



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า

Development for Screening Method of Corn Rust Disease Resistant Variety on Seedling

นามผู้วิจัย นางสาวประณิตา พรหมศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์จินตนา อันอาดมั่งงาม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อาร์ม อันอาดมั่งงาม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า

Development for Screening Method of Corn Rust Disease Resistant Variety on Seedling

โดย

นางสาวประณิศา พรหมศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประณิตา พรหมศรี 2555: การพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ด้านทานโรคราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์จินตนา อันอาดมงาม, Ph.D 84 หน้า

โรคราสนิมข้าวโพด หรือ southern rust ในประเทศไทย เกิดจากเชื้อ *Puccinia polysora* เป็นโรคที่มีความสำคัญในการผลิตข้าวโพด นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดจึงได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมาเพื่อมีความต้านทานต่อโรคราสนิม การพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อและประเมินโรคราสนิมในระยะต้นกล้าจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง การเปรียบเทียบวิธีปลูกเชื้อราสนิมด้วยการวางกระดาษกรอง(Whatman No.1) และการหยดสารแขวนลอย urediospores บนต้นกล้าข้าวโพด หลังจากทำการปลูกเชื้อ 7-10 วัน พบว่า การปลูกเชื้อด้วยการวางกระดาษกรองมีอัตราการเกิดโรคสูงกว่าและระยะเวลาในการแสดงอาการบนต้นกล้า เกิดขึ้นเร็วกว่าการปลูกเชื้อโดยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores จากนั้นปลูกข้าวโพดหวาน 10 สายพันธุ์ (SC01 - SC10) ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา ประเมินความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นนำข้าวโพดทั้ง 10 สายพันธุ์มาทดสอบโรคในโรงเรือนโดยการปลูกเชื้อราสนิมบนต้นกล้า ด้วยวิธีวางกระดาษกรอง พบว่า ข้าวโพดสายพันธุ์ SC03, SC04 และ SC05 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในแปลงปลูก 84.66, 69.91 และ 70.00% ตามลำดับ เมื่อทดสอบโรคในระยะต้นกล้ามีจำนวนแผล 8-16 pustules และมีการพัฒนาของแผลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงจัดอยู่ในระดับอ่อนแอ ในขณะที่ข้าวโพดสายพันธุ์ SC02, SC06, SC07 และ SC09 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในแปลงปลูก 38.41, 38.75, 36.41 และ 38.33 % ตามลำดับ เมื่อทดสอบโรคในระยะต้นกล้ามีจำนวนแผล 1-2 pustules แต่ไม่มีการพัฒนาของแผลเพิ่มขึ้น จึงจัดอยู่ในระดับต้านทานโรค จากผลการทดสอบโรคแสดงให้เห็นว่าการปลูกเชื้อในระยะต้นกล้าด้วยวิธีการวางกระดาษกรองสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ด้านทานโรคในเบื้องต้นได้ นอกจากนี้มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ ribosomal DNA ของเชื้อรา *P. polysora* ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 21 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank (DDBJ) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench จากการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 21 ไอโซเลทนี้ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *P. polysora* จากฐานข้อมูล GenBank และทุกไอโซเลท แยกกลุ่มกับเชื้อรา *P. sorghi* โดยมีค่า bootstrap สูงสุด 100% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS นั้นสามารถนำมาใช้ในการแยกเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ออกจากกันได้ นอกจากนี้ได้คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับย่อยชิ้นส่วนบริเวณ ITS เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมแยกความแตกต่างของเชื้อรา *P. polysora* ออกจากเชื้อรา *P. sorghi* โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench จากการทดสอบเอนไซม์จำนวน 3 ชนิด พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *TaqI* และ *SaII* ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ในเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ได้

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pranita Promsri 2012: Development for Screening Method of Corn Rust Disease Resistant Variety on Seedling. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Mrs. Jintana Unartngam, Ph.D. 84 pages.

Corn rust disease or southern rust in Thailand caused by *Puccinia polysora* is considered a major pathogen of corn production. Therefore, corn breeders have developed new varieties which resistance to rust disease. Seedling inoculation studies are needed to develop reliable screening techniques that insure infection of susceptible variety seedling. Comparison of the inoculation method using filter paper (Whatman no.1) method and urediospores suspension dropping method on corn seedling was conducted. After inoculation 7-10 days, found that filter paper method was more effective than dropping method especially for the rate and timing of disease occurrence. Then, ten varieties of sweet corn (SC01 - SC10) were planted in the National Corn and Sorghum Research Center at Nakhon Ratchasima, Thailand. The rust disease severity on all varieties was evaluated. Then, all ten varieties seedling were inoculated using filter paper method in greenhouse condition. In the field observation, the disease severity of sweet corn 03, 04 and 05 varieties were 84.66, 69.91 and 70.00% respectively, while the number of pustules on sweet corn seedling were 8 -16 pustules and increasing of pustules on the susceptible varieties. On the other hand, the resistant varieties in field test, the disease severity of sweet corn 02, 06, 07 and 09 varieties were 38.41, 38.75, 36.41 and 38.33 % respectively, while the number of pustules on sweet corn seedling were 1-2 pustules and no development of pustules. The result indicated that inoculation method with filter paper was a suitable method for screening of resistant varieties. Moreover, sequencing analysis of internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA was conducted. Twenty-one isolates of *P. polysora* were collected from various localities. All isolates DNA were amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 universal primers. Twenty-one sequences were aligned and analyzed together with *P. polysora* and *P. sorghi* sequences obtained from GenBank (DDBJ) using the CLC Main workbench. The UPGMA clustering showed that the twenty-one sequences were in the same group with other sequences of *P. polysora* from Genbank and all sequences separated from *P. sorghi* supporting by 100% bootstrap value. The results suggested that DNA sequence of ITS region was sufficiently to distinguish *P. polysora* and *P. sorghi*. Furthermore, the screening of restriction enzymes for digestion of ITS region was conducted to distinguish the species of *P. polysora* and *P. sorghi* using CLC Main Workbench. The screening of 3 enzymes such as *EcoRI*, *TaqI* and *SalI* enzymes could not distinguish *P. polysora* and *P. sorghi*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภท
บัณฑิตศึกษา

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ดร.จินตนา อันอาดมิ่งงาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณา
ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จ
สมบูรณ์ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่งตลอดมา ขอขอบพระคุณ ดร.อาร์ม อันอาดมิ่งงาม อาจารย์
ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. วรรณวิไล อินทนู ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร. ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาชี้แนะและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร กำแพงแสนและคณาจารย์ทุกท่านที่
ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สรรเสริญ จำปาทอง จากศูนย์วิจัยข้าวโพด
และข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำทดลอง
รวมไปถึงเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทั้งระดับปริญญาตรี โท และเอก ภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่เป็น
กำลังใจ ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือเสมอมา

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ที่อบรมสั่งสอน สนับสนุนในทุกๆด้าน รวมถึง
เป็นกำลังใจที่สำคัญมาโดยตลอด

ประณิตา พรหมศรี

ตุลาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	76
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การประเมินระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ในแปลงทดสอบโรค จ.นครราชสีมา	42
2 การแบ่งระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ในแปลงทดสอบโรคของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา	43
3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>P. polysora</i> บนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10)	45
4 การแบ่งระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ในระยะต้นกล้า	48
5 เปรียบเทียบการเกิดโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ในแปลงทดสอบโรคและในระยะต้นกล้า	49
6 แสดงตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพด ชนิดของข้าวโพด และแหล่งที่เก็บรวบรวมราสนิม ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	52
7 ตัวอย่างของเชื้อรา <i>P. polysora</i> ในประเทศไทย และเชื้อราสนิมชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank	54
8 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I และ <i>Taq</i> I	63

ตารางผนวกที่

1 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพด ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	77
2 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
3 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการ วางกระดาษกรอง (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	78
4 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการ วางกระดาษกรอง (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	78
5 Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อ <i>Puccinia polysora</i> ร่วมกับเชื้อ <i>P. polysora</i> และ <i>P. sorghi</i>	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงตำแหน่งของ ITS1-5.8S-ITS2 ใน ribosomal DNA (rDNA)	17
2	การงอก germ tube ของ urediospores เชื้อราสนิมหลังจากเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ	32
3	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของ urediospore ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆ	33
4	อาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพดสายพันธุ์อ่อนแอ ที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores	33
5	พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores	34
6	การปลูกเชื้อราสนิมบนใบข้าวโพดในระยะต้นกล้า ด้วยวิธีวางกระดาษกรอง	34
7	อาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	35
8	อาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพดหลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	36
9	การแสดงพัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีการวางด้วยกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores (10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	37
10	เปรียบเทียบจำนวนแผลของโรคราสนิมที่พบบนใบข้าวโพด หลังปลูกเชื้อโดยวิธีการหยดและวิธีการวางกระดาษกรอง	38
11	แปลงทดสอบโรคราสนิม ของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	40
12	ลักษณะอาการของโรคราสนิมบนส่วนต่างๆ ของข้าวโพดหวานในแปลงทดสอบโรคของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	41
13	ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนใบข้าวโพดหวาน	41
14	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การเกิดแผลราสนิม (pustules) หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีวางกระดาษกรองบนต้นกล้าข้าวโพดหวานสายพันธุ์ต่างๆ	47
16	ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>P. polysora</i>	53
17	UPGMA tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> และ <i>P. sorghi</i>	56
18	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>P. polysora</i> เปรียบเทียบกับเชื้อรา <i>P. sorghi</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Sal</i> I	61
19	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อรา <i>P. polysora</i> เปรียบเทียบกับเชื้อรา <i>P. sorghi</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Taq</i> I	62
20	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา <i>P. polysora</i> ที่แยกจากข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC 01-SC 10	66
21	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Puccinia polysora</i> จากข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC 01-SC 10 ที่ย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI	66

การพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า

Development for Screening Method of Corn Rust Disease Resistant Variety on Seedling

คำนำ

ข้าวโพดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นในตลาดโลก จากข้อมูลสถานการณ์และแนวโน้มของผลผลิตข้าวโพด พบว่า ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดฝักอ่อน และข้าวโพดหวาน เพื่อใช้ภายในประเทศ และส่งออกเป็นอันดับต้นๆของโลก รองจากประเทศใหญ่ออย่างสหรัฐอเมริกา นับตั้งแต่ปีพ.ศ. 2549 – 2554 ประเทศไทยมีความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.61 พบว่าด้านการส่งออกและนำเข้ามีแนวโน้มลดลงร้อยละ 0.62 ต่อปี จากความต้องการที่ขยายตัวเพิ่มขึ้นทำให้ผลผลิตข้าวโพดไม่เพียงพอ ประกอบกับปัญหาจากความแปรปรวนทางธรรมชาติ เช่น ฝนแล้งช่วงต้นฤดูปลูก และบางพื้นที่ประสบปัญหาอุทกภัย ทำให้ผลผลิตเสียหาย นอกจากนี้เกษตรกรนิยมเพาะปลูกข้าวโพดพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี แต่พบว่าส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค ทำให้คุณภาพของผลผลิตเสียไปอีกด้วย ซึ่งลดปัญหาเหล่านั้นคือ การปลูกพันธุ์ต้านทานและการใช้สารเคมีกำจัด อย่างไรก็ตามการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมและผู้บริโภคมากกว่าการใช้สารเคมี

ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงและเผยแพร่พันธุ์ข้าวโพดทั้งสายพันธุ์แท้และพันธุ์ลูกผสมของข้าวโพดไร่ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียว เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ลดต้นทุนในการผลิตและต้านทานต่อโรค ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคราสนิมนั้น เริ่มตั้งแต่การปลูกข้าวโพด และรอให้โรคเข้าทำลายเองตามธรรมชาติ จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ตรงตามความต้องการ ซึ่งต้องทดสอบในหลายชั่วรุ่นและใช้ระยะเวลานาน งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการปลูกเชื้อราสนิมในระยะต้นกล้า เพื่อให้ นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในเบื้องต้น เป็นการลดต้นทุน ระยะเวลา และแรงงานในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิม นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ คัดเลือกและทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการจำแนกเชื้อรา *Puccinia polysora* ร่วมกับเชื้อราสนิมชนิด

อื่นที่ใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล (GenBank) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคราสนิมข้าวโพดในประเทศไทย



วัตถุประสงค์

1. พัฒนารูปแบบการปลูกเชื้อราสนิมสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคในสภาพโรงเรือนและศึกษาพัฒนาการของโรคราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคการปลูกเชื้อราสนิมข้าวโพดในระยะกล้า โดยเปรียบเทียบผลการเกิดโรคในสภาพแปลงปลูกและการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน
3. จำแนกชนิดของเชื้อราสนิมข้าวโพดที่ระบาดในประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ของ ribosomal DNA
4. การคัดเลือกและการทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการจำแนกเชื้อรา *Puccinia polysora* สาเหตุโรคราสนิมข้าวโพด ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของข้าวโพด

