.03 ^a	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF36	0.63 ^b	ต้านทาน
SF06	0.39 ^b	ต้านทาน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการ
วิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 การทดลอง detached leaf inoculation 1

อาการของโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* สามารถสังเกตเห็นได้
หลังปลูกเชื้อ 3-4 วัน ใบแผลมีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ ซึ่งเกิดจากการตายของ
เซลล์ใบ โดยในวันที่ 9 หลังจากปลูกเชื้อพบว่า สายต้น SF03 และ SF07 เกิดการตายของเซลล์ใบ
เป็นบริเวณกว้าง นอกจากนั้นยังพบเส้นใยและกลุ่มของโคนิเดียบนผิวใบอยู่เป็นจำนวนมาก ส่วน
สายต้น SF06 และ SF94 จะมีใบแผลส่วนใหญ่เป็นจุดขนาดเล็ก ส่วนใบแผลขนาดใหญ่มีเพียง
เล็กน้อย การเก็บข้อมูลพื้นที่ใบทั้งหมดและพื้นที่ใบที่เป็นโรคในการทดลองนี้ทำในวันที่ 9 หลังจาก
ปลูกเชื้อ

การทดลอง detached leaf inoculation 1 ในใบยูคาลิปตัสจำนวน 6 สายต้น พบว่า การทดลองเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำแทน conidial suspension ไม่พบอาการโรคใบจุดและใบไหม้ในทุกการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P = 0.0001$) ทั้งในระหว่างไอโซเลทเชื้อรา สายต้นยูคาลิปตัส และปฏิกริยาร่วมระหว่างไอโซเลทเชื้อราและสายต้นยูคาลิปตัส (ตารางผนวกที่ 5) สำหรับความรุนแรงของเชื้อราแต่ละไอโซเลทสามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยเมื่อจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท R001 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 52.07 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท K001 และ C001 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 31.37 และ 25.02 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าความสามารถในการเข้าทำลายยูคาลิปตัสในสายต้น SF01, SF03, SF06, SF07, SF18 และ SF94 ของเชื้อราในกลุ่มที่ 1 มีมากกว่าเชื้อราในกลุ่มที่ 2 หรือในกลุ่มที่ 1 มีความรุนแรงมากกว่ากลุ่มที่ 2 นั้นเอง (ตารางที่ 5) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 6 สายต้น สามารถจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้น SF03 และ SF07 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 78.37 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้น SF18 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 36.26 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายต้น SF01, SF06 และ SF94 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 17.44, 7.19 และ 2.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* บนยูคาลิปตัส 6 สายต้น ในการทดลอง detached leaf inoculation 1

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
R001	52.07 ^a
K001	31.37 ^b
C001	25.02 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในการทดลองปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf สามารถแบ่งเป็น 4 ระดับ ตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ดังนี้ ด้านทานมีค่า 0-20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนข้างด้านทานมีค่า 21-40 เปอร์เซ็นต์ ก่อนข้างอ่อนแอมีค่า 41-60 เปอร์เซ็นต์ และอ่อนแอมีค่า 61-100 เปอร์เซ็นต์ จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถจัดสายต้นยูคาลิปตัสในการทดลอง detached leaf inoculation 1 ได้ 3 ระดับ คือ ระดับอ่อนแอประกอบด้วยสายต้น SF03 และ SF07 ระดับก่อนข้างด้านทานประกอบด้วยสายต้น SF18 และระดับด้านทานประกอบด้วยสายต้น SF01, SF06 และ SF94 (ตารางที่ 6) ซึ่งการจัดกลุ่มสายต้นตามวิธีการทางสถิติและตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นของยูคาลิปตัสมีความสอดคล้องกัน

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยและปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในการทดลอง detached leaf inoculation 1

สายต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	ปฏิกิริยาความต้านทานโรค
SF03	78.37 ^a	อ่อนแอ
SF07	75.00 ^a	อ่อนแอ
SF18	36.26 ^b	ก่อนข้างด้านทาน
SF01	17.44 ^c	ด้านทาน
SF06	7.19 ^c	ด้านทาน
SF94	2.67 ^c	ด้านทาน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3 การทดลอง detached leaf inoculation 2

อาการของโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* สามารถสังเกตเห็นได้หลังจากปลูกเชื้อ 3-4 วัน บาดแผลมีลักษณะเช่นเดียวกับการทดลอง detached leaf inoculation 1

โดยในวันที่ 9 หลังจากปลูกเชื้อ พบว่าสายต้น SF07, SF70 และ SF16 มีบาดแผลเป็นแผลไหม้ขนาดใหญ่เกิดขึ้นทั่วทั้งใบ พบการตายของเซลล์ท่อลำเลียงของเส้นกลางใบ และมีกลุ่มของโคนิเดียเกิดขึ้นบนผิวใบจำนวนมาก ในสายต้น SF03 และ SF14 มีบาดแผลเป็นจุดขนาดใหญ่จำนวนมาก ในสายต้น SF18 มีบาดแผลเป็นแผลไหม้ที่เกิดการขยายตัวในรูปทรงไม่แน่นอน แต่บาดแผลที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยกว่าในสายต้น SF03 และ SF14 มาก ส่วนในสายต้น SF01, SF94, SF98, SF36 และ SF06 มีบาดแผลเป็นจุดทั้งขนาดเล็กและใหญ่ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และอาจพบแผลไหม้ที่มีการขยายตัวในรูปทรงไม่แน่นอนแต่มีปริมาณบาดแผลน้อย (ภาพที่ 6) การเก็บข้อมูลพื้นที่ใบทั้งหมดและพื้นที่ใบที่เป็นโรคในการทดลองนี้ทำในวันที่ 11 หลังจากปลูกเชื้อ

การทดลอง detached leaf inoculation 2 ในใบยูคาลิปตัสจำนวน 11 สายต้น พบว่า การทดลองเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำแทน conidial suspension ไม่พบอาการโรคใบจุดและใบไหม้ในทุกการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบว่า ในแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P = 0.0001$) (ตารางผนวกที่ 6) เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 11 สายต้น สามารถจัดกลุ่มตามวิธีการของ DMRT ออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้น SF07 และ SF70 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 86.5 และ 83.5 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้น SF16 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 67.34 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายต้น SF03 และ SF14 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 49.67 และ 40.5 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยสายต้น SF18 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 22.5 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยสายต้น SF01, SF94, SF98, SF36 และ SF06 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 10.5, 6.34, 5.25, 2 และ 1.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

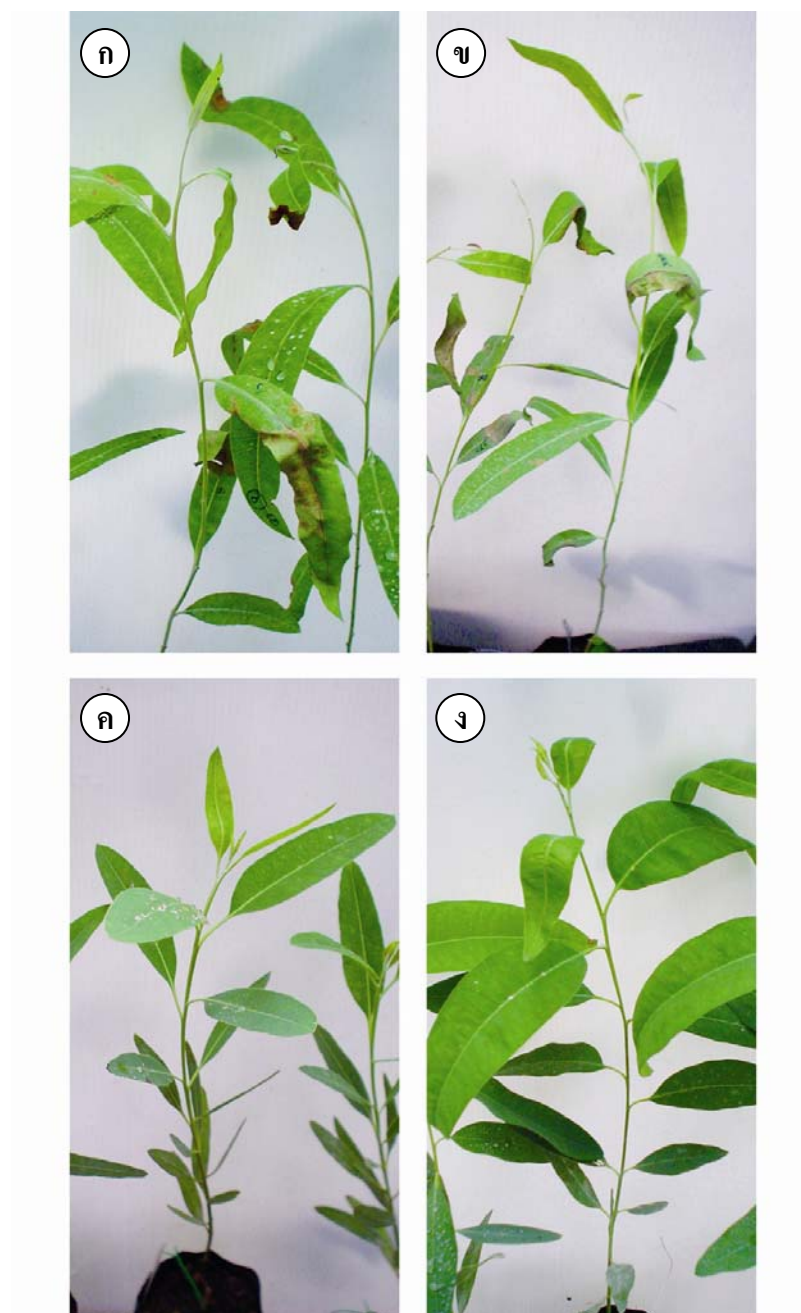
ปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ในการทดลอง detached leaf inoculation 2 สามารถแบ่งเป็น 4 ระดับ โดยใช้เกณฑ์เดียวกับในการทดลอง detached leaf inoculation 1 จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถจัดสายต้นยูคาลิปตัสได้ 4 ระดับ คือ ระดับอ่อนแอประกอบด้วยสายต้น SF07, SF70 และ SF016 ระดับค่อนข้างอ่อนแอประกอบด้วยสายต้น SF03 และ SF14 ระดับค่อนข้างต้านทานประกอบด้วยสายต้น SF18 และระดับต้านทานประกอบด้วยสายต้น SF01, SF94, SF98, SF36 และ SF06 (ตารางที่ 7) ซึ่งการจัดกลุ่มสายต้นตามวิธีการทางสถิติและปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสมีความสอดคล้องกัน

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยและปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้น
ยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในการทดลอง
detached leaf inoculation 2

สายต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	ปฏิกิริยาความต้านทานโรค
SF07	86.50 ^a	อ่อนแอ
SF70	83.50 ^a	อ่อนแอ
SF16	67.34 ^b	อ่อนแอ
SF03	49.67 ^c	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF14	40.50 ^c	ค่อนข้างอ่อนแอ
SF18	22.50 ^d	ค่อนข้างต้านทาน
SF01	10.50 ^{de}	ต้านทาน
SF94	6.34 ^{de}	ต้านทาน
SF98	5.25 ^{de}	ต้านทาน
SF36	2.00 ^e	ต้านทาน
SF06	1.92 ^e	ต้านทาน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวดัง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการ
วิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้า
ทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* เพื่อใช้ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม
ใหญ่ คือ กลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอเท่านั้น โดยจะรวมสายต้นที่อยู่ในระดับค่อนข้างอ่อนแอ
และอ่อนแอเข้าเป็นกลุ่มอ่อนแอ และรวมสายต้นที่อยู่ในระดับค่อนข้างต้านทานและต้านทานเข้า
เป็นกลุ่มต้านทาน เมื่อพิจารณาจากการปลูกเชื้อทั้ง 3 การทดลองสามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่ม
อ่อนแอมีจำนวน 6 สายต้น คือ SF03, SF07, SF14, SF16, SF70 และ SF86 และกลุ่มต้านทานมี
จำนวน 6 สายต้น คือ SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 (ตารางที่ 8)



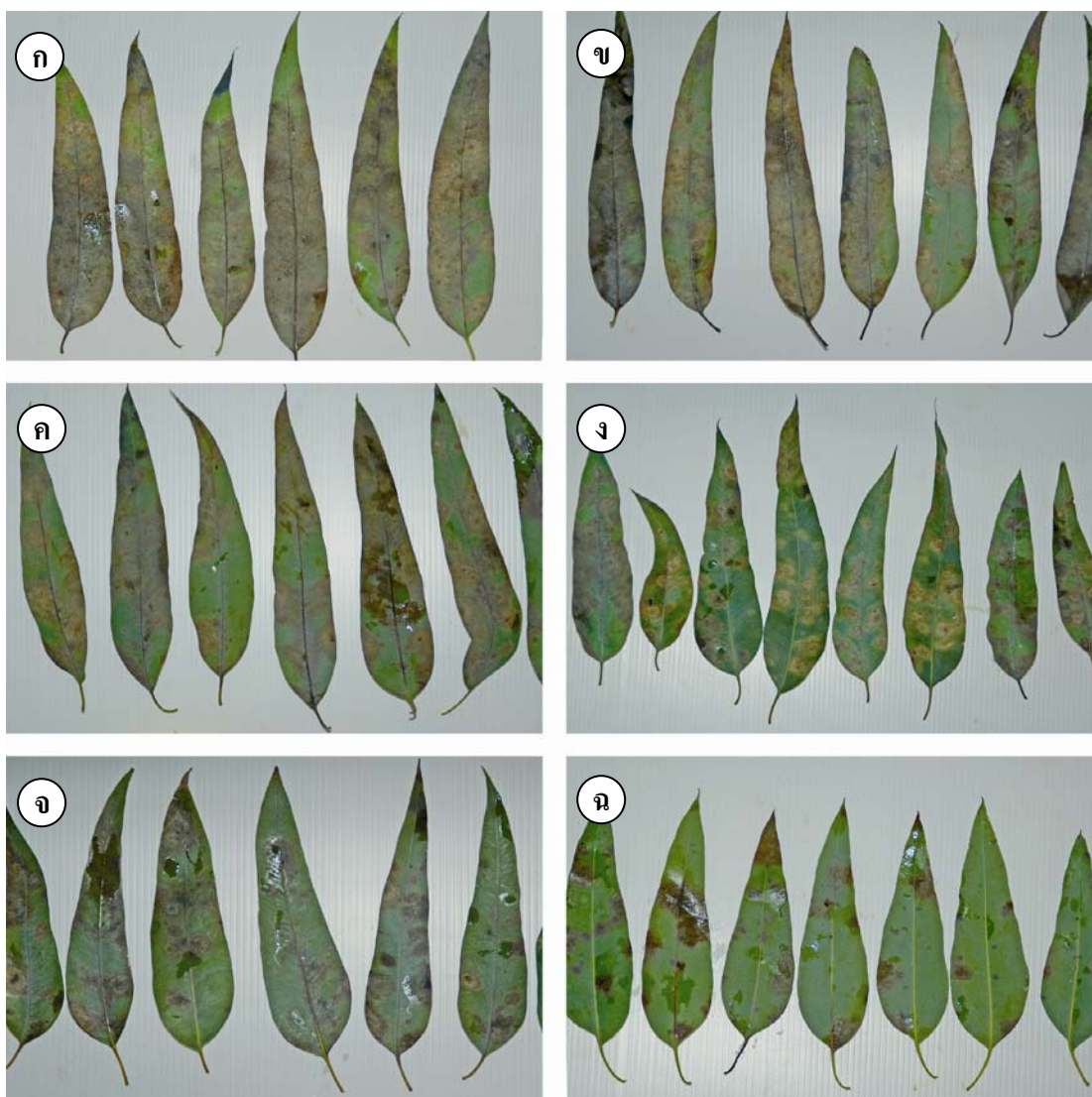
ภาพที่ 5 ระดับความต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน ในการทดลอง intact seedling inoculation

ก สายต้น SF07 ก่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อ

ข สายต้น SF70 ก่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อ

ค สายต้น SF36 ต้านทานต่อเชื้อ

ง สายต้น SF06 ต้านทานต่อเชื้อ



ภาพที่ 6 ระดับความต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ของสายต้นยูคาลิปตัสที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน ในการทดลอง detached leaf inoculation 2

ก สายต้น SF07 อ่อนแอต่อเชื้อ

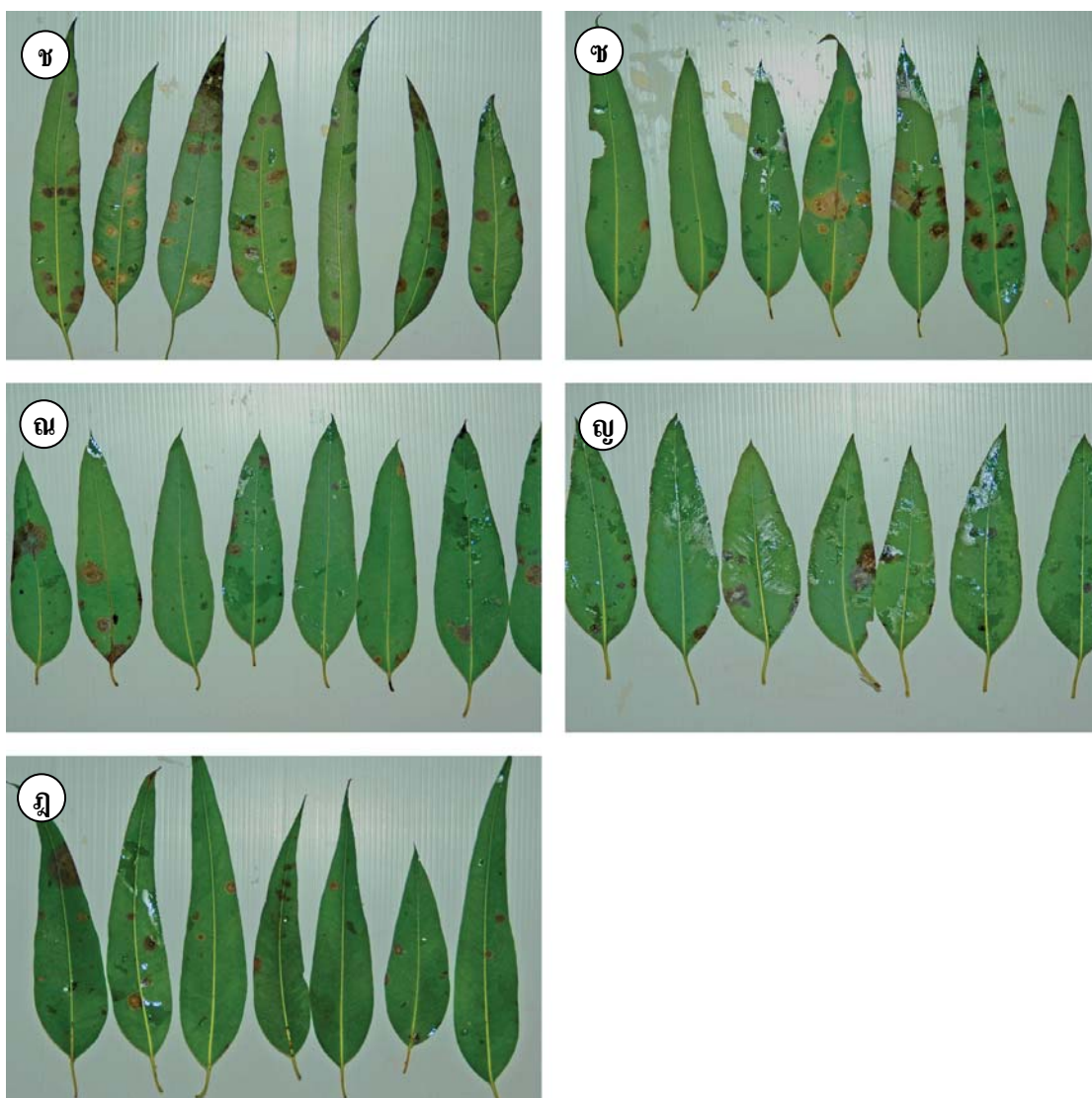
ข สายต้น SF70 อ่อนแอต่อเชื้อ

ค สายต้น SF16 อ่อนแอต่อเชื้อ

ง สายต้น SF03 ค่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อ

จ สายต้น SF14 ค่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อ

ฉ สายต้น SF18 ค่อนข้างต้านทานต่อเชื้อ



ภาพที่ 6 (ต่อ) ระดับความต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ของสายต้นยูคาลิปตัสที่เกิดจากการเข้า
 ทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน ในการ
 ทดลอง detached leaf inoculation 2
 ข สายต้น SF01 ต้านทานต่อเชื้อ
 ข สายต้น SF94 ต้านทานต่อเชื้อ
 ค สายต้น SF98 ต้านทานต่อเชื้อ
 ง สายต้น SF36 ต้านทานต่อเชื้อ
 ฉ สายต้น SF06 ต้านทานต่อเชื้อ

