

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. แผนงานวิจัย** : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย
- 2. โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ซีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
- กิจกรรมที่ 3** : การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
- 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic rust fungi
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**
 - หัวหน้าการทดลอง** : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - ผู้ร่วมงาน** : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวสุณีรัตน์ สิมะเตือ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวอมรรักษ์ คัดใจเดียว สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวสุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
- 5. บทคัดย่อ**

เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยาแพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลซีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของราสนิม จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae* *Puccinia horiana* *Hemileia vastatrix* *Uromyces appendiculatus* *Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ

Plant disease samples caused by rust fungi had been collected during October 2016 – September 2019. Plant disease samples were collected from plantation located in Lampang, Uttaradit, Chiangrai, Chiangmai, Phichit Phayao, Phrae, Phetchabun, Phitsanulok, Phetchaburi, Krabi, Phangnga, Nakhon Si Thammarat, Surat Thani, Nakhon Ratchasima, Lop Buri, Yasothon, and Chaiyaphum provinces. Sixty-two specimens had been observed and identified using

morphological and molecular data of the Large Subunit (LSU), the Small Subunit (SSU) and Internal Transcribed Spacer (ITS) gene regions. It was found that the causal agent could be identified as *Olivea tectonae*, *Puccinia horiana*, *Hemileia vastatrix*, *Uromyces appendiculatus*, *Phakopsora pachyrhizi* and *Puccinia sorghi*, which isolated from *Tectona grandis*, *Chrysanthemum* sp., *Coffea robusta*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* and *Zea mays*, respectively.

6. คำนำ

ราสนิม(Rust fungi) ในorder Pucciniales, sub-phylum Pucciniomycotina, phylum Basidiomycota (Aime, 2006; Cummins and Hiratsuka, 2003) ราสนิม จัดเป็นราสาเหตุโรคพืชกลุ่มใหญ่ (Kirk *et al.*, 2008; Kolmer *et al.*, 2009) ที่ประกอบด้วย มากกว่า 7,000 สปีชีส์ จาก 160 วงศ์ ภายใต้ 14 สกุล (Aime, 2006; Cummins and Hiratsuka, 2003; Cline *et al.*, 2013; Kolmer *et al.*, 2009; Ono and Aime, 2006; Swann *et al.*, 2001; Webster and Weber, 2007) และคาดการณ์ว่ายังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบ โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนชื้น (Shivas and Hyde, 1997) ราสนิมสามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้แก่พืชได้อย่างหลากหลาย เช่น อ้อย กาแฟ ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ไม้ดอกไม้ประดับ พืชตระกูลชิง และอื่นๆ ราสนิม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะขึ้นกับระยะของการเจริญเติบโตของวงจรชีวิตที่มีมากถึง 5 ระยะ และในแต่ละระยะมีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Cummins and Hiratsuka, 2003; Eckardt, 2006; Petersen, 1974) อีกทั้งราสนิมบางชนิดสามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ได้บนพืชอาศัยเพียงชนิดเดียว แต่บางชนิดต้องอาศัยบนพืชต่างชนิดกันอย่างน้อยสองชนิดเพื่อให้ครบวงจรชีวิต (Cunningham, 1931) เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างส่วนขยายพันธุ์ในระยะที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากราสนิมมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีระยะการเจริญเติบโตในวงจรชีวิตที่ซับซ้อน ดังนั้น ในการจำแนกชนิดของราสนิมแต่เดิมจึงอาศัยข้อมูลของพืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะวงจรชีวิตของราสนิม มาใช้ในการจัดจำแนกชนิด

ในประเทศไทย ราสนิมสามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดโรครากับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นโรคราสนิมของข้าวโพด ที่เกิดจาก *Puccinia polysora* และ *Puccinia sorghi* (ชุติมันต์ และคณะ, 2547) โรค ราสนิมของกาแฟ ที่เกิดจาก *Hemileia vastatrix* โรคราสนิมของอ้อย ที่เกิดจาก *Puccinia melanocephala* (เฉลิมพล และคณะ, 2547; ธนาคร และคณะ, 2526) โรคราสนิมของข้าวสาลี ที่เกิดจาก *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* โรคราสนิมของถั่วเหลือง ที่เกิดจาก *Phakopsora pachyrhizi* โรคราสนิมของถั่วลิสง ที่เกิดจาก *Puccinia arachidis* โรคราสนิมของถั่วฝักยาวที่เกิดจาก *Uromyces phaseoli varvignae* (วิจัย, 2551) ระหว่างปี 1980-1994 มีการสำรวจโรคราสนิมในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนประมาณ 64 สปีชีส์ จาก 17 วงศ์ โดยพบบนพืชจำนวน 66 สปีชีส์ (Giatgong, 1980; Gjaerum, 1995; Kakishima *et al.*, 1988; Lohsomboon *et al.*, 1986, 1988, 1992, 1994; Lorsuwan *et al.*, 1984; Ono *et al.*, 1988a,b) ซึ่งการจำแนกชนิดใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการสำรวจล่าสุดโดย Engkhaninum *et al.* (2005) รายงาน