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกรองจากข้าวสาลีและข้าว ข้าวโพดเป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดของโลก รองลงมา ได้แก่ ประเทศจีน บราซิล เม็กซิโก อาร์เจนตินา และไทย โดยมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดทั่วโลกมีประมาณ 826.9 ล้านไร่ มีผลผลิตรวม 575.62 ล้านตัน จากข้อมูลแนวโน้มการผลิตพืชในประเทศไทย ในปีการผลิต 2552/53 พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 6.92 ล้านไร่ ผลผลิตรวม 4.43 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 639 กก./ไร่ สำหรับในปีการผลิต 2553/54 จะมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6-7 ล้านไร่ ผลผลิตรวมประมาณ 4.4 – 4.45 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 640 – 643 กก./ไร่ (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2554) มีการผลิตข้าวโพดเพื่อบริโภคทั้งแบบฝักสดและแปรรูปเป็นสินค้าอุตสาหกรรมการเกษตรต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องทั้งเมล็ด (whole kernel) ครีมข้าวโพด (cream style corn) นํ้านมข้าวโพด นํ้าตาล สบู่ สียาบ้าน เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ จังหวัดที่มีเนื้อที่ปลูกมาก 5 อันดับแรกคือ เพชรบูรณ์ นครราชสีมา เลย น่าน และตาก ปัจจุบันรัฐบาลสนับสนุนให้คนหันมาใช้เอทานอลกันมากยิ่งขึ้น ข้าวโพดซึ่งเป็นพืชที่มีปริมาณการเพาะปลูกมากเป็นอันดับต้นๆ ของโลก เมื่อดูจากพื้นที่การเพาะปลูก ปริมาณผลผลิต ปริมาณความต้องการของตลาด อีกทั้งยังเป็นพืชมีราคาสูง จึงเป็นพืชที่นำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ส่งผลให้ความต้องการวัตถุดิบเพิ่มขึ้น เห็นได้จากการนำเข้าข้าวโพดจากต่างประเทศในปริมาณที่เพิ่มขึ้นทุกๆ ปี (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2555)

ปัญหาสำคัญของเกษตรกรในการปลูกข้าวโพดทุกชนิดรองจากความแปรปรวนทางธรรมชาติ คือ โรคซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการขยายพื้นที่ในการเพาะปลูกและการนำเทคโนโลยีใหม่ๆ มาใช้ในการเกษตร รวมถึงการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดถูกผสมมาเพาะปลูกเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต แต่พบว่าอ่อนแอต่อโรค ส่งผลให้โรคข้าวโพดที่มีอยู่เกิดการระบาดเพิ่มขึ้น การปลูกข้าวโพดเกิดปัญหาโรคพืชระบาดตั้งแต่ระยะเริ่มปลูกไปจนถึงการเก็บรักษาผลผลิต

2. โรคข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา

2.1 โรคใบไหม้แผลเล็ก (Southern หรือ Maydis Leaf Blight)

เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker. หรือชื่อเดิมคือ *Helminthosporium maydis* Nisik. โดยระยะแรกเกิดเป็นจุดเล็กๆ สีเขียวอ่อนนํ้า ต่อมาจะขยายออกตามความยาวของใบโดยจำกัดด้านกว้างของแผลขนานไปตามเส้นใบ ตรงกลางแผลมีสีเทา ขอบแผลมีสีเทานํ้าตาล ขนาดของแผลไม่แน่นอน แผลที่ขยายใหญ่เต็มที่ มีขนาดกว้าง 6-12 มิลลิเมตร และยาว 6-27 มิลลิเมตร ในกรณีที่ใบข้าวโพดเป็นโรครุนแรง แผลจะขยายตัวรวมกันเป็นแผลใหญ่และทำให้ใบแห้งตายในที่สุด เชื้อโรคสามารถระบาดจากต้นหนึ่งไปสู่อีกต้นหนึ่งหรือจากที่หนึ่งไปสู่อีกที่หนึ่ง โดยติดไปกับเมล็ดที่เป็นโรคลมหรือฝน เมื่อเข้าทำลายพืชเป็นแผลบนใบ สามารถสร้างสปอร์อีกมากมายแพร่กระจายในแหล่งปลูก (Fisher *et al.*, 1976)

2.2 โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Leaf Blight)

เกิดจากเชื้อรา *B. turcica* (Pass.) Shoemaker. หรือชื่อเดิมคือ *H. turcicum* Pass. อาการเกิดได้ทุกส่วนของลำต้นข้าวโพดโดยเฉพาะบนใบ นอกจากนั้นอาจจะพบที่กาบใบ ลำต้น และฝัก โดยเกิดเป็นแผล มีขนาดใหญ่สีเทาหรือสีนํ้าตาล แผลมีลักษณะยาวตามใบหว่ายเรียว คล้ายรูปกระสวย แผลมีขนาดระหว่าง 2.5-20 เซนติเมตร แผลที่เกิดบนใบอาจเกิดเดี่ยวๆ หรือหลายแผลซ้อนรวมกันขยายเป็นขนาดใหญ่ ถ้าแผลขยายรวมกันมากๆ จะทำให้ใบแห้งตายได้ เชื้อราจะสร้างสปอร์บนแผลเก่าๆ และสปอร์ ก็จะแพร่ไปโดยลม ฝน สปอร์ของเชื้อจะสร้างขึ้นจำนวนมากภายใต้สภาพความชื้นสูง อุณหภูมิค่อนข้างเย็นระหว่าง 18-27 องศาเซลเซียส ถ้าโรคเข้าทำลายก่อนออกไหม ทำให้ผลผลิตลดได้ถึง 50% แต่ถ้าเข้าทำลายหลังออกไหมแล้ว 6 สัปดาห์ มีผลกระทบต่อผลผลิตน้อย เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ในเศษซากพืช (Shurtleff, 1980)

2.3 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew of maize)

เกิดจากเชื้อรา *Peronosclerospora maydis* (Racib.) C.G. Shaw 1978 มีลักษณะอาการบริเวณใบข้าวโพดเป็นทางยาวสีเหลือง สีเขียวอ่อน และสีเขียวแก่สลับกัน บริเวณใต้ใบโดยเฉพาะตรงทางยาวสีเหลือง หรือเขียวอ่อนจะมีผงคล้ายแป้งเกาะติดอยู่ ซึ่งมักพบในตอนเช้าที่มีอากาศเย็นและมีน้ำค้างมาก ถ้าเป็นกับต้นเล็กต้นจะแคระแกร็น ถ้าเป็นกับต้นข้าวโพดต้นโต ต้นข้าวโพดอาจจะติดฝักแต่ไม่มีเมล็ด การระบาดเริ่มตอนต้นฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคม ถึงเดือน สิงหาคม ไปจนถึงต้นฤดูฝนเมื่อฝนตกต้องตามฤดูกาล อุณหภูมิ 20 – 26 องศาเซลเซียส และความชื้นสูงเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้มาก นอกจากนี้เชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่แห้งดี เชื้อโรคที่ตกอยู่ในดิน หรือที่เกิดบนพืชอาศัยอื่น ประเทศไทยมีรายงานว่าพบ เชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างอื่นๆ ได้แก่ *P. philippinensis* *P. sacchari* และ *Sclerospora rayssiae* (White, 2000)