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยและปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายพันธุ์
ยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในการทดลอง intact
seedling inoculation และ detached leaf inoculation 1 และ 2

สายพันธุ์	Intact seedling inoculation		Detached leaf inoculation 1		Detached leaf inoculation 2	
	เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค	ปฏิกิริยา ความ ต้านทานโรค	เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค	ปฏิกิริยา ความ ต้านทานโรค	เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค	ปฏิกิริยา ความ ต้านทานโรค
SF07	2.87 ^a	MS	75.00 ^a	S	86.50 ^a	S
SF70	2.41 ^a	MS	-	-	83.50 ^a	S
SF16	2.04 ^a	MS	-	-	67.34 ^b	S
SF03	2.03 ^a	MS	78.37 ^a	S	49.67 ^c	MS
SF14	2.49 ^a	MS	-	-	40.50 ^c	MS
SF86	2.44 ^a	MS	-	-	-	-
SF18	-	-	36.26 ^b	MR	22.50 ^d	MR
SF01	-	-	17.44 ^c	R	10.50 ^{de}	R
SF94	-	-	2.67 ^c	R	6.34 ^{de}	R
SF98	-	-	-	-	5.25 ^{de}	R
SF36	0.63 ^b	R	-	-	2.00 ^e	R
SF06	0.39 ^b	R	7.19 ^c	R	1.92 ^e	R
C.V. (%) = 64.12			C.V. (%) = 42.68		C.V. (%) = 32.72	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามการ
วิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
โดย S = อ่อนแอ, MS = ค่อนข้างอ่อนแอ, MR = ค่อนข้างต้านทาน และ R = ต้านทาน

4. การออกแบบ sequence-tagged sites primer

การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PR-protein และยีนต้านทานโรคของพืช จากฐานข้อมูล GenBank สามารถหา accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PR-protein และยีนต้านทานโรคของพืชได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ของ PR-protein และยีนต้านทานโรคของพืชจากฐานข้อมูล GenBank

ชื่อ	Accession Number
PR1	M69248, M69247, A22635, AJ001627, AJ250136, A22636, X05454, D90196, D90197, AF053343, X71592, Z46947, U21849, U70666, U64806 และ M90508
PR2	AJ133470, AY325498, AF311749, A26453, A26451, S51479, U01900, U01901, M80608, AF239617, AY353062, AF435089, AJ000081, AJ810085, U41323, AY086134, X77990, U49454 และ AF435088
PR5	X67244, M21346, AF093743, X95308, AF178653, X89008, AJ010502, X65700, X72927, X03913, AY007309, AY093595, AJ277064, D76437, AF003007 และ AF516207
PR8	Z11564, Z11563, AF097660, AF134347, AF309514, Z68123, M34107, AB006071, AB006070, AF184884, S66038, AF082284, AF241266, M24365, D49953, AB007127, AB007126, X70660, Y16415 และ D11335
PR9	J02979, AB087838, M74103, NM_101321, AY098531 และ L36093
PR10	AY433943, U31669, X13383, AF456481, AB070618, AJ000108, AF002278, AF002277, X98688, U48862, X12573, X12574, AJ417550, AJ289770, Z15128, Y08641, X98867, X61365 และ AJ311050
PR12	U18557, U18556, X97319, NM_106233, AY383485, U59459, AJ311046, และ X91916

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชื่อ	Accession Number
PR14	AY621634, AY621632, AY621633, AY621631, AF151214, X96716, AJ002958, U72765, AY300806, AY300807, AF467946, AF467945, AY395741, AF465408, AY059472, U66465, D13952, U81996, AF525363, AF525362, AF519812, U66466, X62395, AF044204, AY507141, AF531366, AF195863, AF228333, AF195865 และ X92748
PR15	AK117308, AF417299, AY116170, AY116169, AY116168, AY116167, AY084870, X91957, L15737, M63223 และ M63224
PR16	AF051156, AF032975, Y15962, U21743, U75206, U79114, U81162, U75188, U75195, X84786, AJ222979, AJ276491 และ D45425
Chitinase	chitinase type I: AF335589, X51599, S44869, AB008892, AJ301671, Z68152, AJ291505, AF153195, Z15139, U83591, Z15140, X16938, X64519, X64518, X15494, X14133, M38240, M95835, M25336, M25337, U30324, L22032, M13968, S43926, X63899, L37876 และ X88800 chitinase type II: AJ291505, X82329, X82330, AF141373, AF141372, U30465, AF147091, Z15141, Z15139, M29868, M29869, X51427 X67693 chitinase type IV: U52845, U52846, U52848, U52847, U97521, U97522, Z46948, Z46950, A23392, L25826, X61488 และ X57187
ยีนต้านทานโรคของพืช	ยีนต้านทานโรคของพืชที่ไม่มี TIR domain: U65391, AF039682, AF004878, AF004879, AF118127, AF487823, AF074916, AF089710, AF089711, U12860, U14158, X87851, AF209732, AF202179, AF195939, AJ457051, AJ249448, AF502080, AF105140, AF105139, AF060192, U97223, U97224, U97225, U97226, U19616, U97217, AJ298883, AJ298884, AJ298885, AJ298886, AJ298888, AJ298890, AJ298891, AJ298892, AJ307991, AY369228, AY187297, AY187296, AY187298, AY187299 และ AY187300 ยีนต้านทานโรคของพืชที่มี TIR domain: U15605, U73916, AF093645,

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชื่อ	Accession Number
ยีนต้านทาน	U27081, AF098962, AF098964, AJ243468, AF039377, AF116848,
โรคของพืช	AJ009720, AJ009719, U55803, U55804, U55805, U55810, U55806, U55807, U55808, U55811, U55809, NM_180323 และ NM_114331

ส่วนอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PR1, PR2, PR5, PR8, PR9, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, chitinase และยีนต้านทานโรคของพืชถูกนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกสายนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแต่ละยีนมาหนึ่งสาย ซึ่งมี accession number ของแต่ละยีนที่เลือกมาออกแบบไพรเมอร์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10 นอกจากนี้ดังกล่าวยังใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันอื่นๆ มาออกแบบไพรเมอร์ โดยมี accession number ของแต่ละยีนที่เลือกมาดังแสดงในตารางที่ 10

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ทั้งหมด 35 คู่ สามารถแยกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จาก PR-protein จำนวน 12 คู่ ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ PR1, PR2, PR5, PR8, PR9, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, Chi, และ Rch12 กลุ่มที่ 2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากยีนต้านทานโรคของพืชจำนวน 4 คู่ ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ RPS2, Pib, Xa1, และ XA21 และกลุ่มที่ 3 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและเกี่ยวข้องกับการทนทานต่อความเครียดจำนวน 19 คู่ ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ I-SOD, CBP, APX1, SalT, C/Z-SOD, APX2, CatB, OsMADS45, ATPase, Rab21, Waxy, ATN, Fe, Fe1, Fe2, IRT, MY1, ZIP1 และ ZIP4

ตารางที่ 10 ยีน PR-protein, ยีนต้านทานโรค และยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันอื่นๆ ของพืช ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 เพื่อใช้ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ลำดับ	ชื่อคู่ไพรเมอร์	คุณสมบัติ	GenBank Accession No.
1	PR1	antifungal	D90196
2	PR2	β -1,3-glucanase	AF435089
3	PR5	thaumatin-like protein	X89008
4	PR8	chitinase type III	AF241266
5	PR9	lignin forming peroxidase	NM101321
6	PR10	ribonuclease-like	X61365
7	PR12	defensin	X91916
8	PR14	lipid-transfer protein	AY395741
9	PR15	oxalate oxidase	X91957
10	PR16	oxalate oxidase-like	U75206
11	Chi	chitinase	X16938
12	Rcht2	chitinase (Rcht2) gene	L40336
13	RPS2	RPS2	U12860
14	Pib	Pib	AB013448
15	Xa1	XA1	AB002266
16	Xa21	receptor kinase-like protein gene	U37133
17	I-SOD	iron-superoxide dismutase	AB014056
18	CBP	calcium-binding protein	AB021259
19	APX1	ascorbate peroxidase	AB050724
20	SalT	salT	AF001395
21	C/Z-SOD	copper/zinc-superoxide dismutase	D00999
22	APX2	ascorbate peroxidase	D45423
23	CatB	CatB gene (catalase)	D64013
24	OsMADS45	MADS box protein	U31994
25	ATPase	Ca^{2+} -ATPase	U82966
26	Rab21	Water-stress inducible protein	Y00842

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อคู่ไพรเมอร์	คุณสมบัติ	GenBank Accession No.
27	Waxy	Waxy gene	X64108
28	ATN	Metal transporter	Q9SAH8
29	Fe	Yellow Stripe1	AF186234
30	Fe1	Yellow Stripe1	AF186234
31	Fe2	Yellow Stripe1	AF186234
32	IRT	Zrt-Irt related protein	NM179215
33	MY1	Maize Yellow Stripe1	-
34	ZIP1	Zinc transporter	AF033535
35	ZIP4	Metal transporter	NM100972

ไพรเมอร์ทั้ง 35 คู่ สามารถที่จะเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์ได้โดยการสลับคู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer ของคู่ไพรเมอร์ RPS2, Pib และ Xa1 เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีนต้านทานโรคของพืชที่อยู่กลุ่มเดียวกันและการจัดเรียงตัวของยีนต้านทานโรคในจีโนมจะอยู่เป็นกลุ่มๆ ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ จึงสามารถนำมาสลับคู่ระหว่างกันได้ จึงทำให้เกิดคู่ไพรเมอร์ใหม่อีก 6 คู่ คือ RP, PR, PX, XP, RX และ XR (ตารางที่ 11) ดังนั้นไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้จึงมีทั้งหมด 41 คู่

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ที่ได้จากสลับคู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer ของคู่ไพรเมอร์ RPS2, Pib และ Xa1 เพื่อใช้ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	Forward primer	Reverse primer
1	RP	RPS2	Pib
2	PR	Pib	RPS2
3	PX	Pib	Xa1
4	XP	Xa1	Pib
5	RX	RPS2	Xa1
6	XR	Xa1	RPS2

5. การทำปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอของยุงคาลิปดัสที่สกัดโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) พบว่ามีปริมาณมากพอและมีคุณภาพดี ไม่มีอาร์เอ็นเอและโปรตีนปนในดีเอ็นเอที่สกัดได้ และยังสามารถใช้ทำปฏิกิริยา PCR ได้ดี

ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอมี 2 สูตร คือ ปฏิกิริยาที่ 1 มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10X PCR buffer (รวมแมกนีเซียมไอออน 20 มิลลิโมลาร์) 1 เท่า, forward primer และ reverse primer อย่างละ 5 พิโคโมล, *YEA* DNA Polymerase 0.5 ยูนิต และปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ส่วนปฏิกิริยาที่ 2 มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 133 นาโนกรัม, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10X PCR buffer (รวมแมกนีเซียมไอออน 20 มิลลิโมลาร์) 1 เท่า, forward primer และ reverse primer อย่างละ 6.7 พิโคโมล, *YEA* DNA Polymerase 0.67 ยูนิต และปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับตัวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบของไพรเมอร์ทั้ง 41 คู่ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปฏิกริยา PCR และอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ของไพรเมอร์ทั้ง 41 คู่

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ปฏิกริยา PCR	Ta (°C)	ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ปฏิกริยา PCR	Ta (°C)
1	PR1	2	50	22	APX2	-	-
2	PR2	2	50	23	CatB	-	-
3	PR5	2	45	24	OsMADS45	1	45
4	PR8	2	45	25	ATPase	2	45
5	PR9	1	52	26	Rab21	1	50
6	PR10	2	45	27	Waxy	2	45
7	PR12	2	50	28	ATN	2	45
8	PR14	2	45	29	Fe	-	-
9	PR15	2	45	30	Fe1	1	50
10	PR16	2	45	31	Fe2	1	50
11	Chi	1	50	32	IRT	1	50
12	Rcht2	2	50	33	MY1	1	50
13	RPS2	1	50	34	ZIP1	2	45
14	Pib	2	45	35	ZIP4	-	-
15	Xa1	2	45	36	RP	2	45
16	Xa21	2	45	37	PR	2	45
17	I-SOD	2	45	38	PX	2	45
18	CBP	2	50	39	XP	2	45
19	APX1	1	45	40	RX	2	45
20	SalT	-	-	41	XR	2	45
21	C/Z-SOD	1	50				

หมายเหตุ สัญลักษณ์ – แสดงว่าไพรเมอร์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกริยา PCR

6. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างกลุ่มสายต้นอ่อนแอและต้านทาน

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 41 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR มีทั้งหมด 5 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ SalT, APX2, CatB, Fe และ ZIP4 ส่วนไพรเมอร์ที่เหลืออีก 36 คู่ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ และเมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า ในอะกาโรสเจลสามารถตรวจสอบได้เพียง 33 คู่ โดยมีไพรเมอร์ 3 คู่ ประกอบด้วย คู่ไพรเมอร์ XA21, CBP และ Zip1 ที่ไม่สามารถตรวจสอบได้หรือตรวจสอบได้ไม่ดีในอะกาโรสเจล แต่ยังสามารถตรวจสอบได้ในโพลีอะครีลาไมด์เจล

6.1 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

คู่ไพรเมอร์ที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลทั้ง 33 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง (monomorphic band) มีทั้งหมด 4 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ PR9, Chi, APX1 และ Fe2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900, 850, 800 และ 590 คู่เบส ตามลำดับ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในบางตัวอย่าง (polymorphic band) มีทั้งหมด 29 คู่ไพรเมอร์ คือ คู่ไพรเมอร์ PR1, PR2, PR5, PR8, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, Rcht2, RPS2, Pib, Xa1, I-SOD, C/Z-SOD, OsMADS45, ATPase, Rab21, Waxy, ATN, Fe1, IRT, MY1, RP, PR, PX, XP, RX และ XR โดยมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอดังนี้ คู่ไพรเมอร์ PR1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างขนาด 380 คู่เบส แต่เป็นแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจาง, คู่ไพรเมอร์ PR2 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 2 แถบ ขนาด 270 และ 600 คู่เบส แถบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบส ซึ่งพบเฉพาะในสายต้น SF06 และแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ซึ่งพบเฉพาะในสายต้น SF94 และ SF98, คู่ไพรเมอร์ PR 5 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 120 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง มีขนาด 210, 350, 420, 535, 700 และ 870 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR8 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด มีขนาด 150, 220 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR10 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 580 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง มีขนาด 150, 290, 300, 510, 650, 900 และ 1000 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR12 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมดมี

ขนาด 90, 200, 290, 300, 460, 645, 660 และ 1020 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR14 พบแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมดมีขนาด 350, 415, 440, 650, 1100 และ 1350 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR15 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 310 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมี ขนาด 1000, 1400 และ 1600 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR16 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 270 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็น แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 480, 640, 770 และ 1590 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ Rcht2 พบ แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แถบที่ชัดเจน เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่างมีขนาด 180 คู่เบส และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 545 คู่เบส, คู่ไพรเมอร์ RPS2 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 510 คู่เบส และแถบที่เหลือ จะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 240, 290, 650 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ Pib พบ แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 2 แถบ ขนาด 510 และ 750 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 400, 925, 1100 และ 1490 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ Xa1 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันใน ทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 260 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 340, 400, 500, 580, 850 และ 1000 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ I-SOD พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 1 แถบ ขนาด 450 คู่เบส ในสายต้น SF01 และ SF06, คู่ไพรเมอร์ C/Z-SOD พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 2 แถบ ขนาด 660 และ 1490 คู่เบส, คู่ไพรเมอร์ OsMADS45 พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 2 แถบ ขนาด 300 และ 640 คู่เบส, คู่ไพรเมอร์ ATPase พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เหมือนกันในทุกตัวอย่าง 3 แถบ ขนาด 290, 450 และ 600 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่ แตกต่างมีขนาด 400 คู่เบส, คู่ไพรเมอร์ Rab21 พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 5 แถบ ขนาด 200, 400, 510, 640 และ 850 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ Waxy พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็น แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 3 แถบ ขนาด 320, 440 และ 1550 คู่เบส และแถบที่ เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 210, 510, 600 และ 850 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ ATN พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 660 คู่เบส และแถบที่เหลือเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 400, 510 และ 1300 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ Fe1 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันใน ทุกตัวอย่าง 2 แถบ ขนาด 180 และ 510 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 340, 450, 560, 640 และ 670 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ IRT พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 5 แถบ มีขนาด 100, 150, 300, 350 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ MY1 พบแถบดีเอ็นเอที่

แตกต่างกันทั้งหมด 3 แถบ มีขนาด 450, 640 และ 1000 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ RP พบแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 650 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 850 และ 1100 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PR พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 195 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 300 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ PX พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 610 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 240, 700, 850, 925 และ 1170 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ XP พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 260 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 350, 700, 860, 1000, 1280 และ 1300 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ RX พบแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 2 แถบ ขนาด 100 และ 190 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 500 และ 510 คู่เบส ตามลำดับ, คู่ไพรเมอร์ XR พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่าง 1 แถบ ขนาด 190 คู่เบส และแถบที่เหลือจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีขนาด 100, 260, 300, 510, 650 และ 790 คู่เบส ตามลำดับ

