



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
ปริญญา

โรคพืช

สาขา

โรคพืช

ภาควิชา

เรื่อง

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์

Study on Genetic Variability of Corn Rust Fungi on Kasetsart Inbred Line

นามผู้วิจัย นางสาวปัทมา จันทรเรือง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์จินตนา อันอาดมั่งาม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อาร์ม อันอาดมั่งาม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี้ สงประยูร, Ph.D.

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์

Study on Genetic Variability of Corn Rust Fungi on Kasetsart Inbred Line

โดย

นางสาวปัทมา จันทรเรือง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัทมา จันทรเรือง 2555: การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์
แท่งเกษตรศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์จินตนา อันอาดมงาม, Ph.D. 110 หน้า

โรคราสนิมข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* (southern rust) เป็นปัญหาสำคัญสำหรับการ
ผลิตข้าวโพดในประเทศไทย เชื้อรา *P. polysora* สามารถแพร่กระจายได้ดีโดยลมทั้งภายในพื้นที่แปลงปลูกและ
ระหว่างพื้นที่แปลงปลูกข้าวโพด ปัจจุบันมีการพัฒนาพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ด้านทานโรคและส่งเสริมให้
เกษตรกรปลูกเพื่อเพิ่มจำนวนการผลิต วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อ 1) ประเมินความผันแปรทางพันธุกรรม
ของประชากรเชื้อรา *P. polysora* ที่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของประเทศไทยและบนข้าวโพดสาย
พันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน 2) สืบสวนจำนวนจีโน
ไทป์ของเชื้อรา *P. polysora* ที่เข้าทำลายข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่ที่
มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน การศึกษาความผันแปรและความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. polysora*
ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค inter simple sequence repeat (ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ
GAG(TCG)₅, GAG(CGA)₅, (CGA)₅, (GTC)₅ และ (CAG)₅ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 38 แถบ เมื่อ
นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป
โดยวิธีของ Nei พบว่า มีความแตกต่างระหว่างประชากร ($G_{ST} = 0.513$) อย่างไรก็ตามประชากรที่อยู่ใน
ภูมิศาสตร์เดียวกัน เช่น ประชากรจังหวัดตากและเพชรบูรณ์มีความใกล้ชิดกันมากกว่าประชากรอื่น ซึ่งชี้ให้เห็น
ว่ามีการเคลื่อนย้ายหรืออพยพประชากรเชื้อราระหว่างทั้งสองจังหวัด หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรค
ราสนิมข้าวโพดโดยการปลูกข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา
สงขลาและกาญจนบุรี พบว่า เกิดโรคราสนิมกับข้าวโพดในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลาเท่านั้น แต่
ไม่พบการเกิดโรคในจังหวัดกาญจนบุรี โดยสายพันธุ์ Ki36 และ Ki38 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่พบอาการของโรครา
สนิมในทุกจังหวัดที่ปลูกทดสอบ และสายพันธุ์ Ki25 และ Ki26 เป็นสายพันธุ์ที่แสดงอาการของโรคราสนิม
รุนแรงในจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดสงขลา อย่างไรก็ตามระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวโพดสายพันธุ์
ต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกัน การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสาย
พันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ GAG(TCG)₅,
(AGG)₅ และ (GTG)₅ พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงภายในประชากรของเชื้อราสนิม ($G_{ST} = 0.1348$)
โดยประชากรของเชื้อราสนิมในจังหวัดนครราชสีมามีความใกล้ชิดกับประชากรจังหวัดลำปาง นอกจากนี้การ
วิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ พบว่า มีจีโนไทป์ทั้งหมด 39 แบบ บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่ง
เกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) โดยมีจีโนไทป์ที่พบมากกว่า 1 จังหวัด จำนวน 5 จีโนไทป์ คือ จีโนไทป์ Gen1 Gen14
Gen20 Gen27 และ Gen37 แต่มีเพียง 2 จีโนไทป์ที่พบทั้ง 3 จังหวัด คือ Gen20 และ Gen27 จากผลการทดลอง
แสดงให้เห็นว่ามีการเคลื่อนย้ายของ urediospores ระหว่างจังหวัดที่ทดสอบ

Pattama Janruang 2012: Study on Genetic Variability of Corn Rust Fungi on Kasetsart Inbred Line.
Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology.
Thesis Advisor: Mrs. Jintana Unartgram, Ph.D. 110 pages.

Corn rust disease caused by *Puccinia polysora* (southern rust), is considered as major pathogens in corn production of Thailand. *Puccinia polysora* is the air born pathogen widespread within and among corn field locations. Nowadays, many high yields and resistance varieties were developed and introduced to the farmers in order to increase the production. The objective of this study are 1) to estimate genetically variability of *P. polysora* populations from various location of corn plantation in Thailand and on Kasetsart inbred line (Ki1-Ki52) that were grown in different weather locations. 2) to estimate number of genotype patterns that *P. polysora* populations were grown in different weather locations. Genetic variation and differentiation of *P. polysora* in Thailand was analyzed using inter simple sequence repeat (ISSR) marker with five primers, including GAG(TCG)₅, GAG(CGA)₅, (CGA)₅, (GTC)₅ and (CAG)₅. Thirty-eight polymorphic bands were analyzed using the computer software by Nei's method. The results showed that the genetic differentiation occurred among populations ($G_{ST} = 0.5103$). However, the populations in the same geographical area, Tak and Phetchabun were closely related genetically more than another population base on Nei's genetic distance, indicating the movement of the fungus between these areas. Then, corn rust disease severity was evaluated on the Kasetsart inbred line (Ki1-Ki52) in Lampang, Nakhonratchasima, Songkhla and Kanchanaburi. The results showed that the rust symptom occurred on mostly of varieties in Lampang, Nakhonratchasima and Songkhla but not in Kanchanaburi. The Ki36 and Ki38 varieties showed that the rust disease free in all evaluated locations. While, the disease severity was found on Ki25 and Ki26 in Nakhon ratchasima and Songkhla. However, the disease severity level was different in each location. Genetic variability of *P. polysora* populations on Kasetsart inbred lines (Ki1-Ki52) was analyzed using ISSR marker with three primers, including (AGG)₅, GAG(TCG)₅ and (GTG)₅ primers. The results showed that there were high genetically differentiated within *P. polysora* populations ($G_{ST} = 0.1348$), the population of *P. polysora* in Nakhonratchasima was closely related to the population in Lampang. Moreover, the analysis of band pattern or genotype showed that there were thirty-nine genotypes occurred on the Kasetsart inbred line (Ki1-Ki52). There were five genotypes that found in more than one province such as Gen1 Gen14 Gen20 Gen27 and Gen37. However, there were two genotypes that occurred in three provinces as Gen20 and Gen27. The results supported that urediospores have to be migrated among these provinces.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภท
บัณฑิตศึกษา ประจำปี 2555

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.จินตนา อันอาดมงาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้
กรุณามอบความรู้ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาและทำ
วิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี ดร.อาร์ม อันอาดมงาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
ดร.ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร.ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สรรเสริญ จำปาทอง จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ
สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์ จังหวัดนครราชสีมา ศูนย์วิจัยพืชไร่
จังหวัดสงขลา สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัด
ลำปาง ที่ให้คำแนะนำและใช้พื้นที่ในการทำการทดลอง

ทำนุขอขอบพระคุณคุณพ่อนะ จันท์เรือง คุณแม่ว่าสนา จันท์เรือง และทุกคนใน
ครอบครัวที่สนับสนุนการศึกษา ให้ใช้พื้นที่ในการทำการทดลอง ตลอดจนเป็นกำลังใจตลอดมา

ปัทมา จันท์เรือง

ตุลาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	90
สรุป	90
ข้อเสนอแนะ	92
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	93
ภาคผนวก	99
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	110

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย	22
2	แสดงช่วงเวลาการทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้	30
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสนิมข้าวโพด	35
4	แสดงระดับความรุนแรง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีการเกิดโรค ราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52	50
5	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i>	68
6	แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	86
7	แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	87
ตารางผนวกที่		
1	แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดลำปางโดยวิธี RCBD	99
2	แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดสงขลาโดยวิธี RCBD	100
3	แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดนครราชสีมาโดยวิธี RCBD	101
4	แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดกาญจนบุรีโดยวิธี RCBD	102
5	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของเชื้อราสนิมข้าวโพด <i>Puccinia polysora</i> จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย	103
6	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของเชื้อราสนิมข้าวโพด <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ของเชื้อราสนิมข้าวโพด	27
2	จำลองแผนผังการปลูกข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์	30
3	ลักษณะอาการของโรคราสนิมข้าวโพด	34
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Uredium และ Urediospore	40
5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i>	43
6	เปอร์เซ็นต์ของ Molecular variance เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Genetic distance of AMOVA	44
7	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อราสนิมข้าวโพด <i>Puccinia polysora</i> โดยวิธี UPGMA	45
8	การกระจายตัวของตัวอย่างทั้ง 8 ประชากรของเชื้อราสนิมข้าวโพด <i>Puccinia polysora</i> โดยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCA)	46
9	อาการของโรคราสนิมข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	59
10	ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดลำปาง	60
11	ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดสงขลา	61
12	ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดนครราชสีมา	62
13	ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดกาญจนบุรี	63
14	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ uredium ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	65
15	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ urediospore ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)	66
16	การกระจายตัวของตัวอย่างเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> จำนวน 106 ไอโซเลต บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 โดยวิธี PCA	67
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ด้วยเทคนิค ISSR	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	เปอร์เซ็นต์ของ Molecular variance เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Genetic distance of AMOVA	80
19	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อราสนิม <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ โดยวิธี UPGMA	81
20	การกระจายตัวของตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพด <i>Puccinia polysora</i> ที่ปลูกทดสอบโรคในจังหวัดนครราชสีมา ลำปางและสงขลา โดยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCoA)	82
21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG) ₃	83
22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ (AGG) ₃	84
23	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม <i>Puccinia polysora</i> บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ (GTG) ₃	85
24	แสดงรูปแบบการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละจังหวัด	88

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ เกษตรศาสตร์

Study on Genetic Variability of Corn Rust Fungi on Kasetsart Inbred Line

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการผลิตข้าวโพดเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ได้แก่ ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวโพดหวาน นักปรับปรุงพันธุ์จึงได้มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้มีคุณภาพและปริมาณตรงตามความต้องการของมนุษย์ และเนื่องจากเกษตรกรรมปลูกพันธุ์ลูกผสมอย่างแพร่หลาย ทำให้ข้าวโพดทั้ง 3 ชนิดนี้ เริ่มมีความอ่อนแอต่อโรค โดยเฉพาะโรคราสนิม (southern rust) ที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* Underw. อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้ตลาดโลกมีความต้องการข้าวโพดในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี เนื่องจากทุกประเทศทั่วโลกประสบปัญหาการขาดแคลนอาหารและเกิดภัยธรรมชาติ หลายประเทศจึงได้มีแนวทางในการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้มากขึ้นและแนวทางในการควบคุมการระบาดของโรค เพื่อให้ผลผลิตเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ร่วมกับข้าวโพดหวานและข้าวโพดฝักอ่อนก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้ข้าวโพดหวานและข้าวโพดฝักอ่อนมีความต้านทานต่อโรคและทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น เนื่องจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นข้าวโพดที่มีความทนทานได้ดี เหมาะสมที่จะนำมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวโพดที่ดี มีคุณภาพและต้านทานต่อโรค จากความต้องการที่เพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี จึงได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้นทำให้มีการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ติดต่อกันเป็นเวลานานตลอดทั้งปี ดังนั้นจึงเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อราสนิมที่สามารถแพร่กระจายได้ดีโดยลม (air born) จึงทำให้เกิดการกระจายของเชื้อราสาเหตุโรคในแหล่งปลูกต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว (Renfro, 1998) และพบว่าพันธุ์ที่นิยมปลูกเริ่มอ่อนแอต่อโรคราสนิม ดังนั้นข้าวโพดจึงได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์โดยภาครัฐและเอกชนอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่ได้รับการพัฒนาเป็นพันธุ์การค้าและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในกลุ่มเกษตรกร จึงทำให้มีพันธุ์การค้าหลากหลายพันธุ์จำหน่ายในท้องตลาดซึ่งปัจจัยนี้อาจส่งผลให้เกิดความผันแปรขึ้นภายในสปีชีส์ของเชื้อรา *P. polysora* ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อรา *P. polysora* ที่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่เรียกว่า Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) นอกจากนี้ได้ประเมินความผันแปรทาง พันธุกรรมและความรุนแรงของเชื้อรา *P. polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ซึ่งข้าวโพดทั้ง 52 สายพันธุ์นี้ยังไม่ได้มีการประเมินระดับความต้านทานโรคราสนิม ทั้งยังเป็นสาย พันธุ์ที่พัฒนาขึ้นมาให้ทั้งภาครัฐและเอกชนใช้ปรับปรุงเป็นพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต่อไป โดยงาน วิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 มาปลูกทดสอบโรคในปลูกใน พื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการวางแผนปรับปรุง พันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคราสนิมและนำข้าวโพดสายพันธุ์แท่งที่ต้านทานโรคราสนิมในแหล่งปลูก ต่าง ๆ ไปพัฒนาหรือปรับปรุงเป็นพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณภาพดีต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อรา *Puccinia polysora* สาเหตุโรคราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยและบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ที่ปลูกในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน
2. สำรวจจำนวนจีโนไทป์ของเชื้อรา *Puccinia polysora* ที่เข้าทำลายข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ที่ปลูกในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน
3. คัดเลือกข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ที่ต้านทานโรคราสนิมในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน

การตรวจเอกสาร

ข้าวโพด

ข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของมนุษย์ รองจากข้าวและข้าวสาลี จัดอยู่ในวงศ์หญ้า (Family Gramineae) วงศ์ย่อย (Subfamily) Panicoideae เผ่า (Tribe) Maydeae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* L. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์และแปรรูปในด้านอุตสาหกรรมกระป๋อง มีถิ่นกำเนิดมาจากแถบตะวันตกซึ่งเป็นเขตร้อน ปัจจุบันปริมาณการปลูกข้าวโพดมีสูงขึ้น เนื่องจากข้าวโพดสามารถปลูกได้ดีในทุกประเทศทั่วโลก สามารถเจริญได้ดีในทุกพื้นที่ แหล่งผลิตข้าวโพดสำคัญ ๆ ของโลก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา รัสเซีย เม็กซิโก แอฟริกาใต้ อาร์เจนตินา ภูมาเนีย ยูโกสลาเวีย อินเดีย อิตาลี ฝรั่งเศส และอินโดนีเซีย สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกได้ทุกภาค จังหวัดที่มีการปลูกมาก คือ เพชรบูรณ์ ลพบุรี นครสวรรค์ สระบุรี พิษณุโลกแพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา ศรีสะเกษ ขอนแก่น สงขลา สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช แม้ว่าข้าวโพดจะเจริญได้ดีในดินแทบทุกชนิด แต่จะเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่สุดในดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำดี ข้าวโพดเป็นพืชวันสั้นทนทานต่อสภาพอากาศได้ดีและใช้น้ำค่อนข้างน้อย (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ, 2554) ข้าวโพดที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายชนิดและมีการจัดจำแนกได้หลายแบบ เช่น การจำแนกตามลักษณะของเมล็ด โดยอาศัยตำแหน่งการสร้างแป้งที่อยู่ในเอนโดสเปิร์มของเมล็ด (วันชัย, 2542) สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. ข้าวโพดหัวนูน (dent corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays indentata* ตอนบนของเมล็ดมีรอยยุบหรือรอยนูนสีขาว เป็นแป้งชนิดอ่อน ด้านข้างและด้านล่างของเมล็ดเป็นแป้งชนิดแข็ง เมื่อเมล็ดถูกทำให้แห้งส่วนที่เป็นแป้งชนิดอ่อน (ด้านบน) จะยุบตัว ทำให้เกิดการนูนจึงเรียกข้าวโพดชนิดนี้ว่า ข้าวโพดหัวนูน

2. ข้าวโพดหัวแข็งหรือข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (flint corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays indurata* ส่วนหัวหรือส่วนบนของเมล็ดเป็นแป้งชนิดแข็ง หัวมีลักษณะเรียบ เมื่อเมล็ดถูกทำให้แห้งส่วนหัวจะไม่ยุบ (หัวไม่นูน) และเมล็ดมีลักษณะแข็ง พันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย เช่น พันธุ์ นครสวรรค์ 1 สุวรรณ 1 สุวรรณ 2 สุวรรณ 3 และสุวรรณ 5 เป็นต้น

3. ข้าวโพดหวาน (sweet corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays saccharata* มีน้ำตาลในเมล็ดสูง แต่มีการเปลี่ยนไปเป็นแป้งไม่สมบูรณ์ ทำให้เมล็ดยังมีความหวานคงอยู่ นิยมปลูกเพื่อรับประทานฝักสดเพราะมีรสหวาน ทั้งนี้มีการนำข้าวโพดหวานมาแปรรูปหลายแบบ เช่น ทำเป็นนํ้านมข้าวโพด ซึ่งเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน อายุการเก็บเกี่ยวฝักสดที่รับประทานประมาณ 70 วัน

4. ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน (waxy corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays ceratina* เนื้อเมล็ดเหนียวคล้ายข้าวเหนียว เป็นแป้งชนิดอ่อน โดยความเหนียวที่อยู่ในเนื้อเมล็ดนั้นเนื่องจากมี amylopectin เป็นส่วนประกอบหลัก ฝักสดเมื่อต้มจะมีรสหวานและเหนียว

5. ข้าวโพดคั่ว (pop corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays everta* เป็นแป้งชนิดแข็ง เปลือกหุ้มเมล็ดหนา รูปร่างเมล็ดมี 2 ลักษณะคือ รูปร่างเรียวยาวแหลมคล้ายเมล็ดข้าวและรูปร่างกลม เมื่อนำไปคั่วหรือให้ความร้อน เมล็ดจะแตกบานออก

6. ข้าวโพดแป้ง (flour corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays amylocea* เนื้อเมล็ดเป็นแป้งชนิดอ่อนมาก เมื่อทำให้แห้งจะมีลักษณะเหมือนข้าวโพดหั่วแข็ง แต่ทึบแสง นิยมปลูกในอเมริกาใต้ อเมริกากลางและสหรัฐอเมริกา เป็นอาหารของชาวอินเดียนแดง

7. ข้าวโพดป้า (pod corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays tunicate* ปลูกในแถบอเมริกา กลางและอเมริกาใต้ ซึ่งเป็นถิ่นกำเนิดของข้าวโพด มีเปลือกหุ้มเมล็ดมิดชิดคล้ายเมล็ดหญ้า มีกาบหุ้มฝัก (husk) ลำต้น ฝัก และเมล็ดมีขนาดเล็ก เป็นพืชที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ส่วนใหญ่ปลูกไว้เพื่อใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์

ชนิดของพันธุ์ข้าวโพด โดยแบ่งตามวิธีการสร้างพันธุ์และการผลิตเมล็ดพันธุ์ มี 2 ประเภท คือ พันธุ์ลูกผสมเปิด (open-pollinated variety) และพันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) ซึ่งพันธุ์ทั้ง 2 ประเภทนี้สามารถแบ่งได้ ดังนี้ (สรรรเสริฐ, 2552)

1. พันธุ์ลูกผสม (conventional hybrid) เป็นเมล็ดพันธุ์ชั่วแรก (รุ่นแรก) ที่เก็บได้ เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ตั้งแต่ 2-4 สายพันธุ์ผสมกัน ข้อเด่นของพันธุ์ลูกผสมคือ มีความสามารถในการให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ผสมเปิด ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีและให้ผลผลิตสูง ข้อด้อยของพันธุ์ลูกผสม คือ ไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ทำพันธุ์ได้ เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ของพันธุ์

ลูกผสมที่เก็บไว้ทำพันธุ์จะมีความไม่คงที่ในการให้ผลผลิตในรุ่นต่อไป พันธุ์ลูกผสมมีหลายแบบ ได้แก่ พันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ 2 สายพันธุ์ผสมกัน ซึ่งในประเทศไทยมีการใช้พันธุ์ลูกผสมชนิดนี้มากที่สุด พันธุ์ลูกผสมสามทาง (three ways cross hybrid) เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์ผสมกัน และพันธุ์ลูกผสมคู่ (double cross hybrid) เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ผสมกัน

2. พันธุ์ผสมเปิดหรือพันธุ์ผสมปล่อย เกิดจากการปล่อยให้สายพันธุ์พืชที่ปลูกมีการผสมกันเองโดยธรรมชาติ ซึ่งเป็นการผสมแบบสุ่ม แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและลักษณะอื่น ๆ ที่ดีไว้ ข้อเด่นของพันธุ์ผสมเปิดคือ เมล็ดพันธุ์มีราคาถูกและสามารถเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ต่อได้ มีความสม่ำเสมอในด้านลักษณะต่าง ๆ ดี ข้อด้อยของพันธุ์ผสมเปิด คือ ให้ผลผลิตน้อยกว่าพันธุ์ลูกผสม สายพันธุ์ผสมเปิดที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ สุวรรณ 1 สุวรรณ 2 สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ นครสวรรค์ 1

ข้าวโพดฝักอ่อน

ข้าวโพดฝักอ่อน (Baby corn หรือ Young ear corn) มีการปลูกเพื่อนำไปใช้ในการบริโภคโดยใช้ฝักอ่อน (แกนกลางหรือขัง) ที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์หรือใช้ในขณะที่ยังไม่โผล่ออกมาจากเปลือกหุ้มฝักจนกระทั่งไหมเริ่มโผล่ยาว 1-3 เซนติเมตร สามารถใช้ในการปรุงอาหารโดยตรงและเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ในอดีตพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อนได้พัฒนามาจากพันธุ์ประเภทผสมเปิด (open-pollinated variety) ซึ่งให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำและคุณภาพของฝักไม่สูงเท่าที่ควร ดังนั้นทั้งภาครัฐและเอกชนจึงได้มีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสมขึ้น โดยเริ่มจากการนำสายพันธุ์สุวรรณ 2 (รุ่นที่ 5) พันธุ์รังสิต 1 (รุ่นที่ 3) และสายพันธุ์แท้ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Ki) จำนวน 4 สายพันธุ์มาผสมรวมกันแล้วนำกลุ่มผสมที่ได้ไปทดสอบ พบว่า มีกลุ่มผสมบางกลุ่มให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์สุวรรณ 2 เดิม ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิดถึง 203 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาได้มีการปรับปรุงข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสมสามทาง ซึ่งเกิดจากข้าวโพดสายพันธุ์แท้ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Ki) โดยใช้ชื่อว่า ข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสม มก.3501 (KBTX 3501) เมื่อนำไปปลูกทดสอบ พบว่า ให้ผลผลิตฝักอ่อนเปลือกเปลือก 167 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์สุวรรณ 2 (รุ่นที่ 7) อยู่ 47 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ในปี พ.ศ. 2524 บริษัทเอกชนต่าง ๆ ได้นำพันธุ์ข้าวโพดไร่ที่มีคุณลักษณะต่าง ๆ ดี มาผลิตเป็นข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสม โดยส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกปรากฏว่าผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสม (ข้าวโพดไร่) สูงขึ้น ฝักมีขนาดสม่ำเสมอ เปอร์เซ็นต์ฝักเสียลดน้อยลงทำให้เริ่มมีการผลิตอย่างแพร่หลายเป็นผลให้ปริมาณและมูลค่าการ

ส่งออกข้าวโพดฝักอ่อนบรรจุกระป๋องของไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (ทิพย์, 2545)

ข้าวโพดหวาน

การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวาน เริ่มจากศาสตราจารย์ ดร. บรรเจิด คติการและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ปลูกทดสอบพันธุ์และรวบรวมพันธุ์ โดยใช้ข้าวโพดหวานพันธุ์ Golden Bantam และ Hawaiian Sugar เป็นแหล่งพ่อแม่พันธุ์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2522 ได้มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวานโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จนได้ข้าวโพดหวานพันธุ์ใหม่ขึ้น ชื่อว่า พันธุ์ไทยซูเปอร์สวีทคอมพอสิต 1 DMR ลักษณะพิเศษของพันธุ์นี้ คือ สามารถต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ แต่คุณภาพและการให้สีของเมล็ดไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเป็นพันธุ์ผสมเปิด ในปี พ.ศ. 2531 มีการแนะนำข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวเป็นครั้งแรก คือ พันธุ์ 27127 เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ในปี พ.ศ. 2538 ได้พันธุ์ข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตและคุณภาพในการรับประทานสูง คือ พันธุ์อินทรี 1 หรือ KSSC 332 ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ SSWI 114 และพันธุ์ TSC 1 DMR-S8-8-2-2 (Ksei 306) โดยพันธุ์อินทรี 1 ที่ได้จะให้น้ำหนักฝักปอกเปลือกประมาณ 1,200 กิโลกรัมต่อไร่ ให้ความหวาน 14.7 เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (brix) และมีลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ดี ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวต่อจากเดิม ทำให้ได้พันธุ์ใหม่ขึ้น คือ พันธุ์อินทรี 2 ซึ่งให้ผลผลิตและมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีกว่าพันธุ์อินทรี 1 (เดิม) เนื่องจากใช้สายพันธุ์แท้ Ksei 14004 เป็นสายพันธุ์พ่อ (พัฒนามาจากสายพันธุ์ [(sh2 Syn 29 × KS 1) × Suwan 3 (S) C4]-F₄ โดยสายพันธุ์ KS 1 คือ ข้าวโพดไร่) ซึ่งข้าวโพดไร่สายพันธุ์ที่คัดเลือกมานั้นมีฐานพันธุกรรมที่ดีคือ ให้ผลผลิตสูง เปลือกหุ้มฝักยาวและปิดมิดชิดปรับตัวที่ดีในทุกสภาพแวดล้อม ให้ความหวานสูง รสชาติดี ให้สีที่สม่ำเสมอตลอดทั้งฝัก และใช้สายพันธุ์แท้ SSWI 114 (สายพันธุ์ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นพันธุ์อินทรี 1) เป็นสายพันธุ์แม่ เนื่องจากให้ความหวานสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้แนะนำพันธุ์ข้าวโพดหวาน KSSC 503 ซึ่งมีลักษณะของผลผลิตที่ใกล้เคียงกับพันธุ์อินทรี 2 แต่มีลักษณะของต้นและฝักที่ดีกว่าพันธุ์อินทรี 2 (ปิยะพงษ์, 2548)