2.4 โรคราเขม่าดำ (Common Smut)

เกิดจากเชื้อรา *Ustilago maydis* (DC.) Cda. หรือชื่อเดิมคือ *U. zeae* Ung. พบอาการของโรคได้ทุกส่วนของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญเซลล์อ่อนบนส่วนต่างๆ ของพืชที่อยู่เหนือดิน ลำต้น ใบ ฝัก และเกสรตัวผู้ เชื้อราจะสร้างปมขึ้น ครั้งแรกมีขนาดใหญ่สีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อแก่ปมจะแห้งเป็นผง เมื่อฝนที่ห่มปมแตกออกจะปล่อยผงสีดำคือสปอร์ของเชื้อราภายในออกมาสามารถแพร่ระบาด โดยลม ฝน น้ำไหล แมลงและสัตว์ เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ในปมเก่าๆ และในดิน บางครั้งสามารถอยู่ได้นานข้ามปี เมื่อถึงฤดูปลูกข้าวโพดภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สปอร์จะงอกและสร้างส่วนที่แพร่พันธุ์ปลิวไปโดยลม (กรมวิชาการเกษตร, 2524; Christensen, 1963)

2.5 โรคราสนิม (Rust)

โรคราสนิมของข้าวโพดที่พบว่าทำความเสียหายในโลกมี 3 ชนิด คือ common rust เกิดจากเชื้อรา *Puccinia sorghi*, southern rust เกิดจากเชื้อรา *P. polysora* และ tropical rust เกิดจากเชื้อรา *Physopella zeae* (Melching, 1975)

Tropical rust ไม่มีรายงานว่าพบในประเทศไทยแผล มีลักษณะกลมไปจนถึงรูปไข่ มีขนาดเล็กและเกิดแผลบริเวณชั้น epidermis ของใบ ตรงกลางของแผล เป็นรอยแผลสีขาวหรือสีเหลืองจางเปิดออกให้เห็นด้านในแผล

Common rust เป็นโรคราสนิมชนิดหนึ่งที่เคยมีรายงานในประเทศไทยแต่พบน้อยกว่า Southern rust (Giatgong, 1980) อาการของโรคราสนิมชนิดนี้ แผลมีลักษณะกลมหรือกลมรีรูปไข่ สีเข้ม กระจุกกระจาย เป็นตุ่มนูน สีน้ำตาลแดงเป็นเกิดทั้งสองด้านของใบ มีต้น *Oxalis* sp. เป็นพืชอาศัยรอง (alternate host) teliospore มีสีเข้ม urediospores รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวไม่เรียบ มีขนาด 23-28 x 20-25 ไมครอน มี 3-4 germ pores (White, 2000)

Southern rust เป็นโรคราสนิมชนิดที่พบระบาดมากในประเทศไทย อาการของโรคราสนิมชนิดนี้ แผลมีลักษณะกลมหรือกลมรี สีน้ำตาลเข้มหรือดำ อยู่ด้านบนของใบ เกิดด้านใต้ใบเป็นส่วนน้อย แผลเกิดได้แทบทุกส่วนของต้นข้าวโพด คือ ใบ ลำต้น กาบใบ ฟัก ช่อดอกตัวผู้ และอาจพบ halo ได้กับพันธุ์ลูกผสม โดยแสดงอาการเป็นจุดนูนเล็กๆ สีน้ำตาลแดง ขนาดของแผลประมาณ 0.2-2.0 มม. เมื่อเป็นโรคในระยะแรกๆ จะพบเป็นจุดนูนเล็กๆ ต่อมาแผลจะแตกออกมองเห็นเป็นผงสีสนิมเหล็ก ในกรณีที่โรครุนแรงจะทำให้ ใบแห้งตายในที่สุด uredospore มีสีเหลืองทองไปจนถึงส้ม รูปร่างกลมรี ผนังสีเหลืองหรือสีทองบางและเป็นหนามแหลมหนา 1-1.5 ไมครอน มีขนาดระหว่าง 20-29 x 29-40 ไมครอน มี germ pore 4-5 รู เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจะสร้าง teliospore เพื่ออยู่ข้ามฤดู teliospore มีรูปร่างกลมหรือทรงกระบอก หัวท้ายมนขนาด 18-27 x 29-41 ไมครอน ผนังเรียบ สีน้ำตาลเข้ม มี 2 เซลล์ เกิดอยู่บนก้านชูสปอร์สีเหลืองหรือสีน้ำตาล มีขนาดระหว่าง 10-30 ไมครอน teliospore อาจเกิดร่วมกับ uredospore ใน uredium เดียวกันได้ (Shurtleff, 1980; Cummins and Hiratsuka, 1959)

