ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* สาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ในยูคาลิปตัส

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

สุพจน์ เหลืองประพฤทธิ์ [1,2,3] และ จินตนา อันอาตม์งาม [1,4]
Supoch Lueangpraplut [1,2,3] and Jintana Unartngam [1,4]

Abstract

Cryptosporiopsis eucalypti has been reported as a causal agent of leaf spot and leaf blight disease of eucalyptus in Thailand. However, at present, *C. eucalypti* was revised to a new genus as *Psedoplagiostoma eucalypti*. The aim of this study was to use the AFLP technique to determine genetic diversity of *P. eucalypti*. The fungal isolates were surveyed and collected from eucalyptus 's plantation from ten provinces. The DNA fingerprint analysis using AFLP technique was conducted with the 4 primer pair combinations. The results showed that there were 77 polymorphic bands and 178 total bands. All polymorphic bands were analyzed using NTSYS program.The similarity coefficient was obtained by using Dice's method. The dendrogram was then generated by UPGMA method. The results showed that genetic diversity was found among fungal isolates divided into 10 groups with cophenetic correlation of 0.955. The DNA fingerprint analysis indicated that no relationship was observed between the AFLP groups and collected sites. Moreover, that more than one strain of *P. eucalypti* could be found in each province. Possibly spreading among planting areas through asexual propagation.

Keywords : Eucalyptus, *Cryptosporiopsis*, *Pseudoplagiostoma*, leaf spots, leaf blight

---

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand
[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900,Thailand
[3]บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด 99 ม.6 ถ.แสงชูโต ต.วังศาลา อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี 71130
The Siam Forestry Co., Ltd. 99 Moo 6, Seang Xuto Road, Wangsala, Tha Muang, Kanchanaburi, 71130, Thailand
[4]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

รับเรื่อง : มีนาคม 2554

Corresponding author : agrjne@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคใบจุด ใบไหม้ของยูคาลิปตัสในประเทศไทยเคยมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Cryptosporiopsis eucalypti* แต่ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกใหม่เป็นเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. eucalypti* ด้วยเทคนิค AFLP โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราจากแหล่งปลูกยูคาลิปตัสใน 10 จังหวัด การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ 4 คู่ไพร์เมอร์ พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบจากทั้งหมด 178 แถบ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธีของ Dice และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่าเชื้อรามีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 10 กลุ่ม และมีค่า cophenetic correlation (r) = 0.955 จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่เก็บรวบรวมเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าในแต่ละจังหวัดมีเชื้อรา *P. eucalypti* มากกว่า 1 สายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการแพร่ระบาดระหว่างพื้นที่เพาะปลูกและมีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศเกิดขึ้น

คำนำ

ยูคาลิปตัส เป็นไม้โตเร็วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันภายในประเทศมีความต้องการใช้ไม้ยูคาลิปตัสประมาณ 9 ล้านตันต่อปี แต่ในขณะเดียวกันสามารถผลิตไม้ยูคาลิปตัสได้เพียง 7 ล้านตันต่อปี จึงไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นภาครัฐและเอกชนจึงได้ส่งเสริมให้ปลูกยูคาลิปตัสกันอย่างกว้างขวางมากขึ้น เพื่อลดการนำเข้าไม้จากต่างประเทศ ในขณะเดียวกันก็พบว่า โรคของไม้ยูคาลิปตัสกลายเป็นปัญหาและอุปสรรคในการปลูกสร้างสวนไม้ ซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ โรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในสวนไม้ได้แก่ โรคใบจุด ใบไหม้ปลายกิ่งและยอดแห้ง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* (Pongpanich, 1999) การควบคุมโดยการใช้สารเคมีได้ผลในระยะกล้าไม้เท่านั้น แต่ในแปลงสวนไม้ขนาดใหญ่การใช้สารเคมีกระทำได้ค่อนข้างยาก และไม่คุ้มค่ากับการลงทุน การใช้สายพันธุ์ต้านทานจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุด

เชื้อรา *C. eucalypti* จัดอยู่ใน Order Phialidales แต่ปัจจุบันนี้มีรายงานการศึกษาของ Cheewangkoon *et al*. (2010) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. eucalypti* ที่เก็บจาก 10 ประเทศในเขตอบอุ่นและเขตร้อน วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 28S ribosomal DNA, internal transcribed spacer (ITS) และ beta-tubulin gene พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในสกุล (genus) *Plagiostoma* จึงได้จัดตั้งสกุลใหม่ เป็น *Pseudoplagiostoma* และเปลี่ยนชื่อเชื้อรา *C. eucalypti* เป็น *Pseudoplagiostoma eucalypti* โดยจัดอยู่ใน Order Diaporthales และ Family Pseudoplagiostomaceae

เชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ของยูคาลิปตัส สำรวจพบครั้งแรกโดย Old ในปี 1986 ในประเทศญี่ปุ่นซึ่งไม่มีการตีพิมพ์ แต่มีรายงานการศึกษาครั้งแรกโดย Sankaran *et al*. (1995) ซึ่งพบในหลาย ๆ ประเทศ ได้แก่ บราซิล อินโดนีเซีย ไทย เวียดนาม และ ญี่ปุ่น โดยทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้ เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายใบ ปลายกิ่งและยอดอ่อน ทำให้เกิดแผลจุดไหม้รุนแรง ใบร่วง กิ่งแห้ง ต้นไม้อ่อนแอ เปิดช่องทางให้เชื้อราที่ไม่สร้างความเสียหายรุนแรง (weak pathogen) ชนิดอื่นๆ เช่น *Cytospora* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp. เข้าทำลายส่วนของกิ่ง และลำต้นเป็นผลให้เกิดโรคแผลแตก ยางไหล และยอดตาย ทำให้ทรงต้นผิดปรกติ คดงอแคระแกร็นหรือรุนแรงส่งผลให้ต้นตายได้ (Pongpanich, 1999) เชื้อราแต่ละชนิดในสกุลนี้มีความแตกต่างกันน้อยมาก บางครั้งจึงจำเป็นต้องใช้ขนาดของ conidia เป็นหลักในการจำแนก

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อ *P. eucalypti* ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากแปลงสวนไม้ในจังหวัดกาญจนบุรี มีการสร้าง conidiomata และ conidia ที่เหมือนกัน แต่มี

ลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน รวมทั้งยังมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกันด้วย (Proumkid, 2006) ซึ่งลักษณะการสร้างส่วนขยายพันธุ์และอัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม จึงไม่สามารถจำแนกเชื้อราชนิดนี้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้

เทคนิคทางอณูวิทยา มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง ได้มีการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Peyachoknagul, 2002) เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมาโดย Vos *et al.* (1995) เป็นเทคนิคทางอณูวิทยาวิธีหนึ่งที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างจำนวนมาก น่าเชื่อถือ และเป็นที่นิยมนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ของยูคาลิปตัส โดยอาศัยเทคนิค AFLP ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เก็บใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้จากสวนป่าในจังหวัดต่างๆ 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา นครปฐม เพชรบูรณ์ ราชบุรี หนองบัวลำภู อุดรธานี ปราจีนบุรี และอุทัยธานี (ตารางที่ 1)นำมาบ่มไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-3 วัน ใบยูคาลิปตัสจะเกิดกลุ่มของโคนิเดีย (conidial masses) เขี่ยกลุ่มโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ แล้วนำไปวางบนอาหาร water agar (วุ้น 15 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) (Singchada, 2006) และแยกโคนิเดียเดี่ยว (single conidial isolation) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextose Agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลต ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA แล้วย้ายมาวางบนอาหาร PDA ใหม่ บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD:completely randomized design) จำนวน 5 ซ้ำ (1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ 1 ซ้ำ) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป R (version 2.7.0) นอกจากนี้นำค่าเฉลี่ยของความกว้าง ความยาว ของโคนิเดีย และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของทุกไอโซเลตมาหาความสัมพันธ์แบบ Scatter plot 3D โดยใช้ NTSYS pc version 2.02 (Rohlf, 1993)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราแต่ละไอโซเลต มาตรวจสอบการสร้างโคนิเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อเชื้อรามีการสร้างโคนิเดีย เขี่ยโคนิเดียมาย้อมสีโคนิเดียด้วย lactophenol cotton blue บันทึกลักษณะรูปร่างโคนิเดีย วัดขนาดความกว้างและความยาวของโคนิเดียด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดจำนวน 30 ซ้ำ (ที่ละหนึ่งโคนิเดีย) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (version 2.7.0)

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP

การเตรียมเชื้อรา และการเตรียมดีเอ็นเอ

นำเชื้อรา *P. eucalypti* ที่แยกสปอร์เดี่ยว มาทำสารแขวนลอยโคนิเดีย โดยการเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดที่ผิวหน้าอาหารเบาๆ แล้วดูด สารแขวนลอยโคนิเดีย

1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้โดยเขย่าบน rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เก็บเส้นใยโดยนำมากรองบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 300 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Lyophilizer เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอ โดยนำเส้นใยแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใช้ผงเส้นใย 50 มิลลิกรัม เติม extraction buffer (200 mM Tris HCl, pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA และ 0.5% SDS) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) อย่างละ 250 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสข้างบนย้ายลงหลอดใหม่ เติม RnaseA (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) 25 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า และหมุนเหวี่ยง ที่13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสข้างบนย้ายลงหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม absolute alcohol ปริมาตร 2 เท่า นำไปไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย TE (10 mM Tris HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 50 ไมโครลิตร และตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอบน 0.8% agarose gel ด้วยวิธี electrophoresis