พบราสนิมจำนวน 10 สปีชีส์ จาก 7 วงศ์ ได้แก่ *Crossospora fici* *Crossospora zizyphi* *Maravalia achroa* *Pileolaria shiraiana* *Puccinia cara* *Ravenelia japonica* *Sphaerophragmium clemensiae* *Uredo musae* *Uredo operculinae* *Uromyces commelinae* โดยเป็นรายงานการพบครั้งแรกบนพืชจำนวน 6 ชนิด

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้ นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยราชชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al.*, 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของเชื้อราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้สามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) ทำให้มีการค้นพบราสาเหตุโรคพืชใหม่หลายชนิด รวมถึงราสนิม อย่างไรก็ตาม การถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS ในราสนิมค่อนข้างยาก (Liu *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงมีการใช้ข้อมูลของพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นประกอบเพื่อจำแนก และแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ เช่น the Small Subunit (SSU) the Large Subunit (LSU) the Intergenic Spacer (IGS) Mitochondria cytochrome oxidase subunit 3 (CO3) และอื่นๆ (Aime, 2006; Beenken *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2010; Minnis *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2011)

การรายงานและการศึกษาราสนิมในประเทศไทยเป็นการรายงาน และจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลการจำแนกชนิดของราสนิมที่มีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประกอบอย่างน้อยหรือไม่ครอบคลุม อีกทั้งยังมีการศึกษาและรายงานว่า ราสนิมหลายสปีชีส์มีแนวโน้มว่ามีความซับซ้อน (complex species) จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่เพียงพอต่อการจำแนก รวมถึงความซับซ้อนในการจัดจำแนกของราสนิม ทำให้การจำแนกชนิดของราสนิมโดยใช้ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา ร่วมกับข้อมูลชีวโมเลกุลจึงมีความสำคัญ หากทราบถึงชนิดของราสนิมบนพืชอาศัยต่างๆ นอกจากสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการจำแนกชนิดของราสนิมแล้ว ยังสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการของราสนิม ประโยชน์ในทางด้านโรคพืช การเกษตรทั่วไป และสามารถใช้อ้างอิงในการใช้สำหรับการอ้างอิงหรือยืนยันในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืช โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถังพลาสติก ถังกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ของกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave
- micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo
- Dry heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
- Lithium Borate buffer (LB)
- PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- SERVA HiSens Stain G
- Nuclease-Free Water
- ไพร์เมอร์ ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1F/ITS4B (Gardes and

Bruns, 1993) the Large Subunit (LSU) Rust2inv (Aime, 2006)/ LR7 (Vilgalys and Hester, 1990) และ ทำ nested PCR ด้วย LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990) และ the Small Subunit (SSU) NS1 (White *et al.*, 1990)/Rust18SR (Aime, 2006)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 20.0.3 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

- วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิม

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniales จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ ภาคกลางได้แก่ จังหวัด สุโขทัย พิษณุโลก สุพรรณบุรี นครสวรรค์ นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุรธานี ภาคตะวันตกได้แก่ ตาก กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และลดความชื้นเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่นที่จะขึ้นปกคลุม บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตีพิมพ์เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniopore spermatia และลักษณะอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound เพื่อบันทึกขนาด รูปร่างและบันทึกภาพ รวมถึงการบันทึกข้อมูลของพืชอาศัย จำแนกชนิดราสนิม สาเหตุโรคพืช โดยเปรียบเทียบกับลักษณะของราสนิมที่ศึกษา กับคู่มือหรือวรรณกรรมของ Aime (2006) Cummins and Hiratsuka (2003) Cline *et al.* (2013) Kolmer *et al.* (2009) Ono and Aime (2006) และ Swann *et al.* (2001)

3. จำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดชิ้นส่วนของราสนิมที่พบบนชิ้นส่วนของพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo ย้ายลงในหลอดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง the Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) Internal Transcribed Spacer (ITS) และ Cytochrome Oxidase 3 (CO3) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่ง LSU SSU ITS และ CO3 ที่ 62 60 60 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม gel 1% และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสม pcr product 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ pcr product ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้ เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคราสนิม (Figure 1) จากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยาแพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างมาทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตักสปอร์จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว และกาแฟ ภายใต้กล้อง stereo microscope จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง Large Subunit (LSU) the Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS)

โดยใช้ Phusion DNA Polymerase วิเคราะห์เพื่อการจัดจำแนกด้วยวิธี Phylogenetic reconstruction ได้ผล ดังนี้



Figure 1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

Table 1: Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

Common name	Scientific name	location	Lat.	Long.
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>	Nakhoratchasima	15° 11' 40.0622"	101° 29' 42.5740"
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Lopburi	14° 57' 26.8660"	101° 16' 21.0011"