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือข้าวโพดไร่

ในปี พ.ศ. 2475 หม่อมเจ้าสิทธิพร กฤดากร อธิบดีอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ได้นำข้าวโพดจากสหรัฐอเมริกา 2 พันธุ์เข้ามาปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้ปลูกเป็นการค้า ได้แก่ พันธุ์ Mexican June (พันธุ์หัวนูปสีขาว) และ พันธุ์ Nicolson Yellow Dent (พันธุ์หัวนูปสีเหลือง) (Sriwatanapongse *et al.*, 1993) ข้าวโพดทั้งสองพันธุ์เจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของไทยได้ดี โดยได้ทำการทดลองปลูกที่ตำบลบางเบิด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และตำบลทับกวาง จังหวัดสระบุรี ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในเวลาต่อมา ทำให้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตเป็นจำนวนมาก ในปี พ.ศ. 2503 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้เริ่มพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดขึ้นภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จนได้ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 จึงมีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เนื่องจากเป็นพันธุ์ดีเป็นสาเหตุให้การผลิตข้าวโพดเพิ่มขึ้นตามลำดับ (สุทัศน์, 2539) ในปี พ.ศ. 2517 ใช้สายพันธุ์ Thai composite#1 ที่มีการคัดเลือกแบบ S_1 recurrent selection เลือกประชากรรุ่นแรกไปผสมกับสายพันธุ์ Philippine DMR 1, 5 (ต้านทานโรคน้ำค้างและทนต่อสภาพแวดล้อม) ประชากรที่ได้จากการผสมนี้จะนำไปผสมกลับ (backcross) กับต้นที่ต้านทานของประชากรรุ่นแรก (พ่อหรือแม่ที่ต้านทาน) ทำเช่นเดิม 3 ครั้ง จนได้พันธุ์ Thai composite 1 DMR BC₁(S) C₂ หรือ สุวรรณ 1 ในปี พ.ศ. 2518 ได้พัฒนาพันธุ์สุวรรณ 2 โดยปรับปรุงจากพันธุ์สุวรรณ 1 ทำให้ในปี พ.ศ. 2529 มีการผลิตข้าวโพดสูงขึ้นจาก 3 ล้านตันเป็น 4.9 ล้านตัน และในปี พ.ศ. 2530 ได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดอย่างต่อเนื่องจนได้ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งได้จากการพัฒนาพันธุ์จากพันธุ์สุวรรณ 1

Sriwatanapongse *et al.* (1993) ทำการพัฒนาข้าวโพดสายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งได้ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ขึ้น โดยปัจจุบันนี้มีข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) หลายสายพันธุ์ที่อยู่ในนามมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และได้มีการเผยแพร่สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ออกสู่ภาครัฐและเอกชน ทั้งในและต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมและใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมต่อไป

โชคชัย และคณะ (2536) ได้พัฒนาข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวที่มีศักยภาพสูงในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในประเทศและส่งออกต่างประเทศ โดยใช้ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ได้แก่ Ki21, Ki32, Ki36, Ki43 และ Ki44 เป็นแหล่งพันธุ์กรรม จากผลการทดสอบ พบว่า ในช่วงระยะเวลา 5 ปี (2531-2535) ทำให้ได้ข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวทั้ง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ 3501, 3502, 3503 และ 3504 ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ Ki32×Ki21,

Ki36×Ki21, Ki43×Ki21 และ Ki44×Ki21 ตามลำดับ โดยพันธุ์ 3501, 3502, 3503 และ 3504 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมเดี่ยว ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์สุวรรณ 3101 (ปกติ) ถึง 8.7%, 8.5%, 10.3% และ 10.1% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมและมีคุณลักษณะบางอย่างที่ดีกว่าพันธุ์อื่น เช่น เปอร์เซ็นต์ดินหักล้มต่ำ ด้านทานโรคทางใบสูง เปลือกหุ้มฝักมิดชิด และมีเปอร์เซ็นต์การหักเน่าต่ำ

Srisawang (1998) ได้พัฒนาข้าวโพดลูกผสม โดยใช้ข้าวโพดสายพันธุ์ Suwan1 และสายพันธุ์แท็กเกษตรศาสตร์ (Ki) เช่น สายพันธุ์ Ki21 และ Ki33 เป็นแหล่งพันธุกรรมในการผสมพันธุ์ข้าวโพด ซึ่งข้าวโพดลูกผสมที่ได้จะถูกเก็บในรุ่นที่ 0, รุ่นที่ 1, รุ่นที่ 3, รุ่นที่ 5, รุ่นที่ 7, รุ่นที่ 9 และรุ่นที่ 11 เพื่อใช้ศึกษาพัฒนาการในการปลูกและขยายพันธุ์ จากผลการทดสอบพบว่า ในสายพันธุ์ Ki21 ให้ผลผลิตสูงกว่าเดิม 4.28 เปอร์เซ็นต์หรือ 34.54 กิโลกรัมต่อไร่ต่อการปลูกขยายพันธุ์หนึ่งรุ่น สายพันธุ์ Ki33 มีผลผลิตสูงกว่าเดิม 6.91 เปอร์เซ็นต์หรือ 27.76 กิโลกรัมต่อไร่ต่อการปลูกขยายพันธุ์หนึ่งรุ่น แต่สำหรับสายพันธุ์ Suwan1 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุดในรุ่นที่ 9 โดยให้ผลผลิต 1,107.63 กิโลกรัมต่อไร่

George *et al.* (2004) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท็กที่มีความสัมพันธ์กับโรคราน้ำค้าง ในการศึกษาที่ใช้ข้าวโพดสายพันธุ์ต่าง ๆ จากเอเชีย แอฟริกา สหรัฐอเมริกาและเยอรมนี สำหรับสายพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทยนั้นได้คัดเลือกข้าวโพดไร่สายพันธุ์แท็กเกษตรศาสตร์ (Ki) 4 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับข้าวโพดสายพันธุ์แท็กพันธุ์อื่น ได้แก่ Ki3, Ki14, Ki44 และ Ki45 โดยใช้เทคนิค simple sequence repeats (SSR) ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน พบว่า ข้าวโพดสายพันธุ์แท็กเกษตรศาสตร์ Ki3 มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท็กเกษตรศาสตร์ (Ki) สายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ ARMP12, ARMP14, ARMP16 และ ARMP21 ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ซึ่งทั้ง 5 สายพันธุ์นี้มียีนจำนวน 10 ตำแหน่งที่เหมือนกันและพบว่ามีเพียงยีน 6 ตำแหน่งที่ทำให้ข้าวโพดสายพันธุ์ดังกล่าวต้านทานต่อโรคและแมลง

สำหรับประเทศไทยมีการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เพื่อเป็นอาหารสัตว์ ในอนาคตประเทศไทยมีความต้องการข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยจะเห็นได้จากข้อมูลการส่งออกในช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2554 มีปริมาณการส่งออก 10.9 ล้านตัน มีมูลค่าการส่งออก 84.3 ล้านบาทและช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2555 มีปริมาณการส่งออก 43.8 ล้านตัน มีมูลค่าการส่งออก

414.5 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก รองลงมาได้แก่ จีน เม็กซิโกบราซิล อาร์เจนตินา อินเดีย สำหรับประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550/2551 เป็นต้นมา มีพื้นที่การเพาะปลูกและผลผลิตข้าวโพดเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงเนื่องจากมีความต้องการใช้เมล็ดข้าวโพดในปริมาณมากขึ้น โดยเฉพาะการทำเป็นอาหารสัตว์ แต่ในปี พ.ศ. 2554 มีอัตราการผลิตและส่งออกลดลง เนื่องจากเกิดภัยธรรมชาติ ในปี พ.ศ. 2555 ปริมาณการผลิตข้าวโพดก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากความต้องการด้านอาหารสัตว์เพิ่มขึ้น ทั้งยังมีการศึกษาหาแหล่งพันธุ์กรรมที่ดีเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดด้วยจากแนวโน้มที่สูงขึ้นเป็นผลให้เกษตรกรเห็นความสำคัญและปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้น แต่ยังพบปัญหาในการผลิตข้าวโพดคือ พันธุ์ที่มีอยู่มีคุณภาพของผลผลิตต่ำและอ่อนแอต่อโรค ซึ่งปัญหาดังกล่าวทำให้ผลผลิตของข้าวโพดลดลงทั้งด้านปริมาณและด้านคุณภาพ เกษตรกรจึงหันมาใช้สารเคมีและใช้พันธุ์ข้าวโพดลูกผสม เพื่อควบคุมปัญหาโรคระบาด

โรคทางใบที่สำคัญของข้าวโพดในประเทศไทย

ประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น เป็นสภาพที่เหมาะสมกับการเกิดโรคอย่างยิ่ง โดยโรคทางใบที่สำคัญของข้าวโพดในประเทศไทยมีหลายสาเหตุดังนี้ สาเหตุของโรคที่เกิดจากเชื้อรา ได้แก่ โรคราน้ำค้าง เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุด เกิดจากเชื้อรา *Peronosclerospora maydis* โรคราสนิม ซึ่งในประเทศไทยเคยมีรายงานว่าพบ 2 ชนิด คือ common rust (*Puccinia sorghi*) และ southern rust (*P. polysora*) แต่ปัจจุบันด้วยข้อมูลการสำรวจใหม่และการศึกษาด้านอนุชีวโมเลกุลพบว่า มีการพบเพียงชนิดเดียว คือ southern rust (Unartngam *et al.*, 2011) โรคใบไหม้แผลใหญ่ (turcicum leaf blight: northern leaf blight) เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium turcicum* (*Exserohilum turcicum*) โรคใบไหม้แผลเล็ก (Maydis leaf blight หรือ southern maize leaf blight) เกิดจากเชื้อรา *H. maydis* (*Bipolaris maydis*) โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata*, *C. pallens* และ *C. maculans* สาเหตุโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โรคใบขีด (Bacterial leaf stripe) เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas rubriligneans* (*P. avenae*) *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรค *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) โรค *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) โดยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนี้มีผลเสียอ่อนเป็นแมลงพาหะทำให้เกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว

โรคราสนิม

โรคราสนิมมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยโรคราสนิมข้าวโพดที่พบในปัจจุบันนี้มี 3 ชนิด คือ common rust (*Puccinia sorghi* Schw.) southern rust (*Puccinia polysora* Underw.) และ tropical rust (*Physopella zea*) (Melching, 1975) สำหรับประเทศไทยเคยมีรายงานการพบ 2 ชนิด คือ southern rust และ common rust แต่ปัจจุบันมีรายงานเพียงชนิดเดียว คือ southern rust (จินตนา และ ปัทมา, 2554) เชื้อราสนิม southern rust เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ มีการสร้างสปอร์แบบ urediniospore (ในบางครั้งเรียกว่า uredospore หรือ urediospore) และสร้างสปอร์แบบ teliospore หรือ teluetospore ในสภาพสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิตหรือให้อยู่ข้ามฤดูได้ พบได้กับทุกส่วนของต้นข้าวโพดเช่น ใบ ลำต้น กาบใบและฝัก โดยแสดงอาการเป็นจุดนูนเล็กๆ มีหลายสี เช่น สีเหลือง สีส้ม สีส้มน้ำตาลแดงหรือสีสนิมเหล็ก แผลจะเกิดจากใบส่วนล่างของต้นขึ้นไปยังใบส่วนบน ในระยะแรกจะพบจุดนูนขนาดเล็ก ต่อมาแผลจะแตกออกทำให้มองเห็นเป็นผงสีสนิมเหล็กขนาดแผ่ขยายใหญ่ขึ้น ในกรณีที่อาการรุนแรงจะทำให้ลำต้นแห้งตายได้ (Raid *et al.*, 1988)

1 Southern rust

เกิดจากเชื้อ *P. polysora* พบครั้งแรกปี 1891 บนต้น grama grass (*Tripsacum dactyloides* L.) ที่เมือง Alabama ประเทศสหรัฐอเมริกา (Underwood, 1897) เจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นสูง อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส พบได้ตั้งแต่ต่ำกว่าระดับ 1220 เมตร (Hee, 2006) ต่อมาพบการระบาดทั่วไปในอเมริกา แอฟริกา เอเชียและออสเตรเลีย แผลมีลักษณะกลมไปจนถึงกลมรี สีเหลือง-สีน้ำตาล สปอร์มีสีเหลือง-เหลืองทอง ลักษณะกลมรี ขนาด $24-41 \times 20-29$ ไมโครเมตร อาการที่พบบ่อยคือส่วนบนใบ ส่วนใต้ใบจะพบแผลน้อยกว่าบนใบ (Cammack, 1959) ในเมือง Maryland ที่เกิดการระบาดของ southern rust อย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตของข้าวโพดลดลง 24-37 เปอร์เซ็นต์ (Melching, 1975) เนื่องจากสปอร์ของเชื้อโรคราสนิมสามารถปลิวไปตามลมได้ ทำให้การแพร่กระจายตัวไปได้ไกล ในกรณีที่สปอร์ตกลงสู่พืชอาศัยหรือผิวพืช เมื่อสปอร์ได้รับความชื้นก็จะงอกและเข้าทำลายพืช ทำให้พืชแสดงอาการของโรคราสนิมได้

Raid *et al.* (1988) ศึกษาลักษณะการแพร่กระจายตัวของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดใน Pennsylvania และ Maryland พบว่า โรคราสนิมที่ปรากฏแสดงอาการที่ใบส่วนล่างของต้นมากกว่า ใบส่วนบนยอด การแสดงอาการจะลดลงตามลำดับที่ใบสูงขึ้นไป ใบส่วนล่างจะมีความหนาแน่นของแผลราสนิมมากกว่าใบส่วนบน การทดสอบในช่วงปี 1983 และ 1984 พบว่า ความเร็วในการแพร่กระจายของสปอร์ราสนิมใน Pennsylvania เป็น 1.6 เมตรต่อวัน และใน Maryland เป็น 9.1 เมตรต่อวัน ทำให้ผลผลิตข้าวโพดลดลง 17.7 และ 39.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าใน Maryland มีความเร็วในการแพร่กระจายสปอร์ราสนิมมากกว่าใน Pennsylvania ทำให้ผลผลิตใน Maryland ลดลงได้มากกว่าใน Pennsylvania สรุปได้ว่าความเร็วในการแพร่กระจายมีผลต่อการลดลงของผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเชื้อรา *P. polysora* สร้าง urediospores ปริมาณมากและแพร่กระจายได้ดีโดยลม อย่างรวดเร็วและแพร่กระจายไปได้ไกล จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อราสนิมมีการระบาดอย่างรุนแรง ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราสนิมข้าวโพดนี้เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมเชื้อราสนิมด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งในเวลาต่อมาทำให้พบเชื้อราอีกชนิดหนึ่งชื่อว่า *Sphaerellopsis* sp. เชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อราสนิม และพบว่าเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดราสนิมของข้าวโพด โดยเกิดเป็นตุ่มสีดำ อยู่ภายในแผลของราสนิม ซึ่งเมื่อเกิดพร้อมกันแล้วจะทำให้ความรุนแรงของโรคราสนิมลดลงได้

Paningbatan *et al.* (2000) ศึกษาชีววิธีในการควบคุมโรคราสนิม *P. polysora* โดยเชื้อ *Sphaerellopsis* sp. หรือ *S. filum* เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ (mycoparasite) ของเชื้อราสนิมข้าวโพด จากการเก็บตัวอย่างราสนิมจำนวน 81 ตัวอย่างในเมือง Visayas และ Mindanao ประเทศฟิลิปปินส์ พบเชื้อ *S. filum* บนใบข้าวโพดเกือบทุกตัวอย่าง (<100%) โดยเชื้อ *S. filum* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ (uredospore) ของเชื้อราสนิมได้ 69-92 เปอร์เซ็นต์ในห้องปฏิบัติการ ลดการเข้าทำลายของเชื้อราสนิมได้ 75-82 เปอร์เซ็นต์ในสภาพโรงเรือน และช่วยลดความรุนแรงได้ 25-46 เปอร์เซ็นต์ในสภาพแปลงปลูก

2 Common rust

เกิดจากเชื้อ *P. sorghi* Schwein. พบครั้งแรกในประเทศบราซิล เชื้อราชนิดนี้ชอบ อุณหภูมิประมาณ 16-23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์สูงและมีดินฝึเลื่อราตรี หรือ Indian park (*Oxalis* sp.) เป็นพืชอาศัยรอง (alternate host) แผล (pustule) มีลักษณะเป็นรูปไข่และรี เป็นคุ่มนูนสีน้ำตาลแดงเป็นทั้งสองด้านของใบ urediniospore รูปร่างค่อนข้างกลม teliospore มีสีเข้ม การแยกความแตกต่างของ common rust กับ southern rust นั้น ส่วนใหญ่จะใช้ประโยชน์ของลักษณะแผลและสปอร์ โดย common rust จะพบแผลนูนถี่ เกิดขึ้นทั้ง 2 ด้านของใบ แผลมีลักษณะกลมไปจนถึงกลมรีรูปไข่ สีเข้ม ส่วน southern rust จะมีแผลสีเข้ม เมื่อเป็น teliospores (White, 2000)

Deadman *et al.* (2006) ศึกษาเชื้อราสนิมข้าวโพด *P. sorghi* ในประเทศโอมาน (รัฐสุลต่านโอมาน) ซึ่งข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศโอมาน ใช้เป็นอาหารสัตว์และบริโภค เชื้อราสนิมที่พบบนใบข้าวโพด แผลมีลักษณะกลม สีแดงไปจนถึงน้ำตาล สปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาด 23-28×20-25 ไมโครเมตร ผิวมีลักษณะไม่เรียบคล้ายหนาม (echinulate) มี 3-4 germ pore ลักษณะของ teliospore มีขนาด 16-19×38-42 ไมโครเมตร และพบระยะ aecial stage บนต้น *Oxalis* sp.

ปัญหาโรคระบาดมีความสำคัญมากในการผลิตข้าวโพดเพื่อให้มีคุณภาพและผลผลิตสูง เนื่องจากการเกิดโรคระบาดเป็นการลดผลผลิตข้าวโพด แนวทางในการแก้ปัญหาด้านโรคระบาดที่ดีควรใช้พันธุ์ต้านทาน (Chávez-Medina *et al.*, 2007) ทั้งยังเป็นการลดการใช้สารเคมี ลดสารตกค้างในธรรมชาติและสภาพแวดล้อม สิ่งสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้ต้านทานต่อโรค คือ การศึกษาโครงสร้างและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชเพื่อ เป็นประโยชน์ในด้านการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดที่มีคุณภาพต่อไปในอนาคต

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการศึกษาความผันแปรของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ตั้งแต่อดีตการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชมีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อรามาจนถึงปัจจุบัน แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวยังคงมีข้อจำกัดในการศึกษาเชิงลึก เนื่องจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (pathogenicity) และสรีรวิทยาของเชื้อรานั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมหรือมีสิ่งมากระตุ้นจากภายนอก แต่ในส่วนของดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมหรือสิ่งกระตุ้นภายนอก ปัจจุบันจึงมีการศึกษาด้านความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราและการศึกษาโครงสร้างประชากร (Population structure) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทำให้หลายประเทศทั่วโลกได้นำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการประเมินสิ่งเหล่านี้ควบคู่ไปกับลักษณะอื่น ๆ

สำหรับการศึกษาด้านอณูชีวโมเลกุลมีการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลด้วยกัน 2 แบบคือ โปรตีนและดีเอ็นเอ โดยทั้งสองแบบนี้มีวิธีการตรวจสอบเหมือนกันคือตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิส สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลประเภทดีเอ็นเอ โดยสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ซึ่งเรียกว่า โพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) หรือ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นการตรวจสอบที่ใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ ในอดีตมีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดสายดีเอ็นเอแล้วแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส แต่ปัจจุบันเทคโนโลยีมีความก้าวหน้าทำให้มีวิธีการหลายแบบที่ใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลได้ ทำให้สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นพื้นฐาน นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค PCR ขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552) ได้แก่ Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ฯลฯ

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอ (arbitrary primer) วิธีการนี้สามารถเรียกได้หลายแบบ เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 หรือมากกว่า 20 นิวคลีโอไทด์, DNA amplification fingerprinting (DAF) ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์

สำหรับโปรแกรมการเพิ่มปริมาณใช้อุณหภูมิเพียง 2 ระดับแทนที่จะเป็น 3 ระดับเหมือน PCR ทั่วไปหรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละแบบอาจแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่ใช้หลักการเดียวกัน แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส เป็นเทคนิคที่ทำงาน รวดเร็ว ให้ข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาก แต่มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ อาจได้ผลที่ต่างไปจากเดิม (สุรินทร์, 2545)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ร่วมกับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นการรวมเอาความ น่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย แล้วตรวจผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส และประสิทธิภาพของเทคนิค PCR เข้าด้วยกัน เทคนิค AFLP เริ่มจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะกับดี เอ็นเอเป้าหมาย แล้วทำการเชื่อมต่อ adapter ของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นเข้ากับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ต่อจากตำแหน่งที่เอนไซม์ตัด โดย adapter เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่ง เป็นปลายเหนียว (sticky end) ผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์และต่อด้วย adapter ก็นำไปเพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้นแบบด้วย เทคนิค PCR จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวนมาก ซึ่งยากต่อการแยกชิ้นส่วนเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงมีเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อคัดเลือกรายงานชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้มี ปริมาณมากขึ้น ก่อนจะนำไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide) ข้อได้เปรียบ ของเทคนิคนี้คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ เป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอได้ หลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมกัน ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวนมาก (polymorphism) สามารถทำซ้ำและให้ผลเหมือนเดิมซ้ำบ่อย คือ ต้องใช้ความชำนาญในการปฏิบัติ เนื่องจากมีหลาย ขั้นตอน (สุรินทร์, 2545; Vos *et al.*, 1995)

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) คล้ายกับ Microsatellite-primed PCR (MP-PCR) โดย MP-PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน ไมโครแซทเทลไลท์ คือ ลักษณะลำดับเบสที่เป็นชุดซ้ำสั้น ๆ เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกัน ที่ตำแหน่งหนึ่งอาจมีลำดับ เบสซ้ำยาวต่อเนื่องกันได้หลายร้อยคู่เบส อาจมีจำนวนซ้ำเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ มีชื่อเรียกว่า SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ STR (Short Tandem Repeat) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการ ข่มร่วมกัน (Codominance marker) คือ สามารถแสดงออกให้เห็นความแตกต่างระหว่างโฮโมไซ

โกดและเฮเทอโลไซโกตได้ ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ เช่น (CA)₁₀ (GAT)₇ ฯลฯ ซึ่งใช้เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา โดยใช้ไพรเมอร์เพียง 1 ชนิดเท่านั้น ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากลำดับเบสที่เป็นชุดซ้ำ (ไมโครแซทเทลไลต์) กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมและมีบางตำแหน่งอยู่ใกล้กัน ไพรเมอร์ที่ใช้จึงสามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ทั้ง 2 ทิศทาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบางตำแหน่งที่มีความยาวของลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มาก ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาจจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบไม่แน่นอน ทำให้ผลผลิตของ PCR ที่ได้มีความยาวไม่สม่ำเสมอ จึงมีการประยุกต์โดยเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 5' หรือ 3' ของไพรเมอร์ จำนวน 1-3 เบส เพื่อช่วยให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นไปอย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ทำให้ผลผลิต PCR มีความยาวสม่ำเสมอและสามารถแยกความแตกต่างของจำนวนชุดซ้ำที่ตำแหน่งไพรเมอร์จับได้ สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ ISSR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบข่มสมบูรณ์ (dominate marker) นอกจากนี้ยังเป็นการตรวจสอบยีนครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน (สุรินทร์, 2545) แม้ว่าจะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แต่สามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ โดยการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 5' และ 3' ของไพรเมอร์ ข้อดีของการใช้เทคนิค ISSR คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ให้แถบดีเอ็นเอค่อนข้างสูง (polymorphism) ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิค RFLP มีความน่าเชื่อถือสูงกว่าเทคนิค RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) และใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่เหมาะสมในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและพันธุศาสตร์ประชากร (Rabet, 2009) โดยเฉพาะกับเชื้อราสนิมที่มีข้อจำกัดเรื่องปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ประเภท obligate parasite ไม่สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารสังเคราะห์ได้