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 500 นาโนกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco* RI (5 units) และ *Mse* I (5 units) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเชื่อมต่อ *Eco* RI adapter (5 pmole) *Mse* I adapter (20 pmole) และเติม T4 DNA ligase (1 ยูนิต) 1 mM ATP และ10X bufferA แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกริยา PCR ในการศึกษา AFLP นั้นจะทำ PCR 2 ครั้ง ครั้งแรก (pre-amplifiction) จะทำโดยการใช้ primer 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3’ อยู่ 1 เบส โดยนำดีเอ็นเอที่ย่อยแล้ว 5 ไมโครลิตร มาเป็นต้นแบบ เติมไพรเมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 5 pmole และ 10X buffer 2 mM dNTP 1 ยูนิต *Taq* polymerase และ 25 mM $MgCl_2$ ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ในปฏิกิริยา PCR ขั้นที่สอง (selective amplification) โดยการใช้ ไพร์เมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเหมือนไพรเมอร์ คู่ที่ใช้ใน PCR ครั้งแรก แต่มีความยาวเพิ่มขึ้น 1-2 เบส (ตารางที่ 2) ปฏิกิริยา PCR จะเริ่มต้นที่ 1 รอบของ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจะปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียส ในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบตามวิธีของ Vos *et al*. (1995) หลังจากนั้นทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยนำเจลมาแช่ใน 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำมาย้อมด้วย silver solution ($AgNO_3$ 1 กรัม formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร) ล้างผ่านน้ำ 1 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน developer ที่แช่เย็น (sodium carbonate 30 กรัม sodium thiosulphate 0.01กรัม formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 ลิตร) จนกระทั่งแถบดีเอ็นเอปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid และล้างน้ำ 2 นาที โดยเขย่าบน rotary shaker ทุกขั้นตอน

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันในทุกตัวอย่าง ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอกำหนดเป็น “1” ถ้าไม่

ปรากฏแถบดีเอ็นเอกำหนดเป็น “0” จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ NTSYS – pc รุ่น 2.20e (Rohlf, 1993) โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี DICE (Dice’s similarity coefficient) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA แล้วแสดงผลการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ phylogenetic tree และวิเคราะห์ค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ตารางที่ 1 ไอโซเลตของเชื้อ *Pseudoplagiostoma eucalypti* และแหล่งที่เก็บรวบรวม

Isolate No.	Location	Isolate Code	Isolate No.	Location	Isolate Code
1	กาญจนบุรี	KAN1	19	เพชรบูรณ์	PHE1
2	กาญจนบุรี	KAN2	20	เพชรบูรณ์	PHE2
3	กาญจนบุรี	KAN3	21	เพชรบูรณ์	PHE3
4	กาญจนบุรี	KAN4	22	ราชบุรี	RAT1
5	กาญจนบุรี	KAN5	23	หนองบัวลำภู	NON1
6	กาญจนบุรี	KAN6	24	หนองบัวลำภู	NON2
7	ขอนแก่น	KHO1	25	หนองบัวลำภู	NON3
8	ขอนแก่น	KHO2	26	หนองบัวลำภู	NON4
9	ขอนแก่น	KHO3	27	หนองบัวลำภู	NON5
10	ขอนแก่น	KHO4	28	หนองบัวลำภู	NON6
11	ฉะเชิงเทรา	CHA1	29	อุดรธานี	AUD1
12	ฉะเชิงเทรา	CHA2	30	อุดรธานี	AUD2
13	ฉะเชิงเทรา	CHA3	31	อุดรธานี	AUD3
14	ฉะเชิงเทรา	CHA4	32	อุดรธานี	AUD4
15	ฉะเชิงเทรา	CHA5	33	ปราจีนบุรี	PHA1
16	นครปฐม	NAK1	34	ปราจีนบุรี	PHA2
17	นครปฐม	NAK2	35	อุทัยธานี	AUT1
18	นครปฐม	NAK3	36	อุทัยธานี	AUT2

ตารางที่ 2 คู่ไพร์เมอร์ (primer combinination) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ขั้นที่สอง

***Mse* I**	***Eco* RI**
5'-GATGAGTCCTGTAGTA**G**- 3'	5' –GACTGCGTACCAATTC**ACT**- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTA**GT**- 3'	5' –GACTGCGTACCAATTC**AC**- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTA**GT**- 3'	5' –GACTGCGTACCAATTC**AG**- 3'
5'-GATGAGTCCTGTAGTA**GTA**- 3'	5' –GACTGCGTACCAATTC**A**- 3'