3. การแพร่ระบาดของโรคราสนิม *Puccinia polysora*

ราสนิมเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชประเภท obligate parasite ที่ต้องอาศัยบนเซลล์ของพืชที่มีชีวิต หรือส่วนของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ เชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตบนเศษซากพืชที่ตายแล้วได้ แต่สามารถพักตัวอยู่ข้ามฤดูได้บนซากพืชในลักษณะของการสร้างสปอร์ที่มีผนังหนา ขั้วโปกที่ปลุกหลังฤดูฝนมักพบโรคนี้เข้าทำลาย โดยสปอร์ของเชื้อโรคราสนิม จะถูกพัดพาไปตามลม ทำให้การแพร่กระจายตัวไปได้ไกล เมื่อสปอร์ตกลงสู่ผิวพืชอาศัย หากสภาพแวดล้อมและความชื้นเหมาะสมกับการเข้าทำลายของเชื้อราสนิม เกิดการงอกของสปอร์และเข้าทำลายพืช ทำให้พืชแสดงอาการของโรคราสนิมได้ หากสภาพแวดล้อมนั้นเหมาะสม แต่ไม่มีต้นข้าวโปกในแปลงหรือในไร่ เชื้อราสนิมจะมีการพักตัวอีกครั้ง และเมื่อมีการปลูกข้าวโปกขึ้นมา เชื้อจะปลิวจากซากพืชอาศัยกลับมาที่ข้าวโปกได้อีกและสามารถเข้าทำลายพืชในฤดูต่อไป (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5, 2539 และ Deacon, 2006) สปอร์เชื้อโรคราสนิมสามารถปลิวไปได้ไกลมาก ดังนั้นบางครั้งเราจะไม่พบพืชบริเวณไร่เป็นโรคราสนิม แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและข้าวโปกนั้นเป็นพันธุ์อ่อนแอ จะพบโรคราสนิมระบาดรุนแรงได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของ urediospores คือ 23-28 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 13 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส การงอกของสปอร์จะลดลง ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งคือความชื้นบนผิวใบที่ช่วยให้สปอร์งอกเข้าทำลายพืชได้สำเร็จ (Melching, 1975) โรคราสนิมระบาดปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว ในขณะที่มีความชื้นในอากาศสูง 95-100% และมีอุณหภูมิค่อนข้างเย็น ประมาณ 24-28 องศาเซลเซียส ถ้าเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอจะเป็นโรครุนแรง สภาพการระบาดรุนแรงพบเสมอที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา เลย เชียงใหม่ ตาก (สมเกียรติและคณะ, 2521) เชื้อราสนิม *P. polysora* สร้างสปอร์ 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า urediospore หรือ uredospore เพื่อสืบต่อการเป็นโรค ชนิดที่สองเรียกว่า teliospore หรือ teluetspore เพื่อทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยจะได้ยังคงมีชีวิตอยู่รอดข้ามฤดู ส่วนสปอร์ที่พบมากและแพร่ระบาดได้ดี คือ uredospore การแยกความแตกต่างของ common rust กับ southern rust นั้น ส่วนมากใช้แผล (pustule) โดย common rust มีแผลลักษณะเป็นตุ่มนูนเกิดขึ้นถี่ และ พบทั้ง 2 ด้านของใบ ตุ่มนูนค่อนข้างกลมหรือกลมรี รูปไข่ สีเข้ม การกระจายแบบบาง ๆ ไม่หนาแน่น มีเพียงเล็กน้อย ขนาดใหญ่กว่า แผล ของ southern rust ซึ่งเกิดบนใบ และมีสีเข้มขึ้นเมื่อเป็น teliospores แทนที่จะเป็นสีค่อนข้างแดงของ urediospores (White, 2000)

โรคราสนิมข้าวโปกเป็นโรคที่รู้จักกันมานานแล้วในประเทศที่ปลูกข้าวโปก โดยเฉพาะประเทศที่ปลูกมากกว่า 2 ฤดู เช่น เอลกัววาดอร์ ปลูกข้าวโปกปีละ 4 ครั้ง ดังนั้นพื้นที่ส่วนใหญ่ของการปลูกข้าวโปก จึงพบการระบาดของเชื้อราสนิม *P. polysora* (Wellman, 1972) เชื้อราสนิม

P. polysora ไม่เป็นที่รู้จักกันมากนักในสหรัฐอเมริกา หลายปีต่อมา มีรายงานว่า พบเชื้อชนิดนี้ตามรัฐต่างๆ เช่น อินเดีย ฟลอริดา และจอร์เจีย เป็นต้น การพบ *P. polysora* ในเซอราลิออน เป็นการบันทึกครั้งแรกของเชื้อราชนิดนี้ที่เกิดขึ้นนอกเขตซีกโลกตะวันตก มีการระบาดที่รวดเร็ว และขยายวงกว้างในระยะเวลา 4 - 5 ปี พบว่าโรคนี้อาจแพร่ไปถึงประเทศแถบมหาสมุทรอินเดีย หมู่เกาะฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และประเทศไทย (Cammack, 1958) โรคราสนิมข้าวโพด ที่เกิดจากเชื้อรา *P. polysora* เป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของข้าวโพด ในแหล่งปลูกข้าวโพดทั่วโลก เช่น ในสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบตามรัฐต่างๆ อเมริกาใต้ เม็กซิโก และเปอร์โตริโก (Cummins, 1941) นอกจากนี้ยังพบในแถบแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกาตะวันออก แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย หมู่เกาะฟิลิปปินส์ และประเทศไทย สำหรับแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของโลกเมื่อมีการระบาดของโรคราสนิมเกิดขึ้นสามารถสร้างความเสียหายให้แก่ข้าวโพดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เพาะปลูก (Cammack, 1958)

ประเทศไทยพบเชื้อราสนิม *P. polysora* ในปี พ.ศ. 2499 ภายหลัง จากที่พบในปอร์เนียงเหนือ ปี พ.ศ. 2495 (Cammack, 1958) แต่ไม่ได้ทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตข้าวโพดมากนัก จนมีการระบาดของโรคราน้ำค้างในปี พ.ศ. 2511 เป็นต้นมา ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคราสนิมมานานกว่า 40 ปี ทำความเสียหายมากในแหล่งปลูกข้าวโพด ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา แต่สามารถแก้ไขโดยการฉีดสารเคมีกำจัดเชื้อรา ซึ่งต้องสิ้นเปลืองงบประมาณ แต่วิธีการฉีดพ่นสารเคมีไม่สามารถป้องกันการกำจัดเชื้อราเข้าทำลายพืชของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ การใช้สารเคมีได้ผลดีเมื่อใช้กำจัดเชื้อราในระยะแรกที่พบว่ามีโรคเกิดขึ้นในแปลงหรือใช้จำนวนบางครั้งจึงจะสามารถควบคุมโรคราสนิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถือเป็น การเพิ่มต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้การใช้สารเคมีบางชนิดยังมีผลตกค้างในผลผลิต เช่น ตกค้างในน้ำมัน หรือในเนื้อ กรณีที่ใช้ข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นการใช้สารเคมีถือเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคราสนิมจึงเป็นวิธีที่ควรนำมาใช้ เพราะทำให้ความเสียหายทางด้านผลผลิตและเศรษฐกิจลดลงได้ เป็นการลดการใช้สารเคมี ลดแรงงาน ปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