ไพรเมอร์ทั้ง 29 คู่ ที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างพบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างกลุ่มสายต้นด้านทานและอ่อนแอที่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลจำนวน 4 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ PR5, Pib, Xa1 และ ATN และส่วนที่เหลืออีก 25 คู่ ที่ประกอบด้วย คู่ไพรเมอร์ PR1, PR2, PR8, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, Rcht2, RPS2, I-SOD, C/Z-SOD, OsMADS45, ATPase, Rab21, Waxy, Fe1, IRT, MY1, RP, PR, PX, XP, RX และ XR ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มสายต้นด้านทานและอ่อนแอ

6.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยปฏิกิริยา PCR ทั้ง 36 คู่ จะนำมาตรวจสอบในโพลีอะครีลาไมด์เจลเพียง 32 คู่ โดยไม่นำไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทุกตัวอย่างในอะกาโรสเจล คือ คู่ไพรเมอร์ PR9, Chi, APX1 และ Fe2 มาตรวจสอบในโพลีอะครีลาไมด์เจลอีก จากคู่ไพรเมอร์ทั้ง 32 คู่ ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ PR1, PR2, PR5, PR8, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, Rcht2, RPS2, Pib, Xa1, Xa21, I-SOD, CBP, C/Z-SOD,

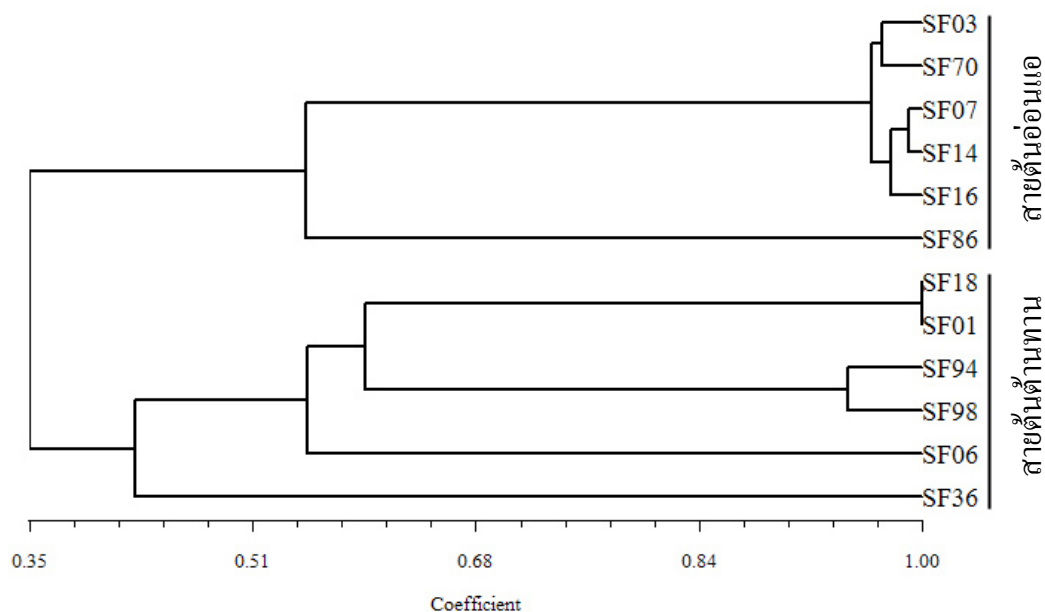
OsMADS45, ATPase, Rab21, Waxy, ATN, Fe1, IRT, MY1, ZIP1, RP, PR, PX, XP, RX และ XR จากคู่ไพรเมอร์ทั้ง 32 คู่ พบว่า มีคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างกลุ่มสายต้นด้านทานและอ่อนแอเพิ่มจากที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจล (คู่ไพรเมอร์ PR5, Pib, Xa1 และ ATN) คือ คู่ไพรเมอร์ PR5 และ RPS2 ส่วนไพรเมอร์อีก 26 คู่ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มสายต้นด้านทานและอ่อนแอ

7. ความคล้ายคลึงและความสัมพันธ์ของยูคาลิปตัสที่ได้จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นยูคาลิปตัส 12 สายต้น ที่ได้จากการแยกขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจลโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 32 คู่ พบว่า มีคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างแต่ละสายต้นยูคาลิปตัส จำนวน 28 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ PR1, PR2, PR5, PR8, PR10, PR12, PR14, PR15, PR16, Rcht2, RPS2, Pib, Xa1, Xa21, I-SOD, CBP, C/Z-SOD, OsMADS45, Rab21, Waxy, ATN, Fe1, IRT, MY1, ZIP1, PN, NP และ XN โดยมีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างรวมทั้งสิ้น 103 แถบ ที่ใช้เป็นข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.01e (Rohlf, 1993) จะให้ค่าออกมาเป็นดัชนีความเหมือน (similarity index) (ตารางที่ 13) โดยพบว่า ในสายต้น SF03, SF07, SF14, SF16 และ SF70 ที่เป็นสายต้นอ่อนแอจะมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างกันมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายต้น SF86 ที่เป็นสายต้นอ่อนแออีกหนึ่งสายต้นจะมีค่าดัชนีความเหมือนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์กับสายต้นอ่อนแออื่นๆ ส่วนในระหว่างสายต้นด้านทานจะพบว่า SF18 และ SF01 มีค่าดัชนีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์และ SF94 และ SF98 จะมีค่าดัชนีความเหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นในระหว่างสายต้นด้านทานอื่นๆ จะมีความเหมือนกันไม่มากเท่าใดนัก และจากดัชนีความเหมือนนำไปจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA โดยแสดงผลในรูปแบบของ dendrogram (ภาพที่ 7) ซึ่งพบว่า ที่ระดับความเหมือน 34 เปอร์เซ็นต์ สายต้นด้านทานทั้งหมดจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และสายต้นอ่อนแอทั้งหมดจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน ซึ่งผลจาก dendrogram นี้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti*

ตารางที่ 13 ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนโพลีอะครีลาไมด์เจลของ
 ยูkaliปัส 12 สายต้น จากคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 28 คู่

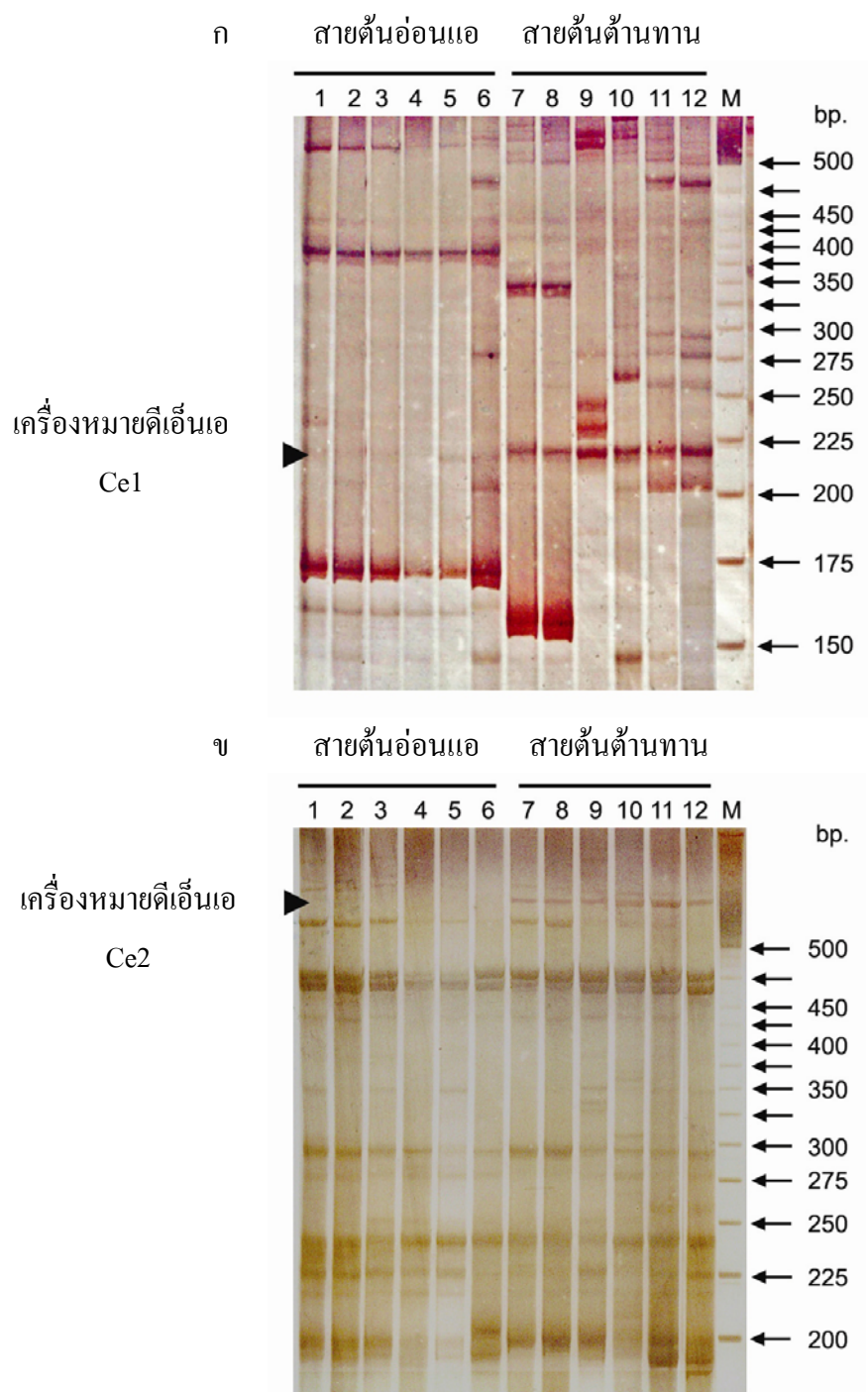
สาย ต้น	SF03	SF07	SF14	SF16	SF70	SF86	SF18	SF01	SF06	SF36	SF94	SF98
SF03	1.000											
SF07	0.971	1.000										
SF14	0.962	0.991	1.000									
SF16	0.952	0.981	0.972	1.000								
SF70	0.971	0.962	0.972	0.962	1.000							
SF86	0.545	0.569	0.563	0.569	0.520	1.000						
SF18	0.236	0.265	0.281	0.265	0.234	0.561	1.000					
SF01	0.236	0.265	0.281	0.265	0.234	0.561	1.000	1.000				
SF06	0.378	0.366	0.362	0.344	0.352	0.414	0.571	0.571	1.000			
SF36	0.350	0.337	0.333	0.313	0.321	0.312	0.386	0.386	0.529	1.000		
SF94	0.375	0.384	0.400	0.364	0.371	0.495	0.577	0.577	0.524	0.405	1.000	
SF98	0.364	0.392	0.408	0.392	0.380	0.521	0.617	0.617	0.552	0.442	0.946	1.000



ภาพที่ 7 Dendrogram ของสายต้นยูคาลิปตัสที่ได้จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนโพลีอะคริลาไมด์ เจลโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 28 คู่

8. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกแยะระหว่างสายต้นต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. eucalypti*

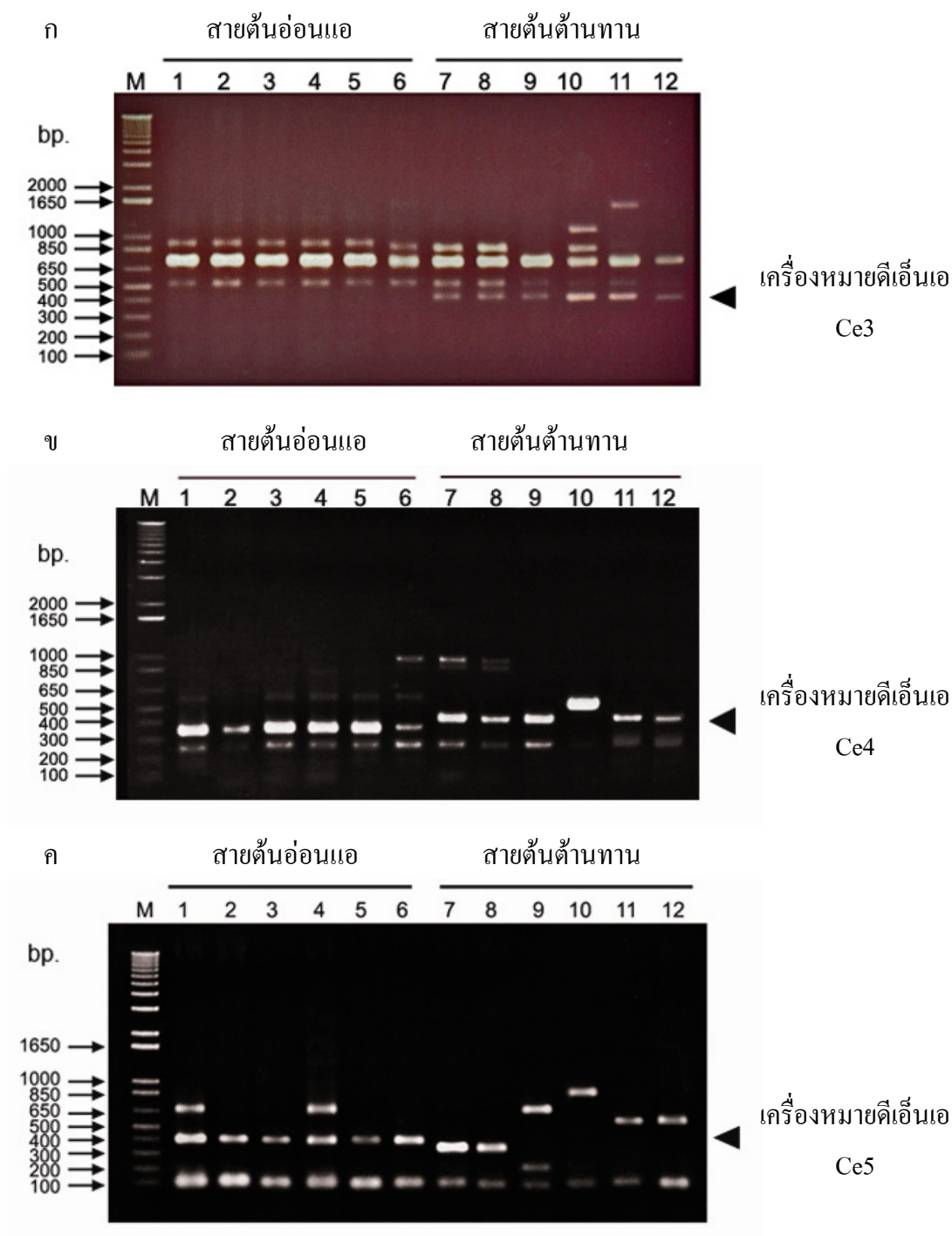
คู่ไพรเมอร์ที่ให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกกลุ่มระหว่างสายต้นต้านทานและสายต้นอ่อนแอมีทั้งหมด 5 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ PR5, NBS, Pib, Xa1 และ ATN ซึ่งให้เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 6 ชนิด โดยคู่ไพรเมอร์ PR5 ให้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 ชนิด โดยเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในสายต้นต้านทานมี 3 ชนิด คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2 และ Ce3 ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ PR5 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจลมีขนาด 220 คู่เบส (ภาพที่ 8ก) เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ RPS2 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจลมีขนาด 750 คู่เบส (ภาพที่ 8ข) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ Pib เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลมีขนาด 420 คู่เบส (ภาพที่ 9ก) ในส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในสายต้นอ่อนแอมี 3 ชนิด คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4, Ce5 และ Ce6 โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ Xa1 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลมีขนาด 340 คู่เบส (ภาพที่ 9ข), เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce5 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ PR5 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลมีขนาด 420 คู่เบส (ภาพที่ 9ค) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce6 ได้มาจากคู่ไพรเมอร์ ATN เป็นแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลมีขนาด 510 คู่เบส (ภาพที่ 9ง)



ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยช่อง 1-12 คือ SF03, SF07, SF14, SF16, SF70, SF86, SF18, SF01, SF06, SF36, SF94 และ SF98

ก เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 ขนาด 220 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นต้านทาน

ข เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 ขนาด 750 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นต้านทาน

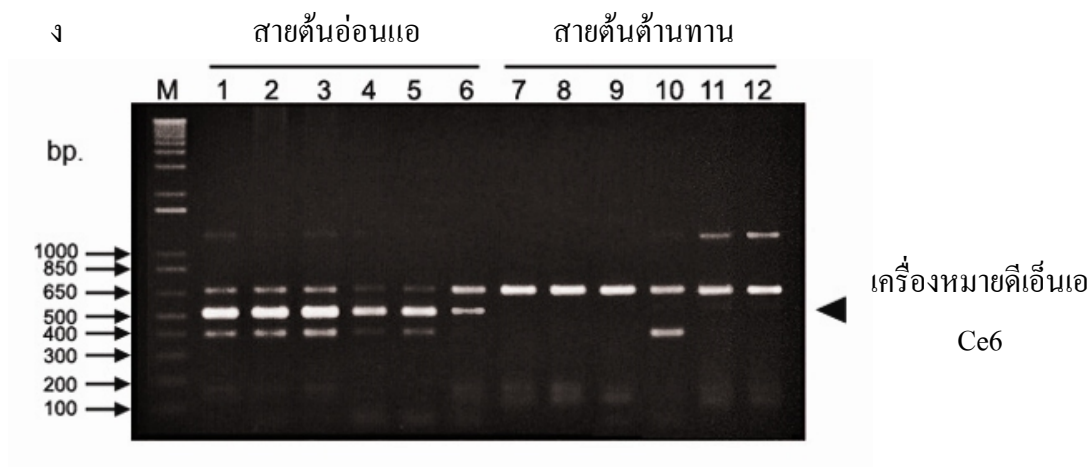


ภาพที่ 9 สายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยช่อง 1-12 คือ SF03, SF07, SF14, SF16, SF70, SF86, SF18, SF01, SF06, SF36, SF94 และ SF98

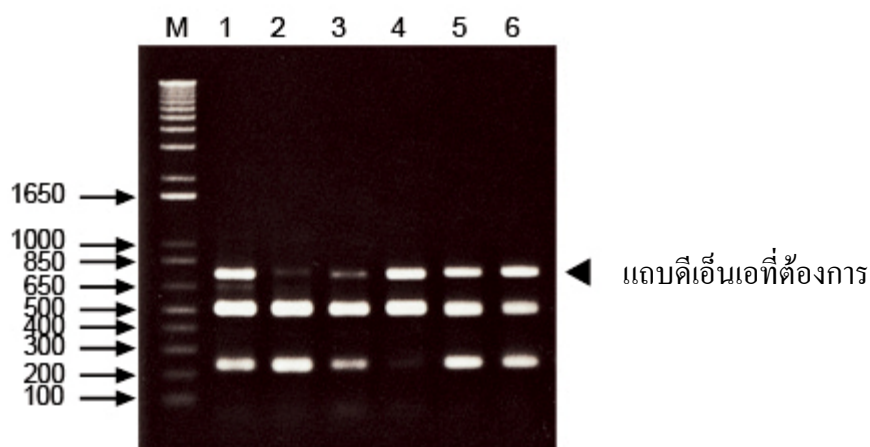
ก เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 ขนาด 420 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นต้านทาน