Bamboo	<i>Bambusa vulgaris</i>	Lampang	18° 19' 33.7337"	99° 16' 31.8475"
Teak	<i>Tectona grandis</i>	Phrae	18° 01' 01.9"	99° 42' 55.8"
Guinea grass	<i>Megathyrsus maximus</i>	Nakhoratchasima	15° 8' 32.5187"	101° 50' 58.3782"
Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 34' 49.6"	100° 07' 08.1"
Maize	<i>Zea mays</i>	Uttaradit	70° 34' 49.7451"	100° 07' 8.1989"
Coffee	<i>Coffea robusta</i>	Chiang Rai	20° 5' 19.4812"	99° 58' 39.8915"
Blady grass	<i>Imperata cylindrica</i>	Chiang Rai	20° 3' 40.2543"	99° 57' 23.8213"
Grass	<i>Apluda sp.</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 49' 31.9007"	100° 4' 31.9007"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 49' 31.7298"	100° 4' 15.1078"
Golden shower	<i>Cassia fistula</i>	Phichit	16° 16' 37.2320"	100° 35' 57.2604"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.6889"
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 47.3486"
Weed	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Teak	<i>Tectona grandis</i>	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 42.3486"
Globe amaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Phayao	19° 5' 38.7834"	99° 54' 37.6888"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Phrae	18° 15' 12.4412"	100° 13' 41.4469"
Weed	<i>Cynodon dactylon</i>	Phrae	18° 15' 12.4413"	100° 13' 41.4469"
Wild sugarcane	<i>Saccharum spontaneum</i>	Phitsanulok	17° 42' 31.9007"	100° 4' 11.4627"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Phitsanulok	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.5859"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 39' 37.7013"	99° 32' 49.4195"
Globe amaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Chiang Mai	18° 57' 58.8930"	99° 14' 30.2139"
Maize	<i>Zea mays</i>	Chiang Mai	18° 56' 45.8935"	98° 58' 55.8608"
Soybean	<i>Glycine max</i>	Chiang Mai	18° 54' 20.6499"	99° 00' 42.0400"
Blady grass	<i>Imperata cylindrica</i>	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"
Lemon Grass	<i>Cymbopogon citratus</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.4117"	99° 39' 12.6582"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Bamboo	<i>Bambusa vulgaris</i>	Chiang Rai	19° 46' 32.0395"	99° 39' 8.2557"
Spanish needles	<i>Bidens biternata</i>	Chiang Rai	19° 46' 31.4483"	99° 39' 8.0433"
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.4112"	99° 39' 12.6582"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"

ราสนิมสัก

เชื้อราสาเหตุ

Olivea tectonae (Racib.) Thirum., Current Science 18 (5): 176 (1949)

Synonymy:

- ≡ *Chaconia tectonae* T.S. Ramakr. & K. Ramakr., Indian Phytopathology 2 (1): 19 (1949)
- ≡ *Olivea neotectonae* Buriticá & Salazar-Yepes, Revista, Facultad Nacional de Agronomía Medellín: 3652 (2007)
- ≡ *Olivea tectonae* (T.S. Ramakr. & K. Ramakr.) J.L. Mulder, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 365 (1973)
- = *Tegillum neotectonae* (Buriticá & Salazar-Yepes) Doweld, Index Fungorum 36: 1 (2013)
- = *Tegillum tectonae* (Racib.) Doweld: 1 (2013)
- = *Uredo tectonae* Racib., Parasitische Algen und Pilze Java's 1: 28 (1900)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Chaconiaceae
Genus	<i>Olivea</i>
Species	<i>tectonae</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบสัก

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วไป เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วไป หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 2)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปริออก ภายในบรรจุ urediniospores รูปร่างรีคล้ายไข่ สีเหลืองส้มขนาดประมาณ 18-28 × 14-22 µm ผนังเซลล์ของสปอร์ใสไม่มีสีหนาประมาณ 2 µm ไม่มี germ pore มักพบปนกับ telia

พืชอาศัย สัก (*Tectona grandis* L.)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
CCCGAAGGTAAACCTCCTGACCCACATGTGACCTTGATTTGCTTCTGTTGATTCTGTTCGGCGTCTGGACGGCCGTCGCGCC  
GCCCCGCGACCCGGAACCCAGGCGGCCCTGGGACCAATATCAACTCTTTGTATCCACTAGTCTTCTGATCAGCCGCACGGCA  
CCAAGAAATGGATCAAAACTTTTCTTACAGAAGGGGAGGGATCCGTGAATTGGAAAACGCAACGAACCGTGAAAAGTAAAGGG  
AATTGTGGAATTCTAGGAATCATGCAATCTTTGAATGTTTCATTGCGCCTGCCAGCATTTTGGCGGGGATGGCTGTTTCGAGGGGA  
CATTTCAACCCCTCGAGCTCCCCTTTGGAAGTCCGGGAGTTGGGACCTGTAGACTTACCGTTTGTGAAACCATGGATTTGTGGC
```

TGTGATTCATTTACCTCCGCGTAGAATCTATACACCGCATCGGAAACTCGGCGGGGCCACCCCGCAAAACCCCTTAATTTGGG
AACATTTATCATTGAACAAGAAAGATTACCCGCTGAACTTAATCATAACAATGTAACGGAAG



Figure 2 Rust disease symptom on *Tectona grandis* (a) sori on lower leaf (b) urediniospores of *O. tectonae* (c)

ราสนิมขาวเบญจมาศ

เชื้อราสาเหตุ

Puccinia horiana Henn., Hedwigia Beiblätter 40: 25 (1901)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae

Genus *Puccinia*

Species *horiana*

พืชและส่วนที่พบ ใบเบญจมาศ

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วไป เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วไป หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 3)



Figure 3 Rust disease symptom on *Chrysanthemum* (a-d) teliospore of *P. horiana* (e)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปริออก ภายในบรรจุ urediniospores รูปร่างรีคล้ายไข่ สีเหลืองส้มขนาดประมาณ $18-28 \times 14-22 \mu\text{m}$ ผนังเซลล์ของสปอร์ใสไม่มีสีหนาประมาณ $2 \mu\text{m}$ ไม่มี germ pore มักพบปนกับ telia teliospore มีสีเหลืองใส แบบ 2 เซลล์ มีระยางค์ตรงปลายยอด

พืชอาศัย เบญจมาศ (*Chrysanthemum*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGTTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTATTAAGAAGACTAGAGTGCACTTTATTGTG  
GCTTGACCCCTTTTAAATATATCACCCAACTATTTTAACTTGGATGCATGAATTTTTGAAAGGTTTCATTGCAATTGAGTAT  
AAGTAACTTCTTTTACTAAGAAATGTTACATTACCCCCCCCCCTTTATTTTTTACCCCTTTTTTATTATATAACACAAGT  
TTAAATGAATGTAAAAACCCTTTAATTATAAAATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAG
```

TGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTTTTGGTATTCCAA
AAGGTACACCTGTTTGTAGTGTGCATGAAACCCTCTCACAAAATAATTTTTGTTAATTATTTAGTGGATGTTGAGTGTGCTGTC
ATTAGCTCACTTTAAATATATCAGTCACTTTTTTTTTTTTTTTTCAAATAAGTTGGATTGACTTGGTGAATAATTTTTTCATCAA
GGAAAGTAGCAATACTTGCCAGCTTTTGTGTTTTGAAAAAAAAAAGAAGACTTCTAAAAACCCAAAATTAATCTTTAAGACCTC
AAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACCTAAG

ราสนิมกาแฟ

เชื้อราสาเหตุ

Hemileia vastatrix Berk. & Broome, Gardeners' Chronicle: 1157 (1869)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Genus	<i>Hemileia</i>
Species	<i>vastatrix</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกาแฟ (*Coffea robusta*)

ลักษณะอาการของโรค เริ่มพบเป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็กบนผิวใบเมื่อโรคเริ่มพัฒนาจะพบจุดขยายใหญ่ขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-25 mm. โดยสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลส้ม พบการสร้างสปอร์บริเวณใต้ใบ โดยบนใบจะเห็นเป็นจุดสีซีด หากพบอาการรุนแรงบริเวณแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มและแผลมีลักษณะแห้งและใบกาแฟจะร่วง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม (Figure 4)

ลักษณะของเชื้อ sori สร้างบริเวณใต้ใบ อยู่เป็นกลุ่มลักษณะเป็นวงขนาดประมาณ 3-25 mm. มีสีเหลืองถึงเหลืองส้ม (Figure 4) มี clavate filaments รอบ stomata โดยตรงส่วนปลายของ filaments จะติดกับ pedicels ของ urediospores ซึ่งมีลักษณะใส ขนาด 28-36 x 18-28 μm ผิวของ urediospore มีลักษณะเป็น warty ตรงส่วนโค้ง และเรียบตรงส่วนโคน หรือด้านเรียบ ผนังหนา 1 μm teliospores รูปร่างแบบ spherical ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-28 μm ผนังใส เรียบ หนา 1 μm



Figure 4 Rust disease symptom on coffee and sori of *H. vastatrix*

พืชอาศัย *Coffea arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* และ *Coffea* spp.

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

CGAATTTAACCCCGCGGTTAGGCATATATAATTCTCTCTGAGGGTTGTATGTGTTCTAATCTTTTTTTTTTTATTTTCAACCA
CAAATTTATACATATGTATATATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAAATATAAACTTTTAAACAATGGATCTCTTGGCTCTCA
CATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCATATTG
CGCCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGAGTATGAAAGGTCAGGGTGTGAGAGAGTTATTAAGAAAAAGAAAA
AGGCAAAGTAACACTTTAAGTGTATTTTGTCTTTGATTTTTTTTTCTCTTAGCATCTTGGATATTGGGTGCTTGCCATTATT
AAGTTTGATGGCTCACCTTAAATTTATAAGTTGTTTTTATTAAGGATGAAAAGTCTTTTGATGGCTTGATGTTATTGATATAT
GAAATGTCATTCATCAAGAAATCAGGGGGGTGACTAACCTTGATGAGAAATGTTGACTTT

Large Subunit (LSU)