Villaréal *et al.* (2002) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิม *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* โดยเก็บตัวอย่างโรค stripe rust จาก 4 แปลง ทางตอนเหนือของประเทศฝรั่งเศสจำนวน 247 ตัวอย่าง มาศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) โดยใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ตัวอย่างจำนวน 147 ตัวอย่างมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับความรุนแรง (v17) ซึ่งมีเพียงหนึ่งหรือสอง pathotypes เท่านั้นที่พบในแต่ละแปลง สอดคล้องกับยีนต้านทาน (Yr17) โดยโพลิมอร์ฟิซึมที่พบมี 67 loci และคิดเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง จากการวิเคราะห์รูปแบบของโพลิมอร์ฟิซึมที่คล้ายกันทำให้สามารถแบ่งได้เป็น 12 กลุ่ม

Gouveia *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิม *Hemileia vastatrix* โดยใช้เทคนิค RAPD โดยเชื้อรา *H. vastatrix* เป็นสาเหตุโรคราสนิมของกาแฟและทำความเสียหายให้กับต้นกาแฟเป็นอย่างมาก ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง การเก็บตัวอย่างเชื้อราสนิมกาแฟจำนวน 45 ตัวอย่างซึ่งมาจากหลายภูมิภาคเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมกาแฟด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์ จากผลการศึกษาพบว่า ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 35 แถบ หรือคิดเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมของเชื้อราสนิมที่พบในแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาได้ คิดเป็น 0.865 0.768 และ 0.266 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มประชากรของอเมริกาได้ พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *H. vastatrix* ค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่า มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการดำรงชีวิตและการแพร่ระบาดของเชื้อรา จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พืชที่ต้านทานต่อไปได้

Dracatos *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของโรค crown rust (*P. coronate*) บนข้าวไรท์ (ryegrass) ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนไมโครแซทเทลไลต์ ด้วย EST-SSR marker โดยเก็บตัวอย่างมาจาก 4 ประเทศ คือ ประเทศอังกฤษ นิวซีแลนด์ ญี่ปุ่นและออสเตรเลีย ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์(PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 4 ชนิด (PCESTSSRB01E14, PCESTSSRB01L19, PCESTSSRB01B10 และ PCESTSSRB01F04) พบว่า เชื้อราชนิดนี้มีความหลากหลายทั้งในและระหว่างกลุ่มประชากรของแต่ละประเทศ ทั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการใช้ EST-SSR markers สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ได้กับ *Puccinia* สปีชีส์อื่นและเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota (cross-amplification)

Zhong-dong *et al.* (2006) ศึกษาความแตกต่างของเชื้อรา *Melampsora larici-populina* สาเหตุโรคราสนิมของต้น poplar ในประเทศจีนเปรียบเทียบกับยุโรป ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่าพบเชื้อรา *M. larici-populina* อยู่ 5 สายพันธุ์ (race) ในประเทศยุโรป อเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย และจีน เมื่อจำแนกโดยใช้การก่อโรคบนต้นพืชพบว่า ไม่สามารถจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ การทดลองจึงได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ inter simple sequence repeat (ISSR) เปรียบเทียบกับ inter translation space (ITS) พบว่า จากการศึกษาลำดับเบสในส่วน of inter translation space (ITS) ไม่สามารถแยกกลุ่มของสายพันธุ์ (race) เชื้อรา *M. larici-populina* ได้กล่าวคือ เมื่อจัดกลุ่มแล้วอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ inter simple sequence repeat (ISSR) สามารถแยกกลุ่มของสายพันธุ์ (race) ได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 (ISSR1) ได้แก่ สายพันธุ์ C1 และ C3 กลุ่ม 2 (ISSR2) ได้แก่ สายพันธุ์ C1, C4 และ C5 กลุ่ม 3 (ISSR3) ได้แก่ สายพันธุ์ C4 กลุ่ม 4 (ISSR4) ได้แก่ สาย

พันธุ์ C2 กลุ่ม 5 (ISSR5) ได้แก่ สายพันธุ์ C4 และ กลุ่ม 6 (ISSR6) ได้แก่ สายพันธุ์ C3

Unartngam *et al.* (2011) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Puccinia polysora* สาเหตุของโรคราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR-ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ได้แก่ GAG(TCG)₅, GAG(CGA)₅, (CGA)₅, (GTC)₅ และ (CAG)₅ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 38 แถบ จากตัวอย่างจำนวน 38 ตัวอย่าง เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) มาสร้างความสัมพันธ์แบบ dendrogram โดยวิธี UPGMA พบว่า แบ่งได้เป็น 13 กลุ่ม ที่สัมพันธ์ความเหมือน 75% ของ Dice และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.826 โดยพบตัวอย่างที่มาจากจังหวัดที่ต่างกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนว่ามีการอพยพหรือเคลื่อนย้ายของสปอร์เชื้อราสนิมจากจังหวัดหนึ่ง ไปอีกจังหวัดหนึ่ง

การศึกษาโครงสร้างประชากร

ประชากร (population) คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่อยู่อาศัยอยู่ในบริเวณหนึ่ง ในช่วงเวลาหนึ่ง มีการผสมพันธุ์กันระหว่างสมาชิกในกลุ่มประชากร ดังนั้นจึงมียีนควบคุมลักษณะหนึ่ง ๆ หลายรูปแบบ (allelic form) และความถี่ของยีนแต่ละแอลลีลอาจเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา จึงมีการศึกษาถึงอิทธิพลที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมหรือความถี่ของยีนและความถี่ของจีโนไทป์ในประชากร ซึ่งเรียกว่า พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ในบางครั้งยีนอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้แก่ การถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรที่อยู่ต่างพื้นที่ การกลายพันธุ์ (mutation) การอพยพ (migration) การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (selection) และการสูญหายของความถี่ยีนบางยีน (gene drift) ทำให้รูปแบบของแอลลีลมีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างออกมาให้เห็น เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในด้านวิวัฒนาการ ความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะต่าง ๆ และก่อเกิดสายพันธุ์ใหม่ได้นำไปสู่การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากร รวมทั้งการดูแลควบคุมบางประชากรที่เพิ่มอย่างไม่จำกัด ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการทำนายและหาทางควบคุมโรคระบาด

ในธรรมชาติประชากรมีขนาดไม่เท่ากัน บางกลุ่มประชากรไม่เป็นไปตามสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) เช่น สิ่งมีชีวิตที่มีการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ การคัดเลือกของยีนที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ โดยธรรมชาติหรือการผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) แต่ส่วนใหญ่ประชากรของสิ่งมีชีวิตมีการผสมแบบสุ่มคือ เพศผู้และเพศเมียทุกจีโนไทป์มีโอกาสผสมพันธุ์กันได้เท่า ๆ กัน ทำให้การกระจายตัวของแอลลีลเป็นปกติตามกฎของเมนเดลและเป็นตามสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) คือ ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ที่มีรูปแบบแอลลีล 2 แบบ ให้สัญลักษณ์เป็น A และ a มีจีโนไทป์ 3 แบบ คือ AA Aa และ aa ความถี่ของแอลลีลเด่น A ให้แทนด้วย p และความถี่ของแอลลีลด้อย a แทนด้วย q ผลรวมความถี่ของแอลลีลทั้งหมดที่ตำแหน่งนี้เท่ากับ 1 ยกตัวอย่างเช่น หนูในเขตตะวันตกมีแอลลีลเด่นที่เป็นโฮโมไซโกตแบบ AA และให้หนูในเขตตะวันออกมีแอลลีลด้อยที่เป็นโฮโมไซโกตแบบ aa ซึ่งทำให้หนูในเขตตะวันตกมีความถี่แอลลีล AA Aa และ aa เป็น 1 0 0 ตามลำดับ ในขณะที่หนูในเขตตะวันออกจะมีความถี่แอลลีล AA Aa และ aa เป็น 0 0 1 ตามลำดับ แต่เมื่อหนูทั้งสองเขตออกมาหาอาหารในเขตภาคกลางและเกิดการผสมพันธุ์กันตามธรรมชาติ ผลที่ได้จะเป็นไปตามสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก หนูในเขตภาคกลางจะมีจีโนไทป์แบบ Aa ขึ้น ทำให้ความถี่ของยีนจากเดิม AA/aa เท่ากับ 0.5/0.5 เปลี่ยนไป ดังสมการ

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

จะเห็นได้ว่า ค่าที่มีการเปลี่ยนแปลง คือ ค่าของเฮเทอโรไซโกต จึงมีการศึกษาค่าเฉลี่ยของเฮเทอโรไซโกตเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งมีหลายค่าในการศึกษา เช่น H_s คือ ค่าเฉลี่ยของเฮเทอโรไซโกตระหว่างประชากรย่อย H_r คือ ค่าเฉลี่ยของเฮเทอโรไซโกตระหว่างประชากรย่อยในเขตพื้นที่ที่ประชากรย่อยอาศัยอยู่ H_T คือ ค่าเฉลี่ยของเฮเทอโรไซโกตระหว่างประชากรในทุกเขตพื้นที่ที่ประชากรย่อยอาศัยอยู่ เมื่อทุกค่าอยู่ภายใต้สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก โดยประชากรย่อยมีการผสมแบบสุ่ม (Hartl and Clark, 2007)

การคำนวณความแตกต่างของยีนโดยวิธี Nei เป็นวิธีที่ไม่คำนึงถึงขนาดของประชากรว่าจะมีขนาดใหญ่หรือเล็ก ดังสมการ

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

โดยที่ H_S คือ ค่าเฉลี่ยของประชากรย่อยที่เป็นเฮเทอโรไซโกตภายใต้สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก และ H_T คือ $1 - \sum \bar{P_i}^2$ ของจำนวนแอลลีลทั้งหมด โดยค่า G_{ST} คือ ค่าที่ใช้วัดความแตกต่างระหว่างประชากรย่อย โดยจะมีค่าสูงหรือต่ำขึ้นกับความผันแปรภายในประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด สามารถเขียนได้ดังสมการ

$$G_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} < 1 - H_S$$

โดยที่ $1 - H_S$ คือ ค่าเฉลี่ยภายในประชากรที่เป็นโฮโมไซโกต จากสมการข้างต้นทำให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนว่าค่าที่ได้จะไม่เกินไปกว่าระดับของโฮโมไซโกตและปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดด้านวิวัฒนาการคือ ปริมาณและรูปแบบของความผันแปร ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาก จะทำให้ระดับของโฮโมไซโกตลดลงและทำให้ค่า G_{ST} ที่สูงสุดลดลงตามไปด้วย การหาค่า gene diversity (h) หรือ H ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับนิยาม โดยคำนวณได้จากสูตร

$$h = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

โดย P_i คือ ความถี่ของแอลลีล (i) ในแต่ละประชากร มีค่าตั้งแต่ 0-1 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากร โดยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA) หรือ Φ_{PT}

$$\Phi_{PT} = \frac{V_{AP}}{V_{AP} + V_{WP}}$$

โดย V_{AP} คือ ความแปรปรวนระหว่างประชากร V_{WP} คือ ความแปรปรวนภายในประชากร เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวอย่างว่ามีความน้อยเท่าไรและแสดงถึงความแตกต่างทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยปกติถ้า $\Phi_{PT} = 0$ แสดงว่าไม่มีความผันแปรคือ มีจีโนไทป์เหมือนกัน (Peakall and Smouse, 2010)

Ordoñez *et al.* (2010) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อรา *Puccinia triticina* ในอเมริกาใต้เปรียบเทียบกับอเมริกาเหนือ เพื่อหาบรรพบุรุษและดูการอพยพเคลื่อนย้ายระหว่างสองทวีป เก็บตัวอย่างเชื้อ *P. triticina* บนข้าวสาลีจำนวน 130 ตัวอย่าง จากประเทศอาเจนตินา บราซิล ชิลี เปรูและอุรุกวัย มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและความรุนแรงโดยใช้เทคนิค

Simple Sequence Repeat (SSR) ด้วย 23 ไพรเมอร์ พบว่า การแสดง Principal coordinate analysis plots แบ่งได้เป็น 5 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยที่อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้เป็นจุดกำเนิด (origin) ของเชื้อรา *P. triticina* นอกจากนี้เทคนิค SSR ยังทำให้พบหลายฟีโนไทป์ (virulence phenotypes) ที่เหมือนกันทั้งในอเมริกาและอูรุกวัย ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการอพยพของเชื้อรา *P. triticina* จากเม็กซิโกไปยังอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้

ในปัจจุบันนี้มีการศึกษาทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลกันอย่างกว้างขวางทั้งในมนุษย์ สัตว์ พืชและเชื้อโรค เพื่อแก้ปัญหาทางด้านการจัดจำแนกกลุ่มที่ยังไม่ชัดเจน ความหลากหลายทางพันธุกรรม การควบคุมโรคและการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชด้านทานซึ่งการระบาดของโรคราสนิมข้าวโพดนั้นเกิดจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น การใช้ข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม การใช้สารเคมีหรือแม้กระทั่งการที่สภาพแวดล้อมและสภาพอากาศเปลี่ยนไป ส่งผลให้เชื้อราสนิมในธรรมชาติมีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ดังนั้นการป้องกันหรือการควบคุมการระบาดของเชื้อราสนิมข้าวโพดจึงมุ่งเน้นไปที่พันธุ์ด้านทานและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ความต้านทานมีประสิทธิภาพสูงสุด จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทราบถึงโครงสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร (Genetic structure and genetic variability) เชื้อราสนิมที่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวโพดที่มีภูมิประเทศแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่มีความผันแปรและผลิตพันธุ์ข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพสูงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจาก 8 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ ตาก เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิและสงขลา (ตารางที่ 1) นำตัวอย่างโรคราสนิม มาเก็บรักษาในรูปแบบแห้ง (herbarium) โดยนำไปข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคราสนิมมาทับด้วย กระดาษหนังสือพิมพ์ เปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวันประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อใบข้าวโพดแห้งดี แล้วนำมาเก็บใส่ซอง พร้อมทั้งเขียนระบุรายละเอียดไว้ที่ซองตัวอย่างและบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Fungal Collection (KKFC)

2. การจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำใบข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคราสนิม (ข้อ 1) ซึ่งอยู่ในรูปแบบแห้ง (herbarium) มา ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope โดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมเขี่ยสปอร์ของเชื้อราจากรอยแผล (pustule) แล้ววางบนสไลด์ที่มีหยดน้ำ (10-20 ไมโครลิตร) ใช้ cover slide ปิดทับ วัดขนาดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้ micrometer พร้อมทั้งบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ความ กว้าง ความยาว ความหนาของผนังสปอร์ (cell wall) และลักษณะผิวภายนอกของสปอร์ เก็บข้อมูล จากสปอร์จำนวน 30 สปอร์ต่อตัวอย่าง (isolate) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยหาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำค่าเฉลี่ยของความกว้าง ความยาว และ ความหนาของผนังสปอร์ของทุกไอโซเลต มาหาความสัมพันธ์แบบ Scatter plot 3D โดยใช้ โปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTSYS pc.) (Rohlf, 1993) หาค่าสัมประสิทธิ์ความ เหมือน (Similarity coefficient) โดยวิธี Jaccard เลือก Ordination แบบ Eigen เลือก Graphics แบบ Mod 3D plot

ตารางที่ 1 ตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย

Specimen	Pedigree	Location
KKFC1	SB51-1	Saraburi
KKFC2	SB51-2	Saraburi
KKFC5	SB51-5	Saraburi
KKFC7	SB51-7	Saraburi
KKFC12	SB51-12	Saraburi
KKFC21	TK51-5	Tak
KKFC23	TK51-7	Tak
KKFC25	TK51-9	Tak
KKFC26	TK51-10	Tak
KKFC27	TK51-11	Tak
KKFC30	TK51-14	Tak
KKFC34	PB51-4	Phetchabun
KKFC38	PB51-8	Phetchabun
KKFC42	PB51-12	Phetchabun
KKFC53	PB51-23	Phetchabun
KKFC56	SK51-2	Songkhla
KKFC58	SK51-4	Songkhla
KKFC61	SK51-7	Songkhla
KKFC63	SK51-9	Songkhla
KKFC66	SK51-12	Songkhla
KKFC67	CM51-1	Chiang Mai
KKFC68	CM51-2	Chiang Mai
KKFC69	CM51-3	Chiang Mai
KKFC71	CM51-5	Chiang Mai
KKFC81	CP51-1	Chaiyaphum
KKFC83	CP51-3	Chaiyaphum
KKFC84	CP51-4	Chaiyaphum

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location
KKFC85	CP51-5	Chaiyaphum
KKFC93	LB51-1	Lop Buri
KKFC114	LB51-22	Lop Buri
KKFC119	LB51-27	Lop Buri
KKFC159	NR51-10	Nakhonratchasima
KKFC160	NR51-11	Nakhonratchasima
KKFC162	NR51-13	Nakhonratchasima
KKFC164	NR51-15	Nakhonratchasima
KKFC165	NR51-16	Nakhonratchasima

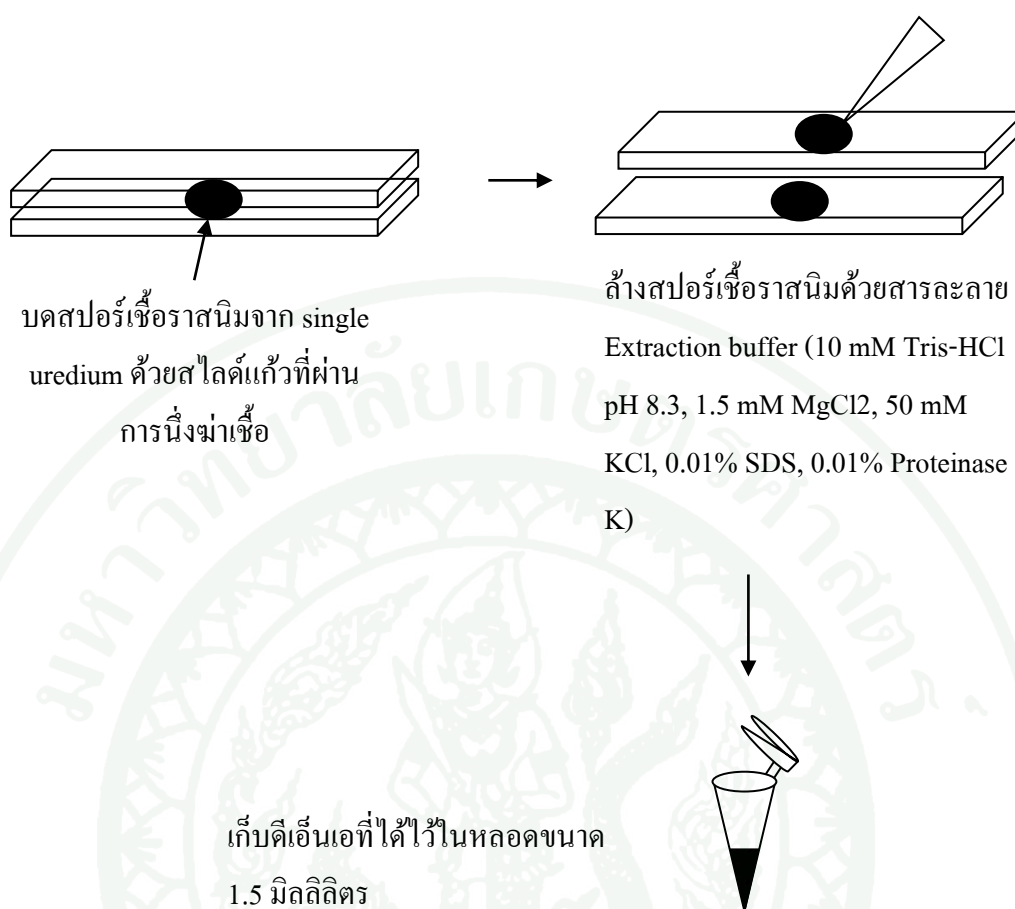
3. การศึกษาโครงสร้างและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมข้าวโพดด้วยเครื่องหมาย ISSR

3.1 สกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดทั้ง 8 จังหวัดของประเทศไทย (ข้อ 2) ที่เก็บรักษาในรูปแบบแห้ง (herbarium) มาสกัดดีเอ็นเอ โดยเขียนสปอร์ของเชื้อราสนิมจากแผล (200-300 สปอร์) บนใบข้าวโพดในแต่ละสายพันธุ์ วางระหว่างแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้สปอร์แตกโดยการกดแผ่นสไลด์แก้ว (ภาพที่ 1) หลังจากนั้นดูดสารละลาย Extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% SDS, 0.01% Proteinase K) 20 ไมโครลิตร ล้างสปอร์ที่แตกละเอียดบนสไลด์ ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที และที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (Virtudazo *et al.*, 2001) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

3.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.1 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน of inter simple sequence repeat (ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅, GAG(CGA)₅, (CGA)₅, (GTC)₅ และ (CAG)₅ 10 pmole และมีส่วนประกอบอื่น ๆ ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ 1x buffer, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂ และ 2.5 units *Taq* polymerase โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 37 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลบน 1.5 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที พร้อมทั้งเก็บข้อมูล



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ของเชื้อราสนิมข้าวโพด โดยใช้แผ่นสไลด์
แก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.3 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection and data analysis)

เก็บข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (ข้อ 3.2) โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อพบแถบดีเอ็นเอและให้คะแนน 0 เมื่อไม่พบแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้น ๆ นำข้อมูลที่ได้ (binary data) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (POPGEN) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากร โดยวิธี Unweighted pair-group arithmetic mean average method หรือ UPGMA (Nei, 1972, 1987) และวิเคราะห์การกระจายตัวแบบ principal coordinate analysis (PCA) การวิเคราะห์ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (GenAlEx) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างและความผันแปรของกลุ่มประชากรมีตัวแปรทางสถิติที่ใช้ในการวัดค่า ได้แก่ ค่า G_{ST} (POPGEN) คือ ค่าที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร โดยเมื่อค่า G_{ST} น้อยกว่า 0.4 หมายถึง มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรต่ำ แต่มีความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรสูง และเมื่อค่า G_{ST} มากกว่า 0.4 หมายถึง มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรสูง แต่มีความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรต่ำ ค่า Φ_{PT} (GenAlEx) คือ ค่าที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร โดยเมื่อค่า Φ_{PT} เท่ากับ 0 หมายถึง ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (เทียบได้กับ $F_{ST}, R_{ST} = 0$) และเมื่อค่า Φ_{PT} มากกว่า 0 หมายถึง มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (เทียบได้กับ $F_{ST}, R_{ST} > 0$) (Peakall and Smouse, 2010)

4. การทดสอบความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน

4.1 ปลุกข้าวโพดเพื่อทดสอบโรค

ปลุกข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์) ในพื้นที่ 4 จังหวัดของประเทศไทย คือ สงขลา นครราชสีมา ลำปาง และกาญจนบุรี โดยวางแผนการปลูกแบบสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปลูกสายพันธุ์ละ 2 แถวต่อซ้ำ ระยะห่างระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างหลุมปลูก 25 เซนติเมตร ใช้ข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 เป็น border row (ภาพที่ 2) ปลูก 2 เมล็ดต่อหลุม การปลูกข้าวโพดทดสอบโรคในจังหวัดสงขลาทำการปลูก ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดนครราชสีมาปลูก ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์ จังหวัดลำปางปลูก ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ล้านนา และจังหวัดกาญจนบุรีปลูก ณ แปลงเกษตรกร อำเภอท่ามะกา โดยปลูกข้าวโพดสายพันธุ์แท้ เกษตรศาสตร์ในฤดูกาลที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคของแต่ละจังหวัด (ข้อมูลจากการสอบถาม เกษตรกรผู้ปลูกข้าวโพดในแต่ละพื้นที่) (ตารางที่ 2)

4.2 เก็บข้อมูลการเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรค

เก็บข้อมูลและบันทึกผลจากข้อ 4.1 โดยการสังเกตอาการของโรคด้วยสายตาในแปลง ปลูก เมื่อข้าวโพดมีอายุได้ 45, 60, 70 และ 100 วัน ทำการเก็บข้อมูลการเกิดโรคประเมินความ รุนแรงของโรคคุณลักษณะอาการและดัชนีการเกิดโรค โดยเก็บข้อมูลซ้ำละ 20 ต้น เก็บต้นที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 และ 21 ของแต่ละแถว ทำเหมือนกันทั้ง 3 ซ้ำ โดยการประเมินความรุนแรงของ โรคแบ่งระดับความรุนแรงเป็น 7 ระดับ โดยดัดแปลงจากวิธีการประเมินของ Reid (2005) ดังนี้

ระดับ 1 = พืชไม่แสดงอาการ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 0

ระดับ 2 = เกิดแผล (pustule) บริเวณใบล่างตำแหน่งที่ 1-2 แผลมีขนาดเล็กกระจายทั่วทั้งใบ แผลมีการกระจายอย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 1-20 %

ระดับ 3 = เกิดแผล (pustule) บริเวณใบล่างตำแหน่งที่ 1-4 แผลกระจายทั่วทั้งใบ ใบล่าง ตำแหน่งที่ 1 และ 2 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ส่วนใบล่างตำแหน่งที่ 3 และ 4 แผลกระจาย อย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 21-40 %

ระดับ 4 = เกิดแผล (pustule) บริเวณใบล่างตำแหน่งที่ 1-6 หรือครึ่งหนึ่งของลำต้น (50% ของต้น) แผลกระจายทั่วทั้งใบโดยใบล่างตำแหน่งที่ 1-4 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ส่วนใบ ล่างตำแหน่งที่ 4-5 แผลกระจายอย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 41-60 %