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อรา

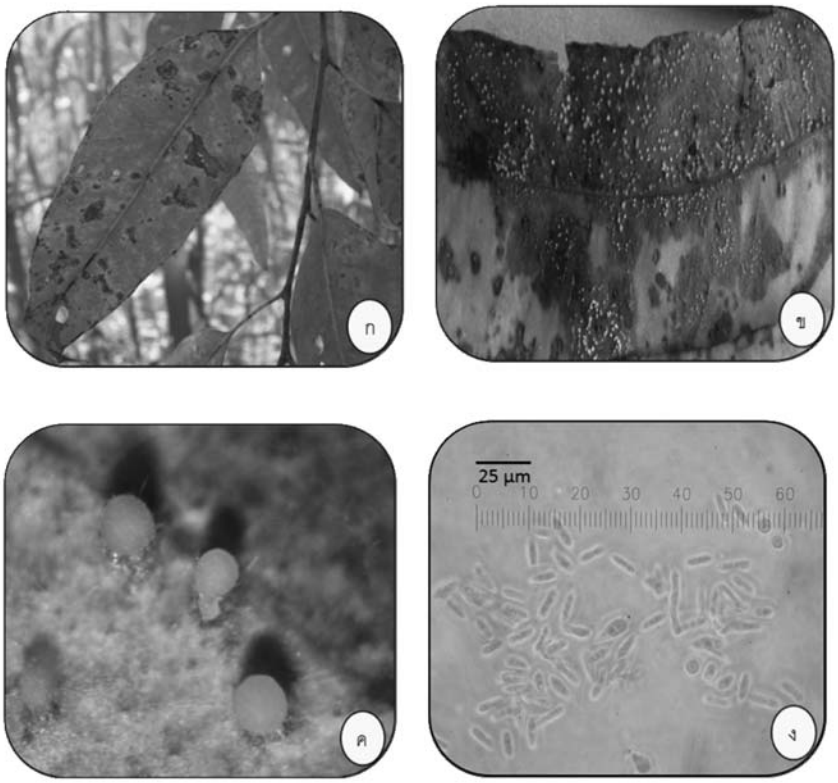
Pseudoplagiostoma eucalypti

ใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุด และใบไหม้ ในระยะแรกของการเข้าทำลายโดยเชื้อรา จะตรวจพบแผลเป็นจุดกลมๆ เล็กๆ สีเหลือง กระจายอยู่ทั่วบนใบ จุดแผลจะมีการขยายออกตามการเจริญของเชื้อรา และในบริเวณตรงกลางของแผลจะมีการตายของเซลล์ ทำให้เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำอยู่ภายในวงสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cheewangkoon *et al.* (2010) ซึ่งบรรยายลักษณะอาการของโรคไว้ บางครั้งยังพบแผลไหม้ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล มีการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง (ภาพที่ 1ก) เมื่อนำใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบจุดและใบไหม้มาบ่ม ในที่มีความชื้นสูงประมาณ 2-3 วัน พบว่าเชื้อรามีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียออกมาจำนวนมาก (ภาพที่ 1 ข-ค) ลักษณะของโคนิเดียจะมีรูปร่างเป็นรูปวงรีหรือทรงกระบอก ปลายมน ฐานมนหรือเรียวแหลม เชื้อรา *P. eucalypti* ที่แยกจากใบยูคาลิปตัสที่เก็บมาจาก 10 จังหวัดมีจำนวน 36 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