CTAACAAGGATTCCCCTAGTAATGGCGAATGAAGAGGGAAAAGCCCAATTTTGAATCTGGCCCTTTTAGGGTCCGAGTTGTA
AAGTGAAGAGGTGCTTTCTTGTGCTGGACCATATATAAGTCTGTTGGAATACAGCATCATTGAAGGTGAGAATCCTGTCTAAT
GATATGGACTACCAGTGCTTTTATGAAGCAGTCTCTAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTAAATTC
CATCTAAGGCTAAATATTGGTGAGAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGGAAAGAGAGT
TAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACACTTGAAGTTAGACTTGATAATGTCAGTTCAGCCTTTTATTAGGGTGTATTC
TGTGCATTATCAGACCAACATCAATTTTGGGTGTTAGATAAGGGTTTGGGAAATGTAGCAACTTTGTTGTGTTATAGTCCTG
AATTTTCATATATAATGCCCAAGATTGAGGAGATTCACAGTAAGCTGGAAAGAGATTTTCAGTAGGTCACCAAAATGGTTGACA
CTCTTACTATGGATGTTGGTGAATAGCTTTAAATGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCTTGCAAGTAT
TTGAGTGGTAAAACCTCACATGCGCAATGAAAGTGAATGTAAATGGGATCCAAAA

Large Subunit (SSU)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATAAGAGTGCACCTTAATTGTGGCTTGAAATTTTACTTATTTACACCCA
ACGTCTTCGGGACACTGCGGCAATTTATTGCTTAGCGAATTTAACCCCTGCGGTTAGGCATATATAATTTCTCTGAGGGTTG
TATGTGTTCTAATCTTTGTTTTTTTTATTTTCAACCACAAATTTATACATATGTATATATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAA
ATATAAACTTTTAAACAATGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCATATTGCGCCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGAGTATGAAAG
GTCAGGGTGTGAGAGAGTTATTAATAAAGAAAGGCAAAGTAACACTTTAAGTGTTATTTTGTCTTTGATTTTTTTTTT
TCTCTTAGCATCTTGGATATTGGGTGCTTGCCATTATTAAGTTTGATGGCTCACCTTAAATTTATAAGTTGTTTTTTTATTAAG
GATGAAAAGTCTTTTGTGGCTTGATGTTATTGATATATGAAATGTCATTATCAAGAAATCAGGGGGGTGACTAACCTTGAT
GAGAAATGTTGACTTTATAAACACATGTTAAAAGATAAATAAAAAGTAAAAGATAAAAAAATTAATAAATTAATAAATTAAGG
GAAAGAAGTAAAAGAATGAGAGGTATGACATATT

ราสนิมถั่วฝักยาว

เชื้อราสาเหตุ

Uromyces appendiculatus F. Strauss, Exantheme der Pflanzen. Up.: 277 (1833)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	<i>Uromyces</i>
Species	<i>appendiculatus</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วฝักยาว (*Phaseolus vulgaris*)

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมา
ตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผล
สนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ (Figure 5) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ pycnia หรือ aecia พบได้ทั้งบริเวณผิวใบและใต้ใบ อยู่เป็นกลุ่มเล็ก (Figure 5)ขนาดประมาณ
8 mm. ลักษณะแบบ cupulate aecia มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25-0.3 mm. aeciospores มีรูปร่างแบบ
angular ellipsoidal ขนาด 15-26 μm ผนังใสไม่มีสี ผิวแบบ verrucose หนา 1-1.5 μm urediospores
รูปร่างแบบ ellipsoidal จนถึง obovoidal ขนาด 20-30 x 20-26 μm ผนังหนา 1-2 μm มีจำนวน 2 pores
แบบ \pm equatorial หรือ superequatorial teliospores รูปร่างแบบ ellipsoidal มีลักษณะ umbonate ตรง
ส่วนปลายยอด ขนาด 28-38 x 20-36 μm ผนังเรียบ อาจพบลักษณะ warty หรือ striate ได้บางครั้ง ผนัง

ด้านข้างหนา 2.5-3.5 μm และมีความหนาของผนังตรงส่วนยอด 4-8 μm pedicels แบบ fragile ลักษณะใส จนถึงสีน้ำตาลจาง pedicels ยาวประมาณ 20 μm (Figure 5)

พืชอาศัย *Phaseolus* spp. และ *Vigna* spp.