ข เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 ขนาด 340 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นอ่อนแอ

ค เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce5 ขนาด 420 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นอ่อนแอ



ภาพที่ 9 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยช่อง 1-12 คือ SF03, SF07, SF14, SF16, SF70, SF86, SF18, SF01, SF06, SF36, SF94 และ SF98
ง เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce6 ขนาด 510 คู่เบส พบเฉพาะในสายต้นอ่อนแอ



ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RPS2 โดยใช้แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอออกจากโพลิอะครีลาไมด์เจลมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยช่อง 1-6 คือ SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98

9. การโคลนแถบดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกกลุ่มระหว่างสายต้นด้านทานและอ่อนแอที่นำมาโคลนแถบดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2, Ce3 และ Ce4 โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 สามารถโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 220 คู่เบส ในสายต้น SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 สามารถโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส ในสายต้น SF01 และ SF36 เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 สามารถโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 420 คู่เบส ในสายต้น SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 สามารถโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340 คู่เบส ในสายต้น SF03, SF07, SF14, SF16, SF70 และ SF86 นอกจากนั้นในคู่ไพรเมอร์ Xa1 นี้ ยังโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส ในสายต้น SF01, SF06, SF18, SF94 และ SF98 และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340 และ 500 คู่เบส ในสายต้น SF36 เมื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 ในสายต้น SF01, SF06, SF18, SF36 และ SF98 มีความยาว 179 คู่เบส และในสายต้น SF94 มีความยาว 176 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายต้น SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 มีความเหมือนระหว่างกันสูงโดยมีค่า aligned score ตั้งแต่ 94 ขึ้นไป (ภาพที่ 11) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 ที่ได้จากสายต้น SF01 และ SF36 มีความยาว 582 และ 538 คู่เบส โดยสายนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สาย มีความเหมือนระหว่างกันสูงโดยมีค่า aligned score เท่ากับ 99 จะเห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ยาวประมาณ 750 คู่เบส แต่การหาลำดับเบสในครั้งหนึ่งจะหาลำดับได้ยาวประมาณ 500-600 เบส จึงทำให้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ได้ทั้งหมดใน 1 ครั้ง ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไม่มีความเหมือนกับยีนที่ออกแบบมาจึงไม่ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จนครบทั้งสาย (ภาพที่ 12) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 ในสายต้น SF06 และ SF36 มีความยาว 400 คู่เบส สายต้น SF18, SF94 และ SF98 มีความยาว 399 คู่เบส และสายต้น SF01 มีความยาว 360 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 พบว่า ในสายต้น SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 มีความเหมือนระหว่างกันค่อนข้างสูงโดยมีค่า aligned score ตั้งแต่ 77 ขึ้นไป ส่วนในสายต้น SF01 จะมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายต้นอื่นน้อย (ภาพที่ 13) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 ในสายต้น SF07, SF14 และ SF70 มีความยาว 297 คู่เบส สายต้น SF03 และ SF86 มีความยาว 298 คู่เบส สายต้น SF16 มีความยาว 299 คู่เบส สายต้น SF94 มีความยาว 348

คู่เบส สายต้น SF98 มีความยาว 350 คู่เบส สายต้น SF01, SF18 และ SF06 มีความยาว 361 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายต้น SF03, SF07, SF14, SF16, SF70, SF86, SF18, SF01, SF06, SF94 และ SF98 มีความเหมือนระหว่างกันสูงโดยมีค่า aligned score ตั้งแต่ 81 ขึ้นไป (ภาพที่ 14) ส่วนใน สายต้น SF36 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากสายต้นอื่นๆ อย่างมาก

เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 340 คู่เบส ที่พบเฉพาะในกลุ่มสายต้นอ่อนแอ แต่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ที่พบในสายต้นด้านทาน ยกเว้นในสายต้น SF36 การที่แถบ ดีเอ็นเอทั้งสองแถบมีขนาดต่างกันเนื่องจากเกิดการเพิ่ม (insertion) และขาดหายไป (deletion) ของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 60 เบส (ภาพที่ 14) จึงทำให้ในกลุ่มสายต้นอ่อนแามีลำดับ นิวคลีโอไทด์สั้นกว่าในกลุ่มสายต้นด้านทาน

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment		
Ce1_Marker_SF06	-----ACCTTTTCGAGTCTTATGGCTACGCTTAGAATTAAATCGGATGTCCAAATC	50
Ce1_Marker_SF98	-----ACCTTTTCGAGTCTTATGGCTACGCTTAGAATTAAATCGGATGTCCAAATC	50
Ce1_Marker_SF36	-----ACCTTTTCGAGTCTTATGGCTACCTCAGAATTAAATCGGATGTCCAAATC	50
Ce1_Marker_SF01	-----ACCTTTTCGAGTCTTATGGCTACCTCAGAATTAAATCGGATGTCCAAATC	50
Ce1_Marker_SF18	-----ACCTTTTCGAGTCTTATGGCTACCTCAGAATTAAATCGGATGTCCAAATC	50
Ce1_Marker_SF94	ACAACCAATCGTCTTGGAATCTCAATGTTCCATCTTAAG--AAATCTAAAGTCAGCTT	58
	* * * * *	
Ce1_Marker_SF06	AAAATCAAATTACTCTAGCCAATAGA----TCTAGATGTTTAAAAGATTCTATAGGAAGA	106
Ce1_Marker_SF98	AAAATCAAATTACTCTAGCCAATAGA----TCTAGATGTTTAAAAGATTCTATAGGAAGA	106
Ce1_Marker_SF36	AGAATCAAATTACTCTAGCCGATAGA----TCTAGAAGTTTAAAAGATTCTATAGGAAGA	106
Ce1_Marker_SF01	AGAATCAAATTACTCTAGCCGATAGA----TCTAGAAGTTTAAAAGATTCTATAGGAAGA	106
Ce1_Marker_SF18	AGAATCAAATTACTCTAGCCGATAGA----TCTAGAAGTTTAAAAGATTCTATAGGAAGA	106
Ce1_Marker_SF94	TCCTTTTATTGTCATCATCTTGCAGGATTTTCTGAACATCTGAATCTGTCTATTAAGTG	118
	* * * * *	
Ce1_Marker_SF06	CACCGAGAGAAGAAAAGTTGACTTCCAGATTTCTGATGATGGAGCATTGAGATTCGGAGG	166
Ce1_Marker_SF98	CACCGAGAAAAGAAAAGTTGACTTCCAGATTTCTGATGATGGAACATTGAGATTCGGAGG	166
Ce1_Marker_SF36	CATCGAGAAAAGAAAAGTTGACTTCCAGATTTCTGATGATGGAACACTGAGATTCGGAGG	166
Ce1_Marker_SF01	CATCGAGAAAAGAAAAGTTGACTTCCAGATTTCTGATGATGGAACACTGAGATTCGGAGG	166
Ce1_Marker_SF18	CATCGAGAAAAGAAAAGTTGGCTTCCAGATTTCTGATGATGGAACACTGAGATTCGGAGG	166
Ce1_Marker_SF94	CACTGATTCTGACCTGCACCTTCTGGCTCAATTCTAAGGGTGG--CCATAAGATTCCAAAG	176
	** * *	
Ce1_Marker_SF06	ACGATTGGTTGTA	179
Ce1_Marker_SF98	ACGATTGGTTGTA	179
Ce1_Marker_SF36	ACGATTGGTTGTA	179
Ce1_Marker_SF01	ACGATTGGTTGTA	179
Ce1_Marker_SF18	ACGATTGGTTGTA	179
Ce1_Marker_SF94	-----	

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ด้วย โปรแกรม ClustalW 1.82 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

Ce2_Marker_SF01    ACCTGAACTGGTCATGTTTCCGAACGGATTCTTCAACTCTTGAGGTAGTTGCCTGTGAT 60
Ce2_Marker_SF36    ACCTGAACTGGTCATGTTTCCGAACGGATTCTTCAACTCTTGAGGTAGTTGCCTGTGAT 60
*****

Ce2_Marker_SF01    GCATCCACTGTTCTGCATCTGTTCTCTTGATCCTCCACTCTTCCAGTCGGACCGTTGTAG 120
Ce2_Marker_SF36    GCATCCACTGTTCTGCATCTGTTCTCTTGATCCTCCACTCTTCCAGTCGGACCGTTGTAG 120
*****

Ce2_Marker_SF01    ATTGGAGATATGTCTGTTAGATGAGCACATTAGTTTCTAACATTACCTGTTTAGGTAAAC 180
Ce2_Marker_SF36    ATTGGAGATATGTCTGTTAGATGAGCACATTAGTTTCTAACATTACCTGTTTAGGTAAAC 180
*****

Ce2_Marker_SF01    CGAAGCATCACGCATCGCTTCCAATTCTTGCTAGTCGCTAAAATTTTTTTGGACTGAA 240
Ce2_Marker_SF36    CGAAGCATCACGCATCGCTTCCAATTCTTGCTAGTCGCTAAAATTTTTTTGGACTGAA 240
*****

Ce2_Marker_SF01    AAACACATATAGGAAATGACAGAAGAAAAATAGTGAGTCATCCATTTTACTTGCATATT 300
Ce2_Marker_SF36    AAACACATA--GGAAATGACAGAAGAAAAATAGTGAGTCATCCATCTTACTTGCATATT 298
*****

Ce2_Marker_SF01    TCCAATCAGCAATGCAAAGAGAACTAGCCCTAGAGTCGCAATGACTATGGCGAAAAACAAT 360
Ce2_Marker_SF36    TCCAATCAGCAATGCAAAGAGAACTAGCCCTAGAGTCGCAATGACTATGGCGAAAAACAAT 358
*****

Ce2_Marker_SF01    TTCTCCGACATATGTGCTCGTTGAGAGATTTTGTCCTCAAGGAAGTCAAGTGCGATCAAA 420
Ce2_Marker_SF36    TTCTCCGACATATGTGCTCGTTGAGAGATTTTGTCCTCAAGGAAGTCAAGTGCGATCAAA 418
*****

Ce2_Marker_SF01    AGATCATCATCTGAACTAGACAGTAGTCGAACGAGAATGACATTAGCTCAATAAATGTG 480
Ce2_Marker_SF36    AGATCATCATCTGAACTAGACAGTAGTCGAACGAGAATGATATTCAGCTCAATAAATGTG 478
*****

Ce2_Marker_SF01    GAGATGGAAGAGAGAAAGAGACGCATCTCCGCAAATCTATCTGTCGCTTCCAACCATAGTG 540
Ce2_Marker_SF36    GAGATGGAAGAGAGAAAGAGACGCATCTCCGCAAATCTATCTGTCGCTTCCAACCATAGTG 538
*****

Ce2_Marker_SF01    GTTAAATTTT CAGATATAATCAAGCATCTAGAGAAAAGTTTCA 582
Ce2_Marker_SF36    -----

```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

Ce3_Marker_SF06  -----TCACTACCATTGGTCGCAAAGGAGGTACCCAAA--GATAACCCCCCGAGGTCTG  52
Ce3_Marker_SF36  -----TCACTACCATTGATCGCAAAGGAGGTGCCTAGA--GATAACCCCCCTGAGGTTCG  52
Ce3_Marker_SF18  -----TCACTACCATTGGTCGCAAAGGAGGTACCTAGA--AATAATCCCGCGAAGTTTG  52
Ce3_Marker_SF98  -----TCACTACCATTGGTCGCAAAGGAGGTACCTAGA--AATAACCCCGCGAAGTTTG  52
Ce3_Marker_SF94  -----TCACTACCATTGGTCGCAAAGGAGGTACCTAGA--GACAATCCCGCTAAGTTTG  52
Ce3_Marker_SF01  GTTAAATTACCCCATAGCTACCATCTTGTGGACGCGGTTTAATTTCTCATTGAGGACA  60
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  ACGGGTTCGATATGACCAAGACTTGCGAATACCACATGGGAGAAAGGCGGCATGATATAG  112
Ce3_Marker_SF36  CCGGGTTCGATATAACCAAGACATGTGAATACCACATGGGAGAAATGGGCGCATGATGATAG  112
Ce3_Marker_SF18  CCAAGTTCGATGTGACCAAGACCTGCGAGTATCACATGGGAGAAAGGGGCGCATGATGCTA  112
Ce3_Marker_SF98  CCAGGTTCGATGTGACCAAGACCTGCGAGTATCACATGGGAGAAAGGGGCGCATGACGTTA  112
Ce3_Marker_SF94  TCAGGTTCGATGTGACCCAAACCTGCAAGTACCACATGGGAGAAATGGGCGTATGATGTGG  112
Ce3_Marker_SF01  -CATTTTCTTCACCTCCATAATATCTACCAGCACTAGGGATTTCATACAATTTGG--AA  116
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  ATAATTGTCACATGCTGAGATACAAAGTTCAACAATTCTAGACAAGAACATCTTGATT  172
Ce3_Marker_SF36  ATAATTGTCACATGCTGAGATACAAAGTTCAACAGCTTCTAGACAATAACATTTTGACTT  172
Ce3_Marker_SF18  ATAATTGCTACGTGCTAAAAATACAAAGTCCAATTGCTGCTAGATAAGGGGTGCTTGACTT  172
Ce3_Marker_SF98  ATAATTGCTACATGCTGAAATACAAAGTCCAATTGCTGCTAGATAAGGGGTGCTTAACTT  172
Ce3_Marker_SF94  ATAATTGCTATGTGCTGAAATACAAAGTCCAACAGCTACTAGATAAGAGCATCTTGACTT  172
Ce3_Marker_SF01  GCATCCACCCTAGAGGGCGTTGACCTCCCAATGTCTCTCGAAAATTGAGTTCACTCCC  176
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  TTAGGGAGGCTCAACCCAACGTGCAACAGAACCCCTCTACAAAATCATGCCGGGGAGTGA  232
Ce3_Marker_SF36  TCAGGGAAGCTCAGCCCAACGTGCAACAGAACCCCTCTACCAAATCTTGTAGGGGGAGTGA  232
Ce3_Marker_SF18  TCAGGGAAGCTCAGCCTAGCGTGCAAGCAAAATCCTCTACCAAATCATGCATTGAAAGTGA  232
Ce3_Marker_SF98  TCAGGGAAGCTCAACCTAGTGTGCAAGTAGAATCCTCTACCAAATCATGCATTAAAGTGA  232
Ce3_Marker_SF94  TCAGGAAAGCTTAGCTTAACGTGCAACAGAAATCTCTTATCAAATCATGCATTAAAGTGA  232
Ce3_Marker_SF01  TCTGCATGATTTGATAAGAGATTCTGTTGCACGTTAAGCTAAGCTTTCC--TGAAAGTCA  234
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  ACTCAATTTTGGAGACACGCGGGCGAGTCAACAGCCTCTAGTGTTAGATGCTTCCGAGT  292
Ce3_Marker_SF36  ACTCAATTTTGGAGACACGCGGGCGAGTCAACAGCCTTTAGTATTGGATGCTTCCGAGT  292
Ce3_Marker_SF18  ACTCAATCTCCGAGGAGACCCGGGTGGGTCAACGGCCTCTAGTGGTAGATGCATCCAAAT  292
Ce3_Marker_SF98  ACTTAATCTCCGAGGAGACCCGGGTGGGTCAACGGCCTCTAGTGGTAGATGCTTCCAAAT  292
Ce3_Marker_SF94  ACTTAATCTCCGAGGAGACATTGGGAGGTCAACGGCCTCTAGTGGTGATGCTTCCAAAT  292
Ce3_Marker_SF01  AGATGCTCTTATCTAGTAGCTGTTGGACTTTGTATTTAGCACATAGCAATTATCCACAT  294
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  TGTATGAATCCCTAGTGCTAGCGGGATACTATGAAGGCCAGGAGGATGTGACCCTAAAG  352
Ce3_Marker_SF36  TGTATGAGTCCCTAGTGCTAGTAGGATACTATGAAGGCCATGAGGATGTGATCCTAGAA  352
Ce3_Marker_SF18  TATATGAGTCCCTAGTGCTGGCAAGATATTATGGAAGTGAGGAAGACGTGACCCCGAGG  352
Ce3_Marker_SF98  TATATGAGTCCCTAGTGCTGGCAAGATATTATGGAAGTGAGGAAGACATGACCCCTAAG  352
Ce3_Marker_SF94  TGTATGAATCCCGAGTGCTGGCAAGATATTATGGAAGTGAGGAAGACATGACCCCTAAG  352
Ce3_Marker_SF01  CATAC--CCCATTTCTCCCATGTGGTACT-TGCAGGTTTGGGTACATCGAACCT--G  347
                  * * * * * * * * * * * * * * * *

Ce3_Marker_SF06  AGAAATTGAACCGCATCCGTAGGATGGTAGCCATGGGAGTAATCAGAA  400
Ce3_Marker_SF36  AGAAATTGAACCGCATCCGTAGGATGATAACCATGGGAGTAATCAGAT  400
Ce3_Marker_SF18  AGAAATTAAAC-ACGTCCGCAAAATAGTAGCCATGGGGGTAATCTAAC  399
Ce3_Marker_SF98  AGAAATTAAAC-ACGTCCGCAAGATAGTAGCCATGGGGGTAATTTAAC  399
Ce3_Marker_SF94  AGAAATTAAAC-ACGTCCGCAAGATAGTAGCCATGGGGGTAATCTGAC  399
Ce3_Marker_SF01  ACAAACCTTAGCGG-----  360
                  * * * * * * *