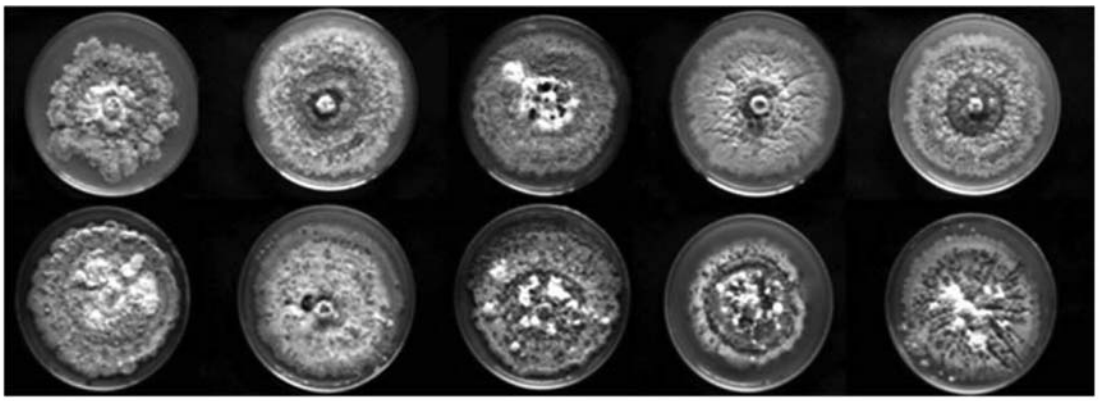
การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีเชื้อรา *P. eucalypti* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกเส้นใยเชื้อราจะมีสีขาว เส้นใยที่มีอายุ 3-4 วันจะเปลี่ยนเป็นสีครีม หลังจากนั้นสีของเส้นใยเชื้อราจะเข้มขึ้น โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลปนดำหรือดำ ตามลำดับ โคโลนีเชื้อราเจริญติดไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (adpressed) การเจริญเติบโตบนอาหาร PDA จนเต็มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาประมาณ 21 วัน การสร้างโคนิเดียจะเริ่มจากโคโลนีมีการขับของเหลวข้น (exudates) ที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำใสหรือสีครีมใสออกมาจากโคนิเดียที่เชื้อราสร้างขึ้น หยดของเหลวข้นจำนวนมากจนท่วมผิวหน้าของโคโลนี (ภาพที่ 2)การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา 36 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) ระหว่าง 3.72-7.38 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singchada (2006) เชื้อรา *C. eucalypti* ที่เก็บได้จากสวนป่ายูคาลิปตัส 9 ไอโซเลตมีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท โดยเชื้อราที่เก็บได้จากสวนป่าจังหวัดราชบุรีและจังหวัดกาญจนบุรีมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในแต่ละไอโซเลต ส่วนจังหวัดฉะเชิงเทรามีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ซึ่งอาจเกิดมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเชื้อราไอโซเลต NON2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนียาวที่สุด (7.38 เซนติเมตร)



ภาพที่ 1 โรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* ก. อาการโรคใบจุดใบไหม้ของยูคาลิปตัส ข. กลุ่มโคนิเดียบนผิวใบยูคาลิปตัส ค. กลุ่มของโคนิเดียบนผิวใบยูคาลิปตัสภายใต้กล้องสเตอริโอ ง. ลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* บนอาหาร PDA

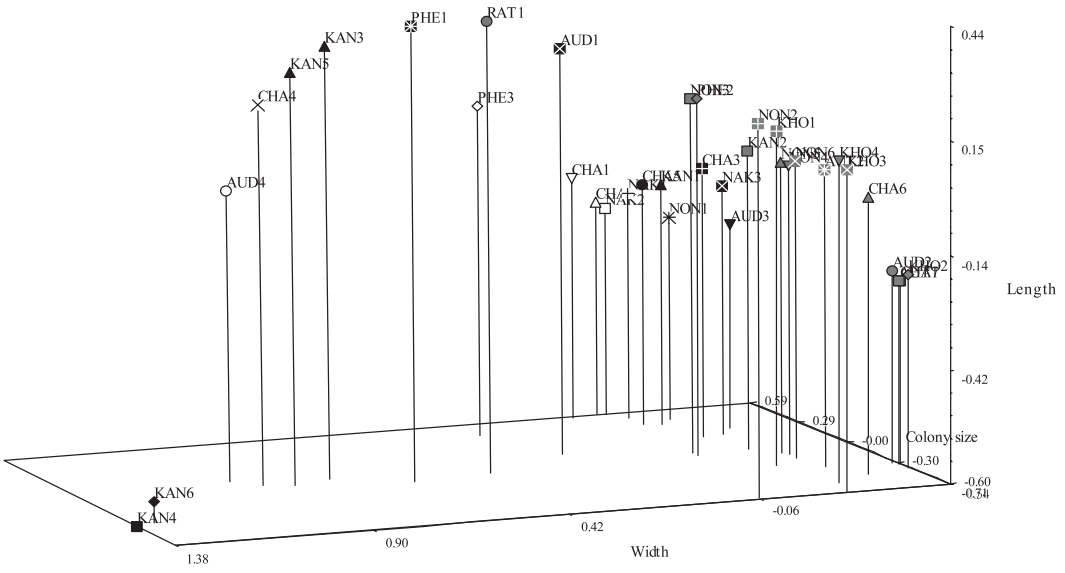
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *P. eucalypti* มีรูปร่างของโคนิเดียแต่ละไอโซเลตเหมือนกัน คือ รูปร่างทรงกระบอกหรือรูปรี ปลายมน ฐานมนหรือเรียวแหลม ขนาดของโคนิเดียของเชื้อรา 36 ไอโซเลต มีค่าอยู่ระหว่าง 4.63-6.71 x 13.33-20.96 ไมโครเมตร ซึ่งมีลักษณะดังที่ Cheewnagkoon *et al*. (2010) ได้อธิบายไว้ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความกว้างและความยาวพบว่าทั้งความกว้างและความยาวมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3)