ระดับ 5 = เกิดแผล (pustule) บริเวณใบล่างตำแหน่งที่ 1-7 หรือมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของ ลำต้น แผลกระจายอย่างหนาแน่นทั่วทั้งใบโดยใบล่างตำแหน่งที่ 1-6 แผลกระจายบนใบอย่าง หนาแน่น แผลมีขนาดใหญ่ พบผงสปอร์แตกออกมาจากแผลส่วนใบล่างตำแหน่งที่ 7 และหรือ 8 แผลกระจายอย่างเบาบาง พบแผลตามกาบใบฝัก ใบล่างตำแหน่งที่ 1-2 มีอาการแห้งตาย เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค 61-80 %

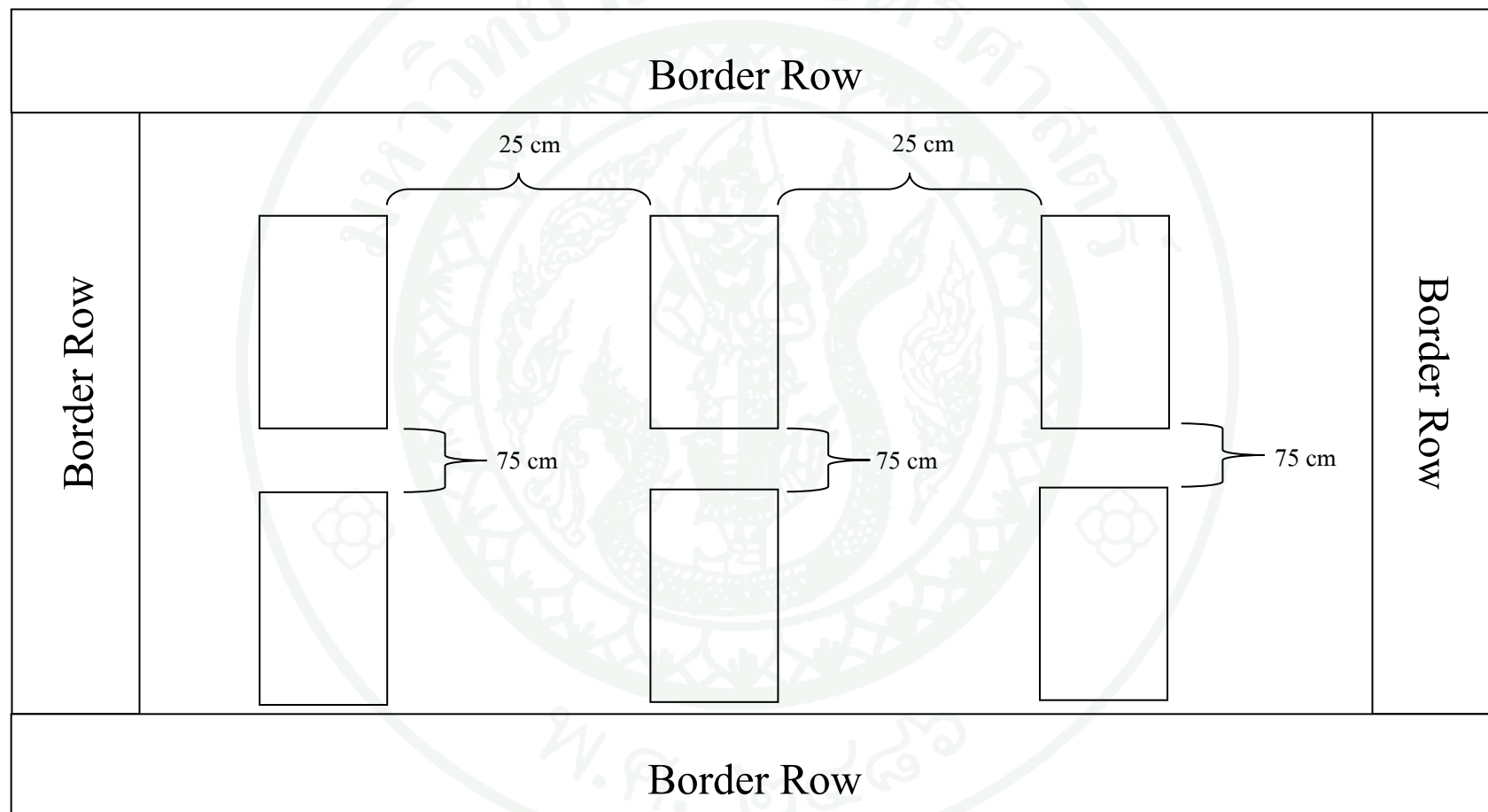
ระดับ 6 = เกิดแผล (pustule) บริเวณใบล่างทุกใบไปจนถึงปลายยอด แผลกระจายทั่วทั้งใบ อย่างหนาแน่น โดยใบล่างตำแหน่งที่ 1-8 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น แผลมีขนาดใหญ่ พบผง สปอร์แตกออกมาจากแผล ใบส่วนยอดมีแผลกระจายอย่างเบาบาง พบแผลตามกาบใบฝัก ใบล่าง ตำแหน่งที่ 1-4 มีอาการเหี่ยวตาย เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 81-100 %

ระดับ 7 = พืชเหี่ยวตายทั้งต้น

ประเมินดัชนีการเกิดโรคในแปลงปลูกมี 4 ระดับ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ McMaugh (2008) ดังนี้ ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค คะแนนการเกิดโรคเป็น 0, ระดับต่ำ = ต้นพืชแสดงอาการ 1-30% คะแนนการเกิดโรคเป็น 1, ระดับปานกลาง = ต้นพืชแสดงอาการ 31-50% คะแนนการเกิดโรคเป็น 2 และระดับรุนแรง = ต้นพืชแสดงอาการมากกว่า 50% คะแนนการเกิดโรคเป็น 3 จากคะแนนการเป็นโรคและจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคต่อแปลง นำมาใช้คำนวณดัชนีการเกิดโรค ซึ่งเป็นตัวชี้วัดระดับความรุนแรงของโรคในแปลงปลูก ดังสมการ

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = [(na \times 0 + nb \times 1 + nc \times 2 + nd \times 3) \div (N \times 3)] \times 100$$

เมื่อ na = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 0, nb = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 1, nc = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 2, nd = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 3 และ N = จำนวนของต้นที่มีการประเมินทั้งหมด



ภาพที่ 2 จำลองแผนผังการปลูกข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (RCBD)

ตารางที่ 2 แสดงช่วงเวลาการทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ในแต่ละจังหวัด

ปี	2553	2554										
เดือน จังหวัด	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.
ลำปาง		←	→									
สงขลา									←	→		
นครราชสีมา										←	→	
กาญจนบุรี			←	→								

5. การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 จากทั้ง 4 จังหวัดที่ปลูกทดสอบโรค นำมาเก็บรักษาในรูปแบบแห้ง (herbarium) โดยนำไปข้าวโพดที่แสดงอาการโรคราสนิมทุกสายพันธุ์ มาทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยจะเปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวันประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อใบข้าวโพดแห้งดีแล้วก็นำมาใส่ซอง เขียนระบุที่มาและข้อมูลของตัวอย่างไว้ข้างซองให้ละเอียด พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Fungal Collection (KKFC)

การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมจากตัวอย่างโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ทั้ง 4 จังหวัด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope โดยการใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมเขี่ยสปอร์ของเชื้อราจากรอยแผล (pustule) แล้วนำมาวางบนสไลด์ที่มีหยดน้ำอยู่ (10-20 ไมโครลิตร) ใช้ cover slide ปิดทับ วัดขนาดสปอร์โดยใช้กำลังขยายเดียวกัน (40X) ใช้ micrometer เป็นเครื่องวัด พร้อมทั้งบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ความกว้าง ความยาว ความหนาของผนังสปอร์ (cell wall) และลักษณะผิวภายนอกของสปอร์ โดยเก็บข้อมูลจากสปอร์จำนวน 20 สปอร์ต่อตัวอย่าง (isolate) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ หาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำค่าเฉลี่ยของความกว้าง ความยาว และความหนาของผนังสปอร์ของทุกไอโซเลต มาหาความสัมพันธ์แบบ Scatter plot 3D โดยใช้โปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTSYS pc.) (Rohlf, 1993) หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) โดยวิธี Jaccard เลือก Ordination แบบ Eigen เลือก Graphics แบบ Mod 3D plot

6. การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและความแตกต่างของจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม

P. polysora บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ด้วยเทคนิค ISSR

6.1 สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำตัวอย่างโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ที่ปลูกทดสอบโรคราในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีที่อธิบายในข้อ 3.1

6.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

นำดีเอ็นเอจากข้อ 6.1 ที่สกัดจาก urediospores ของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ inter simple sequence repeat โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅, (AGG)₅ และ (GTG)₅ 10 pmole และมีส่วนประกอบอื่น ๆ ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 1x buffer, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂ และ 2.5 units Taq polymerase โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 37 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลบน 1.5 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที พร้อมทั้งเก็บข้อมูล

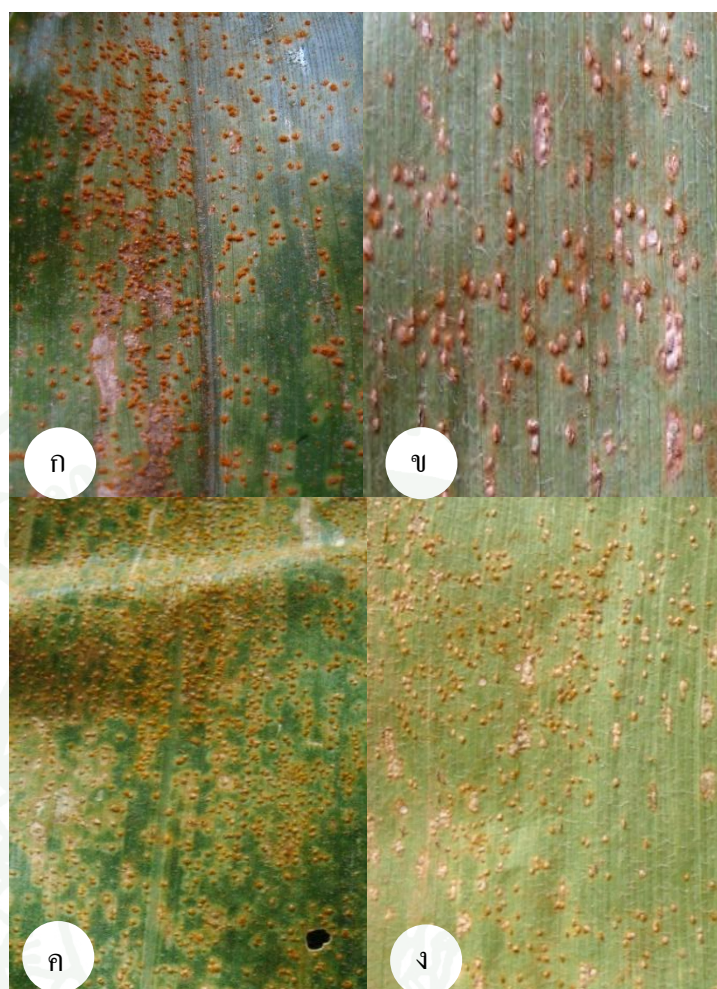
6.3 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection and data analysis)

เก็บข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ จากการตรวจสอบผลบน 1.5 % agarose gel electrophoresis (ข้อ 6.2) โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อพบแถบดีเอ็นเอและให้คะแนน 0 เมื่อไม่พบแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้น ๆ นำข้อมูลที่ได้ (binary data) ไปวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (POPGEN) สร้างความสัมพันธ์แบบ phylogenetic tree หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยวิธี Unweighted pair-group arithmetic mean average method หรือ UPGMA (Nei, 1972, 1987) พร้อมทั้งวิเคราะห์การกระจายตัวแบบ principal coordinate analysis (PCA) และวิเคราะห์ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (GenAlEx)

ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย

เก็บตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดจำนวน 186 ตัวอย่าง จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ ตาก เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิและสงขลา สุ่มตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่างมาทำการศึกษา พบว่า ลักษณะอาการของโรคราสนิมมีสีของแผลหรือ pustule ที่ปรากฏบน ใบข้าวโพด แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มสีแดง (red) กลุ่มสีส้ม (orange) และกลุ่มสีเหลือง (yellow) (ภาพที่ 3) โดยตัวอย่างในจังหวัดสระบุรี ตาก สงขลา ชัยภูมิและนครราชสีมา มี 2 กลุ่ม คือ สีส้ม และสีแดง ตัวอย่างจังหวัดเพชรบูรณ์ มี 2 กลุ่ม คือ สีส้มและสีเหลือง ตัวอย่างจังหวัดเชียงใหม่และลพบุรี มี 3 กลุ่ม คือ สีแดง สีส้มและสีเหลือง (ตารางที่ 3) ตัวอย่างที่แสดงอาการน้อยจะพบแผลมีการกระจายตัวเล็กน้อยทั่วทั้งใบหรือเกิดบริเวณปลายใบ เนื่องจากเป็นที่เกาะของน้ำ น้ำค้างและฝน ซึ่งมีความชื้นอยู่จำนวนมาก ส่วนตัวอย่างที่แสดงอาการอย่างรุนแรงมากจะพบแผลทั้งบริเวณบนใบ ใต้ใบ ลำต้น กาบใบ และฝัก แผลราสนิมมีการกระจายทั่วทั้งใบอย่างหนาแน่น แผลมีขนาดใหญ่ พบกลุ่มของสปอร์ (urediospore) แตกออกมานอกแผล (pustule) โดยจะพบแผลที่ใบส่วนล่างมากกว่าใบส่วนบน (Raid *et al.*, 1988) เกิดการระบาดรุนแรงทั่วทั้งแปลงและในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวโพดติดต่อกันตลอดทั้งปีหรือมีการปลูกข้าวโพดเป็นพืชหลัก โดยเฉพาะแหล่งปลูกข้าวโพดที่เป็นศูนย์วิจัยต่าง ๆ หรือแปลงทดสอบโรคเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด ได้แก่ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมาและศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสงขลา ซึ่งพบว่ามี ความรุนแรงของโรคสูงกว่าแหล่งอื่น ๆ เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ (inoculum) ทำให้เชื้อราสนิมมีการเจริญและก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดในฤดูปลูกถัดไป (Singh *et al.*, 2006; Futrell, 1975; Zummo, 1988)



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของโรคราสนิมข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* กลุ่มสีแดง (ก) และ (ข); กลุ่มสีส้ม (ค) และกลุ่มสีเหลือง (ง)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราสนิมข้าวโพดใน 8 จังหวัดของประเทศไทย

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size (μm)	Wall thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC1	SB51-1	Saraburi	Orange	E	Present	31.25×27.88	2.19	E	E	<i>Puccinia polysora</i>
KKFC2	SB51-2	Saraburi	Orange	E	Absent	35.38×23.13	2.38	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC5	SB51-5	Saraburi	Orange	E	Absent	36.75×27.00	2.38	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC7	SB51-7	Saraburi	Red/Orange	E	Absent	36.75×24.63	2.50	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC12	SB51-12	Saraburi	Orange	E/G	Present	35.00×26.25	2.50	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC21	TK51-5	Tak	Red	E	Present	35.88×26.75	1.75	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC23	TK51-7	Tak	Orange	E/G	Present	34.88×26.25	1.31	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC25	TK51-9	Tak	Orange	E/G	Present	34.75×24.25	1.88	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC26	TK51-10	Tak	Red	E/G	Present	36.00×27.25	1.38	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC27	TK51-11	Tak	Red	E	Present	35.50×25.00	2.10	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC30	TK51-14	Tak	Orange	E/G	Present	36.38×28.38	1.69	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC34	PB51-4	Phetchabun	Orange	E	Present	33.88×24.38	2.19	E	E	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size (μm)	Wall thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC38	PB51-8	Phetchabun	Yellow	E	Present	31.50×24.62	1.63	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC42	PB51-12	Phetchabun	Orange	E	Absent	36.25×28.25	1.88	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC53	PB51-23	Phetchabun	Orange	E/G	Present	37.50×27.25	2.06	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC56	SK51-2	Songkhla	Red	E	Absent	35.62×27.37	1.87	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC58	SK51-4	Songkhla	Red	E/G	Present	35.25×28.37	1.93	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC61	SK51-7	Songkhla	Red	E/G	Absent	34.50×25.12	2.12	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC63	SK51-9	Songkhla	Orange	E/G	Present	34.25×27.00	2.25	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC66	SK51-12	Songkhla	Red	E/G	Present	35.75×25.12	1.56	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC67	CM51-1	Chiang Mai	Orange	E/G	Absent	35.12×23.87	1.87	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC68	CM51-2	Chiang Mai	Red/Orange	E	Absent	34.37×26.00	2.37	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC69	CM51-3	Chiang Mai	Yellow	E/G	Present	36.50×26.50	2.18	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC71	CM51-5	Chiang Mai	Orange	E	Absent	34.80×27.87	2.25	E	E	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size (μm)	Wall thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC81	CP51-1	Chaiyaphum	Orange	E	Absent	30.12×22.75	2.12	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC83	CP51-3	Chaiyaphum	Orange	E	Absent	30.62×21.25	2.00	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC84	CP51-4	Chaiyaphum	Red	E	Absent	34.62×25.5	2.25	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC85	CP51-5	Chaiyaphum	Red	E	Present	31.50×23.00	2.00	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC93	LB51-1	Lop Buri	Red	E	Absent	34.00×23.37	1.87	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC114	LB51-22	Lop Buri	Yellow	E/G	Present	34.75×27.87	2.00	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC119	LB51-27	Lop Buri	Orange	E/G	Present	32.12×22.5	2.12	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC159	NR51-10	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.87×24.00	2.25	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC160	NR51-11	Nakhonratchasima	Orange	E/G	Present	33.00×23.75	2.18	E	E	<i>P. polysora</i>
KKFC162	NR51-13	Nakhonratchasima	Orange	E	Present	33.25×23.75	2.12	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC164	NR51-15	Nakhonratchasima	Orange	E/G	Present	32.50×23.37	1.93	E	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC165	NR51-16	Nakhonratchasima	Orange	E/G	Present	32.87×23.87	2.25	E	E/O	<i>P. polysora</i>

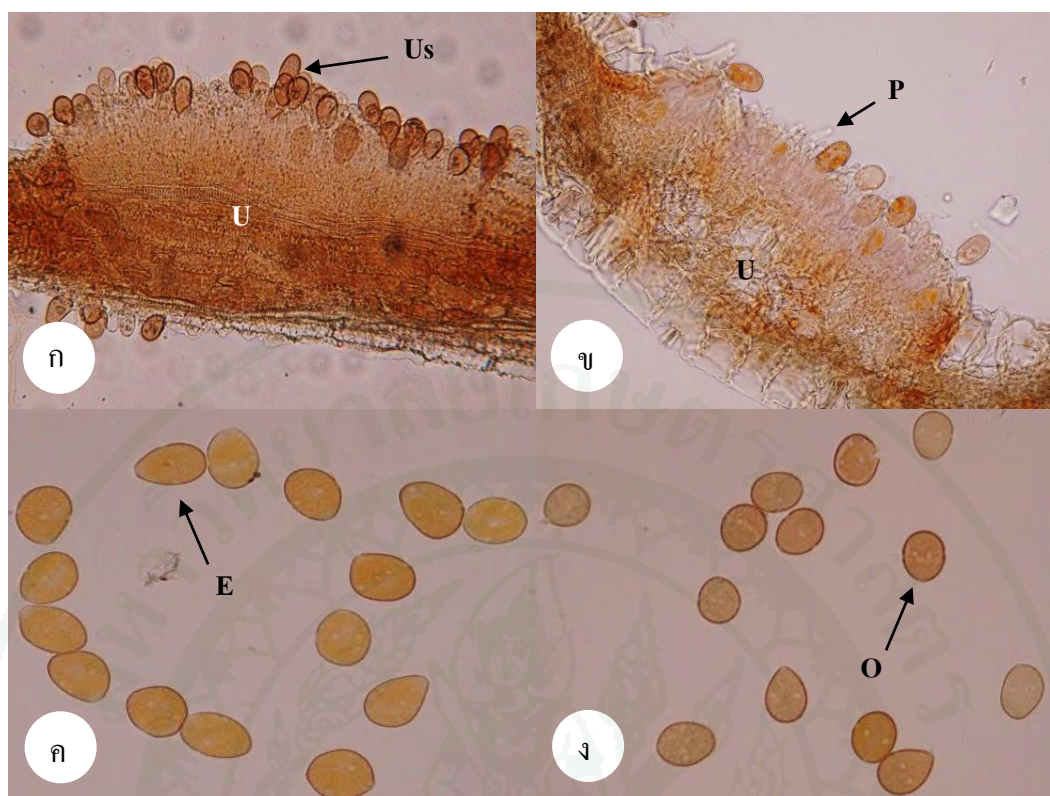
2. การจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราสนิมที่รวบรวมจาก 8 จังหวัด จำนวน 36 ตัวอย่าง (ข้อ 1) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พบว่า ราสนิมที่พบอยู่ในระยะ uredinal stages ซึ่งเป็นระยะที่มีการผลิตสปอร์จำนวนมากเข้าไปซ้ำมา (repeating state) บนพืชอาศัย เรียกว่า urediospores หรือ urediniospores ภายใน uredium เมื่อมีการงอกจะสามารถสร้างเป็น uredinal stages ได้และสร้างซ้ำอยู่เช่นนี้ทุกรอบบนพืชอาศัยเดิม โดยทั่วไปราสนิมมี 5 ระยะ คือ

1. ระยะ spermagonial stages เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์แบบ spermagonia ภายใน spermatia โดย spermagonia เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะสร้างเป็น aecial stages
2. ระยะ aecial stages เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์แบบ aeciospore ภายใน aecia เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศสปอร์ของระยะนี้จะสร้างเป็น uredinal stages
3. ระยะ uredinal stages เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์แบบ urediospore หรือ urediniospore ภายใน uredium เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศสปอร์จะสร้างเป็น telial stages หรืออาจผลิตสปอร์แบบเดิมบนพืชอาศัยเดิมได้
4. ระยะ telial stages เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์แบบ teliospore ภายใน telium เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะสร้างเป็น basidial stages
5. basidial stages เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์แบบ basidiospore ภายใน basidium เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะสร้างเป็น spermagonial stages บนพืชอาศัยรอง (alternate host) ได้ (Cummins and Hiratsuka, 1983) โดยเชื้อราสนิมแต่ละชนิดจะสร้างสปอร์ระยะต่าง ๆ ได้จำนวนแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ พืชอาศัยหลักและพืชอาศัยรอง ซึ่งการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมจึงต้องอาศัยข้อมูลหลายอย่างประกอบนอกเหนือจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยเคยมีรายงานว่ามีการพบราสนิมข้าวโพด 2 ชนิด คือ *P. polysora* และ *P. sorghi* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ uredia และ urediospore ในการจัดจำแนก (Giatgong, 1980; Lorsuwan, 1984) แต่จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. polysora* สาเหตุโรคราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยโดย จินตนา และ ปัทมา (2554) พบว่า มีเพียงชนิดเดียวในประเทศไทย คือ เชื้อรา *P. polysora* โดยจากการศึกษาลำดับเบสในส่วน of internal transcribed spacer (ITS) เปรียบเทียบกับเชื้อราสนิม *P. sorghi* และ *P. graminis* ในฐานข้อมูล (GenBank) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี maximum parsimony และสร้างความสัมพันธ์แบบ phylogenetic tree พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. polysora* ได้แยกออกจากกลุ่มของเชื้อรา *P. sorghi* และ *P. graminis* ด้วยค่า bootstrap 100 เปอร์เซนต์ โดยส่วนมากประเทศไทยจะพบราสนิมในระยะ uredial stage เนื่องจากมีสภาพอากาศแบบร้อนชื้น และมีโอกาสพบระยะ telial stage น้อยมาก เช่นเดียวกับเชื้อรา *P. polysora* ที่พบเฉพาะระยะ uredial stage รูปร่างของ uredium มี 2 แบบ คือ ลักษณะกลมและรี (Globose: G, Elongate: E) ในบางตัวอย่างพบ paraphysis ภายใน uredium

(ภาพที่ 4) สปอร์ (urediospore) มีขนาด $(30.12-36.75) \times (21.25-28.38)$ ไมครอน (Shurtleff, 1980) ผนังสปอร์ขนาด 1.31-2.50 ไมครอน ลักษณะผิวของสปอร์มีหนาม (echinulate: E) ลักษณะของสปอร์มี 2 แบบ คือ ลักษณะกลมรี ผนังหนา (ellipsoid: E) และลักษณะแบบกลม ผนังหนา (Ovoid: O) โดยบางตัวอย่างมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบกลมรี (E) เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 2) แต่บางตัวอย่างมีลักษณะของสปอร์เป็นทั้งสองแบบคือ ลักษณะกลมรีและกลม (E/G) พบ germ pore กระจายรอบสปอร์ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญ คือ เป็นช่องเปิดเพื่อให้สปอร์สร้าง germ tube เมื่อสปอร์ได้รับความชื้นและพร้อมจะเจริญเป็นเส้นใย