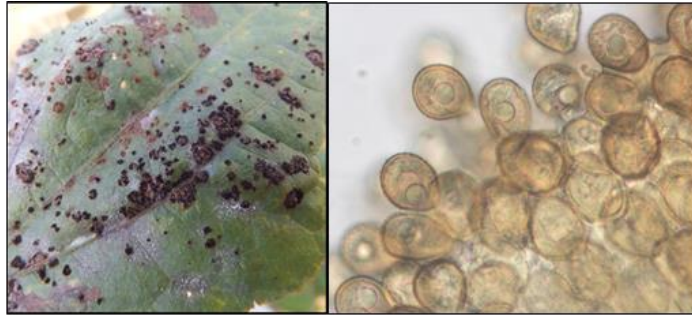


Figure 5 Aecia of rust on *P. vulgaris* and teliospore of *U. appendiculatus*

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
AAATGAGTGCACTTTATTGTGGCTCAAACTTTTTATTTTTTAACCCCAAGACTTGTTTGTGTGGCGTCTTTGCCATTGCACTC
AGGTATACGTAACACTTTTGTGTTACATTACCCCCCTCCCAATTTTTTTTTTTTTATAAACACATGTTGAAATAAGAATGTAA
TATATATATATCTTGAAAATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTAAAATGTGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCATCTTTTGGTATTCCAAAAGGTATGCCTGTTT
GAGTGTGCATGAAAATCTCTCATCAAATTAATTTTTGGTGGATTTTGAGTGCCTGTTATCTAGCTCACTTTAAATATATAAGTT
CTTATCTTATTATGTTGGATTGACTTGGTGAATATTTAACTTTTGTTCACCAAGGAAAGCT
GCAATGCTTGCCAATGTTTTCAAGTCA
```

Large Subunit (LSU)

CCCCTAGTAATGGCGAATGAAAAGGGAAAAGCCCAAATTTGTAATCTGGCTCTCCTGAGACCGAATTGTCATCCTTTAACTG
TTTTCAGTGCTGGACCATATATCAGACCGTCTGACAACGCTTCATCATATAAGGAGAGAATCCTGGTAATGATATGGACTCCC
ATTGCGATATGATACAGACTCTAAGAACCAAGTTGTTTGGGAATGCATCTCAAAGACGGCGGTAATTCATCTAAGGCTAAA
TATTGATGACAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGACCAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAA
ATTGTTAAAAGGGAAACAATTGAAGTTAGACTTGTATTGTTAGTTCAACCTTTTTTTTTAAAGGGAGTATTCTGATGATTAACA
GACCAACATCAACTTTTGAGTGTGGAGAAGGGTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGATTGTGTTATAGTCCTGAGCTTTGAT
ACAATGCTTAAGGTTGAGGATTGCAGTAAGCCTCTTTTTTTTTTTGGGGGAAACA

ราสนิมถั่วเหลือง

เชื้อราสาเหตุ

Phakopsora pachyrhizi Syd. & P. Syd., Annales Mycologici 12 (2): 108 (1914)

Synonymy:

≡ *Physopella pachyrhizi* (Syd. & P. Syd.) Azbukina, Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii 7:
224 (1970)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Phakopsoraceae
Genus	<i>Phakopsora</i>
Species	<i>pachyrhizi</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วเหลือง

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมา
ตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผล
สนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ (Figure 6) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ ไม่พบการสร้าง pycnia หรือ aecia แต่พบ uredia ใต้ใบขนาดประมาณ 0.4 mm ภายในพบ
paraphyses ลักษณะโค้ง สีใส ขนาดยาว 25-45 µm ปลายยอหนา 8-13 µm peridium อยู่รวมเป็นกลุ่ม มี
ผนังเซลล์หนาขนาด 10-15 x 8-12 µm urediospores รูปร่างแบบ globose ถึง subglobose หรือบางครั้งพบ
ลักษณะแบบ ellipsoid มีสีส้ม ไม่ค่อยพบ germ pores มีขนาด 20-28 x 18-22 µm ส่วนใหญ่พบแต่
urediospores ไม่ค่อยพบการสร้าง teliospores บนถั่วเหลือง

พืชอาศัย ถั่วเหลือง (*Glycine max*)



Figure 6 Rust disease symptom on *Glycine max*

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAAAAAGCTAAAGAGTGCACTTTATTGTGGC
TCAAAACTAACTTTTTAATAAACCCATTTAATTGGCTCATTGATTGATAAGATCTTTGGGCAATGGTAGCTTTGAAAAAGCT
GCAACCCACCTATTAATCATAATCTTTTTTTTTTTAACTCAAAGTCAAATAGAATGTTTTATAAAATTTAAATATATATAACT
TTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAATTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGA
ATCATCAAGTTTTTTGAACGCACCTTGACCTTTTGGTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCTCAACA
TTATTTCTTTTTTTAAAGGGAAATTGTTGGATTTTGAGTGTTGCTGTTGCTTTTTTTTGCAGCTCACTTTAAATAAATAAATA
TATATAAGTTTTTCAGTATATTTTGATGTAATAATAAAATCATTTTCATCAAAAAATAAATATATGTGAGATTTATTATAACATTA
ATTGAATGTAAATTTTTTTTTTAAGACCTCAAATCAGGTGAGACTACCCACTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
```

Small Subunit (SSU)

```
GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTTATTTGATGATACCTTACTACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACA
TGCTGAAAAACCTAACCTTTTGGAAAGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGGCCCTCGGGTCTCTTTGGTGATTCATA
ATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTTGTGCTGGTGTGCTTCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA
```

GGCCTACCATGGTGATGACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGAGGGCCTGAGAAACGGCCCTCAAATCTAA
GGATTGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGTATGGCTCTTTTGGGT
CTTACAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCTCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT
CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGACGTTAAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGTCTCTGGCAGTTGGTCCGCCATT
TGGTGTGTACTGATTTGTTGGAGGCTTACCTCTTGGTGAGCCTCAATGCACTTTACTGGGTGTTGAGGGGAACCAGGATTTTT
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTATTGCCTGAATACATTAGCATGGAATAATAAAAATAGGACGTGTGATCCTA
TTTTGTTGGTTTCTAGGATTACCGTAATGATTAATAGGGTCAGTTGGGGCATTGTATTACATCGTCAGAGGTGAAATTTCTT
GGATTGATGTAAGACAACTACTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGACTTCATTGATCAAGAACGAAGGTTAAGGGTTCAAAAA
CGATCAGATACCGTTGTAGTCTTAACAGTAACTATGCCGACTGGGGATCAGACAAGGATTTATAATGACTTGTTTGGCACCC
AAAGGGAAACCTGAAGTTTAGGTTCTGGGGGAGTACGGTCACAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGTGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACACAGTAAGGATTGACAGATTGATA
GCTCTTTCGTGATTTTGTGGTTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAAC
GAGACCTTCTCCTGCTAAATAGTCCAGCTGGCTACGGCTGGCTGCTGACTTCTTAGAGGGACTATCAACGTTTAGTTGATGGA
AGTTGGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACCAGGCCAGCGAGTATA
TCACCTTATCTGAAAAGATTGGGTAATCTTGGGAAACCTGGTCGTGATGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA
GGAATACCTAGTAAGCGTATGTCATCAGCATGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCCCGCTCGCTACTACCGAT
TGGATGGCTTAGTGAGGCGTTCGGAGAGCCTATAAGGAGCTGGCAACAGCAC