โดยเชื้อราไอโซเลต KAN6 มีขนาดความกว้างสูงสุด 6.71 ไมโครเมตรและไอโซเลต KAN4 มีขนาดความยาว สูงสุด 20.96 ไมโครเมตร เมื่อนำค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาวของโคนิเดีย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของทุกไอโซเลต มาหาความ สัมพันธ์โดยวิธี Scatter plot 3D พบว่ามีการกระจายตัวของไอโซเลต ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อรามีความหลากหลายหรือมีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดีย หรือ ขนาดโคโลนี (ภาพที่ 3)

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. eucalypti* จำนวน 36 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer 4 คู่ เกิดแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 178 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบ คิดเป็น 43.25% (ตารางที่ 4) เมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธีการของ Dice (Dice' s similarity) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMAพบว่าเชื้อราทั้ง 36 ไอโซเลตที่นำมาวิเคราะห์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เมื่อแบ่งกลุ่มที่ค่า similarity coefficient 0.45 และค่า cophenetic correlation (matrix correlation) 0.955 แบ่งได้10 กลุ่ม (ภาพที่ 4-5) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อรา 22 ไอโซเลตคือ KAN2, KAN3, KAN4, KAN5, KAN6, CHA4, CHA5, NAK1, CHA3, AUD4, CHA1, CHA2, KHO2, KHO3, AUD3, PHE2, PHE3, PHE1, RAT1, KHO1, NON1 และNON6 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่เก็บมาจาก จ.กาญจนบุรี จ.ฉะเชิงเทรา จ.นครสวรรค์ จ.อุดรธานี จ. ขอนแก่น จ.เพชรบูรณ์ จ.ราชบุรี จ. ขอนแก่น และ จ. หนองบัวลำภู สำหรับกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ NAK3 ที่เก็บมาจาก จ. นครสวรรค์ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ NAK2 ที่เก็บมาจาก จ. นครสวรรค์ กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลต คือNON3 และ NON4 ที่เก็บมาจาก จ.หนองบัวลำภู กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ NON2 ที่เก็บมาจาก จ . หนองบัวลำภู กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ KHO4 ที่เก็บมาจาก จ. ขอนแก่น กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ AUT2 ที่เก็บมาจาก จ.อุทัยธานี กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ PHA2 ที่เก็บมาจาก จ. ปราจีนบุรี



ภาพที่ 3 แสดง morphometry scatter plot 3D ของความยาว, ความกว้างของโคนิเดีย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

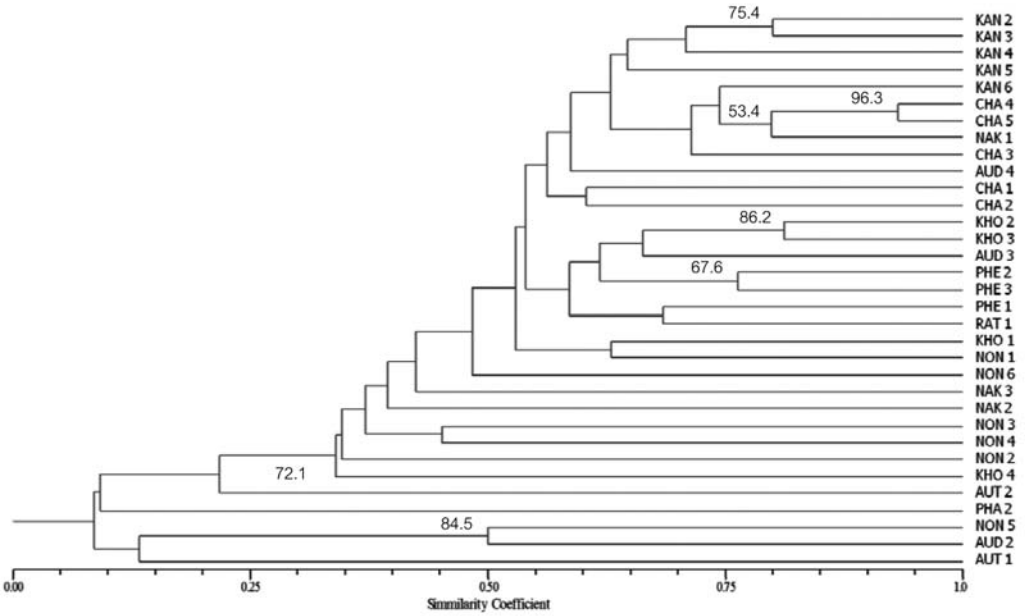
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน และค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาวของโคนิเดียของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	ขนาดโคนิเดีย (ไมโครเมตร)		ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	ขนาดโคนิเดีย (ไมโครเมตร)	
		ความกว้าง	ความยาว			ความกว้าง	ความยาว
KAN1	4.78 fg	5.00 de	14.50 ef	**PHE1**	5.42 cd	5.00 de	17.04 bc
KAN2	5.55 cd	5.08 de	14.63 ef	**PHE2**	5.61 cd	5.00 de	15.08 ef
KAN3	4.78 fg	5.00 de	17.38 bc	**PHE3**	4.11 jk	5.00 de	15.67 de
KAN4	4.74 fg	6.29 b	20.96 a	**RAT1**	5.45 cd	5.00 de	16.46 cg
KAN5	4.78 fg	5.00 de	17.75 b	**NON1**	4.58 gh	5.00 de	14.17 gh
KAN6	4.77 fg	6.71 a	20.38 a	**NON2**	7.38 a	4.96 de	15.46 de
KHO1	6.00 bc	5.00 de	14.79 ef	**NON3**	5.55 cd	4.96 de	15.08 ef
KHO2	6.40 ab	5.00 de	13.46 jk	**NON4**	5.73 cd	5.00 de	14.46 fg
KHO3	7.22 ab	5.13 de	14.63 ef	**NON5**	5.70 cd	5.00 de	14.50 ef
KHO4	6.73 ab	5.08 de	14.63 ef	**NON6**	5.83 cd	5.00 de	14.50 ef
CHA1	4.15 ij	5.00 de	14.75 ef	**AUD1**	5.16 de	4.63 g	15.75 de
CHA2	4.12 jk	5.00 de	14.46 fg	**AUD2**	6.15 ab	5.00 de	13.54 ij
CHA3	5.17 de	5.17 de	14.58 ef	**AUD3**	4.96 ef	5.00 de	14.00 hi
CHA4	4.44 hi	5.00 de	17.96 b	**AUD4**	3.72 l	5.58 c	18.13 b
CHA5	4.70 fg	5.25 d	14.58 ef	**PHA1**	6.48 ab	4.83 fg	14.21 gh
NAK1	4.50 gh	5.04 de	14.50 ef	**PHA2**	6.20 ab	4.83 fg	13.33 k
NAK2	4.08 kl	4.88 ef	14.33 gh	**AUT1**	6.20 ab	5.04 de	13.42 k
NAK3	5.16 de	5.00 de	14.38 gh	**AUT2**	6.13 cd	5.04 de	14.46 fg
C.V. (%)	15.30	4.02	5.42		15.30	4.02	5.42