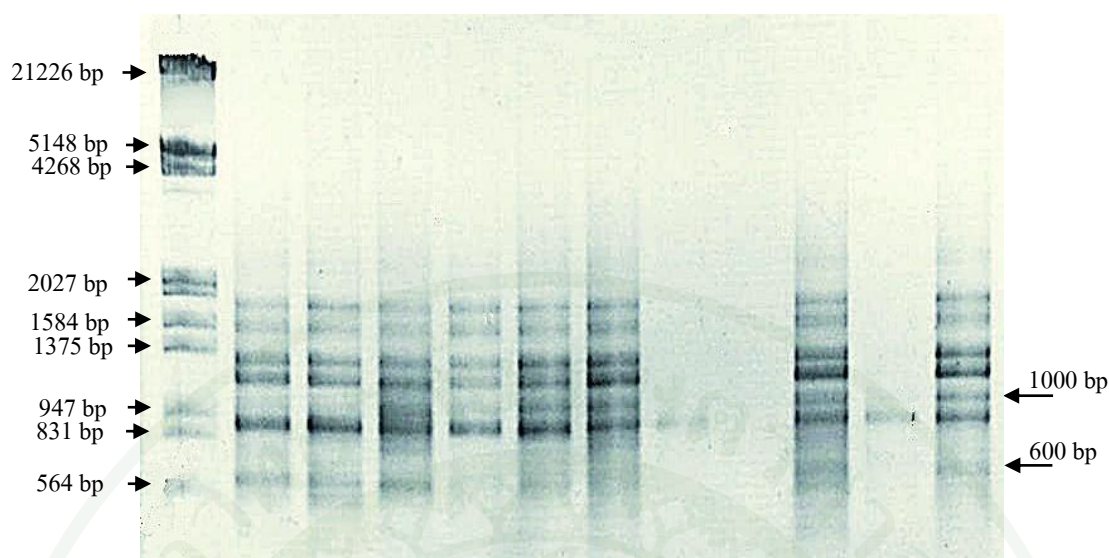
ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Uredium (ก, ข) และ Urediospore (ค, ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope กำลังขยาย 400 เท่า ของเชื้อรา *Puccinia polysora*; Us: Urediospores; P: Paraphysis; E: ลักษณะของสปอร์แบบ Ellipsoid; O: ลักษณะของสปอร์แบบ Ovoid

3. การศึกษาโครงสร้างและความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมข้าวโพดด้วยเครื่องหมาย ISSR

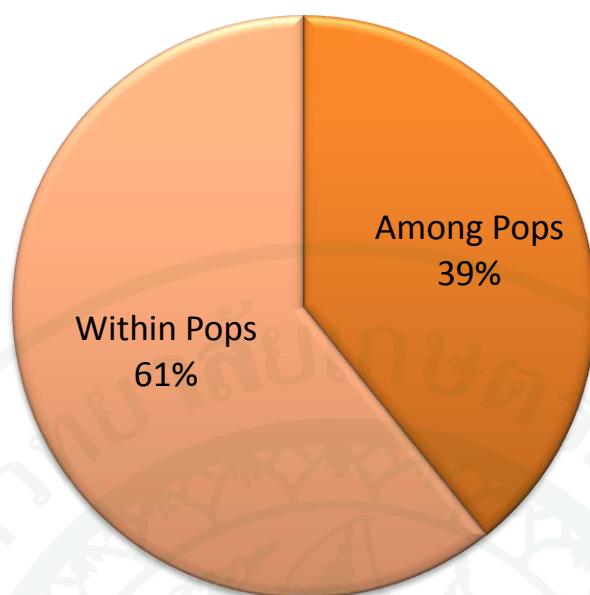
จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมข้าวโพดจำนวน 36 ตัวอย่างจาก 8 จังหวัด ที่สำรวจในประเทศไทยด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅, GAG(CGA)₅, (CGA)₅, (GTC)₅ และ (CAG)₅ ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 38 แถบ (ภาพที่ 5) เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (binary data) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป POPGEN โดยวิธี UPGMA ของ Nei (1978, 1987) และ GenAlEx พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงภายในกลุ่มประชากรของเชื้อราสนิม (ภาพที่ 6) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี AMOVA คือ มีค่า $\Phi_{PT} = 0.393$ ($P > 0.001$) จำนวน 999 ซ้ำ และมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อราสนิม มีค่า $G_{ST} = 0.5103$ (POPGEN) โดยประชากรที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรที่อยู่ในภูมิภาคที่แตกต่างกันหรือห่างไกลออกไป ตัวอย่าง เช่น ประชากรของเชื้อราสนิมในจังหวัดตากและเพชรบูรณ์ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ซึ่งทำให้ Phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นมีความใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 7) และเมื่อศึกษาการกระจายตัวโดยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCA) พบว่า รูปแบบของการกระจายตัว (ภาพที่ 8) มีความสัมพันธ์กับ Phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น และมีความสอดคล้องกันกับการนำแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ AMOVA ด้วยโปรแกรม GenAlEx ซึ่งพบว่า ประชากรของเชื้อราสนิมในจังหวัดตากและจังหวัดเพชรบูรณ์ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย คือ มีค่า $\Phi_{PT} = 0$ โดยค่า $\Phi_{PT} = 0$ แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากรหรือมีความแตกต่างน้อย (Peakal and Smouse, 2010) ข้อมูลดังกล่าวช่วยสนับสนุนว่ามีการเคลื่อนย้ายของ urediospore ระหว่าง 2 จังหวัดนี้ สอดคล้องกับการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Puccinia triticina* โดย Ordoñez *et al.* (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. triticina* ในอเมริกาใต้เปรียบเทียบกับอเมริกาเหนือ โดยใช้เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) พบว่า จากแผนภาพการแสดง principal coordinate analysis plots แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม กล่าวคือ แต่ละกลุ่มประชากรมียีนที่ควบคุมความรุนแรง (virulence genotype) แตกต่างกันหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ คือ มีค่า $\Phi_{PT} = 0.335$ โดยค่า Φ_{PT} คือ ค่าความแตกต่างของจีโนไทป์ในการทดลอง และพบว่า มีการอพยพของเชื้อรา *P. triticina* จากเม็กซิโกมายังอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ กล่าวคือ เมื่อ urediospore จากแหล่งปลูกหนึ่งปลิวไปตกลงบนใบของพืชอาศัยในอีกแหล่งปลูกหนึ่งที่มีสภาพภูมิอากาศที่ใกล้เคียงกันและเหมาะสม จะมีการพัฒนาของโรคราสนิม สปอร์ของเชื้อราสนิมจากแหล่งเดิมจึงสามารถก่อให้เกิดโรคในสภาพแวดล้อมใหม่ได้ (Singh *et al.*, 2006; Futrell, 1975; Zummo, 1988) ซึ่งเชื่อ

ราสนิมเจริญและเพิ่มปริมาณสปอร์ได้ดีในสภาพอากาศร้อนและมีความชื้นสัมพัทธ์สูง

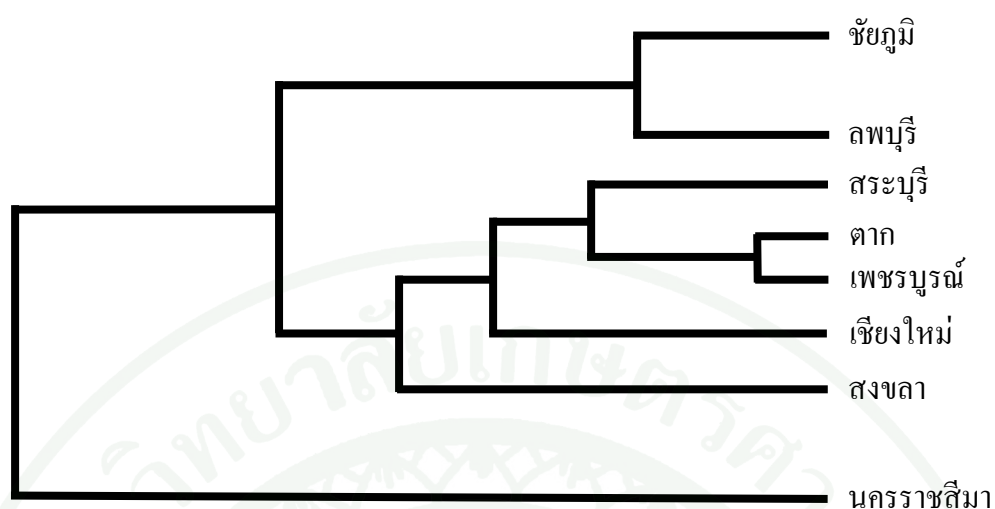
นอกจากนี้ปัจจัยด้านสายพันธุ์ของพืชที่ใช้ปลูก การปรับปรุงพันธุ์พืชและปริมาณน้ำฝน มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมเช่นกัน ในขณะที่เชื้อราสนิมที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดนครราชสีมามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากกลุ่มอื่น ๆ โดยได้แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 7 และ 8) และเมื่อวิเคราะห์จากแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแล้ว พบว่า ตัวอย่างราสนิมที่เก็บรวบรวมมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวอย่างในจังหวัดอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาเป็นพันธุ์เดียวกันและเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกมากในพื้นที่นั้น เชื้อราสนิมจึงมีจีโนมที่ใกล้เคียงกันมากและแตกต่างจากเชื้อราสนิมจากแหล่งอื่น



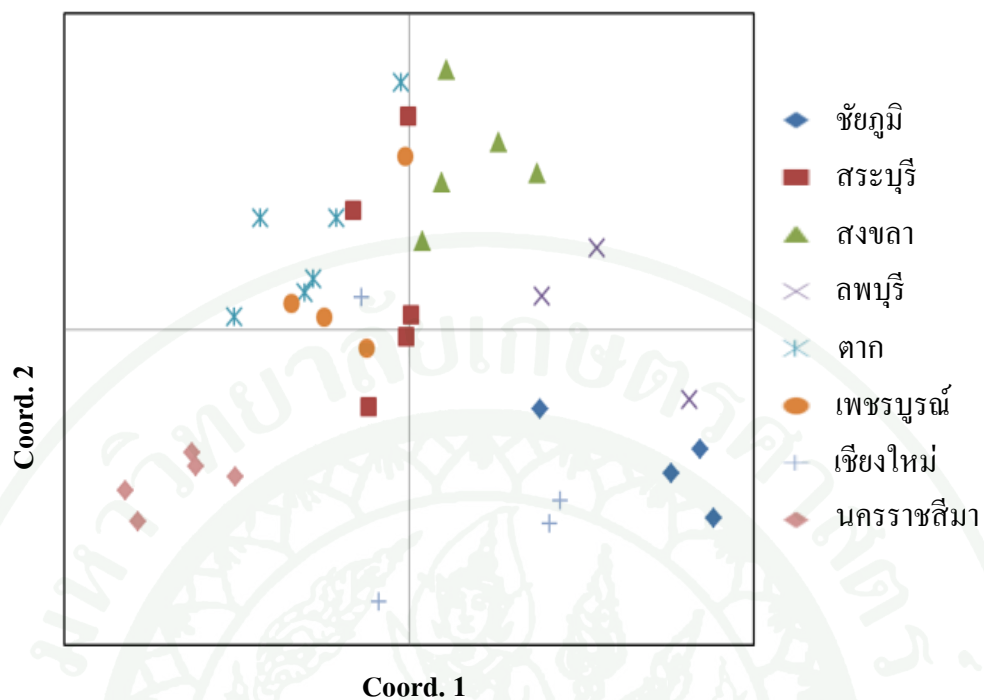
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Puccinia polysora* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ (GTC)₅; M = Lambda DNA *Eco* RI-*Hind* III Marker; บริเวณที่ถูกสรุชี้แสดงลักษณะของแถบ DNA ที่แตกต่างกัน (polymorphic band) มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส (base pair: bp) และขนาดประมาณ 600 คู่เบส (base pair: bp)



ภาพที่ 6 เปอร์เซนต์ของ Molecular variance เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Genetic distance of AMOVA,
 $\Phi_{PT} = 0.393$ ($P > 0.001$)



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อราสนิมข้าวโพด *Puccinia polysora* โดยวิธี UPGMA ค่า $G_{ST} = 0.5103$ (Nei, 1987)



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของตัวอย่างทั้ง 8 ประชากรของเชื้อราสนิมข้าวโพด *Puccinia polysora* โดยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCA), ค่า G_{ST} ระหว่างประชากรจังหวัดดากและจังหวัดเพชรบูรณ์ = 0

4. การทดสอบความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ในพื้นที่ที่ตั้งอยู่ในภูมิประเทศที่ต่างกัน

จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมข้าวโพดทั้ง 8 จังหวัด (ข้อ 3) จึงได้นำข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 มาปลูกทดสอบโรคในจังหวัดนครราชสีมา (ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา) เปรียบเทียบกับการปลูกทดสอบโรคในจังหวัดสงขลา (ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสงขลา) จังหวัดลำปาง (สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา) และจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งแปลงปลูกในจังหวัดสงขลา และจังหวัดนครราชสีมาเป็นศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดที่มีการปลูกข้าวโพดติดต่อกันเป็นเวลานาน แต่แปลงปลูกจังหวัดลำปางและจังหวัดกาญจนบุรีเป็นแปลงที่เคยพบว่ามีโรคเกิดโรคราสนิมรุนแรง โดยประเมินความรุนแรงของเชื้อราสนิมข้าวโพดบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (Ki1-Ki52) ซึ่งทดสอบในสภาพแปลงปลูกทั้ง 4 จังหวัด ใช้มาตรฐานการประเมินโรคโดยแบ่งเป็น 7 ระดับ พร้อมทั้งคำนวณดัชนีการเกิดโรค จากการประเมินความรุนแรงของโรคสนิมข้าวโพดในจังหวัดลำปาง ซึ่งใช้แปลงทดลองของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ในช่วงเดือนมกราคม 2552 ถึงเดือนมีนาคม 2553 ทำการประเมินโรคราสนิมเมื่อข้าวโพดอายุ 100 วัน พบว่า ข้าวโพดแสดงอาการของโรคราสนิมไม่รุนแรงมากนักในขณะที่ช่วงเวลาดังกล่าวก่อนหน้าที่ทดสอบ 1 ปี มีการระบาดของโรครุนแรง แต่อาการของโรคที่พบในปีที่ทำการทดลองนั้นอยู่ในระดับ 2 คือ แสดงอาการของโรค 1-20% ซึ่งพบในสายพันธุ์ Ki2, Ki7, Ki8, Ki10, Ki12, Ki26, Ki30, Ki32 และ Ki49 เท่านั้น มีดัชนีการเกิดโรคสูงสุดคือ 23.3% (ตารางที่ 4) โดยพบแผลราสนิม (pustule) ในใบล่างของต้น (ใบตำแหน่งที่ 1-2) แผลมีลักษณะเล็กกระจายอยู่บนใบอย่างเบาบาง (ภาพที่ 9) ไม่พบแผลที่ส่วนอื่นของต้นข้าวโพด สำหรับสายพันธุ์อื่นที่เหลือนั้นไม่พบอาการของโรคราสนิม ในช่วงการทดสอบโรคนั้นได้มีการตรวจสอบปริมาณน้ำฝนและสภาพอากาศ พบว่า มีปริมาณฝนตกน้อย เฉลี่ย 10-100 ต่อมิลลิเมตร (ภาพที่ 10) อากาศช่วงเช้าค่อนข้างเย็น มีหมอกปกคลุม อุณหภูมิเฉลี่ย 20-37 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา) ซึ่งสภาพอากาศดังกล่าวเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อเชื้อราสนิม (เชื้อราสนิมชอบอากาศชื้นสูง) ทำให้ปริมาณเชื้อหรือ inoculums ในธรรมชาติมีน้อย จึงเกิดการเข้าทำลายข้าวโพดได้น้อย ทั้งนี้ได้ประเมินโรคเมื่อข้าวโพดอายุ 60 วัน แต่ไม่พบโรคราสนิม เนื่องจากสภาพอากาศช่วงก่อนหน้านี้อุ่นและแห้ง

การประเมินความรุนแรงของโรคสนิมข้าวโพดในจังหวัดสงขลา ใช้แปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่ ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม 2553 ประเมินโรคราสนิมเมื่อข้าวโพดอายุ 70 วัน พบว่า ข้าวโพดแสดงอาการของโรคราสนิมรุนแรงมาก โดยในสายพันธุ์ที่อ่อนแอจะแสดงอาการของโรคราสนิมในระดับ 6 (ภาพที่ 9) หรือมีความรุนแรงของการเกิดโรค 95% และมีดัชนีการเกิดโรค 100% โดยพบอาการของโรคราสนิมแพร่กระจายไปทุกส่วน ได้แก่ ลำต้น ใบ กาบ ฝัก และก้านของช่อดอกข้าวโพด ใบล่างเริ่มแห้งประมาณ 3-4 ใบ บางสายพันธุ์เริ่มแห้งหมดทั้งต้น สายพันธุ์ที่อ่อนแอ ได้แก่ Ki25, Ki26, Ki22 และ Ki12 มีความรุนแรงของการเกิดโรคมากกว่า 90% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสายพันธุ์ที่ต้านทานไม่พบอาการของโรคราสนิม แต่จะพบอาการจุดสีเหลืองบริเวณบนใบ ได้แก่ สายพันธุ์ Ki6, Ki38 และ Ki36 มีระดับการเกิดโรคและดัชนีการเกิดโรค 0% (ตารางที่ 4) จากการตรวจสอบปริมาณน้ำฝนและสภาพอากาศ พบว่า มีปริมาณฝนตกเฉลี่ย 100-300 ต่อมิลลิเมตร (ภาพที่ 11) อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา) ซึ่งสภาพอากาศดังกล่าวเหมาะสมกับการเกิดและการแพร่กระจายของโรค เป็นผลให้เกิดโรคราสนิมมีความรุนแรงมากกว่าแปลงทดลองในจังหวัดอื่น

การประเมินความรุนแรงของโรคราสนิมข้าวโพดในจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งใช้แปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณฯ) ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม 2553 ประเมินโรคราสนิมเมื่อข้าวโพดอายุ 60 วัน โดยข้าวโพดแสดงอาการของโรคราสนิมค่อนข้างรุนแรง โดยสายพันธุ์ที่ต้านทาน ได้แก่ Ki36 และ Ki38 ซึ่งไม่พบอาการของโรคราสนิมแต่จะพบอาการจุดสีเหลืองบริเวณใบ สำหรับสายพันธุ์ที่ค่อนข้างอ่อนแอ ได้แก่ Ki10, Ki25 และ Ki26 มีความรุนแรงของอาการ 50-70% (ภาพที่ 9) ซึ่งอยู่ในระดับ 5 (ตารางที่ 4) พบอาการของโรคที่ลำต้น ใบ กาบ และฝักล่าง แต่ไม่พบที่ส่วนปลายและช่อดอก จากการตรวจสอบปริมาณน้ำฝนและสภาพอากาศ พบว่า มีปริมาณฝนตกเฉลี่ย 200-300 ต่อมิลลิเมตร (กรมอุตุนิยมวิทยา) และในช่วงเวลาดังกล่าวแปลงที่ทำการปลูกทดสอบประสบภาวะน้ำท่วมขัง ต้นข้าวโพดที่ปลูกจึงได้รับผลกระทบ ทำให้ต้องทำการประเมินโรคราสนิมที่ข้าวโพดอายุ 60 วัน ต้นข้าวโพดแคระแกร็น และเกิดโรคน้ำค้ำรุนแรง สภาพอากาศดังกล่าวไม่เหมาะสมกับการแพร่กระจายของโรค (ภาพที่ 12) จึงทำให้ระดับความรุนแรงของโรคไม่ถึงระดับ 6 ซึ่งเป็นระดับที่มีความรุนแรงมาก

การประเมินความรุนแรงของโรคราสนิมข้าวโพด ณ แปลงทดลองของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อข้าวโพดอายุ 60 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว พบว่า ไม่มีต้นข้าวโพดสายพันธุ์ใดมีอาการของโรคราสนิม (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 9) โดยการทดลองเริ่มในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน 2554 จากการตรวจสอบปริมาณน้ำฝนและสภาพอากาศ พบว่า มีสภาพอากาศที่แปรปรวนทำให้อากาศในช่วงนี้เย็นลงกว่าปกติคือ มีอุณหภูมิเฉลี่ย 15-20 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา) ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 30-240ต่อมิลลิเมตร (ภาพที่ 13) มีฝนตกหนักเนื่องจากลมมรสุมพัดผ่าน ทำให้น้ำท่วมขัง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่เหมาะกับการเกิดโรค จึงไม่พบว่ามีโรคราสนิมเกิดขึ้นบนพันธุ์ Ki1-Ki52 เลข ซึ่งไม่ได้หมายความว่าข้าวโพดทั้ง 52 สายพันธุ์นี้ต้านทานต่อโรคราสนิมที่ระบาดในจังหวัดกาญจนบุรี แต่อาจจะเนื่องมาจากสภาพอากาศไม่เหมาะสำหรับการพัฒนาโรค ทั้งนี้ในช่วงเวลาที่ทดสอบยังมีฝนและลมค่อนข้างแรง ปริมาณเชื้อหรือ inoculums อาจไม่เพียงพอต่อการเกิดโรค

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป มีผลต่อการเกิดโรค ความรุนแรงและการแพร่กระจายของเชื้อราสนิมข้าวโพด ซึ่งความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่งที่เพาะปลูกมีความแตกต่างกัน สายพันธุ์ที่ต้านทาน Ki36 และ Ki38 นั้นพบว่า เมื่อปลูกทดสอบในแหล่งปลูกทั้ง 4 แห่งนี้ มีระดับการเกิดโรคเป็น 0 ซึ่งไม่พบอาการของโรคราสนิม สำหรับสายพันธุ์ที่อ่อนแอ เช่น Ki25 และ Ki26 นั้นให้ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมไม่เท่ากันในแต่ละแหล่งปลูก แต่จัดเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอเมื่ออยู่ในสภาพอากาศดังกล่าว ซึ่งจากการทดลองในจังหวัดนครราชสีมาและสงขลา พบว่า โรคราสนิมมีความรุนแรงมาก แต่ระดับความรุนแรงในแต่ละพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันไป ทั้งนี้สภาพอากาศในสองจังหวัดนี้ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันในแต่ละปีและเป็นสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อเชื้อราสนิม คือ มีอากาศร้อน สลับกับมีฝน ทำให้มีการพัฒนาของโรคเป็นไปได้ดี จึงพบว่ามีความรุนแรงของโรคราสนิมจากความแตกต่างของระดับความรุนแรงของโรคราสนิมในแต่ละพันธุ์เมื่อปลูกในที่ที่มีสภาพภูมิอากาศต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสนิม *P. polysora* มีความผันแปรภายในสปีชีส์หรือมีความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของเชื้อ จึงสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวโพดได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีการเกิดโรคราสนิมบนข้าวโพด
สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ในแปลงทดสอบโรคทั้ง 4 จังหวัด

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki1	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.95d	5	33.3	
	Songkhla	2.60q	30	33.3	
Ki2	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.10b	5	1.7	
	Nakhonratchasima	2.92c	40	44.4	
	Songkhla	4.03gh	40	66.6	
Ki3	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.92c	30	33.3	
	Songkhla	3.80hi	40	66.6	
Ki4	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	4.05fgh	50	66.6	
Ki5	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.95d	5	33.3	
	Songkhla	3.55ijkl	30	66.6	
Ki6	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	10	33.3	
	Songkhla	1	0	0	No symptom

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki7	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.25b	10	8.3	
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	4.33f	60	66.6	
Ki8	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	3.43jklm	40	66.6	
Ki9	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	5.00cd	70	100	
Ki10	Kanchanaburi	0	0	0	No symptom
	Lampang	1.45ab	15	15	
	Nakhonratchasima	4.88a	70	100	
	Songkhla	5.00cd	70	100	
Ki11	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.92c	40	44.4	
	Songkhla	5.33b	75	100	
Ki12	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.15b	5	5	
	Nakhonratchasima	3.90d	50	55.5	
	Songkhla	5.92a	95	100	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki13	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.90d	10	33.3	
	Songkhla	2.75pq	30	50	
Ki14	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.87c	40	44.4	
	Songkhla	5.00cd	70	100	
Ki15	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	5.13	70	100	
Ki16	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	44.4	
	Songkhla	4.17fg	55	66.6	
Ki17	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.88d	20	33.3	
	Songkhla	4.00gh	50	66.6	
Ki18	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.90d	20	33.3	
	Songkhla	3.33klmn	40	66.6	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki19	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0		No symptom
	Nakhonratchasima	2.90c	40	44.4	
	Songkhla	4.67e	60	66.6	
Ki20	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.87d	20	33.3	
	Songkhla	2.10r	20	33.3	
Ki21	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.88d	20	33.3	
	Songkhla	3.08no	30	33.3	
Ki22	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.87c	40	44.4	
	Songkhla	5.90a	95	100	
Ki23	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.88d	20	33.3	
	Songkhla	3.33klmn	35	66.6	
Ki24	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.87c	40	44.4	
	Songkhla	4.75de	60	66.6	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki25	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	4.95a	65	100	
	Songkhla	6.00a	95	100	
Ki26	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.20b	10	6.7	
	Nakhonratchasima	4.95a	65	100	
	Songkhla	6.00a	95	100	
Ki27	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.90d	20	33.3	
	Songkhla	4.05fgh	50	66.6	
Ki28	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	4.07fgh	50	66.6	
Ki29	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	4.00gh	50	66.6	
Ki30	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.70a	20	23.3	
	Nakhonratchasima	1.93d	5	33.3	
	Songkhla	3.67ij	40	66.6	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki31	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	4.07fgh	50	66.6	
Ki32	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.50ab	15	16.7	
	Nakhonratchasima	2.95c	40	44.4	
	Songkhla	4.77de	60	66.6	
Ki33	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	3.93b	50	55.5	
	Songkhla	1	0	0	No symptom
Ki34	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.98d	20	33.3	
	Songkhla	2.92op	30	33.3	
Ki35	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.95d	20	33.3	
	Songkhla	2.77pq	20	33.3	
Ki36	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1	0	0	No symptom
	Songkhla	1	0	0	No symptom