4. การคัดเลือกพันธุ์ด้านทานและวิธีการประเมินโรค

ข้าวโพดเป็นพืชผสมข้าม (cross – pollinated crop) มีดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน ลักษณะของพืชผสมข้ามคือ เป็นพวกพันธุ์ทาง ในต้นที่เป็นพันธุ์เดียวกันมีจีโนไทป์ต่างกัน ต้องอาศัยลมและแมลงเป็นสื่อในการผสมข้ามของพืชพวกนี้ ส่วนพืชผสมตัวเอง (self - pollinated crop) คือพืชที่ละอองเกสรจะผสมกับไข่ของดอกเดียวกัน แต่ละพันธุ์ให้ลูกหลานที่เป็นพันธุ์แท้ มีจีโนไทป์เหมือนกันทั้งหมดหรือเป็นส่วนใหญ่ ไม่ต้องอาศัยสื่อในการผสมพืชเหล่านี้ก็สามารถผลิตเมล็ดได้เอง การปรับปรุงพันธุ์ของพืช 2 ชนิดนี้แตกต่างกัน จุดมุ่งหมายของการปรับปรุงพันธุ์ในพืชผสมตัวเองคือการผลิตพันธุ์แท้ (pure line) ที่ดี ส่วนจุดมุ่งหมายของการปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้ามคือ เพื่อผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ที่ดี วัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์พืชด้านทานโรคคือ 1)การเพิ่มผลผลิตของพืช 2)เพื่อให้พืชปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศและการขยายพื้นที่เพาะปลูกของพืชที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การปรับปรุงพืชเพื่อให้เกษตรกรสามารถปลูกพืชในท้องที่ๆไม่เคยปลูกพืชชนิดนั้นมาก่อนได้ หรือปรับปรุงพืชที่ปลูกในเขตหนาวให้ต้านทานต่อความแห้งแล้ง 3)ให้มีการต้านทานต่อโรคและแมลง 4)ให้มีคุณภาพดีและตรงตามความต้องการ 5)ให้เหมาะสมกับการเกษตรสมัยใหม่ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้มีลำต้นสั้นเพื่อให้เหมาะกับการเก็บเกี่ยวผลผลิตด้วยเครื่องจักร เป็นต้น (ไพศาล, 2525)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชมีการดำเนินงานหลักๆ คือ 1)การนำเข้าพืชที่จะใช้เป็นแหล่งของยีนหรือใช้เป็นพันธุ์พืชในการปรับปรุงพันธุ์มาจากแหล่งอื่น 2)การผสมพันธุ์ (hybridization) และการคัดเลือกพันธุ์ (selection) วิธีการคัดเลือกที่นิยมใช้กันมากคือ การคัดเลือกแบบบันทึกประวัติ (pedigree method) การคัดเลือกพันธุ์แบบเก็บรวม (bulk method) และการผสมกลับ (backcross method) เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตตามที่ต้องการ (กฤษฎา, 2546) ชนิดของพันธุ์ข้าวโพด แบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. พันธุ์ลูกผสม (conventional hybrid) เป็นเมล็ดพันธุ์ชั่วแรก ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ ตั้งแต่ 2-4 สายพันธุ์ พันธุ์ลูกผสมที่รู้จักกันทั่วไปได้แก่พันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) พันธุ์ลูกผสมสามทาง (three ways cross hybrid) เกิดจากสายพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์ผสมกัน และพันธุ์ลูกผสมคู่ (double cross hybrid) เกิดจากสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ผสมกัน ข้อดีของพันธุ์ลูกผสมคือ ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ผสมเปิด ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้ดี มีความสม่ำเสมอกว่าพันธุ์ผสมเปิด

2. พันธุ์ผสมเปิดหรือพันธุ์ผสมปล่อย คือพันธุ์ที่เกิดจากการนำพันธุ์ผสมเปิดหรือสายพันธุ์จากพันธุ์ต่างๆมารวมกัน แล้วคัดเลือกภายในพันธุ์ให้มีลักษณะผลผลิตและลักษณะอื่น ๆ ที่ดีไว้ พันธุ์ผสมเปิดจะมีความสม่ำเสมอในด้านลักษณะต่าง ๆ และให้ผลผลิตน้อยกว่าพันธุ์ลูกผสม ให้ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์ลูกผสมที่ดี ข้อดีของพันธุ์ผสมเปิดคือ เมล็ดพันธุ์มีราคาถูกและสามารถเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ต่อได้ พันธุ์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ สุวรรณ 1 สุวรรณ 2 สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ นครสวรรค์ 1 เป็นต้น (สรเสรีญ, 2552)

การปลูกข้าวโพดพันธุ์ต้านทานเป็นการป้องกันโรคราสนิมข้าวโพดที่ดีที่สุด ซึ่งปัจจุบันนี้เกษตรกรในประเทศไทยนิยมใช้สายพันธุ์ลูกผสมในการปลูก แต่การใช้สายพันธุ์ดังกล่าวนี้มักพบว่าไม่ต้านทานต่อโรคและเกิดการเข้าทำลายของเชื้อราสนิมสายพันธุ์ใหม่ (new race หรือ different race) ในภายหลัง ความต้านทานในข้าวโพดหวาน (*Zea Mays*L.) ต่อ common rust (*P. sorghi*) พบใน monogenes *Rp1-d* มาเป็นเวลากว่า 15 ปี ในแถบประเทศอาเจนตินา ฮาวาย เม็กซิโก และแอฟริกาใต้ ซึ่งต่อมาไม่สามารถต้านทานเชื้อราได้ เนื่องจากเชื้อราสนิมนั้นเกิดวิวัฒนาการและสามารถเข้าทำลายพันธุ์ที่เคยต้านทาน (Pataky *et al.*, 2001) นอกจากนี้พบว่าข้าวโพดหวานนั้นมีความอ่อนแอต่อโรค southern rust (*P. polysora*) แต่สามารถพบยีนต้านทาน (resistance gene) ที่ต้านทานต่อ southern rust ในข้าวโพด tropical maize จึงได้มีการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพด tropical supersweets ให้มีความต้านทานต่อโรคราสนิม (Martin *et al.*, 1993)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้ทำการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด ทั้งข้าวโพดพันธุ์ผสมเปิดและพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคราน้ำค้างให้เกษตรกรใช้ในการเพาะปลูก ตลอดจนได้พัฒนาสายพันธุ์แท้ให้ภาครัฐและภาคเอกชนนำไปใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ลูกผสม พันธุ์ผสมเปิดที่แนะนำให้เกษตรกร ได้แก่ พันธุ์สุวรรณ 1 (พ.ศ. 2518), พันธุ์สุวรรณ 2 (พ.ศ. 2522), พันธุ์สุวรรณ 3 (พ.ศ. 2530) และพันธุ์สุวรรณ 5 (พ.ศ. 2536) ส่งผลให้การปลูกข้าวโพดในปีเพาะปลูก 2518/19-2534/35 มีผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่), ผลผลิตรวมเฉลี่ย (ล้านตัน) และมูลค่าการส่งออกเฉลี่ย (ล้านบาท) สูงกว่าปีเพาะปลูก 2501/02-2517/18 ถึง 19%, 181% และ 293% ตามลำดับ