```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3

Ce4_Marker_SF03	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF16	CCCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	60
Ce4_Marker_SF86	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF14	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF70	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF07	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF01	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF18	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF06	-CCCTGCTGCCGAGGCAGCTGTCTGCCCCATCCTCAACGCCCTTCGTCGGCGTGGCTTC	59
Ce4_Marker_SF94	-CGCTGCTCCCGAGGCAGCTGTCTGGTCCATCCTCAACGCCCTTCGCCGTC-----CC	53
Ce4_Marker_SF98	-CGCTGCTCCCGAGGCAGCTGTCTGGTCCATCCTCAACGCCCTTCGCCGTC-----CC	53
	* * * * *	
Ce4_Marker_SF03	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF16	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	120
Ce4_Marker_SF86	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF14	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF70	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF07	TCCCTCCAGCGGCTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF01	TCCCTCCAGCGACTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF18	TCCCTCCAGCGACTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF06	TCCCTCCAGCGACTCTCTGGCGTGGAAGGAGCTTTGCTTCAACGAAAACACCGCTTGGT	119
Ce4_Marker_SF94	GTGGACCTGTTGCCCGCTTCGTCGCGCGGCTTCTCCTTCCATCCTCAGC--CGCTTGGT	111
Ce4_Marker_SF98	GTGGACCTGTTGCCCGCTTCGTCGCGCGGCTTCTCCTTCCATCCTCAGC--CGCTTGGT	111
	* * * * *	
Ce4_Marker_SF03	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF16	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	180
Ce4_Marker_SF86	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF14	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF70	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF07	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF01	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF18	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF06	TGGAGTTCACAACAACATCGGGAGGAAGTTAGGCGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	179
Ce4_Marker_SF94	TGGAGTTCACAACGAGACCGGGAGCGAGTTCAAGGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	171
Ce4_Marker_SF98	TGGAGTTCACAACGAGACCGGGAGCGAGTTCAAGGGAGGCACGCTTCACATCAAGGTCC	171
	* * * * *	
	insertion or deletion	
Ce4_Marker_SF03	GTTCTTTAGTTTTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	209
Ce4_Marker_SF16	GTTCTTTAGTTTTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	210
Ce4_Marker_SF86	GTTCTTTAGTTTTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	209
Ce4_Marker_SF14	GTTCTTTAGTTCTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	209
Ce4_Marker_SF70	GTTCTTTAGTTTTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	209
Ce4_Marker_SF07	GTTCTTTAGTTTTATCGCGTCGCTTTGGCT-----	209
Ce4_Marker_SF01	GTTCTTTAGTTTAATCGCGTCGCTTTGGCTATGGCTTGGTCTCTGTTTGGTTTTGAGTTG	239
Ce4_Marker_SF18	GTTCTTTAGTTTAATCGCGTCGCTTTGGCTATGGCTTGGTCTCTGTTTGGTTTTGAGTTG	239
Ce4_Marker_SF06	GTTCTTTAGTTTAATCGCGTCGCTTTGGCTATGGCTTGGTCTCTGTTTGGTTTTGAGTTG	239
Ce4_Marker_SF94	GTTCTTTAGTGTATCGCGTCGCTTTGGCTTGGTCTCTGCTTGGTTTTGAGTGCGATTCT	231
Ce4_Marker_SF98	GTTCTTTAGTGTATCGCGTCGCTTTGGCTTGGTCTCTGCTTGGTTTTGAGTGCGATTCT	231
	* * * * *	
	insertion or deletion	
Ce4_Marker_SF03	-----TGGTCACTGATCACGAGAGGCTTTTC	235
Ce4_Marker_SF16	-----TGGTCACTGATCACGAGAGGCTTTTC	236
Ce4_Marker_SF86	-----TGGTCACTGATCACGAGAGGCTTTTC	235
Ce4_Marker_SF14	-----TGGTCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	234
Ce4_Marker_SF70	-----TTGTCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	234
Ce4_Marker_SF07	-----TGGTCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	234
Ce4_Marker_SF01	CGATTCTGGAAGATTTTGGGGGGTTTTGAGGCTGTGGCCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	298
Ce4_Marker_SF18	CGATTCTGGAAGATTTTGGGGGGTTTTGAGGCTGTGGCCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	298
Ce4_Marker_SF06	CGATTCTGGAAGATTTTGGGGGGTTTTGAGGCTGTGGCCACTGATCACGAGAGGCTTT-C	298
Ce4_Marker_SF94	GGAAGATTTTGGGGGG-----TTTTGAGGCTATCGTCGCTGATCACGATAGGCTTT-T	283
Ce4_Marker_SF98	GGAAGATTTTGGGGGG-----TTTTGAGGCTATGGTCGCTGATCACGATAGGCTTT-T	282
	* * * * *	

ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4

Ce4_Marker_SF03	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	290
Ce4_Marker_SF16	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	291
Ce4_Marker_SF86	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	290
Ce4_Marker_SF14	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	289
Ce4_Marker_SF70	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	289
Ce4_Marker_SF07	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	289
Ce4_Marker_SF01	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	353
Ce4_Marker_SF18	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	353
Ce4_Marker_SF06	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAAT-----CGGGAAATG	353
Ce4_Marker_SF94	TGGTCGACTAT---GTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAATGGAATGGAATTGGGAAATG	340
Ce4_Marker_SF98	TGGTCGACTATTATGTTGGGTTTGGCACGTTGGAATGGAATGGAATGGAATGGAATTGGGAAATG	342

Ce4_Marker_SF03	ACGGGGAA	298
Ce4_Marker_SF16	ACGGGGAA	299
Ce4_Marker_SF86	ACGGGGAA	298
Ce4_Marker_SF14	ACGGGGAA	297
Ce4_Marker_SF70	ACGGGGAA	297
Ce4_Marker_SF07	ACGGGGAA	297
Ce4_Marker_SF01	AAGGGGAA	361
Ce4_Marker_SF18	AAGGGGAA	361
Ce4_Marker_SF06	AAGGGGAA	361
Ce4_Marker_SF94	ACGGGGAA	348
Ce4_Marker_SF98	ACGGGGAA	350
	* *****	

ภาพที่ 14 (ต่อ) การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment)

ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ เมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) กับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 Ce3 และ Ce4 ไม่มีความเหมือนกับยีนด้านโรคของพืช, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน หรือยีนอื่นๆ แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 มีความเหมือน (homology) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cyclic nucleotide-regulated ion channel ของ *Arabidopsis thaliana* แต่มีค่าคะแนนที่น้อย คือ 104 bites และมีค่า E value เท่ากับ 3×10^{-19} (ลำดับเบสที่เหมือนกันมากๆ จะมีค่าคะแนนมากกว่า 200 bites และมีค่า E value เท่ากับ 0) โดยตำแหน่งที่มีความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 จะอยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 293-406 โดยมีความยาวทั้งหมด 114 เบส และมีความเหมือนในช่วงลำดับเบสนี้เท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่มีความเหมือนอีกช่วง คือ ในช่วงลำดับเบสที่ 38-136 โดยมีความยาวทั้งหมด 99 เบส และมีความเหมือนในช่วงลำดับเบสนี้เท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15)

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value
gi 18401686 ref NM_128386.1	Arabidopsis thaliana cyclic nucl...	104	3e-19		
gi 20197600 gb AC006202.4	Arabidopsis thaliana chromosome 2 ...	102	1e-18		
gi 62198328 gb AC150977.12	Medicago truncatula clone mth2-32m9,	64.1	4e-07		
Arabidopsis thaliana cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC15) (At2g28260) mRNA, complete cds Length=2037					
Score = 104 bits (54), Expect = 3e-19 Identities = 94/114 (82%), Gaps = 0/114 (0%) Strand=Plus/Minus					
Query	293	TGCATATTTCCAATCAGCAATGCAAAGAGAACTAGCCCTAGAGTCGCAATGACTATGGCG	352		
Sbjct	1166	TGCATATTTCCAATAAGCAATGCAAACAGAACAGCCGAGAGTTGCTATGATGATGGCG	1107		
Query	353	AAAACAATTTCTCCGACATATGTGCTCGTTGAGAGATTTTGTCCCAAGGAACTG	406		
Sbjct	1106	AAAAGGATTCGCCAGCGTAAGTGCTCGTGGCGAGGTTTGTCCCAAGAGCTG	1053		
Score = 69.9 bits (36), Expect = 8e-09 Identities = 78/99 (78%), Gaps = 0/99 (0%) Strand=Plus/Minus					
Query	38	CTCTTGAGGTAGTTGCCTGTGATGCATCCACTGTTCTGCATCTGTTCTTTCCTGATCCTCCA	97		
Sbjct	1263	CTCTGGTGGAAGTTGTCTATGATGCATCCATTGTTCTGTATCTGTCCTTCTTATCCTCCA	1204		
Query	98	CTCTTCCAGTCGGACCGTTGTAGATTGGAGATATGTCTG	136		
Sbjct	1203	CTCTTCAAGTCTCATTGTTGTTGACTGTAAATAAGTCTG	1165		

ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 กับยีน
ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

วิจารณ์

1. อาการของโรคใบจุดและใบไหม้ และการแยกเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

ลักษณะบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เก็บมาใช้ในการแยกเชื้อ ในการทดลองนี้จะเหมือนกับลักษณะบาดแผลในแบบที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นจุดแบบวงกลมมีสีน้ำตาลอ่อนถึงค่อนข้างดำ และแบบที่ 2 จุดไหม้ขนาดใหญ่มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล บาดแผลมีเซลล์ตาย ขยายออกเป็นบริเวณกว้าง ตามที่ Ciesla *et al.* (1996) ได้แบ่งรูปแบบของบาดแผลไว้ทั้งหมด 4 แบบ ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ของเชื้อรา *C. eucalypti* จากการศึกษา ครั้งนี้มีลักษณะคล้ายกับ Sankaran *et al.* (1995) ได้บรรยายไว้ แต่ในการทดลองนี้พบว่าการสร้าง โคนิเดียของเชื้อราหลังจากแยกเชื้อได้ค่อนข้างช้าและยังไม่พบระยะไมโครโคนิเดีย (microconidial stage) ของเชื้อรา ซึ่งในสปีชีส์ของ *Cryptosporiopsis* บ่อยครั้งที่มีการสร้างสปอร์ช้าเมื่อเลี้ยงบน อาหารและอาจทำให้ยากต่อการจำแนกว่าเป็น Coelomycetes (Verkley *et al.*, 2003)

วิธีการแยกเชื้อทั้งสองวิธีพบว่า การแยกเชื้อโดยตรงจากกลุ่มของโคนิเดียสามารถทำได้ง่าย และสะดวกกว่าวิธี tissue transplanting เนื่องจากไม่มีเชื้อราชนิดอื่นๆ ปะปนมาทำให้แยกได้เฉพาะ เชื้อรา *C. eucalypti* นอกจากนั้นยังสามารถแยกเป็นโคนิเดียเดี่ยวได้เลย โดยนำกลุ่มโคนิเดียไป เจือจางด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อบนผิวหน้าของวุ้น นำไปบ่มเป็นเวลา 1-2 วัน แล้วตัดชิ้นวุ้นที่มีโคนิเดีย เดี่ยวๆ ซึ่งกำลังงอกเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไปเลี้ยงต่อไป ซึ่งต่างจากวิธี tissue transplanting โดยพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในบางครั้งจะมีเชื้อชนิดอื่นๆ หลายชนิดเจริญบนอาหารด้วย โดยเชื้อราชนิดอื่นบางชนิดมี อัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าเชื้อรา *C. eucalypti* ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อรา *C. eucalypti* ออกจาก เชื้อราชนิดอื่นๆ ได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามสามารถลดปัญหาการปะปนของเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้โดย เลือกใช้ใบยูคาลิปตัสที่มีบาดแผลอยู่ในระยะแรกๆ ของการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eucalypti* ซึ่ง สอดคล้องกับในการแยกเชื้อ *Phytophthora infestans* ด้วยวิธีการแยกเชื้อราโดยใช้ชิ้นวุ้นมาป้าย sporangium โดยตรงนั้นสามารถแยกเชื้อราได้เร็วและสะดวกมากกว่าวิธี tissue transplanting (กมลศิริ, 2546)

2. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

ลักษณะของโคโลนีทั้ง 9 ไอโซเลทที่ผ่านการแยกโคโคนิเดียแล้วพบว่า มีความผันแปรของสีโคโลนีในแต่ละไอโซเลท และลักษณะขอบโคโลนีมีความต่างกันซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตมีทั้งที่สม่ำเสมอและไม่สม่ำเสมอตามแนวรัศมีวงกลม เช่น ในไอโซเลท K001 จะมีสีโคโลนีค่อนข้างดำ และขอบโคโลนีจะไม่เจริญออกตามแนวรัศมีวงกลม นอกจากนั้นในไอโซเลท C002 จะมีเม็ดสีน้ำตาลแดงที่ทำให้อาหาร PDA เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ในบางไอโซเลทของ *Cryptosporiopsis rhizophila* ที่มีการสร้างเม็ดสีแดงที่สามารถแพร่ได้บนอาหาร malt extraction agar แต่ไม่พบในสปีชีส์ของ *Cryptosporiopsis* อีก 2 ชนิด (Verkley *et al.*, 2003) นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลานานโคโลนีอาจมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม ในบางไอโซเลทเส้นใยเชื้อราจะเกาะกันหลวมขึ้น พูขึ้นเล็กน้อย สีของโคโลนีจะเป็นสีขาวมากกว่าเดิม เนื่องจากโคโลนีของเชื้อรามีการสร้างเส้นใยสีขาวออกมาเป็นกระจุกหรือทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อ และไม่มีการสร้างของเหลวขึ้นออกมา รวมไปถึงไม่มีการสร้างโคโคนิเดีย

ไอโซเลทที่เก็บจากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดราชบุรีและที่เก็บได้จากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดกาญจนบุรีมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันระหว่างไอโซเลทของแต่ละพื้นที่ ส่วนในเชื้อราที่เก็บได้จากสวนป่ายูคาลิปตัสในบริเวณจังหวัดฉะเชิงเทราจะมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท โดย C004 มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วที่สุด ส่วนไอโซเลท C003 มีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง และไอโซเลท C001 และ C002 มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. eucalypti* ในสวนป่ายูคาลิปตัสบริเวณจังหวัดฉะเชิงเทราอาจจะมีมาก เมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทั้ง 9 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่บ่มเชื้อไว้ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3.6-6.6 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับไอโซเลทของเชื้อรา *C. eucalypti* ที่แยกได้โดย เดชา (2547) ที่พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อราทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางจำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อบ่มเชื้อทั้งหมดไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บนอาหาร PDA สำเร็จรูปมีค่าอยู่ระหว่าง 2.65-6.7 เซนติเมตร ส่วนในอาหาร PDA ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการมีค่าอยู่ระหว่าง 2.83-7.65 เซนติเมตร และพบว่าขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูปมีค่าน้อยกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการเกือบทุกไอโซเลทยกเว้นไอโซเลท T5 และสามารถแบ่งเชื้อราได้เป็น 4 กลุ่ม ตามค่าความแตกต่างของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยที่มี

นัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อจะผันแปรไปตามไอโซเลทและอุณหภูมิในการเลี้ยง เช่น ที่อุณหภูมิเดียวกัน ไอโซเลทอุรธานีเจริญเร็วกว่า ไอโซเลททะเลเชิงเทรา และไอโซเลททั้งสองเจริญที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ได้รวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 24 และ 28 องศาเซลเซียส (Ciesla *et al.*, 1996) จากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *Cryptosporiopsis melanigena* และ *C. radicicola* ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 5-30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างแต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *C. melanigena* เท่ากับ 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *C. radicicola* เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อรา *C. radicicola* เจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา *C. melanigena* ประมาณ 2-3 เท่า (Kowalski *et al.*, 1998)

ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *C. eucalypti* ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ C001, K001 และ R001 ที่เข้าทำลายยูคาลิปตัส 8 สายต้น ในการทดลอง intach seedling inoculation และที่เข้าทำลายยูคาลิปตัส 6 สายต้น ในการทดลอง detached leaf inoculation 1 มีระดับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท แตกต่างกันระหว่างการทดลองเนื่องจากสายต้นที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบดูแนวโน้มของทั้ง 2 การทดลองได้ เพราะว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเข้าทำลายแต่ละสายต้นได้แตกต่างกัน ถ้าพิจารณาแต่ละการทดลองก็พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทมีระดับความรุนแรงแตกต่างกัน แต่จากการทดลองปลูกเชื้อหลายครั้งถึงแม้จะวางแผนการทดลองเหมือนเดิมโดยใช้สายต้นเดียวกันแต่ความรุนแรงของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ก็มีแนวโน้มไม่เหมือนเดิม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการพัฒนาอาการโรคค่อนข้างมาก และอายุของต้นกล้าที่ใช้ในแต่ละครั้งมีความต่างกันหรืออายุของใบที่เลือกมาใช้ทดลองไม่ใกล้เคียงกัน โดยใบที่อ่อนกว่าจะเกิดโรคที่ง่ายกว่าใบที่แก่ รวมไปถึงอายุของเชื้อราที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อเตรียม conidial suspension เนื่องจากการปลูกเชื้อแต่ละครั้งจะมีระยะเวลาห่างกันจึงทำให้เชื้อรามีอายุมากขึ้นและต้องมีการเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ เพื่อให้เชื้อรามีการสร้างโคนิเดียจำนวนมากอยู่เหมือนเดิม แต่โคนิเดียที่สร้างขึ้นมามีอายุน้อยจะมีการเจริญปะปนไปกับโคโลนีเดิมจึงอาจทำให้ความรุนแรงของเชื้อราแต่ละไอโซเลทเปลี่ยนไปจากเดิมได้ อย่างไรก็ตามการแยกระดับความรุนแรงของเชื้อราโดยใช้พืชอาศัยก็สามารถทำได้ดังเช่น การศึกษาระดับความรุนแรงของเชื้อ *Cochliobolus sativus* ที่เป็นสาเหตุของโรค spot blotch ของข้าวบาร์เลย์ ในแต่ละไอโซเลทที่เก็บได้จาก Syria สามารถแยกระดับความรุนแรงของเชื้อราโดยใช้ข้าวบาร์เลย์ 10 จีโนไทป์ พบว่า ในการตอบสนองของจีโนไทป์มีตั้งแต่อ่อนแอมากจนถึงค่อนข้างต้านทาน เมื่อ