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki37	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	4.00gh	50	66.6	
Ki38	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1	0	0	No symptom
	Songkhla	1	0	0	No symptom
Ki39	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	2.00r	20	33.3	
Ki40	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	3.67ij	40	66.6	
Ki41	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	10	33.3	
	Songkhla	3.13no	30	33.3	
Ki42	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.93d	20	33.3	
	Songkhla	4.67e	60	66.6	

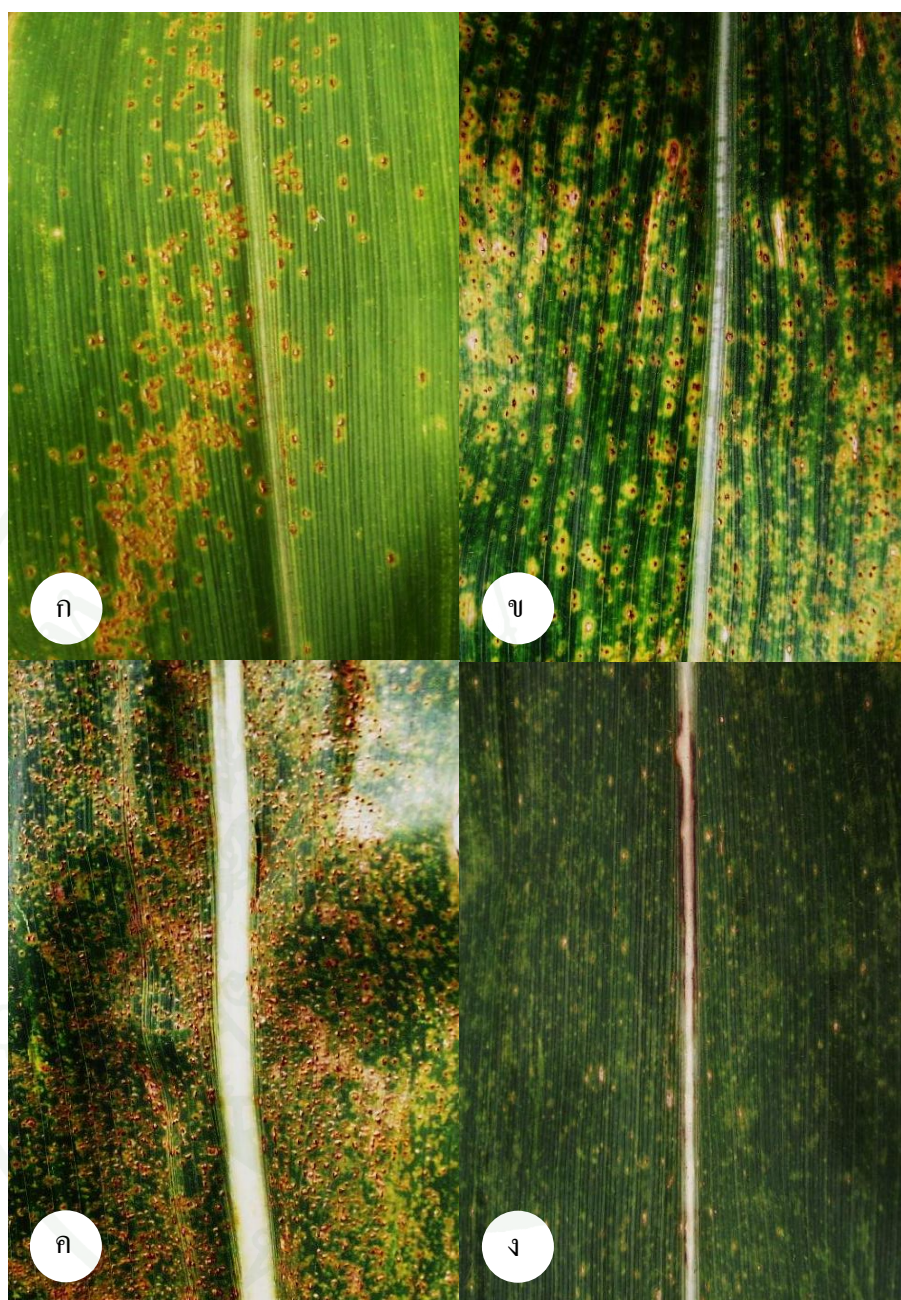
ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki43	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.92c	40	44.4	
	Songkhla	3.67ij	40	66.6	
Ki44	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	4.33f	60	66.6	
Ki45	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.90c	40	44.4	
	Songkhla	5.00cd	70	100	
Ki46	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	3.20mn	30	33.3	
Ki47	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	3.92b	50	55.5	
	Songkhla	5.13bc	70	100	
Ki48	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	2.93c	40	44.4	
	Songkhla	4.17fg	60	66.6	

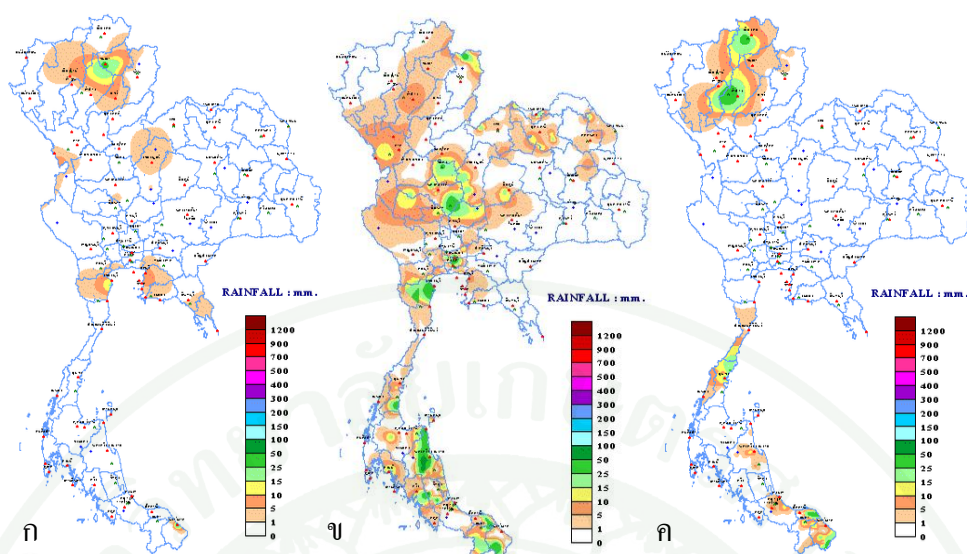
ตารางที่ 4 (ต่อ)

Pedigree	Province	Average level of symptom	Persentate of symptom	Disease index	Annotation
Ki49	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1.20b	10	6.7	
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	3.58ijk	40	66.6	
Ki50	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	3.28lmn	40	66.6	
Ki51	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.95d	20	33.3	
	Songkhla	3.33klmn	40	66.6	
Ki52	Kanchanaburi	1	0	0	No symptom
	Lampang	1	0	0	No symptom
	Nakhonratchasima	1.92d	20	33.3	
	Songkhla	3.33klmn	40	66.6	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ระดับความ
เชื่อมั่นเท่ากับ 99 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความ
เชื่อมั่น 99 % (ค่าเฉลี่ยที่ได้มาจากการเปรียบเทียบภายในจังหวัด)

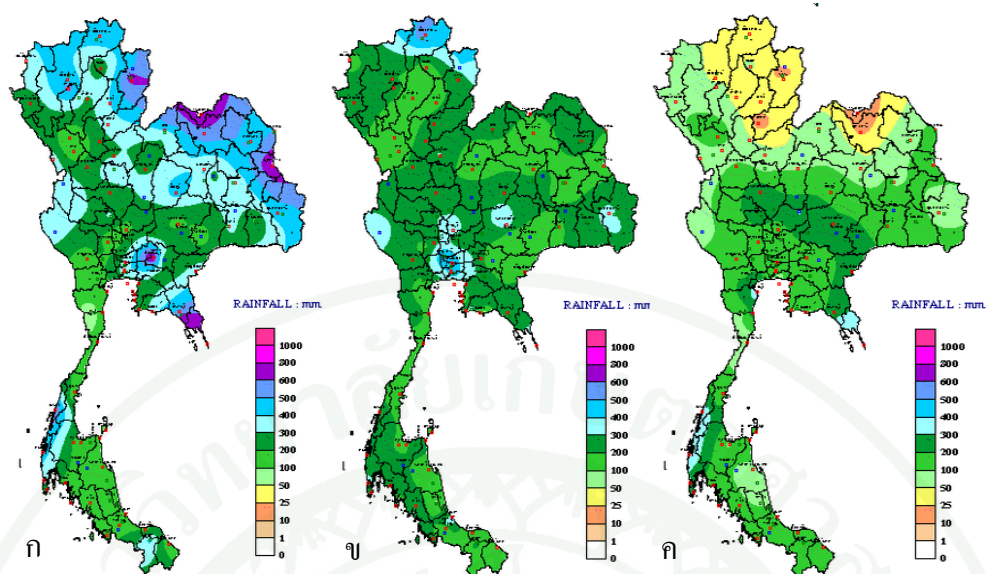


ภาพที่ 9 อาการของโรคราสนิมข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์ แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน, ตัวอย่างโรคจากจังหวัดลำปาง (ก), ตัวอย่างโรคจากจังหวัดนครราชสีมา (ข), ตัวอย่างโรคจาก จังหวัดสงขลา (ค), ตัวอย่างใบข้าวโพดที่ไม่พบอาการของโรคราสนิมที่ทดสอบในจังหวัด กาญจนบุรี (ง)



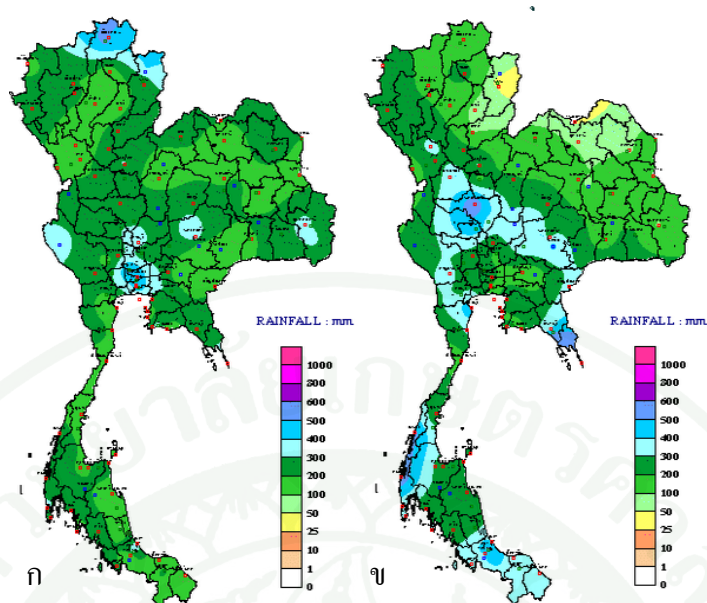
ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดลำปาง เดือนมกราคม (ก), เดือนกุมภาพันธ์ (ข) และเดือนมีนาคม (ค) ปี 2553

ที่มา: สำนักงานแผนที่ภูมิสารสนเทศสุโขทัยวิทยา กรมอุตุนิยมวิทยา (2553)



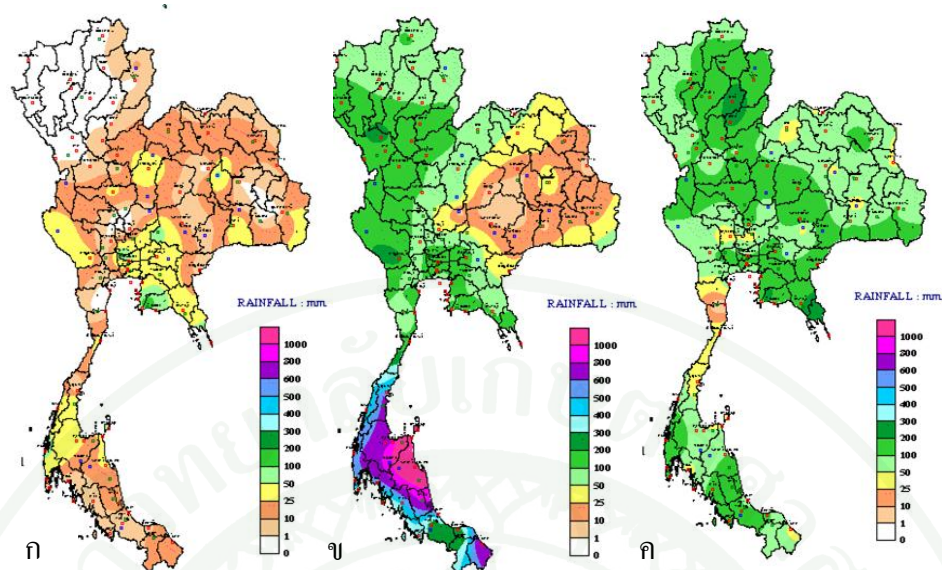
ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดสงขลา เดือนสิงหาคม (ก), เดือนกันยายน (ข) และเดือนตุลาคม (ค) ปี 2553

ที่มา: สำนักงานแผนที่ภูมิสารสนเทศสุรนัยมหาวิทยาลัยสุรนัยวิทยา (2553)



ภาพที่ 12 ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดนครราชสีมา เดือนกันยายน (ก) และ
เดือนตุลาคม (ข) ปี 2553

ที่มา: สำนักงานแผนที่ภูมิสารสนเทศสออุตุนิยมหาวิทยาลัย กรมอุตุนิยมหาวิทยาลัย (2553)

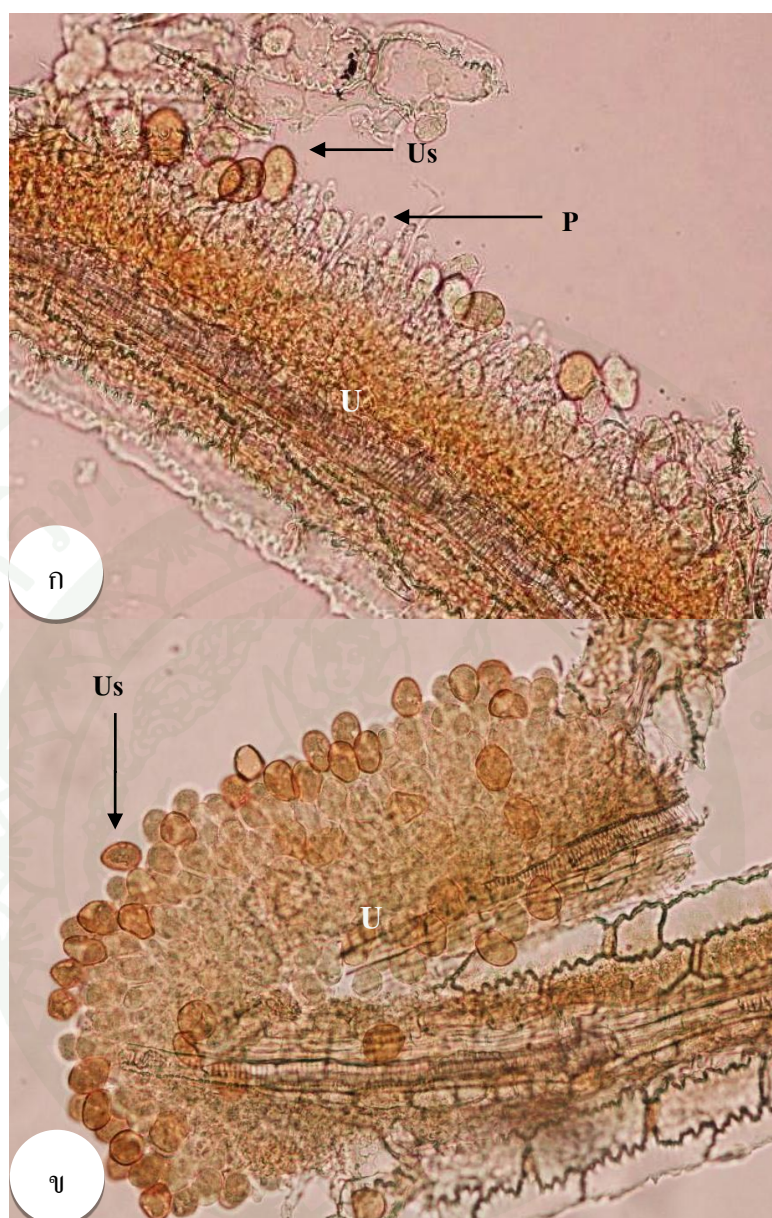


ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำฝนที่ทำการทดลองในจังหวัดกาญจนบุรี เดือนกุมภาพันธ์ (ก),
เดือนมีนาคม (ข) และเดือนเมษายน (ค) ปี 2554

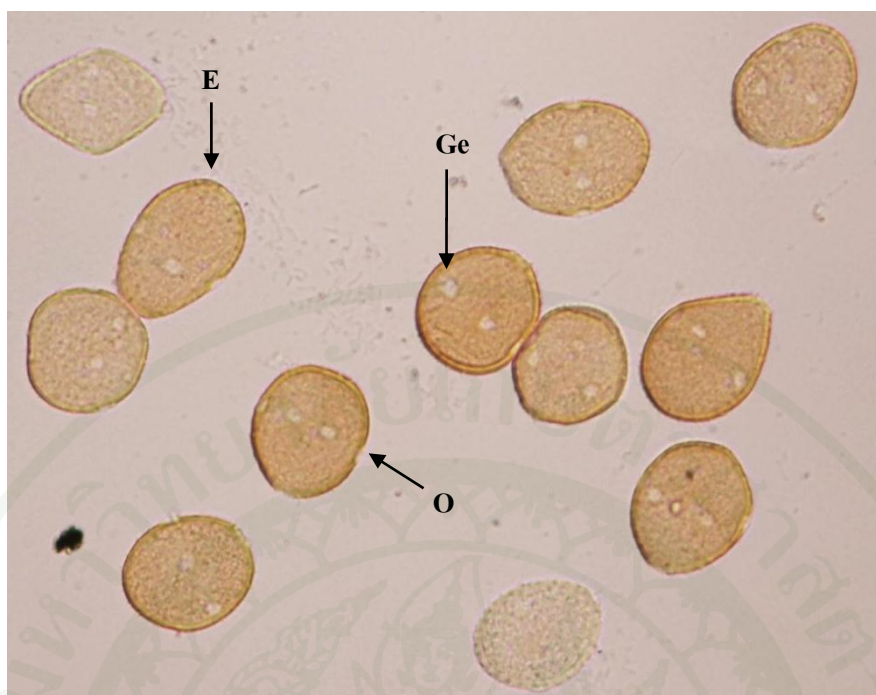
ที่มา: สำนักงานแผนที่ภูมิสารสนเทศสุรนารี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2554)

5. การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสาพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

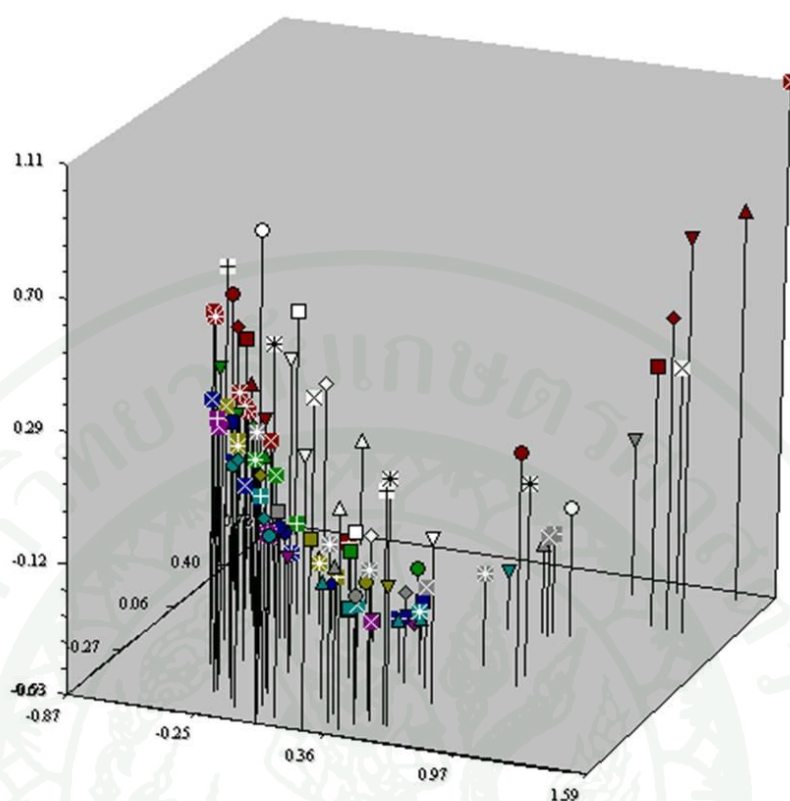
การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พบว่า ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมทั้งสิ้น 106 ไอโซเลต จากทั้ง 3 จังหวัด คือ ลำปาง นครราชสีมา และสงขลา พบเชื้อราสนิมในระยะ uredial stage เท่านั้น และจำแนกได้เป็นเชื้อรา *P. polysora* โดยสร้าง urediospore ภายใน uredium ซึ่งมี paraphysis เกิดขึ้นรอบๆ urediospore (ภาพที่ 14) โดยลักษณะ urediospore มีรูปร่างค่อนข้างกลม (Ovoid:O) หรือรี (ellipsoid: E) ผนังหนา สีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน ที่ผนังของสปอร์มีหนามแหลม (echinulate) เกิดขึ้นรอบผิวสปอร์ พบ germ pore (ภาพที่ 15) กระจายรอบสปอร์ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญ คือ เป็นช่องเปิดเพื่อให้สปอร์สร้าง germ tube เมื่อสปอร์ได้รับความชื้นและพร้อมจะเจริญเป็นเส้นใยหรือใช้ในการเข้าทำลายพืชสำหรับลักษณะของ uredium หรือ pustule ที่เกิดบนใบข้าวโพดนั้น เกิดเป็นกลุ่มและหรือกระจายทั่วทั้งใบ มีลักษณะกลม (Globose: G) และรี (Elongate: E) โดยบางตัวอย่างมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบกลมรี (E) เพียงอย่างเดียว แต่บางตัวอย่างมีลักษณะของสปอร์เป็นทั้งสองแบบคือ ลักษณะกลมรีและกลม (E/G) แผลมีลักษณะปิดและพบว่า มีลักษณะเปิดออกในพันธุ์ที่แสดงอาการรุนแรง เมื่อเกิดขึ้นรวมๆ กันจะมีสีส้มหรือแดง รูปร่างหรือขนาดของแผลไม่แตกต่างกันในแต่ละจังหวัดที่ทดสอบโรค (ตารางที่ 5) โดยเชื้อราสนิมในจังหวัดลำปางมีขนาดของสปอร์ $(21.38-31.94) \times (31.13-42.19)$ ไมครอน สีของแผล (pustule) เป็นสีส้ม จังหวัดนครราชสีมาขนาดของสปอร์ $(20.75-28.83) \times (29.13-34.88)$ ไมครอน สีของแผล (pustule) เป็นสีแดงและจังหวัดสงขลามีขนาดของสปอร์ $(21.94-27.63) \times (30.38-38.38)$ ไมครอน สีของแผล (pustule) เป็นสีแดง (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ urediospore ของทุกไอโซเลตด้วยความสัมพันธ์แบบ Scatter plot 3D พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 16) กล่าวคือ มีการกระจายตัวของทุกไอโซเลตในพื้นที่ของแกน x, y และ z ซึ่งไม่สามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่มได้ ดังนั้นทุกไอโซเลตจึงไม่มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ uredium ของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเศรษฐศาสตร์ (Ki) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope กำลังขยาย 400 เท่า U: uredium, Us: uridiospores, P: paraphysis, uredium ที่พบ paraphysis (ก), uredium ที่ไม่พบ paraphysis (ข)



ภาพที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ urediospore ของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพด
 สายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope
 กำลังขยาย 400 เท่า E: ellipsoid, O: oviod, Ge: Germ pore



ภาพที่ 16 การกระจายตัวของตัวอย่างเชื้อรา *Puccinia polysora* จำนวน 106 ไอโซเลทบนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 โดยวิธี PCA