ราสนิมข้าวโพดหวาน

เชื้อราสาเหตุ

Puccinia sorghi Schwein., Transac. of the American Philosophical Society 4 (2): 295

Synonymy:

≡ *Dicaeoma sorghi* (Schwein.) Kuntze, Revisio generum plantarum 3 (2): 1-576 (1898)

= *Puccinia maydis* Berenger, Atti Rin. sc. ital. Milano: 475 (1844)

= *Puccinia zae* Berenger, Herb. Viv. Mycol. Suppl. no. 18: no. 18 (1851)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	<i>Puccinia</i>
Species	<i>sorghi</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบโพดหวาน

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมาตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วไป ส่วนใหญ่จะพบบนผิวใบ(Figure 7) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ ไม่พบการสร้าง pycnia หรือ aecia แต่พบ uredia บนผิวใบเป็นจำนวนมาก สร้างตามแนวยาวของใบ เมื่อ uredia แตกหรือเปิด ภายในมี urediospores สีน้ำตาลทองจำนวนมากมีขนาด (22-)23-31(-33) x (20-)21-28 รูปร่างแบบ globose ถึง short-ellipsoid ผนังด้านนอกหนา 1.3-2.3 μm สีเหลืองทอง ด้านนอกสีเข้มน้ำตาลเหลือง ผนังด้านในหนา 2.0-3.3 μm มี germ pores จำนวน 3 หรือ 3-4((-5)) บริเวณกึ่งกลางสปอร์

พืชอาศัย ข้าวโพด (*Zea mays* L.)



Figure 7 Rust disease symptom on *Zea mays*

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GCACTTAATTGTGGCTCGACCCCTTTTAAACTCACCCCAAACCTTTCAAAGACTCTTTTGCATGGTTTGTAAACAAATCATTGCA
CCTGAGTAAAAGTAACATTCTTGATTGAATGTTACATTACCCACCCCTTTTATTTTTCCAAAACCTTTTTTTTTACACATACAC
ACAAGTTTAAAAGAATGTAAACAACCACCTTTAATTATAAAATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAA
GAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCCTTTTGG
TATTTCCAAAAGGCACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAACCCTCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGA
GTGCTGCTGTGTTACACATAGCTCACTTTAAATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTG
ATGTGTAATAATTTTTTTTTCATCACATTGAGGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTTGTTGTTGAGATAGAGAC
TACTAAACAAAACAAATTTAAAATTTAAGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Large Subunit (LSU)

ATGAAACCCTCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGAGTGTGCTGTGTTACACATAGCTCACTTTA
AATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTGATGTGTAATAATTTTTTTTTCATCACATTGA
GGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTTGTTGTTGAGATAGAGACTACTAAACAAAACAAATTTAAAATTTAAGACCT
CAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAAGGATTCACCCAGTAACG
GCGAGTGAAGAGGGAAAAGCCCAAATTTGTAATCTGACTCTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTTGAGAACTGTTTTAGTGTCT
GGACCATGTATAAGTCTGTTGAAAAGCAGCATCATTGAGGGTGATAATCCCGTTTATGATATGGACTACCAGTGCATTATGAT
ACAGTCTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATATAGGTGAGAGA
CCGATAGCAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTGCCTGAAATTTGTTAAAAGGG
AAACAATTGAAGTTAGACTTGTATTATTAGTTCAACCTTTTTGGAGTATTCTAATGATTAACAGACCAACATCAATTTTTGAG
TGTTGGAGAAGGGTTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGACTGTGTTATAGTCCTGAGCTTTGATACAATGCTTAAGATTGAGGA
AGGCAGTAAGCGCATGTTGTGTGTGTGGAACAACTAATGTTCTTCTTACTGAGGATGTTGGTGAATAGCTTTAAATGACCC
GTCTTGAACACCGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTATTTGGGTGCTTGAAACCCTTATGCGTAATGAAAGTAAATGT
AAATGGGATCTGTTAAAAGTGCACCATTTGACCAGTCCAGATTATTTATATGATGGTACTGAGTAAGAGCAAGTATGTTGGGAC
CCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAAAGCTCGTAGCGGTTCTGACGTGCAAA

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิมจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยา แพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของราสนิม จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae* *Puccinia horiana* *Hemileia vastatrix* *Uromyces appendiculatus* *Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10.2 สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

12. เอกสารอ้างอิง

เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อุวานิชย์ ญัฐกฤติ พิทักษ์ วลลิกา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทรมพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ ฯ. 147 หน้า

ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2547. *โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด*. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่ ปี 2547 พิมพ์ครั้งที่ 2 สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ. 69 หน้า

ธนากร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศิณาฏ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ ฯ. 180 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิ์รงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. *ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

วิจัย รักรักษาศาสตร์. 2546. *ราวิทยาเบื้องต้น*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-122.