แบ่งกลุ่มตามความรุนแรงของเชื้อสามารถจัดได้ 3 กลุ่ม และที่ระดับค่าเฉลี่ยของโรค 3.71 จะเป็นจุดที่ใช้แยกแยะทางปฏิกิริยาที่รุนแรงและไม่รุนแรงของเชื้อ (Arabi and Jawhar, 2004) นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อรา *C. eucalypti* ถึงแม้จะเป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้น้อยและช้ากว่าเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วย แต่อย่างไรก็ตามการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศก็สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อระดับความรุนแรงของเชื้อได้ โดยในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อ *Phytophthora infestans* พบว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของเชื้อราได้ โดยไอโซเลตต่างๆ ที่ได้จากการแยกชูโอสปอร์เดี่ยวๆ มีความรุนแรงของเชื้อแตกต่างกันออกไปจากไอโซเลตเดิม อาจมีทั้งเป็นเชื้อที่รุนแรงมากขึ้นหรือน้อยลง แต่บางไอโซเลตเมื่อแยกชูโอสปอร์เดี่ยวแล้วไอโซเลตต่างๆ ที่ได้มีความรุนแรงของเชื้อเท่าเดิม (Abu-El Samen *et al.*, 2003b) การจัดกลุ่มไอโซเลตของเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้วิธี UPGMA พบว่า ไอโซเลตที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวซึ่งสปอร์ได้จากไอโซเลต PI-105 สามารถจัดกลุ่มตามความรุนแรงของเชื้อได้ 6 กลุ่ม จัดกลุ่มโดยใช้ RAPD ได้ 11 กลุ่ม และจัดกลุ่มโดยใช้ AFLP ได้ 3 กลุ่ม ส่วนไอโซเลตที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวซึ่งสปอร์ได้จากไอโซเลต PI-1 จัดกลุ่มตามความรุนแรงของเชื้อได้เพียง 1 กลุ่ม จัดกลุ่มโดยใช้ RAPD ได้ 4 กลุ่ม และจัดกลุ่มโดยใช้ AFLP ได้ 6 กลุ่ม นอกจากนั้นยังพบว่าแต่ละประชากรถูกไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการจัดกลุ่มตามความรุนแรง RAPD และ AFLP (Abu-El Samen *et al.*, 2003a)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. eucalypti* ในแต่ละไอโซเลตเมื่อมีการเลี้ยงไปเป็นเวลานาน พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อราจะเปลี่ยนไป โดยเฉพาะสีของโคโลนีทำให้ไม่สามารถที่จะใช้ลักษณะโคโลนีในการจำแนกเชื้อราว่าเป็นไอโซเลตใดได้ แต่มีเพียงบางไอโซเลตที่มีลักษณะเฉพาะของไอโซเลตที่สามารถใช้จำแนกได้ เช่น ไอโซเลต C002 ที่มีการสร้างเม็ดสีน้ำตาลแดง สำหรับการเลี้ยงเชื้อรา *C. eucalypti* ให้เหมาะสมที่สุดเพื่อที่จะใช้ในการปลูกเชื้อ น่าจะใช้เชื้อราที่เพิ่งแยกมาใหม่จากใบยูคาลิปตัสที่มีอาการโรคใบจุดและใบไหม้ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ถี่ขึ้นโดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 5-7 วัน ซึ่งจะทำให้โคโลนีของเชื้อรามีการสร้างของเหลวชั้นออกมาจำนวนมากจนบางครั้งท่วมโคโลนีของเชื้อราและเชื้อราก็จะมีการสร้างโคโคนีเดียวออกมาจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งจะทำให้ได้โคโคนีเดียวจำนวนมากพอที่จะเจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $1-5 \times 10^5$ โคโคนีต่อมิลลิลิตร และถ้าต้องการให้โคโลนีของเชื้อรามีการสร้างของเหลวชั้นและโคโคนีเดียวออกมาจำนวนมากต่อไปเรื่อยๆ ต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นประจำ อาจจะเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 14 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเป็นเวลานานขึ้น เชื้อรามักไม่

ค่อยสร้างโคนิเดียหรือสร้างเพียงเล็กน้อยจนทำให้ไม่สามารถที่จะใช้ในการเตรียม conidial suspension ได้เพียงพอ นอกจากนั้นเชื้อราที่มีอายุมากจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง

3. การคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานด้วยการปลูกเชื้อ

การเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* ที่เป็นสาเหตุของโรค anthracnose ในต้นถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) พบว่า ทั้งการปลูกเชื้อในเมล็ด ในกล้า และด้วยเทคนิค detached leaf ให้ผลการทดลองเหมือนกันในแต่ละวิธี แต่การปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf เป็นวิธีการที่ดีที่สุด (Bigirimana and Hofte, 2001) เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf มีประสิทธิภาพในการแยกสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. eucalypti* มากกว่าการปลูกเชื้อโดยตรงในกล้า โดยปัญหาหนึ่งของการปลูกเชื้อในต้นกล้าคือ ไม่สามารถบ่มต้นกล้าที่ปลูกเชื้อแล้วในกล่องขึ้นไวก้นมีระดับอาการโรคที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายต้นที่ค่อนข้างต้านทานและค่อนข้างอ่อนแอได้ชัดเจน เนื่องจากในบางสายต้นเกิดการรุนแรงของใบทั้งใบที่แสดงอาการของโรครุนแรงและใบที่แสดงอาการของโรคปานกลางจนถึงน้อยโดยใบจะเริ่มร่วงประมาณวันที่ 7 หลังปลูกเชื้อ โดยเฉพาะในสายต้น SF03 ที่ถึงแม้จะไม่พบอาการโรคมานักแต่เกิดการเหี่ยวและการหลุดร่วงของใบอย่างมาก จึงทำให้การประเมินโรคโดยใช้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่สามารถแยกสายต้นที่มีความต้านทานในระดับกลางๆ ได้ดี เช่นเดียวกับการทดลองของ เดชา (2547) พบว่า เมื่อปลูกเชื้อราขึ้นบนต้นกล้ายูคาลิปตัส ในสัปดาห์ที่ 3 หลังปลูกเชื้อ ใบที่เป็นโรคเริ่มเหลืองและมีการร่วงหล่นของใบที่เป็นโรคพร้อมกับการสร้างใบใหม่ขึ้นมา สำหรับการประเมินโรคโดยใช้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf จะใช้ได้ผลดีเนื่องจากแต่ละสายต้นแสดงอาการโรคออกมาในระดับที่แตกต่างกันชัดเจน และนำสะท้อนให้เห็นถึงระดับความต้านทานของแต่ละสายต้นได้ดี โดยเฉพาะความต้านทานที่เป็นลักษณะเชิงปริมาณ

การปลูกเชื้อในต้นกล้ามีอาการของโรคค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากการควบคุมสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะกับการเกิดโรค ดังในการทดลองปลูกเชื้อโดยตรงบนต้นกล้ายูคาลิปตัสด้วยเชื้อรา *C. eucalypti* ก่อนหน้านี้ถึงแม้ในการทดลองปลูกเชื้อจะมีอาการโรคเหมือนกับการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพแปลง แต่ช่วงเวลาที่ยาวในการบ่มต้นกล้าที่ปลูกเชื้อในสภาพความชื้นสูงมักทำให้เกิดปัญหาและการทดลองหลายครั้งที่ล้มเหลวเนื่องจากควบคุมสภาพแวดล้อมได้ไม่เหมาะสมเพียงพอ (Old et al., 2002) นอกจากนั้นอาจเนื่องมาจากต้นกล้าที่ใช้ในการทดลองปลูกไว้ในดิน เมื่อ

เชื้อราเข้าทำลายใบของต้นกล้าแล้วต้นกล้าจะพยายามที่ต่อต้านการเข้าทำลาย เมื่อต้นกล้าปลูกในดิน จึงสามารถที่จะดูดน้ำและแร่ธาตุต่างๆ ทำให้ต้นกล้ามีความแข็งแรงซึ่งต่างจากการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf ที่ใบถูกเด็ดออกมาจากต้นทำให้มีการแสดงอาการของโรคออกมามากกว่า อย่างก็ตามปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้จากเชื้อรา *C. eucalypti* ยังไม่มีความเข้าใจมากนัก แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลักๆ อยู่ 2 ปัจจัย คือ ความชื้นและอุณหภูมิ ในการเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อรา *Albugo candida* ก็พบว่าอุณหภูมิต่ำและความชื้นสูงของผู้ควบคุมการเจริญเติบโตใน 72 ชั่วโมงแรกหลังจากปลูกเชื้อ มีความสำคัญต่อการบุกรุกและตั้งรกรากในพืชอาศัยของเชื้อรา (Goyal *et al.*, 1996) แต่ในการทดลองนี้ได้บ่มต้นกล้าและใบที่ปลูกเชื้อไว้ในกล่องขึ้นตลอดเวลา ดังนั้นความชื้นจึงน่าจะเพียงพอต่อการงอกของโคนิเดีย และการพัฒนาของอาการโรคได้ แต่อุณหภูมิของกล่องขึ้นในการปลูกเชื้อโดยตรงบนต้นกล้าในการศึกษาครั้งนี้มีความไม่สม่ำเสมอและมีระดับค่อนข้างสูงโดยมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24-33 องศาเซลเซียส จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การเกิดโรคน้อยกว่าปกติ จากการศึกษาของ Sankaran *et al.* (1995) ได้นำต้นกล้าที่ปลูกเชื้อชนิดนี้แล้วไว้ในกล่องความชื้นที่มีอุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน พบว่าไม่มีการพัฒนาของอาการโรคใบจุด ส่วน Ciesla *et al.* 1996 ได้รายงานว่าการทดสอบปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *C. eucalypti* ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส สามารถทำให้เกิดอาการใบจุดใน 4-5 วัน หลังจากปลูกเชื้อ แต่จะไม่แสดงอาการโรค ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นการเจริญของเชื้อราชนิดนี้นับอาหารและการสร้างโคนิเดียที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จะลดลงเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และพบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการพัฒนาของอาการโรคเท่ากับ 23-30 องศาเซลเซียส (Old *et al.*, 2002) นอกจากนั้นปัจจัยสิ่งแวดล้อมน่าจะมีผลต่อการเกิดโรคค่อนข้างมาก นอกเหนือจากอาการใบจุดและใบไหม้ เชื้อรา *C. eucalypti* สามารถทำให้เกิดแคงเกอร์ในกิ่ง ก้านและลำต้นของยูคาลิปตัส การเข้าทำลายของเชื้อราที่ทำให้เกิดแคงเกอร์หลายชนิดพบว่าขึ้นกับปัจจัยสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก โดย Heerden and Wingfield (2002) ได้ศึกษาผลจากสภาพแวดล้อมที่มีต่อการตอบสนองของสายต้นยูคาลิปตัสเมื่อปลูกเชื้อรา *Cryphonectria cubensis* พบว่า ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคมีความแตกต่างกันตามตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของแปลงทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาในเชื้อรา *Cryphonectria eucalypti* ที่ทำให้เกิดแคงเกอร์พบว่า การพัฒนาของโรคในสายต้นยูคาลิปตัสขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมอย่างมาก (Gryzenhout *et al.*, 2003)

การทดลองคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัสมาลดอุณหภูมิที่ต้านทานโรคใบจุด โดยวิธีฉีดพ่นสปอร์โดยตรงในกล้าไม้พบว่า สามารถคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัสที่ต้านทานต่อโรคใบจุดได้ใน

ระดับหนึ่งภายใต้เวลาที่รวดเร็วโดยกระทำกับกล้าไม้ขนาดเล็กและอายุน้อย แต่มีข้อจำกัดคือ เชื้อราสาเหตุของโรคพืชไม่สามารถสร้างความเสียหายให้กับกล้าไม้จนถึงตายได้เหมือนกับต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในพื้นที่ที่ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมในเรือนทดลองไม่เหมาะสมสำหรับการระบาดของโรค และกล้าไม้ที่นำมาทดลองอาจอยู่ในช่วงที่กำลังเจริญเติบโตและมีความแข็งแรง (เดชา, 2547) ดังนั้นอายุของต้นยูคาลิปตัสที่เลือกใช้จึงน่าจะมีผลต่อการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราด้วย โดยลักษณะของใบของต้นกล้ายูคาลิปตัสมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากใบของต้นโตเต็มที่ โดยโรคใบจุดใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* มักจะสร้างความเสียหายอย่างมากให้กับต้นยูคาลิปตัสที่มีอายุ 2-4 ปี ในสภาพแปลง การทดสอบความต้านทานจึงอาจต้องมีการเลือกใช้ระยะต้นพืชที่นำมาทดลองให้เหมาะสมที่สุดเพื่อที่แสดงให้เห็นถึงระดับความต้านทานที่ถูกต้องและมีความสอดคล้องกับการคัดเลือกในแปลง เช่น ในการเข้าทำลายของเชื้อ *Pyrenophora semeniperda* บนใบของต้นกล้า และใบของต้นโตเต็มที่ของข้าวสาลีพบว่า โคนิเดียที่พ่นลงบนใบของต้นกล้าสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนบนใบของต้นโตเต็มที่ที่สามารถงอกได้เพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าใบของต้นกล้ามีความอ่อนแอมากกว่าใบของต้นโตเต็มที่ทั้งภายใต้สภาพแปลงทดลองและสภาวะควบคุมปัจจัยแวดล้อม (Campbell and Medd, 2003) อายุต้นพืช อายุใบ และตำแหน่งของใบบนต้นของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) 5 พันธุ์ มีผลต่อความต้านทานแบบไม่จำเพาะ (race-nonspecific resistance) ต่อเชื้อรา *Phytophthora infestans* ทั้งจากการสำรวจในภาคสนามและการทดลองในสภาวะควบคุมปัจจัยแวดล้อม โดยส่วนของตำแหน่งใบบนต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมาก ส่วนอายุต้นพืชและอายุใบมีผลเพียงเล็กน้อย (Visker *et al.*, 2003) ปัจจัยทางพันธุกรรมของต้นพืชก็ส่งผลต่อความต้านทานในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตได้ โดยความต้านทานในต้นกล้ากับต้นโตเต็มที่อาจถูกควบคุมด้วยยีนต่างกันเช่น ในความต้านทานต่อ *Leptosphaeria maculans* ที่เป็นสาเหตุโรค black leg ใน *Brassica juncea* เกี่ยวข้องกับยีน 2 คู่ที่กำหนดความต้านทานในต้นกล้าและในลำต้น ปฏิกริยาการข่มของยีนทั้งสองเป็นแบบ dominant recessive epistasis โดยยีนแรกที่ทำให้ความต้านทานมีการข่มยีนที่ 2 เป็นแบบ dominant และยีนที่ 2 มีการข่มยีนแรกเป็นแบบ recessive (Keri *et al.*, 1997) ในข้าวสาลีสายพันธุ์ Westphal 12A ที่มียีนต้านทานโรคราสนิม (leaf rust) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Puccinia triticina* พบว่า ยีนที่ควบคุมความต้านทานโรคในช่วงเป็นต้นกล้าและต้นโตมีความต่างกัน โดยในขณะที่เป็นต้นกล้ามียีน 3 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค ส่วนในต้นโตเต็มที่จะมียีน *Lr34* ที่เป็นยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับความต้านทานมีการแสดงออกได้ดี (Kolmer and Liu, 2001) ส่วนความต้านทานโรค eyespot ของข้าวสาลีพันธุ์ Cappelle-Desprez (Bezostaya) พบว่า ยีนหลักที่ควบคุมความต้านทานโรคในต้นกล้า

จะอยู่บนโครโมโซม 7A ซึ่งยีนเหล่านี้ไม่มีผลต่อความต้านทานโรคในต้นต้นโตเต็มที่ แต่ยีนหลักที่ควบคุมความต้านทานโรคของต้นโตเต็มที่อยู่บนโครโมโซม 5A (Muranty *et al.*, 2002)

การประเมินโรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ในภาคสนามของ เดชา (2547) พบว่า สายต้น CT76 มีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำและสายต้น CT37 มีระดับรุนแรงของการเกิดโรคสูง ซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคของแต่ละสายต้นในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า SF06 หรือ CT76 อยู่ในกลุ่มต้านทานและมีระดับความต้านทานสูงกว่าสายต้นอื่นๆ ส่วน SF07 หรือ CT37 อยู่ในกลุ่มอ่อนแอและมีระดับความต้านทานต่ำกว่าสายต้นอื่นๆ

ถ้าความต้านทานต่อโรคใบจุดใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. eucalypti* เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคเพียง 1 ยีน ในกรณีที่ยีนต้านทานโรคมีการแสดงออกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง การทดสอบสายต้นยูคาลิปตัสโดยการปลูกเชื้อน่าจะพบเพียงสายต้นที่ต้านทานและอ่อนแอ คือ สายต้นต้านทานที่มียีนต้านทานโรคนั้นจึงทำให้แสดงความต้านทานและสายต้นอ่อนแอที่ไม่มียีนต้านทานโรคนั้นจึงทำให้แสดงความอ่อนแอ แต่จากการทดลอง detached leaf inoculation 2 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัสทั้ง 11 สายต้น ในการปลูกเชื้อโดยใช้ไอโซเลท R001 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.92-86.5 เปอร์เซ็นต์ คือ แต่ละสายต้นมีการแสดงระดับความต้านทานหลายระดับ นอกจากนั้นยังไม่พบการตอบสนองแบบ hypersensitive response ของสายต้นยูคาลิปตัส ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมักพบในเชื้อราที่เป็น biotrophic parasites ดังนั้นความต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับยีนต้านทานหลายยีน โดยแต่ละยีนแสดงออกแบบบวกลบหักลบ ทำให้สายต้นใดที่มียีนต้านทานโรคหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคจำนวนมากก็就会有ความต้านทานมากกว่าสายต้นที่มีจำนวนยีนน้อยกว่า นอกจากนั้นถ้าสายต้นใดมีความบกพร่องของยีนต้านทานโรคหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในสายต้นนั้นๆ หรือการแสดงออกของยีนมีน้อยและไม่รวดเร็วพอจนถึงไม่มีการแสดงออกเลยก็จะทำให้ความต้านทานลดลงตามลำดับ โดยความต้านทานเชิงปริมาณ (quantitative resistance) สามารถดูได้จากการกระจายตัวของพืชต้านทานและไม่ต้านทานที่มีลักษณะที่ต่อเนื่อง และไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน โดยจากการกระจายตัวของประชากร F2 ของฝ้ายจากการผสมระหว่างพันธุ์ Pima S-79 ที่เป็นพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ Acala 44 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อ *Verticillium dahliae* บ่งชี้ว่าความต้านทานโรค *Verticillium wilt* เป็นลักษณะเชิงปริมาณด้วยหลายระดับของการข่ม (dominance) จากพ่อแม่ที่ต้านทาน การกระจายตัวเป็นแบบ transgressive segregation (Bolek *et al.*, 2005) ในเชื้อ *Setosphaeria turcica* ที่เป็นสาเหตุของโรค northern corn leaf blight พบว่า มีแหล่ง

ความต้านทานเชิงคุณภาพและปริมาณอยู่หลากหลายแต่ความต้านทานเชิงคุณภาพบ่อยครั้งจะไม่เสถียร ส่วนความต้านทานเชิงปริมาณมีการแสดงออกขึ้นกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพแต่จะไม่สูญเสียความต้านทานต่อ pathotypes ของ *S. turcica* ในแปลงปลูก (Welz and Geiger, 2000)

4. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกสายต้นต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