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52 ที่ทดสอบโรคใน 4 จังหวัด

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (μm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC264	Ki2	Lampang	Orange	E/G	Present	37.81×29.75	1.50	Echinulate	E/O	<i>Puccinia polysora</i>
KKFC265	Ki7	Lampang	Orange	E/G	Present	42.19×31.94	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC266	Ki10	Lampang	Orange	E/G	Absent	32.69×22.13	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC267	Ki12	Lampang	Orange	E/G	Absent	32.56×23.50	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC268	Ki26	Lampang	Orange	E/G	Present	31.13×21.38	1.38	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC269	Ki30	Lampang	Orange	E/G	Present	33.56×22.94	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC270	Ki32	Lampang	Orange	E/G	Present	31.44×23.25	1.38	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC271	Ki49	Lampang	Orange	E/G	Present	32.88×22.50	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC272	Ki1	Songkhla	Red	E/G	Present	34.44×23.81	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC273	Ki2	Songkhla	Red	E/G	Present	35.06×23.63	1.75	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC274	Ki3	Songkhla	Red	E/G	Present	35.25×23.56	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC275	Ki4	Songkhla	Red	E/G	Present	32.69×23.19	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (μm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC276	Ki5	Songkhla	Red	E/G	Present	31.13×22.75	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC277	Ki7	Songkhla	Red	E/G	Present	31.88×23.50	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC278	Ki8	Songkhla	Red	E/G	Present	32.19×22.69	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC279	Ki9	Songkhla	Red	E/G	Present	32.75×23.19	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC280	Ki10	Songkhla	Red	E/G	Present	31.63×23.94	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC281	Ki11	Songkhla	Red	E/G	Present	33.13×22.38	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC282	Ki12	Songkhla	Red	E/G	Present	33.75×26.32	2.38	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC283	Ki13	Songkhla	Red	E/G	Present	34.32×26.50	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC284	Ki14	Songkhla	Red	E/G	Present	35.75×25.19	2.44	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC285	Ki15	Songkhla	Red	E/G	Present	34.00×21.94	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC286	Ki16	Songkhla	Red	E/G	Present	31.56×23.13	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC287	Ki17	Songkhla	Red	E/G	Present	32.44×22.63	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (μm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC288	Ki18	Songkhla	Red	E/G	Present	32.13×22.94	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC289	Ki19	Songkhla	Red	E/G	Present	35.25×25.50	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC290	Ki20	Songkhla	Red	E/G	Present	30.38×22.25	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC291	Ki21	Songkhla	Red	E/G	Present	32.06×23.13	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC292	Ki22	Songkhla	Red	E/G	Present	31.13×22.69	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC293	Ki23	Songkhla	Red	E/G	Present	31.69×22.75	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC294	Ki24	Songkhla	Red	E/G	Present	31.19×22.88	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC295	Ki25	Songkhla	Red	E/G	Present	31.50×23.00	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC296	Ki26	Songkhla	Red	E/G	Present	32.06×25.00	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC297	Ki27	Songkhla	Red	E/G	Present	31.88×23.44	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC298	Ki28	Songkhla	Red	E/G	Present	33.13×23.00	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC299	Ki29	Songkhla	Red	E/G	Present	38.38×27.63	1.63	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (µm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC300	Ki30	Songkhla	Red	E/G	Present	34.00×25.38	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC301	Ki31	Songkhla	Red	E/G	Present	33.31×24.13	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC302	Ki32	Songkhla	Red	E/G	Present	30.88×23.00	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC303	Ki34	Songkhla	Red	E/G	Present	32.75×22.00	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC304	Ki35	Songkhla	Red	E/G	Present	36.69×27.56	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC305	Ki37	Songkhla	Red	E/G	Present	33.75×23.69	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC306	Ki39	Songkhla	Red	E/G	Present	33.25×24.63	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC307	Ki40	Songkhla	Red	E/G	Present	32.25×23.56	1.75	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC308	Ki41	Songkhla	Red	E/G	Present	32.69×24.44	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC309	Ki42	Songkhla	Red	E/G	Present	32.13×22.06	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC310	Ki43	Songkhla	Red	E/G	Present	33.38×22.75	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC311	Ki44	Songkhla	Red	E/G	Present	33.50×24.06	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (μm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC312	Ki45	Songkhla	Red	E/G	Present	35.88×27.50	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC313	Ki46	Songkhla	Red	E/G	Present	31.13×22.56	1.75	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC314	Ki47	Songkhla	Red	E/G	Present	32.00×22.31	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC315	Ki48	Songkhla	Red	E/G	Present	33.00×24.13	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC316	Ki49	Songkhla	Red	E/G	Present	31.25×23.13	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC317	Ki50	Songkhla	Red	E	Present	31.00×23.13	1.75	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC318	Ki51	Songkhla	Red	E/G	Present	30.50×22.00	1.56	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC319	Ki52	Songkhla	Red	E/G	Present	32.88×23.19	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC320	Ki1	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.63×24.50	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC321	Ki2	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.64×24.81	1.44	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC322	Ki3	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.75×23.94	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC323	Ki4	Nakhonratchasima	Red	E/G	Absent	30.75×22.63	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (µm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC324	Ki5	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.18×24.33	1.83	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC325	Ki6	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.94×26.31	2.31	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC326	Ki7	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	30.11×21.53	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC327	Ki8	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.55×23.80	1.70	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC328	Ki9	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.25×22.25	2.31	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC329	Ki10	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.38×22.25	1.56	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC330	Ki11	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	29.79×22.63	1.69	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC331	Ki12	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	29.43×24.50	2.38	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC332	Ki13	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.69×24.16	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC333	Ki14	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	28.25×22.60	1.63	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC334	Ki15	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.00×21.38	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC335	Ki16	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.51×24.54	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC336	Ki17	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.00×24.13	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (μm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC337	Ki18	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	26.33×19.88	1.69	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC338	Ki19	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.38×22.65	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC339	Ki20	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.39×24.53	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC340	Ki21	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.25×23.75	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC341	Ki22	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.25×24.88	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC342	Ki23	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.19×24.88	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC343	Ki24	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.63×22.50	1.88	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC344	Ki25	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.38×23.63	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC345	Ki26	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.83×23.20	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC346	Ki27	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	29.61×22.95	1.56	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC347	Ki28	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.11×24.31	1.69	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC348	Ki29	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.63×24.56	1.44	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (µm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC349	Ki30	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.96×26.38	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC350	Ki31	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.49×24.79	1.89	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC351	Ki32	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.75×22.75	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC352	Ki33	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.50×23.31	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC353	Ki34	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	29.13×23.63	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC354	Ki35	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.89×22.46	1.38	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC355	Ki37	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.89×25.26	1.56	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC356	Ki39	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.16×25.36	1.75	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC357	Ki40	Nakhonratchasima	Red	E/G	Absent	31.38×22.06	2.25	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC358	Ki41	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.94×24.71	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC359	Ki42	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	29.75×20.75	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC360	Ki43	Nakhonratchasima	Red	E/G	Absent	29.63×23.50	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Specimen	Pedigree	Location	Uredium			Urediospore			Identified	
			Color	Shape	Paraphysis	Size ¹ (µm)	Wall ¹ thickness	Wall surface	Shape	species
KKFC361	Ki44	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.94×24.08	1.81	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC362	Ki45	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.00×23.50	2.06	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC363	Ki46	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	32.40×25.02	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC364	Ki47	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.00×24.00	2.13	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC365	Ki48	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	34.88×28.83	2.00	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC366	Ki49	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.48×23.64	1.94	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC367	Ki50	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.29×26.01	1.44	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC368	Ki51	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	31.68×22.41	1.69	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>
KKFC369	Ki52	Nakhonratchasima	Red	E/G	Present	33.91×28.16	2.19	Echinulate	E/O	<i>P. polysora</i>

หมายเหตุ ¹ หน่วยเป็นไมครอนหรือไมโครเมตร

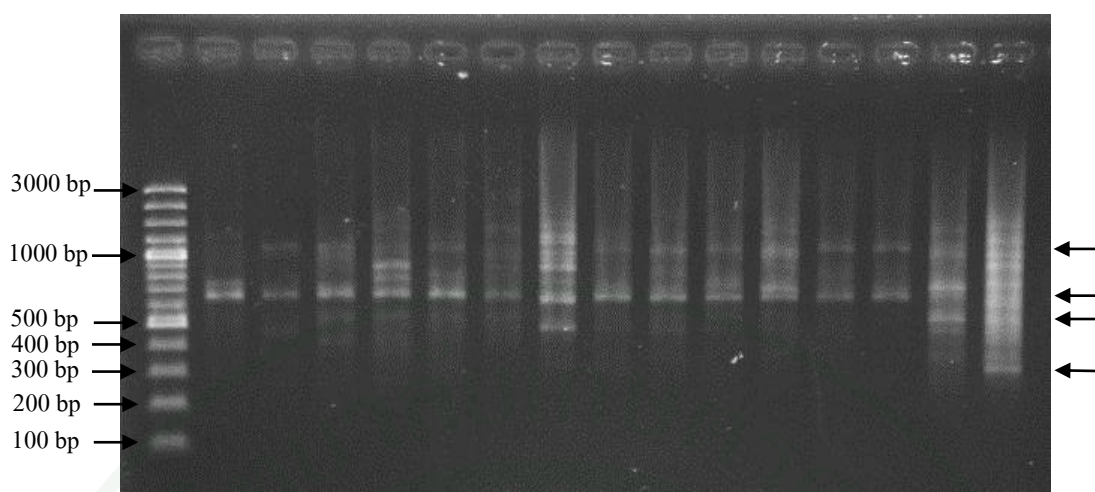
6. การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและความแตกต่างของจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม

P. polysora บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ด้วยเทคนิค ISSR

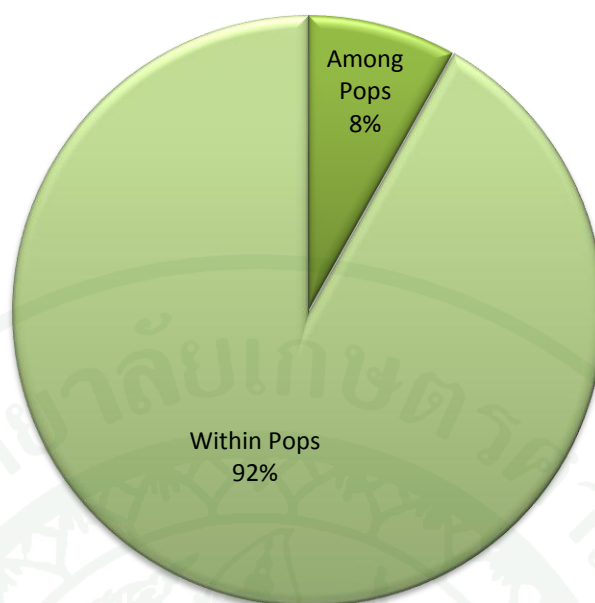
จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ เกษตรศาสตร์จำนวน 31 ไอโซเลท จากทั้งหมด 106 ไอโซเลท ที่รวบรวมจาก 3 จังหวัด ได้แก่ ลำปาง นครราชสีมาและกาญจนบุรี ด้วยเทคนิค inter simple sequence repeat (ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅, (AGG)₅ และ (GTG)₅ ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 28 แถบ (ภาพที่ 17) เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (binary data) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป POPGEN โดยวิธี UPGMA ของ Nei (1978, 1987) และ Gen Alex พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงภายในกลุ่มประชากรของเชื้อราสนิม (92%) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี AMOVA จำนวน 999 ซ้ำ (ภาพที่ 18) แต่มีความแตกต่างน้อยระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อราสนิม (8%) มีค่า $G_{ST} = 0.1348$ (POPGEN) โดยประชากรที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรที่มีระยะทางห่างไกลออกไป ตัวอย่างเช่น ประชากรของเชื้อราสนิมในจังหวัดนครราชสีมาและลำปาง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยหรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม คือ มีค่า $\Phi_{PT} = 0.081$ ($P > 0.05$) จึงทำให้ Phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นมีความใกล้ชิดกัน (ภาพที่ 19) ซึ่งทั้งสองจังหวัดนี้อยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในขณะที่ประชากรของเชื้อราสนิมในจังหวัดสงขลาได้แยกออกไปอยู่นอกกลุ่มเมื่อดูจาก Phylogenetic tree โดยจังหวัดสงขลาอยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการกระจายตัวโดยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCA) พบว่า มีการกระจายของตัวอย่างรอบแกน x และ y (ภาพที่ 20) โดยการกระจายของประชากรจังหวัดลำปาง จังหวัดสงขลาและจังหวัดนครราชสีมา มีความสอดคล้องกับรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ กล่าวคือ มีรูปแบบจีโนไทป์ทั้งหมด 39 จีโนไทป์ จากการใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ GAG(TCG)₅ มีรูปแบบจีโนไทป์ที่แยกได้ 19 จีโนไทป์ ได้แก่ Gen1-Gen19 โดยจะพบรูปแบบจีโนไทป์ที่มีร่วมกัน (ภาพที่ 21) คือ จีโนไทป์แบบ Gen1 ซึ่งพบในตัวอย่างของจังหวัดนครราชสีมา (NR) และจังหวัดสงขลา (SK) ได้แก่ NR6, NR9, NR25, NR45, NR47 และ SK25 และ Gen14 พบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) และจังหวัดลำปาง (LP) ได้แก่ SK9, SK26, SK45, LP10 ไพรเมอร์ (AGG)₅ มีจีโนไทป์ที่แยกได้ 6 จีโนไทป์ ได้แก่ Gen20-Gen25 (ภาพที่ 22) พบรูปแบบจีโนไทป์ที่มีร่วมกัน คือ Gen20 พบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) จังหวัดลำปาง (LP) และจังหวัดนครราชสีมา (NR) ได้แก่ NR6, NR15, NR19, NR25, NR47, NR51, NR52, SK9, SK11, SK25, SK26, SK45, LP10, LP12, LP26, LP30, LP32 และ LP49 และไพรเมอร์ (GTG)₅ มีจีโนไทป์ที่แยกได้ 14 จีโนไทป์ ได้แก่ Gen26-Gen39 (ภาพที่ 23) โดยจะพบรูปแบบจีโนไทป์ที่มีร่วมกัน คือ Gen27 พบในตัวอย่างของจังหวัด

สงขลา (SK) จังหวัดลำปาง (LP) และจังหวัดนครราชสีมา (NR) ได้แก่ NR7, SK6 และ LP10 และจีโนไทป์ Gen37 จะพบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) และจังหวัดลำปาง (LP) ได้แก่ SK45, LP12 และ LP26 ซึ่งข้อมูลของรูปแบบของดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ที่กระจายตัวตามแต่ละจังหวัดนี้จะช่วยสนับสนุนว่ามีการเคลื่อนย้ายของ urediniospore ระหว่างจังหวัดได้ (ภาพที่ 24)

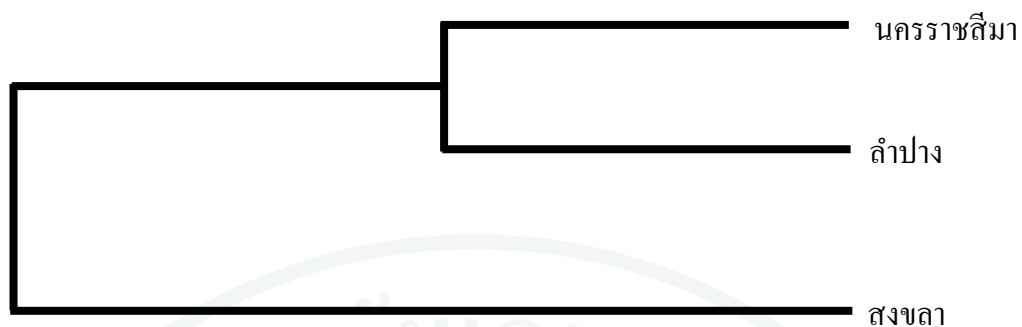




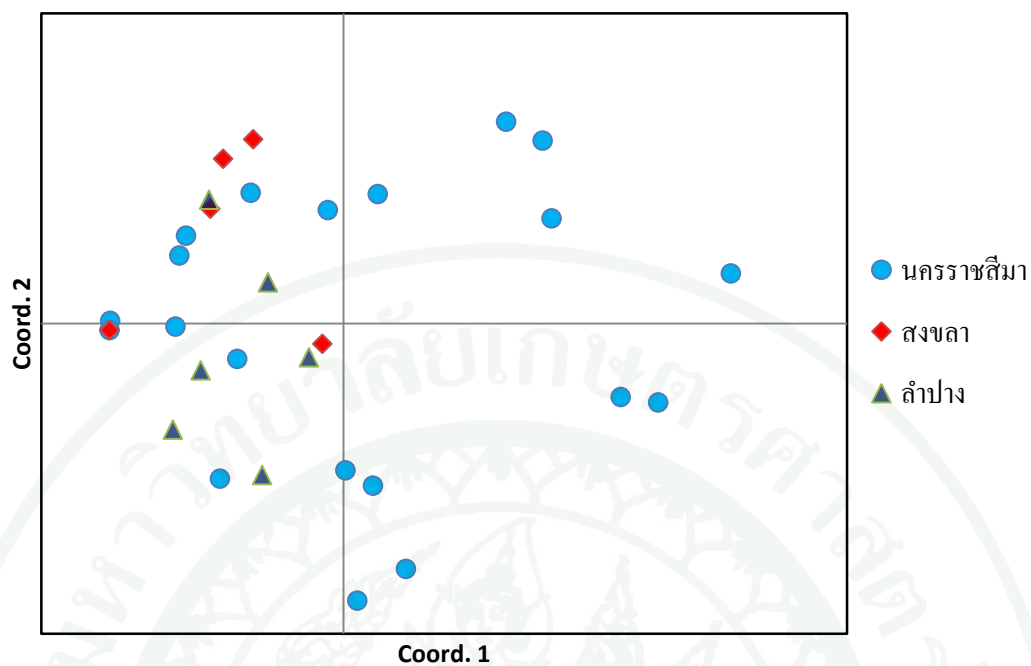
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅; M = 100 bp. Lader plus Marker; บริเวณที่ลูกศรชี้แสดงลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band)



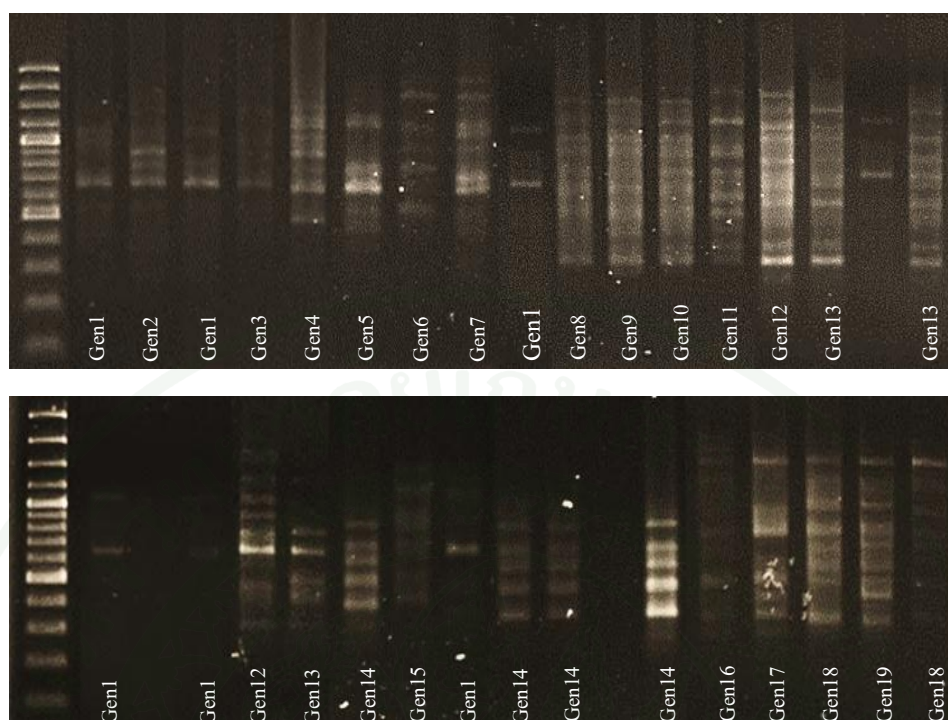
ภาพที่ 18 เปอร์เซนต์ของ Molecular variance เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ Genetic distance of AMOVA,
 $\Phi_{PT} = 0.081$ ($P > 0.05$)



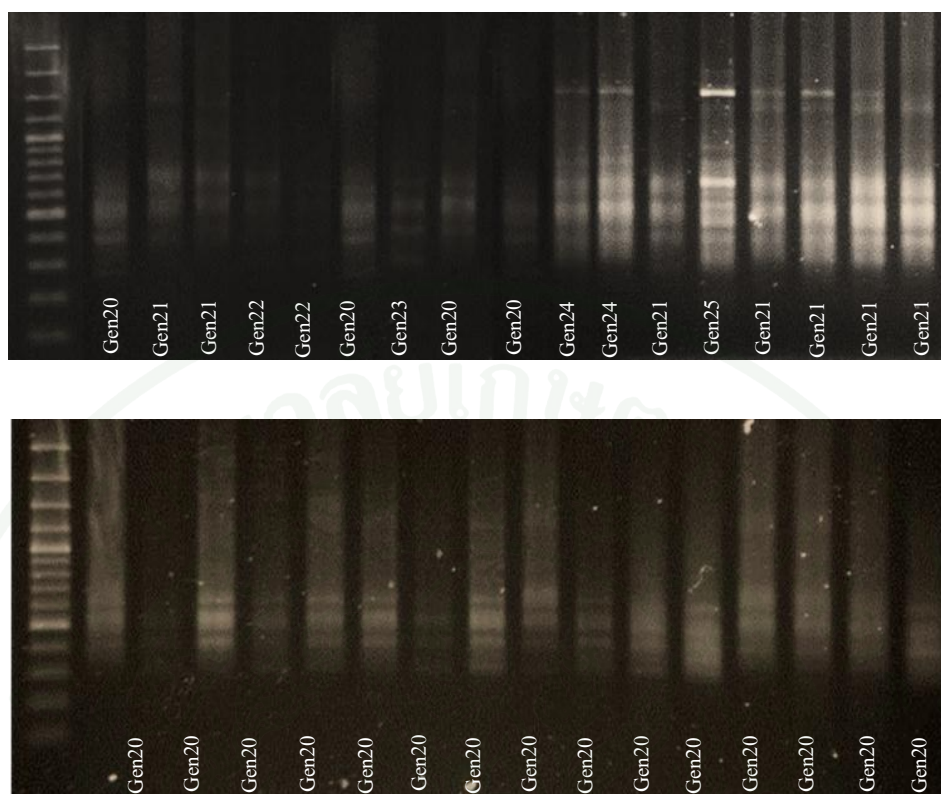
ภาพที่ 19 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อราสนิม *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ โดยวิธี UPGMA, $G_{ST} = 0.1348$ (Nei, 1987)



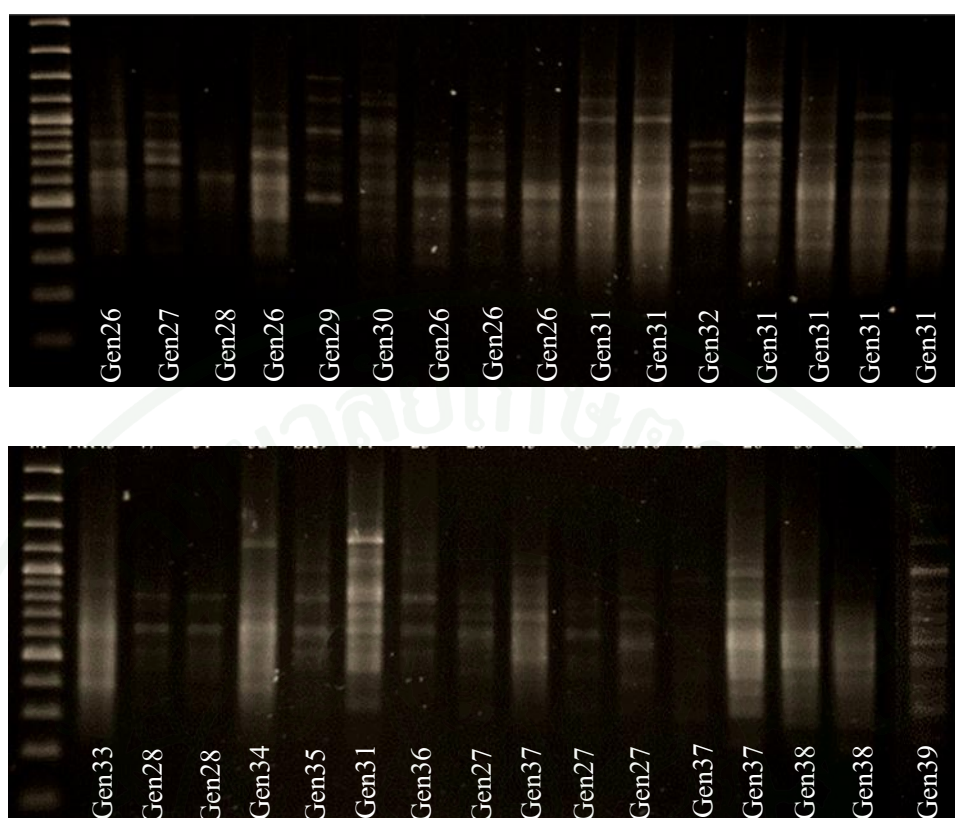
ภาพที่ 20 การกระจายตัวของตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพด *Puccinia polysora* ที่ปลูกทดสอบโรคใน
จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดลำปาง และจังหวัดสงขลา โดยวิธี Principal Coordinate
Analysis (PCA)



ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅, M = 100 bp ladder plus



ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ (AGG)₃, M = 100 bp ladder plus



ภาพที่ 23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อราสนิม *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท่งศาสตร์ (Ki) ในจังหวัดลำปาง นครราชสีมา และสงขลา โดยใช้ไพรเมอร์ (GTG)_n, M = 100 bp ladder plus