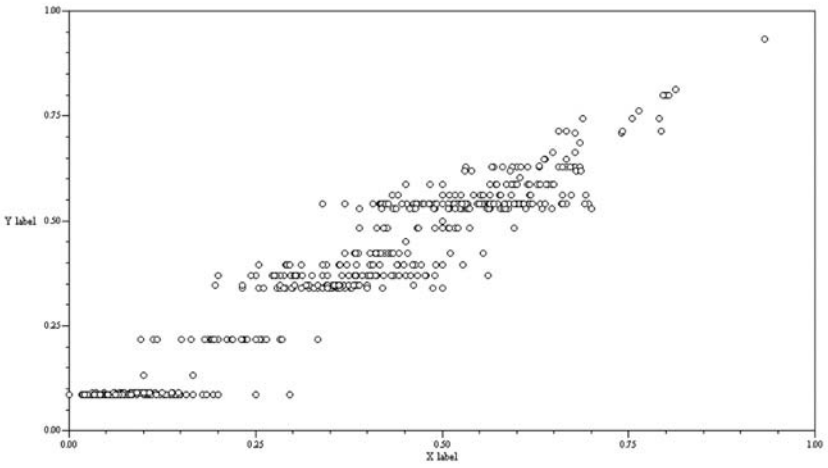
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) และจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total band) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบ PCR ขั้นที่สอง ดีเอ็นเอที่แตกต่าง
M+G/E+ACT	40	12
M+GT/E+AC	57	31
M+GT/E+AG	31	15
M+GTA/E+A	50	19



ภาพที่ 4 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* จากแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 36 ไอโซเลต จากการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 77 polymorphic bands ด้วยค่า Dice's simiilarity coeffcient และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ค่าที่แสดงบนกิ่งคือค่า bootstrap ที่คำนวณจาก 1,000 ซ้ำ



ภาพที่ 5 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มที่มีค่า cophenetic correlation 0.955 โดยการคำนวณค่า similarity และ clustering ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.02