การที่คู่ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยา PCR แล้วให้แถบดีเอ็นเอที่มากกว่า 1 แถบ แม้ว่าไพรเมอร์จะเป็นไพรเมอร์ STS ก็ตาม อาจเนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ได้ใช้ส่วนอนุรักษ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ จากพืชอื่นและเลือกสายนิวคลีโอไทด์มาใช้ออกแบบไพรเมอร์ 1 สาย โดยเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชอื่นที่ไม่ใช่ยูคาลิปตัส ซึ่งในพืชแต่ละชนิดอาจมีการเลือกใช้รหัสพันธุกรรม (codon usage) ที่ต่างกัน ทำให้ไพรเมอร์ที่ได้มีความจำเพาะไม่มากนัก หรืออาจเนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ได้ไม่ดี ทำให้มีตำแหน่งเกาะของคู่ไพรเมอร์ได้หลายตำแหน่งไม่ตรงกับตำแหน่งของยีนที่ต้องการ นอกจากนี้ยังพบว่าภายในสายนิวคลีโอไทด์ของยีนหนึ่งอาจจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันอยู่ในสายนิวคลีโอไทด์นั้น ทำให้ไพรเมอร์เกาะได้หลายตำแหน่งในสายนิวคลีโอไทด์หนึ่ง ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอหลายขนาด โดยพบในการตัดแถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RPS2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล แล้วนำดีเอ็นเอนั้นไปทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวโดยใช้คู่ไพรเมอร์ RPS2 ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 240, 510 และ 750 คู่เบส (ภาพที่ 10) โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 510 คู่เบส จะพบเป็นแถบดีเอ็นเอหลักโดยมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดและพบในทุกสายต้น แต่แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและเป็นแถบดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ กลับพบว่ามีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 510 คู่เบส และแต่ละสายต้นก็มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอไม่เท่ากัน คู่ไพรเมอร์ RPS2 นี้ออกแบบจากยีน RPS2 ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคของ *Arabidopsis thaliana* โดยออกแบบจาก motifs ในส่วนของ nucleotide binding site domains คือ GGVGKTT และ GLPLAL โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ RPS2 นี้มีความเหมือนกันอย่างมากกับไพรเมอร์ 15912 และ 15913 ที่ออกแบบโดย Pan *et al.* (2000) ซึ่งเห็นได้ว่าถึงแม้ไพรเมอร์จะออกแบบจากลำดับอนุรักษ์บนสายนิวคลีโอไทด์แล้วก็มีโอกาสที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นลำดับอนุรักษ์นั้นไปคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นได้ นอกจากนั้นจะพบว่ายีนที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในการศึกษาครั้งนี้หลายยีนเป็นยีนที่อยู่เป็นกลุ่ม (gene family) โดยเฉพาะยีน

PR-protein และยีนต้านทานโรคของพืชทำให้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีโอกาสที่เพิ่มจำนวนโดย PCR แล้วได้แถบ ดีเอ็นเอหลายแถบ จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก coding region ของยีน β -1,3-glucanase เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR พบว่า ผลผลิตของ PCR ที่ได้ เมื่อนำไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มียีน β -1,3-glucanase อย่างน้อย 12 กลุ่ม ที่อยู่ในถั่วเหลือง โดยยีน β -1,3-glucanase อยู่เป็นกลุ่มใน linkage group จำนวน 5 กลุ่ม นอกจากนั้นยังพบว่ายีน β -1,3-glucanase ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันจะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Jin *et al.*, 1999) ในการวางตำแหน่ง defense response (DR) gene บนจีโนมของพริกไทย ศึกษาการวางตัวของ QTL ที่เกี่ยวกับความต้านทานพบว่า PR5, β -1,3-glucanase, chitinase และ Glutathione S-transferase เป็น multiple gene ที่มีหลายชุดในจีโนมของพริกไทย โดยยีนที่ encode ให้ β -1,3-glucanase รวมกลุ่มอยู่ใน linkage group ที่ Pl_a ในขณะที่ยีนที่ encode ให้ chitinase อยู่ในหลาย linkage groups (P1_b, P2_a และ P5) นอกจากนั้นยีน chitinase class III มีตำแหน่งร่วมกับ QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อ *Phytophthora capsici* บน linkage group ที่ P5 ส่วน PR4, PR2 และ PR10 loci วางอยู่ในบริเวณของ QTL ที่ให้ความต้านทานต่อ *P. capsici*, Potato virus Y และ Potyvirus E ตามลำดับ (Pflieger *et al.*, 2001)

ดัชนีความเหมือนที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก PR-protein ยีนต้านทานโรค และยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันพบว่า ในสายต้น SF94 และ SF98 มีความเหมือนกันสูง และระหว่างสายต้น SF01 และ SF18 มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันเลยจากไพรเมอร์ทั้งหมด แต่เมื่อนำมาพิจารณาพร้อมกับสายต้น SF06 และ SF36 จะเห็นว่าในระหว่างสายต้นต้านทานจะมีความเหมือนกันค่อนข้างน้อย ต่างจากในกลุ่มสายต้นอ่อนแอจากทั้งหมด 6 สายต้น มีถึง 5 สายต้น คือ สายต้น SF03, SF07, SF14, SF16 และ SF70 ที่มีความเหมือนกันสูง ยกเว้นสายต้น SF86 ที่เหมือนกับสายต้นอื่นๆ น้อย นอกจากนั้นในสายต้นต้านทานจะพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายกว่าในกลุ่มสายต้นอ่อนแอ ในกลุ่มสายต้นอ่อนแอจะมีลักษณะของใบในต้นกล้าเป็นรูปไข่หรือรูปหอกกว้างพอโตขึ้นจะเป็นรูปรียาวหรือรูปหอก ซึ่งคล้ายกับลักษณะของยูคาลิปตัสคามาลดูลเดนซิสต่างจากกลุ่มสายต้นต้านทานที่มีลักษณะของใบที่หลากหลายกว่าโดยเฉพาะในสายต้น SF36 จะมีลักษณะใบของต้นโตคล้ายรูปหอก มีขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ขอบใบมีลักษณะเป็นเส้นสีเขียวอ่อนที่ชัดเจน เส้นใบจะอยู่เกือบชิดขอบใบ ก้านใบจะยาวเมื่อเทียบกับสายต้นอ่อนแอ ในสายต้น SF06 จะมีลักษณะใบเป็นรูปหอกที่บริเวณฐานใบจะกว้างซึ่งจะคล้ายกับใบของยูคาลิปตัสยูโรฟิลล่า (*E. urophylla*) จากทั้งหมดจะเห็นว่าสายต้นอ่อนแอจะมีลักษณะคล้ายยูคาลิปตัสคามาลดูลเดนซิสแต่ในสายต้นต้านทานจะมีลักษณะที่ไม่เหมือน

ยูคาลิปตัสคามาลดูลินซิส ซึ่งยูคาลิปตัสคามาลดูลินซิสจะมีความอ่อนแอต่อเชื้อรา *C. eucalypti* ก่อนข้างมากกว่าสปีชีส์อื่นๆ ของยูคาลิปตัส

การแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจลของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในการทดลองนี้จะให้แถบดีเอ็นเอที่คล้ายกับในอะกาโรสเจล แต่ในโพลีอะครีลาไมด์เจลจะพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากว่า เนื่องจากโพลีอะครีลาไมด์เจลสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ละเอียดกว่าแม้มีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และสามารถตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่า ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการหาแถบดีเอ็นเอที่ต่างระหว่างตัวอย่างได้มากขึ้น

เทคนิค resistance gene-analog polymorphism (RGAP) ถูกพัฒนาโดย Chen *et al.* (1998) เป็นการหาโพลีมอร์ฟิซึมโดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนอนุรักษ์ (conserved domains) ของยีนต้านทานโรคของพืชแล้วนำไพรเมอร์ที่ได้นั้นไปทำปฏิกิริยา PCR และทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความละเอียดสูง (high-resolution electrophoresis) หรือในโพลีอะครีลาไมด์เจลนั่นเองและตรวจสอบผลด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง เทคนิคนี้ยังสามารถจะให้เครื่องหมาย RGA ที่เป็นข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการจดจำระหว่างตัวเชื้อสาเหตุโรคและพืชอาศัย และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับ Linden *et al.* (2004) พบว่า NBS profiling สามารถที่จะใช้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนต้านทานโรคของพืชและ R-gene cluster สำหรับทำ genomic mapping, positional cloning นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งของ alleles ใหม่และแหล่งของยีนต้านทานใน germplasm ในการศึกษาครั้งนี้มีคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต้านทานโรคของพืชจำนวน 4 คู่ คือ คู่ไพรเมอร์ RPS2, Pib, Xa1 และ Xa21 และคู่ไพรเมอร์ที่ได้จากการสลับคู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer ของคู่ไพรเมอร์ RPS2, Pib และ Xa1 อีกจำนวน 6 คู่ การที่สามารถสลับคู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer เนื่องจากยีน RPS2, Pib และ Xa1 เป็นยีนต้านทานโรคของพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยยีนเหล่านี้จะมีลำดับอนุรักษ์หลายช่วงซึ่งทั้ง 3 ยีน ออกแบบมาจากช่วงที่ต่างกัน ในส่วนนี้จึงเป็นข้อดีของเทคนิค RGA ที่สามารถเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์ได้มากขึ้น และนอกจากนั้นยังพบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต้านทานโรคของพืชนี้ยังให้แถบดีเอ็นเอที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายต้นต้านทานและอ่อนแอถึง 3 คู่ ผลผลิตจากการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์เหล่านี้จะเรียกว่า resistance-gene analog (RGA) โดยแถบดีเอ็นเอที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายต้นต้านทานและอ่อนแอนี้คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2, Ce3 และ Ce4 แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 พบว่าไม่มีความเหมือนกับยีนต้านทานโรคและ RGA ของพืชอื่นๆ ใน

ฐานข้อมูล GenBank ซึ่งคล้ายกับในการศึกษาของ Zhang *et al.* (2004) ที่ได้ใช้เทคนิค RGA เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงอย่างมากกับยีนต้านทาน *Bdv2* (*barley yellow dwarf virus resistance gene*) พบว่า จากคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 187 คู่ มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอ RGA 2 ชนิด ที่ใช้ระบุได้ และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RGA ไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนต้านทานโรคของพืชในฐานข้อมูล ซึ่งเขาได้อธิบายไว้ว่าอาจเนื่องมาจากใช้ชุดตรวจสอบผลโดยการเชื่อมซิลเวอร์ในเตรทของบริษัทที่ไม่มีความไวในการตรวจสอบที่เพียงพอทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มากหรืออาจเป็นเพราะคู่ไพรเมอร์ RGA ที่ใช้มีจำนวนน้อยและอาจไม่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วให้ชิ้นส่วนที่ต้องการ เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้เองก็พบว่ามีปัญหาในการตรวจสอบผลในโพลีอะครีลาไมด์เจลเช่นกัน เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างกลุ่มต้านทานและอ่อนแอที่ไม่ชัดเจน ในบางครั้งจะพบแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจางมากทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ได้ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค RGA ยังคงมีประสิทธิภาพและสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนต้านทานโรคของพืช โดย Yan *et al.* (2003) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Xwgp-17 และ Xwgp-18 ที่ co-segregate กับ *Yr-5* ซึ่งเป็นยีนที่ให้ความต้านทานเชื้อรา *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ที่เป็นสาเหตุโรค stripe rust ในทุก race พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองมีความเหมือนกันถึง 98 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับยีนต้านทานโรคของ *Aegilops ventricosa* และมีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนต้านทานโรค, RGA และ expressed sequence tags (EST) จากข้าวสาลีและพืชอื่นๆ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shi *et al.* (2001) ที่ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ระบุยีน *Yr-9* ด้วยเทคนิค RGA โดยยีน *Yr-9* เป็นยีนที่ให้ความต้านทานต่อ *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* ที่เป็นสาเหตุของโรค stripe rust ในพันธุ์ข้าวสาลี ผลการศึกษาพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RGA 16 ชนิด ได้รับการยืนยันโดยใช้วิธี cosegregation analysis โดยมีเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 ชนิด ที่ coincident กับ *Yr-9* และมีเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ 12 ชนิด ที่เชื่อมโยงอย่างมากกับ *Yr-9* มีค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 1 to 18 cM นอกจากนั้นในหลายการทดลองก็สามารถที่จะแยก RGA ได้ ดังเช่นในการทดลองของ Cordero and Skinner (2002) สามารถใช้ degenerate primers ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ในบริเวณ nucleotide binding site (NBS) ของยีนต้านทานโรค ทำการแยก RGA จาก alfalfa (*Medicago sativa* L.) นอกจากนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RGA ที่ได้พบว่ามีค่าความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ NBS ของพืชชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับ Noir *et al.* (2001) สามารถแยก RGA ที่มีส่วนของ NBS ด้วย degenerate primers จาก *Coffea arabica* และ *C. canephora* ได้ถึง 9 รูปแบบ ที่ต่างกัน

การศึกษา mutational analysis ใน *Arabidopsis* พบว่า *dnd* mutants ที่มียีน *dnd1* (defense, no death) ซึ่ง encode ให้ cyclic nucleotide-gated ion channel ที่ผิดปกติ จะมี salicylic acid อยู่ในระดับที่สูงแต่จะสูญเสียการตอบสนองแบบ hypersensitive response ต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* ที่ไม่รุนแรง แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะขาดการตอบสนองแบบ hypersensitive response ไป แต่ *dnd* mutants สามารถที่จะแสดงออกของ PR gene ในระดับสูงและสามารถจำกัดการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคได้ (Yu *et al.*, 1998; Clough *et al.*, 2000) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานนี้ยังไม่แน่ชัด และไม่ทราบบทบาทของ cyclic nucleotide-gated ion channel ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานอย่างไร ถึงแม้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ช่วง ที่เหมือนกับ cyclic nucleotide-regulated ion channel ของ *Arabidopsis thaliana* โดยมีความยาวช่วงละ 114 และ 99 คู่เบส สาเหตุที่พบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น้อยและเป็นช่วงสั้นๆ อาจเนื่องมาจากขนาดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 สั้นเกินไป

เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 (แถบดีเอ็นเอขนาด 340 คู่เบส ในกลุ่มอ่อนแอ) จะคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ในกลุ่มต้านทานยกล้วนสายต้น SF36 ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวแต่พบแถบดีเอ็นเอหลักขนาด 500 คู่เบส และยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากสายต้นอื่นๆ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 กับแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ของสายต้นต้านทานยกล้วนสายต้น SF36 เป็นแถบดีเอ็นเอเดียวกันแต่มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์จึงทำให้มีขนาดต่างกัน ส่วนสายต้น SF36 ที่พบแถบดีเอ็นเอหลักที่มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างออกไปทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีความห่างทางพันธุกรรมจากสายต้นอื่นๆ ค่อนข้างมากทำให้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงบางยีนต่างออกไป โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ก็เป็น RGA

ไพรมอร์ทั้ง 5 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR จะให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบและมีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอรวมอยู่ด้วย ซึ่งถ้าเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นแถบดีเอ็นเอหลัก จะตรวจสอบในเจลได้ง่ายกว่าแถบดีเอ็นเอที่มีความสว่างของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่า โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นแถบดีเอ็นเอหลักประกอบด้วย เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4, Ce5, และ Ce6 ส่วนในเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2 และ Ce3 เป็นแถบดีเอ็นเอรอง โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 และ Ce2 พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจล ซึ่งแสดงว่ามีปริมาณของดีเอ็นเอน้อย นอกจากนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 ยังทำซ้ำได้ค่อนข้างลำบาก เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้เมื่อทำปฏิกิริยา PCR บางครั้งอาจจะสามารถ

เพิ่มปริมาณได้แต่บางครั้งจะไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ซึ่งอาจเป็นผลมาจากไฟรเมอร์ไม่มีความเฉพาะเจาะจงพอ จึงทำให้ใช้ตรวจสอบได้ยากกว่าในเครื่องหมายดีเอ็นเออื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 6 ชนิด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลายต้นยูคาลิปตัสมากที่สุดคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 ที่ใช้ตรวจสอบสายต้นอ่อนแอในอะกาโรสเจล เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสซึ่งทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่าในโพลีอะครีลาไมด์เจล แอบดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นแอบดีเอ็นเอหลักที่มีปริมาณดีเอ็นเอมาก ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอนโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 พบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มสายต้นอ่อนแอและด้านทาน (ยกรุ่น SF36) เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 นี้จึงน่าจะใช้ในการคัดเลือกลายต้นด้านทานและอ่อนแอของยูคาลิปตัสได้ดีที่สุด ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่น่าจะมีประสิทธิภาพรองลงมาคือเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 ถึงแม้จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นแอบดีเอ็นเอรองและต้องตรวจสอบในโพลีอะครีลาไมด์เจล แต่สามารถที่ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce5 ไปพร้อมกันได้ด้วยเนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 และ Ce5 มาจากคู่ไฟรเมอร์ PR5 โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 พบในสายต้นด้านทานและเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce5 พบในสายต้นอ่อนแอ จึงเป็นการยืนยันทั้งสายต้นด้านทานและอ่อนแอไปพร้อมกัน เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce6 น่าจะมีประสิทธิภาพที่ดีเช่นกันเนื่องจากสามารถตรวจสอบได้บนอะกาโรสเจล และแอบดีเอ็นเอยังเป็นแอบดีเอ็นเอหลัก แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พบในสายต้นอ่อนแอเท่านั้น ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3 ถึงแม้จะสามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลแต่แอบดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายเป็นแอบดีเอ็นเอรองที่มีความเข้มของแอบดีเอ็นเอไม่มาก ทำให้อาจเห็นได้ไม่ชัดเจน และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 น่าจะมีประสิทธิภาพน้อยที่สุด

แนวทางในการคัดเลือกลายต้นยูคาลิปตัสที่ด้านทานต่อเชื้อรา *C. eucalypti* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลายต้นน่าจะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2, Ce3, Ce4, Ce5 และ Ce6 ร่วมกันเพื่อให้ผลที่ดีที่สุด แต่ถ้าต้องการคัดเลือกลายต้นด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนน้อยที่สุดน่าจะพิจารณาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 เพียงชนิดเดียวหรืออาจพิจารณาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 กับ Ce1 และ Ce5 แต่อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความถูกต้องที่มากขึ้นของเครื่องหมายดีเอ็นเออาจต้องมีการตรวจสอบการกระจายตัวและการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากรที่สร้างจากสายต้นด้านทานและอ่อนแอหลายๆ ประชากร โดยเฉพาะระหว่างในสายต้น SF06 ที่ด้านทานต่อเชื้อรามากที่สุด กับสายต้น SF07 ที่อ่อนแอต่อเชื้อรามากที่สุด

สรุป

1. การแยกเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* สามารถแยกได้ทั้งจากวิธี tissue transplanting และแยกจากกลุ่มของโคนิเดียโดยตรงแต่ในวิธีหลังจะมีความสะดวกและง่ายกว่า จากวิธีการทั้งสองนี้สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ที่แตกต่างกัน ส่วนขนาดและรูปร่างของโคนิเดียของเชื้อราในแต่ละไอโซเลทจะไม่มี ความแตกต่างกัน

2. การทดสอบความต้านทานโรคของสายต้นยูคาลิปตัสโดยการปลูกเชื้อในเรือนเพาะชำ และห้องปฏิบัติการพบว่า การปลูกเชื้อด้วยเทคนิค detached leaf สามารถแยกระดับความต้านทานของแต่ละสายต้นยูคาลิปตัสได้ดีกว่าวิธีการปลูกเชื้อโดยตรงในต้นกล้า จากผลการทดสอบทั้งสองวิธีพบว่า มีสายต้นต้านทานจำนวน 6 สายต้น คือ SF01, SF06, SF18, SF36, SF94 และ SF98 และสายต้นอ่อนแอจำนวน 6 สายต้น คือ SF03, SF07, SF14, SF16, SF70 และ SF86

3. ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาสามารถออกแบบได้ทั้งหมด 35 คู่ ประกอบด้วย คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจาก PR-protein จำนวน 12 คู่ ยืนต้านทานโรคของพืชจำนวน 4 คู่ และยืนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันจำนวน 19 คู่ แต่ในคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยืนต้านทานโรค 3 คู่ สามารถนำมาสลับคู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer ระหว่างคู่ไพรเมอร์ทั้งสาม ทำให้มีไพรเมอร์ที่ใช้คัดเลือกทั้งหมด 41 คู่ จากคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 41 คู่ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้ 36 คู่ และสามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลได้ 33 คู่ ส่วนในโพลีอะครีลาไมด์เจลสามารถตรวจสอบได้ทั้งหมด 36 คู่

4. Dendrogram ที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ที่ระดับความเหมือน 35 เปอร์เซ็นต์ สายต้นต้านทานทั้งหมดจะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และสายต้นอ่อนแอทั้งหมดจะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มตามปฏิกิริยาความต้านทานโรคในการทดสอบความต้านทานโรคโดยปลูกเชื้อ

5. คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกกลุ่มระหว่างสายต้นต้านทานและอ่อนแอมีทั้งหมด 5 คู่ คือ PR5, RPS2, Pib, Xa1 และ ATN โดยพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกกลุ่มได้จำนวน 6 ชนิด ซึ่งได้จากคู่ไพรเมอร์ PR5 จำนวน 2 ชนิด แบ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ระบุสายต้นต้านทาน

จำนวน 3 ชนิด คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2 และ Ce3 และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ระบุสายต้นอ่อนแอจำนวน 3 ชนิด คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4, Ce5 และ Ce6 ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 และ Ce2 ตรวจสอบได้บนโพลีอะคริลาไมด์เจล ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce3, Ce4, Ce5 และ Ce6 ตรวจสอบได้บนอะกาโรสเจล

6. เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1, Ce2, Ce3 และ Ce4 ได้ทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความเหมือนกับยีนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันในฐานข้อมูล GenBank เลย มีเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce2 ที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ encode ให้ cyclic nucleotide-regulated ion channel ใน *Arabidopsis thaliana* อยู่ 2 ช่วงและเป็นช่วงสั้นๆ

7. เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 6 ชนิด สามารถนำมาช่วยในการคัดเลือกสายต้นยูคาลิปตัส ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ได้ ก่อนนำไปปลูกในสภาพแปลง โดยแนวทางการคัดเลือกอาจพิจารณาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 6 ชนิด ร่วมกันเพื่อความถูกต้องมากที่สุด หรือถ้าต้องการคัดเลือกโดยใช้จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอให้น้อยที่สุดอาจพิจารณาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 เพียงชนิดเดียว หรืออาจพิจารณาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce4 ร่วมกับ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Ce1 และ Ce5

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กมลศิริ เพชรบูรณ์. 2546. การศึกษาโครงสร้างประชากรของเชื้อรา *Phytophthora infestans* จากมะเขือเทศและมันฝรั่งในจังหวัดตากและจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมป่าไม้. ม.ป.ป. ผลกระทบของการปลูกไม้ยูคาลิปตัส และมันสำปะหลังต่อดิน ระบบนิเวศ และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- กรมป่าไม้. 2533. ยูคาลิปตัสพันธุ์ไม้เศรษฐกิจที่มีค่าทั้งปัจจุบันและอนาคต. พิมพ์ครั้งที่ 1. ฝ่ายส่งเสริมและเผยแพร่ กองอนุรักษ์ต้นน้ำ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- กระทรวงพาณิชย์. 2545. อุตสาหกรรมเยื่อ. ข้อมูลพื้นฐานอุตสาหกรรม. แหล่งที่มา: <http://www.dephtai.go.th/scripts/internetcgi/formsearchkey1.pl>, 14 มิถุนายน 2547.
- กฤษณา พงษ์พานิช. 2542. โรคของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย และแนวทางในการลดผลกระทบ, น. 101-106. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4. โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน พัทยา, ชลบุรี.
- เดชา ดวงนามล. 2547. การคัดเลือกลายต้นยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสที่ต้านทานต่อโรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* โดยวิธี Rapid Screening. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทัศนีย์ รัตวานิช, อรรณพ อภิชาติบุตร และเพ็ญศรี นามประเสริฐ. 2525. การผลิตเยื่อซัลเฟตจากไม้ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส. กองวิจัยผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 11 น.

สุชาติ ไทยเพชร. 2528. คุณสมบัติของไม้อยูคาลิปตัส คามาลดูละนซิส, น. 222-224. ใน รายงานการ
 สัมมนาไม้อยูคาลิปตัส คามาลดูละนซิส, 30 ตุลาคม – 1 พฤศจิกายน 2527. กรมป่าไม้,
 กรุงเทพฯ.

อรุณ ขมชาญ และวินัย ปัญญาธัญญะ. 2528. ไม้อยูคาลิปตัสกับการผลิตถ่าน, น. 249-256. ใน
 รายงานการสัมมนาไม้อยูคาลิปตัส คามาลดูละนซิส, 30 ตุลาคม – 1 พฤศจิกายน 2527. กรม
 ป่าไม้, กรุงเทพฯ.

Abu-El Samen, F.M., G.A. Secor, and N.C. Gudmestad. 2003a. Genetic variation among asexual
 progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. **Plant Pathol.**
 52: 314-325.

_____, _____, and _____. 2003b. Variability in virulence among asexual progenies of
Phytophthora infestans. **Phytopathology** 93(3): 293-304.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias*
asillaris leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.

Arabi, M.I.E., and M. Jawhar. 2004. Identification of *Cochliobolus sativus* (Spot Blotch) isolates
 expressing differential virulence on barley genotypes in Syria. **J. Phytopathology** 152:
 461–464.

Bach, M., J.P. Schnitzler, and H.U. Seitz. 1993. Elicitor-induced changes in Ca^{2+} influx, K^{+}
 efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. 1993.
Plant Physiol. 103: 407-412.

Bigirimana, J., and M. Hofte. 2001. Bean antracnose: Inoculation methods and influence of plant
 stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **J. Phytopathology** 149: 403-408.

- Boland, D.J., M.I.H. Brooker, G.M. Chippendale, N. Hall, B.P.M. Hyland, R.D. Johnston, D.A. Kleining and J.D. Turner. 1997. **Forest Tree of Austraria**. 4 th ed. Nelson and CSIRO, Austraria.
- Bolek, Y., A.A. Bell, K.M. El-Zik, P.M. Thaxton, and C.W. Magill. 2005. Reaction of cotton cultivars and an F₂ population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahliae*. **J. Phytopathology** 153: 269-273.
- Bolwell, G.P., D.R. Davies, C. Gerrish, C-K. Auh, and T. M. Murphy. 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. **Plant Physiol.** 116: 1379–1385.
- Bravo, J.M., S. Campo, I. Murillo, M. Coca, and B.S. Segundo. 2003. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. **Plant Mol. Biol.** 52: 745-759.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones. 2000. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Courier Companies, Inc., United States of America.
- Campbell, M.A., and R.W. Medd. 2003. Leaf, floret and seed infection of wheat by *Pyrenophora semeniperda*. **Plant Pathol.** 52: 437–447.
- Caruso, C., G. Chilosi, C. Caporale, L. Leonardi, L. Bertini, P. Magro, and V. Buonocore. 1999. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Sci.** 140: 107–120.
- Chen, X.M., R.F. Line, and H. Leung. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. **Theor. Appl. Genet.** 97: 345-355.

- Ciesla W.M., M. Diekmann, C.A.J. Putter. 1996. **FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm, No. 17, *Eucalyptus* spp.** FAO-IPGRI, Rome. 62 p.
- Clough, S.J., K.A. Fengler, I-c. Yu, B. Lippok, Jr.R.K. Smith, and A.F. Bent. 2000. The *Arabidopsis dnd1* (defense, no death) gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 9323-9328.
- Cordero, J.C. and D.Z. Skinner. 2002. Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1283-1289.
- Dickinson, M. 2003. **Molecular plant pathology.** BIOS scientific publishers, London.
- FAO. 1979. ***Eucalyptus* for planting.** FAO Forestry Series 11. FAO, Rome. 677 p.
- Ferreira FA, SF. Silveira, AC. Alfenas, AM. Demuner. 1998. Mancha-de-criptoriopsis em eucalipto no Brasil (*Eucalyptus* leaf spot in Brazil caused by *Cryptosporiopsis eucalypti*). **Fitopatologia Brasileira** 23: 414.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9: 275-296.
- Gadgil, P.D. and M. Dick. 1999. Fungi sivicolae Novazealadiae: 2. **New Zealand J. of For. Sci.** 29: 440-458.
- Glazebrook, J., E.E. Rogers, and F.M. Ausubel. 1997. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. **Annu. Rev. Genet.** 31: 547-569.
- Goyal, B.K., P.R. Verma, D.T. Spurr, and M.S. Reddy. 1996. *Albugo candida* staghead formation in *Brassica juncea* in relation to plant age, inoculation sites, and incubation conditions. **Plant Pathol.** 45: 787-794.

- Graham, M.Y., J. Weidner, K. Wheeler, M.J. Pelow, and T.L. Graham. 2003. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.** 63: 141–149.
- Greenberg, J.T., and B.A. Vinatzer. 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Curr. Opin. Microbiol.** 6: 20-28.
- Gryzenhout, M., B.E. Eisenberg, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield. 2003. Pathogenicity of *Cryphonectria eucalypti* to *Eucalyptus* clones in South Africa. **Forest Ecol. and Manage.** 176: 427-437.
- Hammond-Kosack, K.E., and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 575-607.
- Heerden, S.W. and M.J. Wingfield. 2002. Effect of environment on the response of *Eucalyptus* clones to inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **For. Path.** 32: 395-402.
- Heo, W.D., S.H. Lee, M.C. Kim, J.C. Kim, W.S. Chung, H.J. Chun, K.J. Lee, C.Y. Park, H.C. Park, J.Y. Choi, and M.J. Cho. 1999. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 766-771.
- Jin, W., H.T. Horner, R.G. Palmer, and R.C. Shoemaker. 1999. Analysis and Mapping of gene families encoding β -1,3-glucanase of soybean. **Genet.** 153: 445-452.
- Keri, M., C.G.J. van den Berg, P.B.E. McVetty, and S.R. Rimmer. 1997. Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica juncea*. **Phytopathology** 87(6): 594-598.

- Kolmer, J.A., and J.Q. Liu. 2001. Simple inheritance of partial resistance to leaf rust in two wheat cultivars. **Plant Pathol.** 50: 546-551.
- Kowalski, T., E. Halmschlager, and K. Schrader. 1998. *Cryptosporiopsis melanigena* sp. nov., a root-inhabiting fungus of *Quercus robur* and *Q. petraea*. **Mycol. Res.** 102(3): 347-354.
- Krishnaveni, S., S. Muthukrishnan, G.H. Liang, G. Wilde, and A. Manickam. 1999. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. **Plant Sci.** 144: 9-16.
- Linden, C.G.V.D., D.C.A.E. Wouters, V. Mihalka, E.Z. Kochieva, M.J.M. Smulders, and B. Vosman. 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theor. Appl. Genet.** 109: 384-393.
- Liu, Y., J. Luo, C. Xu, F. Ren, C. Peng, G. Wu, and J. Zhao. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. **Plant Physiol.** 122: 1015-1024.
- 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.
- Mano, Y., B. E. Sayed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka, and T. Komatsuda. 1999. Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.** 98: 937-946.
- Martin, G.B., A.J. Bogdanove, and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance protein. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54: 23-61.

- McDowell, J.M., and B.J. Woffenden. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **Trends in Biotechnology** 21: 178-183.
- Muranty, H., J. Jahier, A.M. Tanguy, A.J. Worland, and C. Law. 2002. Inheritance of resistance of wheat to eyespot at the adult stage. **Plant Breeding** 121: 536-538.
- Naik, S., K.S. Gill, V.S. Prakasa Rao, V.S. Gupta, S.A. Tamhankar, S. Pujar, B.S. Gill, and P.K. Ranjekar. 1998. Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 97: 535-540.
- Niderman, T., I. Genetet, T. Bruyère, R. Gees, A. Stintzi, M. Legrand, B. Fritig, and E. Mosinger. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiol.** 108: 17-27.
- Nielsen, K.K., J.E. Nielsen, S.M. Madrid, and J.D. Mikkelsen. 1997. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. **Plant Physiol.** 113: 83-91.
- Noir, S., M.C. Combes, F. Anthony, and P. Lashermes. 2001. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Mol. Genet. Genomics** 265: 654-662.
- 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.
- _____, M.J. Dudzinski, K. Pongpanich, Z.Q. Yuan, P.Q. Thu, and N.T. Nguyen. 2002. Cryptosporiosis leaf spot and shoot blight of eucalypts. **Australasian Plant Pathol.** 31: 337-344.

- _____ 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.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor, and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. **Science** 245: 1434-1435.
- Pan, Q., J. Wendel, and R. Fluhr. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **J. Mol. Evol.** 50: 203–213.
- Pflieger, S., A. Palloix, C. Caranta, A. Blattes, and V. Lefebvre. 2001. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. **Theor. Appl. Genet.** 103: 920-929.
- Polle, A., T. Otter, and F. Seifert. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Physiol.** 106: 53-60.
- Pellinen, R., M.S. Korhonen, A.A. Tauriainen, E.T. Palva, and J. Kangasja. 2002. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. **Plant Physiol.** 130: 549-560.
- Pousajja, R. 1993. **Eucalypt plantation in Thailand. Regional Expert Consultation on Eucalyptus**, 4–8 October 1993, Bangkok. Bangkok, FAO/RAPA.
- Radwan, O., M.F. Bouzidi, P. Nicolas, and S. Mouzeyar. 2004. Development of PCR markers for the P15/P18 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. **Theor. Appl. Genet.** 109: 176–185.

- Rohlf, H.J. 1993. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 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.
- Sasabe, M., K. Takeuchi, S. Kamoun, Y. Ichinose, F. Govers, K. Toyoda, T. Shiraishi, and T. Yamada. 2000. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **Eur. J. Biochem.** 267: 5005-5013.
- Segura, A., M. Moreno, A. Molina, and F. Garcia-Olmedo. 1998. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS Lett.** 435: 159-162.
- _____, A., M. Moreno, and F. García-Olmedo. 1993. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. **FEBS Lett.** 332: 243-246.
- Shi, Z.X., X.M. Chen, R.F. Line, H. Leung, and C.R. Wellings. 2001. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust. **Genome** 44(4): 509-516.
- Skiba, B., R. Ford, and E.C.K. Pang. 2003. Amplification and detection of polymorphic sequence-tagged sites in *Lathyrus sativus*. **Plant Mol. Biol. Reporter** 21: 391-404.

- Smith, P.H., R.M.D. Koebner, and L.A. Boyd. 2002. The development of a STS marker linked to a yellow rust resistance derived from the wheat cultivar Moro. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1278–1282.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.
- Sutton, B.C. 1980. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, U.K.
- Terras, F.R., H.M. Schoofs, M.F. De Bolle, F. Van Leuven, S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P. Cammue, and W.F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J. Biol. Chem.** 267: 15301-15309.
- Toojinda, T., L.H. Broers, X.M. Chen, P.M. Hayes, A. Kleinhofs, J. Korte, D. Kudrna, H. Leung, R.F. Line, W. Powell, L. Ramsay, H. Vivar, and R. Waugh. 2000. Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). **Theor. Appl. Genet.** 101: 580–589.
- Torres-Schumann, S., J.A. Godoy, and J.A. Pintor-Toro. 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. **Plant Mol. Biol.** 18: 749-57.
- Trudel, J., J. Grenier, C. Potvin, and A. Asselin. 1998. Several thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans. **Plant Physiol.** 118: 1431–1438.
- Vannini, A., C. Caruso, L. Leonardi, E. Rugini, E. Chiarot, C. Caporale, and V. Buonocore. 1999. Antifungal properties of chitinases from *Castanea sativa* against hypovirulent and virulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.** 55: 29-35.

- Van Loon, L.C. and E.A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.** 55: 85-97.
- Verkley G.J.M. 1999. A monograph of genus *Pezicula* and its anamorphs. **Studies in Mycol.** 44: 1-180.
- _____, J.D. Zijlstra, R.C. Summerbell, and F. Berendse. 2003. Phylogeny and taxonomy of root-inhabiting *Cryptosporiopsis* species, and *C. rhizophila* sp. nov., a fungus inhabiting roots of several Ericaceae. **Mycol. Res.** 107(6): 689–698.
- Visker, M.H.P.W., L.C.P. Keizer, D.J. Budding, L.C. Van Loon, L.T. Colon, and P.C. Struik. 2003. Leaf position prevails over plant age and leaf age in reflecting resistance to late blight in potato. **Phytopathology** 93(6): 666-674.
- Welz, H.G., and H.H. Geiger. 2000. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. **Plant Breeding** 119: 1-14.
- Whetten, R., and R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. **Plant Cell** 7: 1001-1013.
- Yan, G.P., X.M. Chen, R.F. Line, and C.R. Wellings. 2003. Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the Yr5 gene for resistance to wheat stripe rust. **Theor. Appl. Genet.** 106: 636-643.
- Yu, I-c., J. Paker and A.F. Bent. 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95: 7819-7824.

Zhang, Z., J. Xu, Q. Xu, P. Larkin, and Z. Xin. 2004. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. **Theor. Appl. Genet.** 109: 433-439.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti*

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Treatment	8	28.95	3.62	16.23**	0.0001
Error	27	6.02	0.22		
Total	35	34.97			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ** แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 9.11 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวโคนเดี่ยวของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ทั้งหมด 4 ไอโซเลท

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Treatment	3	7.59	2.53	0.84 ^{ns}	0.4738
Error	196	591.13	3.02		
Total	199	598.72			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ns แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 12.88 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างโคนิเดียของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ทั้งหมด 4 ไอโซเลต

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Treatment	3	6.59	2.20	2.35 ^{ns}	0.0737
Error	196	183.09	0.93		
Total	199	189.68			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ns แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 16.97 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 8 สายต้น
หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน ในการทดลอง intact seedling inoculation

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Isolate	2	53.02	26.51	17.6**	0.0001
Clone	7	51.92	7.42	4.93**	0.0003
Isolate x Clone	14	61.23	4.37	2.9*	0.003
Error	48	72.28	1.51		
Total	71	238.45			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ** แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 64.12 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 6 สายต้น
หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน ในการทดลอง detached leaf inoculation 1

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Isolate	2	7206.02	3603.01	15.13**	0.0001
Clone	5	50417.65	10083.53	42.35**	0.0001
Isolate x Clone	10	13796.41	1379.64	5.79**	0.0001
Error	36	8572.53	238.13		
Total	53	79992.61			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ** แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 42.68 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของยูคาลิปตัส 8 สายต้น
หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน ในการทดลอง detached leaf inoculation 2

Source	df	SS	MS	F value	P > F
Treatment	10	43738.75	4373.87	34.98**	0.0001
Error	33	4126.79	125.05		
Total	43	47865.53			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ** แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
C.V. = 32.72 เปอร์เซ็นต์