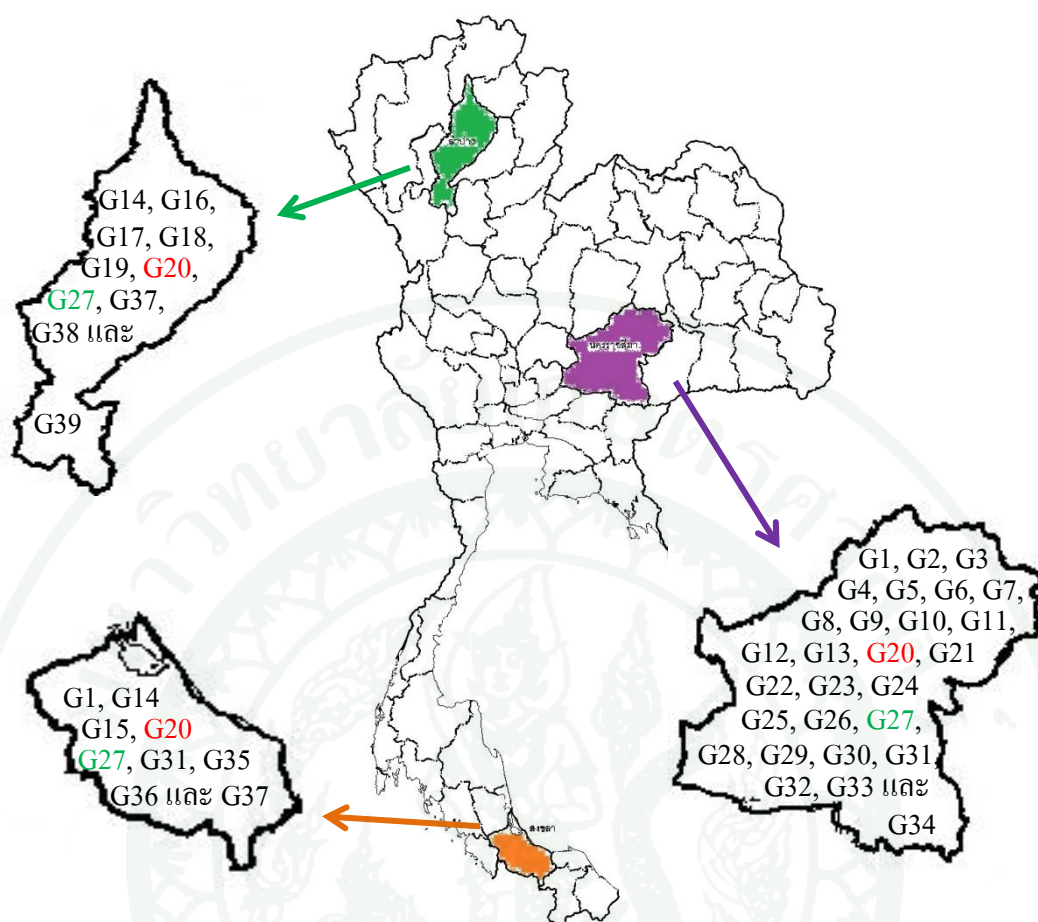
ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (Ki) ด้วยเทคนิค PCR-ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ GAG(TCG)₅

Primers	Genotypes	Provinces	Pedigrees
GAG(TCG) ₅	Gen1	NR และ SK	NR6, NR9, NR25, NR45, NR47 และ SK25
	Gen2	NR	NR7
	Gen3	NR	NR10
	Gen4	NR	NR11
	Gen5	NR	NR15
	Gen6	NR	NR16
	Gen7	NR	NR19
	Gen8	NR	NR26
	Gen9	NR	NR27
	Gen10	NR	NR33
	Gen11	NR	NR34
	Gen12	NR	NR40, NR51
	Gen13	NR	NR41, NR43, NR52
	Gen14	SK และ LP	SK9, SK26, SK45, LP10
	Gen15	SK	SK11
	Gen16	LP	LP12
	Gen17	LP	LP26
	Gen18	LP	LP30, LP49
	Gen19	LP	LP32

หมายเหตุ: NR = จังหวัดนครราชสีมา, SK = จังหวัดสงขลา และ LP = จังหวัดลำปาง; หมายเลขที่ต่อท้ายอักษรย่อคือ สายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (Ki) แต่ละสายพันธุ์ (Pedigree)

ตารางที่ 7 แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (Ki) ด้วยเทคนิค PCR-ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ (AGG)₅ และ (GTG)₅

Primers	Genotypes	Provinces	Pedigrees
(AGG) ₅		NR	NR6, NR15, NR19, NR25, NR47, NR51, NR52,
	Gen20	SK	SK9, SK11, SK25, SK26, SK45
		LP	LP10, LP12, LP26, LP30, LP32, LP49
	Gen21	NR	NR7, NR9, NR33, NR40, NR41, NR43, NR45
	Gen22	NR	NR10, NR11
	Gen23	NR	NR16
	Gen24	NR	NR26, NR27
	Gen25	NR	NR34
(GTG) ₅	Gen26	NR	NR6, NR10, NR16, NR19, NR25
	Gen27	NR, SK และ LP	NR7, SK6, LP10
	Gen28	NR	NR9, NR47, NR51
	Gen29	NR	NR11
	Gen30	NR	NR15
	Gen31	NR	NR26, NR27, NR34, NR40, NR41, NR43
		SK	SK11
	Gen32	NR	NR33
	Gen33	NR	NR45
	Gen34	NR	NR52
	Gen35	SK	SK9
	Gen36	SK	SK25
	Gen37	SK และ LP	SK45, LP12, LP26
	Gen38	LP	LP30, LP32
	Gen39	LP	LP49



ภาพที่ 24 แสดงรูปแบบการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละจังหวัด G : เป็นตัวอักษรย่อของ Genotype หมายเลขที่ต่อท้ายอักษรย่อ (G) คือ สายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ เกษตรศาสตร์ (Ki) แต่ละสายพันธุ์ (Pedigree) โดยจังหวัดที่มีสีเขียว คือ จังหวัดลำปาง, จังหวัดที่มีสีม่วง คือ จังหวัดนครราชสีมา และ จังหวัดที่มีสีส้ม คือ จังหวัดสงขลา, ตัวอักษรย่อที่เหมือนกัน คือ จีโนไทป์เดียวกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมข้าวโพดจาก 8 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ ตาก เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิ และสงขลา พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราสนิมสูง ประชากรที่อยู่ในแหล่งที่มีสภาพภูมิอากาศเหมือนกันจะมีความแตกต่างกันน้อย ในขณะที่บางประชากรมีความแตกต่างจากประชากรอื่น ๆ มาก เช่น ประชากรจากจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดนี้มาจากแหล่งปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดที่สำคัญของประเทศไทย จึงเป็นแหล่งสะสมของเชื้อราสาเหตุโรค และเมื่อทำการทดสอบความรุนแรงของโรคราสนิม โดยใช้ข้าวโพดสายพันธุ์แท็กเมตรศาสตร์ (Ki1-Ki52) เป็นสายพันธุ์ทดสอบ ปลูกทดสอบในจังหวัด นครราชสีมา เปรียบเทียบกับ จังหวัดลำปาง สงขลา และกาญจนบุรี พบว่า ช่วงของระยะเวลาในการระบาดและก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคนั้นแตกต่างกันไป โดยจังหวัดลำปางมีการระบาดของโรคตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ จังหวัดนครราชสีมาจะมีการระบาดของโรคตั้งแต่เดือนกันยายน จังหวัดสงขลามีการระบาดของโรคตั้งแต่เดือนกันยายน และจังหวัดกาญจนบุรีมีการระบาดของโรคตั้งแต่เดือนมีนาคม นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาการระบาดและความรุนแรงของโรคแปรผันไปตามสภาพภูมิอากาศ โดยสายพันธุ์ Ki25 และ Ki26 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอมาก แสดงระดับอาการของโรคราสนิมไม่เท่ากันในแต่ละจังหวัด ในขณะที่แปลงทดสอบในจังหวัดลำปางและกาญจนบุรีไม่แสดงอาการ ดังนั้นสภาพอุณหภูมิ สภาพแวดล้อมและปริมาณน้ำฝนมีผลต่อปริมาณเชื้อ (inoculum) และการพัฒนาของโรคราสนิม

2. จากการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์ พบว่า มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือจีโนไทป์มีทั้งหมด 39 จีโนไทป์ แต่มีจีโนไทป์ที่ร่วมกันในแต่ละจังหวัดเพียง 5 จีโนไทป์คือ Gen1 พบในตัวอย่างของจังหวัดนครราชสีมา (NR) และจังหวัดสงขลา (SK) ได้แก่ NR6, NR9, NR25, NR45, NR47 และ SK25 จีโนไทป์ Gen14 พบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) และจังหวัดลำปาง (LP) จีโนไทป์ Gen20 พบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) จังหวัดลำปาง (LP) และจังหวัดนครราชสีมา (NR) จีโนไทป์ Gen27 พบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) จังหวัดลำปาง (LP) และจังหวัดนครราชสีมา (NR) และจีโนไทป์ Gen37 จะพบในตัวอย่างของจังหวัดสงขลา (SK) และจังหวัดลำปาง (LP) โดยข้อมูลดังกล่าวจะช่วยสนับสนุนว่ามีการเคลื่อนย้ายของ urediospore ระหว่างจังหวัด

3. การคัดเลือกข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ที่ปลูกในสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน พบว่า สายพันธุ์ Ki36 และ Ki38 เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทาน มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 0 คือ ไม่พบอาการของโรคราสนิม พบเพียงจุดสีเหลืองเท่านั้น และสายพันธุ์ Ki25 และ Ki26 เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอ มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 6 และ 5 ตามลำดับ เมื่อทดสอบปลูกในจังหวัด นครราชสีมา และ ลำปาง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน



ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝนและความชื้นสูง มีผลต่อการเข้าทำลาย การพัฒนาโรคราสนิมและการแพร่ระบาดของเชื้อโรค การวางแผนการปลูกพืช เพื่อหลีกเลี่ยงสภาพที่เหมาะสมดังกล่าว จะช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อได้ ตัวอย่างเช่น จากการสำรวจโรคราสนิม พบว่า จังหวัดเพชรบูรณ์ เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่การปลูกข้าวโพดมากที่สุดในประเทศ แต่พบว่าการระบาดของโรคราสนิมน้อยกว่าจังหวัดอื่น ๆ เนื่องจากจังหวัดเพชรบูรณ์มีการทิ้งช่วงการปลูกข้าวโพदनานถึง 6-8 เดือน

2. จากการทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้ในแหล่งปลูกที่มีสภาพอากาศที่แตกต่างกัน พบว่า ความรุนแรงของโรคราสนิมบนพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในแต่ละแหล่งนั้นมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราสนิมที่เกิดขึ้นในแต่ละพื้นที่ ซึ่งการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดควรมีการทดสอบโรคมามากกว่า 1 แหล่ง ซึ่งจะทำให้มั่นใจว่าข้าวโพดที่คัดเลือกได้นั้นสามารถต้านทานโรคได้ แม้ไปปลูกในแหล่งอื่น ๆ นอกจากนี้ ข้อมูลทางด้านจีโนมไทป์ที่วิเคราะห์ได้ยังแสดงให้เห็นว่า ในแต่ละพื้นที่ปลูกนั้น มีเชื้อราสาเหตุ *P. polysora* อยู่หลายสายพันธุ์และมีความเหมือนหรือต่างกันระหว่างพื้นที่

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- โชคชัย เอกทัศนาวรรณ, สรรเสริญ จำปาทอง และ ชำนาญ นัตรแก้ว. 2536. ข้าวโพดพันธุ์ใหม่: ลูกผสมเดี่ยวเกษตรศาสตร์ 3501, 3502, 3503 และ 3504. 200-206 น. ใน รายงานการ
ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31: สาขาพืช. 3-6 กุมภาพันธ์
2536. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทิพย์ เลชะกุล. 2545. การปลูกข้าวโพดฝักอ่อนเพื่ออุตสาหกรรม. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการ
เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
กรุงเทพฯ. 292 หน้า
- ปิยะพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์. 2548. การถ่ายยีนโคโคเนสเข้าสู่ข้าวโพดหวานสายพันธุ์แท้.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันชัย จันทรประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 276 หน้า
- สรรเสริญ จำปาทอง. 2552. พันธุ์: สิ่งที่เกี่ยวข้อง. 1-12 น. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม
เรื่องการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้ได้ผลผลิตคุ้มค่า. 21-22 เมษายน 2552. ศูนย์วิจัย
ข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ สถาบันอิทธิจันทรสถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืช
ศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. 2554. ข้าวโพด. แหล่งที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK3/chapter2/t3-2-12.htm#sect4>, 11 มีนาคม 2554.
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2539. การปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอล
พี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 หน้า

———. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php, 25 กุมภาพันธ์ 2555.

สำนักงานแผนที่ภูมิสารสนเทศสอศดุนิยมวิทยา กรมอุตุนิยมวิทยา. 2553. ภาพแผนที่แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา. แหล่งที่มา: <http://www.arcims.tmd.go.th/DailyDATA/>. ตุลาคม 2554

Cammack, R.H. 1959. Studies on *Puccinia polysora* Underw.: III Description and Life Cycle of *P. polysora* in West Africa. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 42(1): 55-58.

Chávez-Medina, J.A., N.E. Leyva-López and J.K. Pataky. 2007. Resistance to *Puccinia polysora* in maize accessions. **Plant Dis.** 91: 1489-1495.

Cummins, G.B. and Y. Hiratsuka. 1983. **Illustrated Genera of Rust Fungi: Revised Edition.** The American Phytopathological Society. USA.

Deadman, M.L., A.M. Al Sadi, Y.M. Al Maqbali, S. Livingston, M.C. Aime. 2006. First report of *Puccinia sorghi* on maize in oman. **Plant Disease** 90:826.

Dracatos, P.M., J.L. Dumsday, R.S. Olle, N.O.L. Cogan, M.P. Dobrowolski, M. Fujimori, H. Roderick, A.V. Stewart, K.F. Smith and J.W. Forster. 2006. Development and characterization of EST-SSR markers for the crown rust pathogen of ryegrass. **NRC Research Genome** 49: 572-583.

Futrell, M.C. 1975. *Puccinia polysora* epidemics on maize associated with cropping practice and genetic homogeneity. **Phytopathology** 65: 1040-1042.

- George, M.L., E. Regalado, M. Warburton, S. Vasal and D. Hoisington. 2004. Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew. **Euphytica** 135: 145–155.
- Gouveia, M.M.C., A. Ribeiro, V.M.P. Várzea, C.J. Rodrigues. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia** 97(2): 396-404.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 2007. **Principles of Population Genetics: Fourth Edition**. Sinauer Associates. MA, USA.
- Hee, C.J. 2006. Epidermal cell response to rust hyphae and the resistance mode of tropical maize to southern corn rust. **Journal of Plant Biology** 49(5): 392-397.
- MaMaugh, T. 2008. **Guidelines for Surveillance for Plant Pests in Asia and the Pacific**. Australian Center for International Agricultural Research. Australia.
- Melching, J.S. 1975. Corn rusts: Types, races and destructive potential, pp. 90-115. *In* **Proceeding of the 30th Annual Corn and Sorghum Research Conference**. 30th ASTA. Chicago, USA.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. **Am. Nat.** 106: 283-292.
- . 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.
- Ordoñez, M.E., S.E. Germán and J.A. Kolmer. 2010. Genetic differentiation within the *Puccinia triticina* population in South America and comparison with the North American population suggests common ancestry and intercontinental migration. **Phytopathology** 100(4): 376-383.

- Paningbatan, R. A. and G. N. Bastasa. 2000. Biological control of *Puccinia polysora* Underw. (corn rust) with *Sphaerellopsis* sp. pp. 23. In **30th Annual Scientific Conference of the Crop Science**. 2-7 May 2000, Philippine Journal of Crop Science 25: 23. Batac, Ilocos, Philippines.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 228-295.
- Rabet, S.M-M., Y He'Naut, A. Dor, G. Pe'rez-Lachaud, C. Pe'lissier, C. Gers and L. Legal. 2009. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). **The Journal of Arachnology** 37:10–14.
- Raid, R.N., S.P. Pennypacker and R.E. Stevenson. 1988. Characterization of *Puccinia polysora* epidemic in Pennsylvania and Maryland. **Phytopathology** 78: 579-585.
- Reid, L.M. and X. Zhu. 2005. **Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada**. Agriculture and Agri-Food Canada, Canada. 29 p.
- Renfro, R. 1998. Maize Rusts, pp. 8-14. In C. Casela, R. Renfro and A.F. Krattiger, eds. **Diagnosing Maize Diseases in Latin America**. Ithaca, New York. 57 p.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Exeter Software**. New York. 206 p.
- Shurtleff, M.C. 1980. **Compendium of Corn Diseases**. The American Phytopathological Society. Society. Paul, Minnesota: 105 p.

- Singh, R.P., D.P. Hodson, Y. Jin, J. Huerta-Espino, M.G. Kinyua, R. Wanyera, P. Njau and R. W. Ward. 2006. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. **CAB Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 1: 1-13.
- Srisawang, B. 1998. **Responses to S1 Recurrent Selection in Suwan 1 Maize Population**. Kasetsart Univ. Bangkok, Thailand.
- Sriwatanapongse, S., S. Jinahyon and S.K. Vasal. 1993. **Suwan-1: Maize from Thailand to the World**. Bangkok, Thailand.
- Staples, R.C. 2000. Research on the Rust Fungi during the Twentieth Century. **Annual Reviews Phytopathology** 38: 49-69.
- Unartngam, J., P. Janruang and C. To-anan. 2011. Genetic diversity of *Puccinia polysora* in Thailand based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analysis. **Journal of Agricultural Technology** 7(4): 1125-1137.
- Underwood, L.M. 1897. Some new fungi chiefly from Alabama. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 24: 81-86.
- Villaréal, L.M. M.A., C. Lannou, C.D. Vallavieille-Pope and C. Neema. 2002. Genetic Variability in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* Populations Sampled on a Local Scale during Natural Epidemics. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(12): 6138-6145.
- Virtudazo, E.V., H. Nakamura and M. Kakishima. 2001. Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. **J. Gen. Plant. Pathol.** 67: 28-36.

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. **Nucleic Acids Research** 23(21): 4407-4414.

White, D.G. 2000. **Compendium of Corn Diseases**: Third edition. The American Phytopathological Society. Minnesota 55121-2097, USA.

Zhong-dong, Y., L. Xiao-yong and C. Zhi-min. 2006. ISSR marker and ITS sequence study of *Melampsora larici-populina*. **Agricultural Sciences in China** 5(11): 847-854.

Zummo, N. 1988. Components contributing to partial resistance in maize to *Puccinia polysora*. **Plant Disease** 72: 157-160.



ตารางผนวกที่ 1 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดที่ปลูกทดสอบโรคในจังหวัดลำปางโดยวิธี RCBD

ซ้ำที่	ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52																									
1	46	23	20	2	44	15	1	43	35	8	39	29	22	4	36	19	47	33	13	21	38	34	3	24	7	26
	6	31	10	50	16	17	32	25	45	18	42	30	9	11	37	52	5	51	49	14	40	12	27	41	48	28
2	32	22	16	8	19	36	45	30	14	12	40	37	31	52	47	38	51	15	25	46	20	50	21	24	49	10
	48	6	29	2	43	41	35	18	23	13	27	28	11	5	7	1	33	34	4	26	39	3	17	9	44	42
3	7	2	1	17	41	49	24	30	44	32	3	19	34	50	22	51	45	4	36	35	26	48	38	47	6	25
	33	16	31	28	12	9	23	43	39	18	15	46	5	8	52	37	29	20	42	11	21	10	40	13	14	23

หมายเหตุ: ตัวเลขแต่ละตัวบอกถึงสายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52)

ตารางผนวกที่ 2 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดที่ปลูกทดสอบโรคในจังหวัดสงขลา โดยวิธี RCBD

ซ้ำที่	ข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52																											
1	51	41	10	35	9	13	24	29	18	21	19	7	43	15	50	44	22	33	6	39	36	42	14	5	26	25		
	12	45	46	40	49	2	47	20	16	48	8	34	32	17	37	3	23	38	11	4	30	28	27	1	31	52		
2	7	10	43	9	25	19	3	42	52	30	39	1	28	22	36	37	47	20	26	33	35	51	41	2	34	5		
	11	8	4	40	18	31	49	38	17	46	14	32	48	27	45	12	29	23	15	24	21	13	50	44	6	16		
3	7	20	42	35	32	2	39	46	50	45	17	31	22	51	4	40	43	52	18	37	28	1	44	6	34	38		
	14	36	29	3	12	13	49	30	41	24	25	9	19	15	11	16	47	10	33	26	5	48	27	23	21	8		

หมายเหตุ: ตัวเลขแต่ละตัวบอกถึงสายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท่งเกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52)

ตารางผนวกที่ 3 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดที่ปลูกทดสอบโรคในจังหวัดนครราชสีมา โดยวิธี RCBD

ซ้ำที่	ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52																									
1	31	49	44	50	45	35	6	51	15	19	11	13	27	8	17	34	4	33	14	43	18	9	30	48	47	22
	39	21	40	42	24	52	28	3	26	37	20	2	29	1	36	32	38	23	10	46	12	41	25	7	5	16
2	17	15	45	42	36	40	26	24	41	37	18	30	28	52	5	12	19	23	33	13	3	38	49	25	7	2
	8	51	14	35	9	47	16	39	27	50	11	48	44	31	46	20	29	21	10	34	22	4	32	1	6	43
3	17	21	15	31	20	36	35	25	44	6	48	12	23	45	13	7	22	42	33	18	29	10	51	30	38	39
	14	27	50	19	9	1	3	41	28	24	40	43	2	4	52	47	49	34	8	16	5	32	26	11	37	46

หมายเหตุ: ตัวเลขแต่ละตัวบอกถึงสายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52)

ตารางผนวกที่ 4 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพดที่ปลูกทดสอบโรคในจังหวัดกาญจนบุรี โดยวิธี RCBD

ซ้ำที่	ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki1-Ki52																											
1	27	4	24	12	44	19	43	29	34	33	49	39	45	26	51	21	42	17	7	15	32	3	9	23	5	14		
	46	20	52	22	16	37	2	13	1	48	6	28	11	25	35	40	30	10	31	50	41	36	38	8	18	47		
2	39	15	27	36	31	17	52	28	47	48	7	11	9	3	35	38	4	10	13	23	33	16	32	8	34	45		
	21	20	2	25	18	42	14	44	29	43	24	40	51	6	22	5	19	30	1	46	49	37	12	26	41	50		
3	12	13	5	24	48	23	7	22	30	28	38	31	41	18	3	33	42	45	34	4	6	52	1	19	37	10		
	49	46	27	50	20	15	39	43	44	35	16	29	25	8	2	26	36	40	32	47	14	51	17	21	11	9		

หมายเหตุ: ตัวเลขแต่ละตัวบอกถึงสายพันธุ์ของข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki1-Ki52)

ตารางผนวกที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของแต่ละตัวอย่างของเชื้อราสนิมข้าวโพด *Puccinia polysora* จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย

Isolate	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน																																					
CP51-1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0			
CP51-3	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
CP51-4	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		
CP51-5	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
SB51-1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
SB51-2	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
SB51-5	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
SB51-7	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
SB51-12	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
SK51-2	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
SK51-4	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
SK51-7	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
SK51-9	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SK51-12	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

Isolate	แถบสีเอ็นเอทีแตกต่าง																																					
LB51-1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1		
LB51-22	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB51-27	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
TK51-5	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
TK51-7	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
TK51-8	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
TK51-10	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
TK51-11	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
TK51-14	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
PB51-4	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
PB51-8	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
PB51-12	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
PB51-23	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
CM51-3	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

Isolate	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน																																					
CM51-1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		
CM51-2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
CM51-5	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
NR51-10	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
NR51-11	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
NR51-13	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
NR51-15	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
NR51-16	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของแต่ละตัวอย่างของเชื้อราสนิม *Puccinia polysora* บนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki)

Isolate	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism)																												
	ไพรเมอร์ GAG(TCG) ₅												ไพรเมอร์ AGG ₅						ไพรเมอร์ GTG ₅										
NR6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	
NR7	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
NR9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
NR10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
NR11	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
NR15	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
NR16	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
NR19	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
NR25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
NR26	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NR27	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NR33	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
NR34	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

Isolate	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism)														
	ไพรเมอร์ GAG(TCG) ₅					ไพรเมอร์ AGG ₅					ไพรเมอร์ GTG ₅				
NR41	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
NR43	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
NR45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
NR47	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
NR51	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
NR52	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
SK9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
SK11	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SK25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SK26	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
SK45	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
LP10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

Isolate	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism)														
	ไพรเมอร์ GAG(TCG) ₅										ไพรเมอร์ AGG ₅				
	ไพรเมอร์ GTG ₅														
LP26	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
LP30	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
LP32	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
LP49	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปัทมา จันทรเรือง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	27 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	16/4 หมู่ 1 ตำบลพระแท่น อำเภอดงเจริญ จังหวัดกาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประสบการณ์การทำงาน	ผู้ช่วยสอนรายวิชาโรคพืชเบื้องต้น ปีการศึกษา 2553 ผู้ช่วยสอนรายวิชาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ปีการศึกษา 2554
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) (พ.ศ. 2555)
ผลงานตีพิมพ์	1. ปัทมา จันทรเรือง, สรรเสริญ จำปาทอง และ จินตนา อันอาม้งาม. 2555. ความแตกต่างทางพันธุกรรมและ ความรุนแรงของโรคราสนิมข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> ในประเทศไทย. วารสารโรคพืช. ปีที่ 26 เล่ม 1-2. 2. Unartngam, J., P. Janruang and C. To-anan. 2011. Genetic diversity of <i>Puccinia polysora</i> in Thailand based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analysis. Journal of Agricultural Technology 7(4): 1125- 1137. 3. Pattama Janruang, Arm Unartngam and Jintana Unartngam . 2012. Genetic Variability of Southern Corn Rust on Inbred Line: Ki1-Ki52 in Different Geographical Area. Organizing Committee of JKTC Seminar 2012, November 10, 2012, Okayama University, Japan.
โครงการแลกเปลี่ยน	The Louisiana State Agricultural Center Summer Internship for Graduate Students of Kasetsart University, Thailand on May 20-August 19, 2011, Baton Rouge, Louisiana, USA