Beenken, L., S. Zoller and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.

Bennett, C., M.C. Aime and G. Newcombe. 2011. Molecular and pathogenic variation within *Melampsora* on *Salix* in western North America reveals numerous cryptic species. *Mycologia* 103: 1004-1018.

- Cline, E.T., D.F. Farr, A.Y. Rossman, M.E. Palm and E.B. McCray. 2013. *Fungal Nomenclature Database, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. ARS, USDA. (Online). Available. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/nomen/Nomenclature.cfm>. (March, 2013).
- Cräutlein, M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen and J. Rikkinen. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers Conserv* 20: 373-389.
- Cummins, G.B. and Y. Hiratsuka. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. St. Paul, Minnesota: APS, Press. 223 p.
- Cunningham, G.H. 1931. *The Rust Fungi of New Zealand: together with the biology cytology and therapeutics of the Uredinales*. Dunedin, New Zealand: Printed privately by J. McIndos. 261 p.
- Dixon, L.J., L.A. Castlebury, C.A. Aime, N.C. Glynn and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44:25-30.
- Eckardt, N.A. 2006. Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 1-3.
- Engkhaninun, J., S. Chatasiri, C. To-anun, N. Visarathanonth, M. Kakishima and Y. Ono. 2005. New geographical distribution and host records of rust fungi from northern Thailand. *Mycoscience* 46: 137-142.
- Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Giatgong, P. 1980. *Host index of plant diseases in Thailand*. 2nd edn. Department of Agriculture, Ministry of Agricultural Cooperative, Thailand. 124 p.
- Gjaerum, H.B. 1995. Rust fungi from various countries. *Lidia* 3: 145–170.
- Kakishima, M., P. Lohsomboon, Y. Ono, L. Manoch and V. Nippon. 1988. *Newinia thailana*, a new rust fungus from Thailand. *Mycologia* 80: 397-400.

- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Kirk, P.M., P.E. Cannon, J.C. David and J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of The Fungi*. Egham, UK: CABI Bioscience. 655 pp.
- Kolmer, J.A., M.E. Ordonez and J.V. Groth. 2009. *The Rust Fungi*. (Online). Available. <https://pdfs.semanticscholar.org/e98d/72543aa518854295b26e576df3f24b287250.pdf>. (February 1, 2019)
- Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Apply Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- Lohsomboon, P., Kakishima, M., Ono, Y., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988. Materials for the rust flora in Thailand III. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 29: 225-234.
- Lohsomboon, P., L. Manoch and N. Visarathanonth. 1992. The rust fungi of Thailand 1.on Graminicolous plants. *Kasetsart Journal: Natural Science* 26: 244-256.
- Lohsomboon, P., L. Manoch, N. Visarathanonth, M. Kakishima, Y. Ono and S. Sato. 1986. Materials for the rust flora in Thailand II. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 27: 271-281.
- Lohsomboon, P., M. Kakishima and Y. Ono. 1994. A monograph of *Sphaerophragmium* (Uredinales). *Mycological Research* 98: 907-919.
- Lorsuwan, C., S. Tontyaporn, N. Virasathanonth, L. Manoch and M. Kakishima. 1984. Materials for the rust flora in Thailand I. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 25: 57-65.
- Minnis, A.M., A.R. McTaggart, A.Y. Rossman and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.
- Ono, Y. and M.C. Aime. 2006. Recent advances in rust systematics. *Mycoscience* 47: 111.
- Ono, Y., M. Kakishima, P. Lohsomboon, L. Manoch and N. Visarathanonth. 1988a. Two new species of Uredinales from Thailand. *Mycologia* 80: 261-263.

- Ono, Y., M. Kakishima, P. Lohsomboon, S. Sato, L. Manoch and N. Visarathanonth. 1988b. Two rust fungi with pseudosuprastomatal sori collected in Thailand. *Transaction British Mycological Society* 91: 467–472.
- Petersen, R.H. 1974. The Rust Fungus Life Cycle. *Botanical Review* 40:453-513.
- Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.
- Shivas, R.G. and K. D. Hyde. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics, pp. 47-56. In : KD Hyde., ed. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong: Hong Kong University Press.
- Swann, E.C., E.M. Frieders and D.J. McLaughlin. 2001. Urediniomycetes. pp. 37-55. In : D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin and P.A. Lemke., eds. *The Mycota*. Verlag, Berlin: Springer.
- Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.
- Webster, J. and W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. New York: Cambridge University Press. 841 p.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In : M Innis, D Gelfand, J Shinsky and T White., eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- Yun, Y.H., A.M. Minnis, Y.H. Kim, L.A. Castlebury and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommeella* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.