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลต คือ NON5 และ AUD2 ที่เก็บมาจาก จ. หนองบัวลำภู และ จ. อุดรธานี และ กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อรา 1 ไอโซเลต คือ AUT1 ที่เก็บมาจาก จ. อุทัยธานี จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีความหลากหลายทางจีโนไทป์ นอกจากนี้การกระจายตัวของตัวอย่างในกลุ่มต่างๆ แสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มไม่มีความสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บรวมรวมเชื้อ เช่นในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลตของเชื้อราที่มาจากคนละจังหวัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อรามีการแพร่ระบาดไปยังแหล่งต่างๆ ได้เช่น ติดไปกับต้นกล้ายูคาลิปตัส และเนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ทำให้มีการสร้างสปอร์จำนวนมาก และมีคุณสมบัติที่เหมือนกันทุกสปอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราในแต่ละจังหวัดแบ่งแยกได้คนละกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าในแต่ละพื้นที่อาจพบเชื้อราชนิดนี้มากกว่า 1 สายพันธุ์ สำหรับเชื้อราชนิดนี้ ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่กว้างขวางมากนัก แต่มีรายงานของเชื้อราในกลุ่มเดียวกันที่ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน El-Khalifeh *et al.* (2009) ได้ใช้เทคนิค AFLP ในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) ของเชื้อรา *Fusarium* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในข้าว durum wheat (*Triticum turgidum* L.var.*durum*) พบว่า จากการวิเคราะห์ข้อมูลจาก AFLP สามารถแยกไอโซเลตเชื้อรา *Fusarium* ได้เป็น 2 กลุ่ม แม้ว่าทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางลักษณะสัณฐานวิทยา นอกจากนี้การแบ่งกลุ่มด้วยข้อมูล AFLP ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งมาที่ของเชื้อราหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* หรือในรายงานฉบับอื่นที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืชชนิดต่างๆ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่า เชื้อราทั้ง 18 formae specials นั้นไม่ได้แยกออกจากกันตามพืชอาศัยเมื่อวิคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเชื้อราไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic (Bogale *et al.,* 2006) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *P. eucalypti* มีสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างไอโซเลตค่อนข้างต่ำ โดยมีไอโซเลตที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่ำกว่า 35% อยู่ 4 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ ซึ่งเคยมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP โดย Baayen *et al.* (2000) พบว่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตของเชื้อรา *F. proliferatum* ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์

ความเหมือนต่ำถึง 40% หรือในเชื้อราชนิดอื่นเช่น *Ganoderma spp*. เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลทด้วยเทคนิค AFLP พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.3282-0.746 อย่างไรก็ตามเชื้อรา *P. eucalypti* ที่ศึกษาในครั้งนี้ต้องนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน ITS และเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Cheewangkoon *et al*. (2010) ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลต่อไป

สรุป

จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. eucalypti* พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเมื่อนำเชื้อรามาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค AFLP แล้วพบว่า เชื้อราทั้ง 36 ไอโซเลต มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 77 แถบ และแบ่งกลุ่มได้ 10 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับแหล่งที่เก็บรวบรวมเชื้อรา หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราที่เก็บรวบรวมมาได้จากจังหวัดต่างๆ แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์ที่คล้ายกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อรามีการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่ต่างๆ ได้ และสามารถขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ซึ่งสร้างสปอร์จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าในแต่ละจังหวัดอาจมีเชื้อรา *P. eucalypti* มากกว่า 1 สายพันธุ์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Baayen, R.P., P.H.J.F. van den Boogert, P.J.M. Bonants, J.T.K. Poll, W.J. Blok and C. Waalwijk. 2000. *Fusarium redolens* f.sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. **European Journal of Plant Patho**. 106: 907-912.

Bogale, M., D. W. Brenda, J.W. Michael and T.S. Emma. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. **Fungal Diversity**. 23: 51-66.

Cheewangkoon, R., J. Z. Groenewald, G. J. M. Verkley, K. D. Hyde, M. J. Wingfield, M. Gryzenhout, B. A. Summerell, S. Denman, C. Toanun and P. W. Crous. 2010. Re-evaluation of *Cryptosporiopsis eucalypti* and *Cryptosporiopsis*-like species occurring on *Eucalyptus* leaves. **Fungal Diversity**. 44(1): 89-91

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

Peyachoknagul, S. 2002. **Genomes and DNA Makers: RAPD and AFLP Laboratory.** Kasetsart University, Bangkok

Pongpanich, K. 1999. Eucalyptus Disease in Thailand and Options for Reducing Their Impact, pp. 101-106. *in* **The Fourth National Plant Protection Conference**. Ambasdor City Hotel. Jomthian. Pattaya. Chonburi, 27-29 October 1999 (in Thai)

Proumkid, P. 2006. **Study on Fungi Phathogens Causing Leaf Spot and Leaf Blight Symtoms on *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh**. Special problem, Kasetsart University (in Thai)

Rohlf, F.J. 1993. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Exeter Software, NewYork .206 p.

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.

Singchada, Y. 2006. **DNA Markers for *Cryptosporiopsis eucalypti* Resistant/Susceptible Eucalypt Clone Selection using Sequence-Tagged Site Technique.** M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J.Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

Yap, I. and R.J. Nelson. 1996. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. **IRRI Discussion Paper Series 14**. International Rice Research Institute, Manila. Philippines.