พันธุ์สุวรรณ 1 เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่มีความสำคัญมากในการพัฒนาการผลิตข้าวโพดของประเทศไทย ในยุคที่มีโรคราน้ำค้างระบาด เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีเสถียรภาพสูงในการให้ผลผลิตปรับตัวได้กว้าง ต้านทานโรคราน้ำค้าง และโรคทางใบอื่น ๆ จึงมีมากกว่า 20 ประเทศ ที่นำพันธุ์สุวรรณ 1 ไปใช้เป็นพันธุ์ปลูกโดยตรง และใช้เป็นเชื้อพันธุ์กรรมที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์

โดยเฉพาะในการผลิตสายพันธุ์แท้มล็ดสีส้มเหลืองชนิดหัวแข็ง เมื่อนำไปผสมกับสายพันธุ์แท้มล็ดสีเหลืองชนิดหัวบุบหรือกึ่งหัวบุบของข้าวโพดเขตอบอุ่น หรือกึ่งเขตร้อน จะได้ลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูง และต้านทานต่อโรค

พันธุ์สุวรรณ 2 เป็นพันธุ์ที่มีบรรพบุรุษร่วมกับพันธุ์สุวรรณ 1 คือ พันธุ์ไทยคอมพอลิตเบอร์ 1 ด้านทานโรคน้ำค้างได้ดี ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเนื่องจาก เป็นพันธุ์ที่มีอายุเก็บเกี่ยวสั้น (90-100 วัน) มีการหักล้มของลำต้นน้อย สามารถปลูกจำนวนต้นต่อพื้นที่ได้มากกว่าพันธุ์สุวรรณ 1 ให้เมล็ดสีส้มเหลืองชนิดหัวแข็ง แต่ให้ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์สุวรรณ 1 ประมาณ 20-30% ความสูงต้น และจำนวนฝักต่ำกว่าพันธุ์สุวรรณ 1

พันธุ์สุวรรณ 3 พัฒนาขึ้นโดยนำเชื้อพันธุกรรมที่ให้เฮเทอโรซิสสูงกับพันธุ์สุวรรณ 1 ที่มีลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ที่ดีและให้ผลผลิตสูง ผสมกับพันธุ์สุวรรณ 1 โดยใช้สัดส่วนของเชื้อพันธุกรรมนอก 20% เป็นการเพิ่มฐานพันธุกรรมของยีนที่ดีให้กับพันธุ์สุวรรณ 1 และเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโพด เนื่องจากในช่วงที่มีการปลูกพันธุ์สุวรรณ 1 ทั่วประเทศมากกว่า 90% ในกรณีที่มีโรคหรือแมลงระบาดแล้วพันธุ์สุวรรณ 1 ไม่สามารถต้านทานโรคหรือแมลงดังกล่าวได้อาจเป็นผลให้การผลิตข้าวโพดของประเทศเสียหายได้ พบว่าเมื่อปรับปรุงพันธุ์สุวรรณ 3 แล้ว ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงกว่าพันธุ์สุวรรณ 1 ประมาณ 10% ปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมทั่วไป ด้านทานโรคน้ำค้างและโรคราสนิม แต่มีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคน้ำค้างสูงกว่าเล็กน้อย มีระบบรากและลำต้นแข็งแรง มีอายุเก็บเกี่ยว 110-120 วัน ใบยังคงมีสีเขียวเข้มขณะที่เปลือกหุ้มฝักแห้ง มีลักษณะทางการเกษตรบางอย่างดีกว่าพันธุ์สุวรรณ 1 เช่น มีความสูงและฝักต่ำกว่า มีระบบรากและลำต้นแข็งแรงกว่า และเมล็ดมีสีส้มเหลืองชนิดหัวแข็งถึงกึ่งหัวแข็ง

พันธุ์สุวรรณ 5 ได้รับการวิจัยและพัฒนาเป็นข้าวโพดอาหารสัตว์พันธุ์แรกของประเทศไทย เพื่อแนะนำให้เกษตรกรใช้ในการเลี้ยงโคเนื้อและโคนมในรูปข้าวโพดหมัก ข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นการช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงโคนม โดยลดปริมาณการใช้อาหารข้นที่มีราคาแพง พบว่า พันธุ์สุวรรณ 5 ด้านทานโรคน้ำค้างและโรคราสนิมได้ดี ให้ผลผลิตเฉลี่ยอยู่ในช่วง 839-1,168 กก./ไร่ มากกว่าพันธุ์สุวรรณ 1 และ สุวรรณ 3 นอกจากนี้ ยังมีลักษณะทางการเกษตรอื่นๆที่ดีเช่น ใบมีขนาดใหญ่และยาวจึงทำให้มีน้ำหนักรากต้นสด และน้ำหนักแห้งสูง มีฝักขนาดใหญ่และยาวสม่ำเสมอ มีลำต้นสูงใหญ่มีอายุเก็บเกี่ยว 110-120 วัน ใบยังคงมีสีเขียวเข้มขณะที่เปลือกหุ้มฝักแห้ง เมล็ดมีสีส้มเหลืองชนิดหัวแข็งถึงกึ่งหัวแข็ง เมล็ดเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสัตว์

โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เริ่มพัฒนาสายพันธุ์แท้และ
 เผยแพร่สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Ki) ตู้อาจารย์และเอกชนต่าง ๆ เพื่อใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์
 ลูกผสม และใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสม (โชคชัยและคณะ, 2546) มีดังนี้ พ.ศ. 2525
 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki 1 ถึง Ki 19 สายพันธุ์แท้ที่นำมาผลิตลูกผสมเป็นการค้า ได้แก่ Ki 3 และ Ki
 11 ใช้สร้างลูกผสมเดี่ยวพันธุ์สุวรรณ 2301 พ.ศ. 2527 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki 20 สายพันธุ์แท้ Ki
 20 ใช้เป็นพ่อผสมกับพันธุ์สุวรรณ 2301 ได้พันธุ์สุวรรณ 2602 พ.ศ. 2528 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki
 21 และ Ki 22 สายพันธุ์แท้ Ki 21 ใช้เป็นพ่อในการผสมกับพันธุ์ KSX 2903 ได้ลูกผสมสามทาง
 พันธุ์สุวรรณ 3101 พ.ศ. 2530 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki 23 ถึง Ki 30 สายพันธุ์แท้ที่ใช้ผลิตลูกผสม
 เป็นการค้า ได้แก่ Ki 27 และ Ki 28 ซึ่งผสมกันได้ลูกผสมเดี่ยว KSX 2903 และใช้เป็นแม่ของ
 ลูกผสมสามทางพันธุ์สุวรรณ 3101v พ.ศ. 2535 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki 31 ถึง Ki 44 สายพันธุ์แท้
 ที่ใช้ผลิตลูกผสมเป็นการค้า ได้แก่ Ki 32, Ki 36, Ki 43 และ Ki 44 ใช้ผสมกับ Ki 21 ได้ลูกผสมเดี่ยว
 เกษตรศาสตร์ 3501, 3502, 3505 และ 3504 ตามลำดับ พ.ศ. 2538 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki45 ซึ่ง
 ให้ผลผลิต และลักษณะทางการเกษตร ดีกว่าสายพันธุ์ Ki21 สายพันธุ์ Ki45 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อของ
 ลูกผสมเดี่ยวพันธุ์สุวรรณ 3601 สุวรรณ 3851 และสุวรรณ 3853 พ.ศ. 2540 เผยแพร่สายพันธุ์แท้
 Ki 46 ให้ผลผลิต และสมรรถนะการผสมทั่วไปและเฉพาะสูง และมีลักษณะทางการเกษตร ที่ดี
 ด้านทานโรคราน้ำค้าง โรคราสนิม และโรคไวรัสใบด่างอ้อย (SCMV) สายพันธุ์แท้ Ki 46 ให้
 สมรรถนะการผสมเฉพาะสูงกับสายพันธุ์แท้ Ki 45 ได้ลูกผสมเดี่ยวพันธุ์สุวรรณ 3851 พ.ศ. 2544
 เผยแพร่สายพันธุ์แท้ Ki 47 ให้ผลผลิต และสมรรถนะการผสมทั่วไปและเฉพาะสูง มีลักษณะทาง
 การเกษตรที่ดี ด้านทานโรคราน้ำค้าง สายพันธุ์แท้ Ki 47 ให้สมรรถนะการผสมเฉพาะสูงกับสาย
 พันธุ์แท้ Ki 45 ได้ลูกผสมเดี่ยวพันธุ์สุวรรณ 3853 (โชคชัยและคณะ, 2546)

สิ่งสำคัญในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน คือ วิธีการประเมินความรุนแรง หรือความต้านทาน
 โรคในแปลงปลูกพืช โดยประเมินด้วยสายตาเป็นหลัก และมีการแปลงค่ามาตรฐานสำหรับแบ่ง
 ระดับความรุนแรงหรือความต้านทาน โดยมีหลายวิธีในการประเมินและใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่

Hee (1980) ได้ทำการประเมินความรุนแรงของโรคราสนิมที่ก่อความเสียหายบนพื้นที่ใบ
 และลำต้น ดังนี้ ระดับ 1 = Highly resistant ; (น้อยกว่า 1%) แสดงอาการที่ใบล่าง หรือไม่แสดง
 อาการระดับ 2-3 = Resistant ; (2 to 20%) เกิดแผลน้อย แสดงอาการที่ใบล่างและหูใบ ระดับ 4 =
 Moderately resistant ; (21 to 35%) เกิดแผลแสดงอาการที่ใบล่างและหูใบ ระดับ 5 = Intermediate
 ; (36 to 50%) เกิดแผลแสดงอาการที่ใบล่างและหูใบ แบ่งกลุ่มได้ไม่ชัดเจน อยู่ระหว่างต้านทาน
 และอ่อนแอ ระดับ 6 = Moderately susceptible ; (51 to 65%) เกิดแผลแสดงอาการที่ใบล่าง หูใบ

และใบบน เริ่มมีการแสดงอาการที่บริเวณก้านใบ ระดับ 7-8 = Susceptible ; (66 to 80%) เกิดแผลแสดงอาการรุนแรงทั้ง ใบล่าง, หูใบ, ใบบน, และก้านใบ ระดับ 9 = Highly susceptible ; (มากกว่า 80%) แสดงอาการรุนแรงทั้งต้น หรือพืชตาย

Reid (2005) ได้ทำการประเมินความรุนแรงโดยแบ่งระดับความรุนแรงเป็น 7 ระดับดังนี้
 ระดับ 1 = พืชไม่แสดงอาการ ระดับ 2= เกิดแผลน้อย (< 1% ของพื้นที่ใบ) ระดับ 3= เกิดแผล 1-5% ของพื้นที่ใบ 4= เกิดแผล 6-20% ของพื้นที่ใบ 5= เกิดแผล 21-50% ของพื้นที่ใบ 6= >50% แสดงอาการบนใบ และ 7= พืชตาย และสำหรับระดับความต้านทาน แบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้
 ระดับ I (immune) = ไม่แสดงอาการราสนิม, ระดับ HR (highly resistant) = แสดงอาการเป็นจุดสีเหลือง, ระดับ R (resistant) = แผลขนาดเล็กมาก, ระดับ MR (moderately resistant) = แผลขนาดเล็กปกคลุม cuticle ของใบเป็นส่วนมาก แสดงให้เห็น urediospores น้อย, ระดับ MS (moderately susceptible) = แผลขนาดใหญ่เชื่อมชนกัน แสดงให้เห็น urediospores มาก, ระดับ S (susceptible) = แผลจำนวนมากเชื่อมชนกันเป็นแผลใหญ่ มีการแตกให้เห็น urediospores จำนวนมาก

เจตษฎา และคณะ (2552) ประเมินลักษณะความต้านทานโรคราสนิมโดยการให้คะแนน 1-9 การให้คะแนนพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การเกิดแผล (pustule density) บนพื้นที่ใบข้าวโพด 3 ใบ ได้แก่ ใบที่อยู่เหนือฝักบนสุด 1 ใบ และที่อยู่ใต้ฝักบนสุด 2 ใบ ดังนี้ คะแนน 1 = เกิดแผล 70 %; คะแนน 2 = เกิดแผล 50 %; คะแนน 3 = เกิดแผล 30 %; คะแนน 4 = เกิดแผล 20 %; คะแนน 5 = เกิดแผล 10 %; คะแนน 6 = เกิดแผล 5 %; คะแนน 7 = เกิดแผล 3 %; คะแนน 8 = เกิดแผล 1 %; คะแนน 9 = เกิดแผล 0 %

McMaugh (2008) เก็บข้อมูลดัชนีการเกิดโรค เพื่อประกอบข้อมูลความรุนแรงของโรคบนพันธุ์ต่างๆ โดยการประเมินและให้คะแนนการเกิดโรคในแปลงปลูกแบ่ง 4 ระดับ ดังนี้ ระดับ 0= ไม่แสดงอาการของโรค คะแนนการเกิดโรคเป็น 0 ระดับต่ำ = 1-25% ของต้นที่เป็นโรค คะแนนการเกิดโรคเป็น 1 ระดับปานกลาง = 25-50% ของต้นที่เป็นโรค คะแนนการเกิดโรคเป็น 2 ระดับรุนแรง = มากกว่า 50% ของต้นที่เป็นโรค คะแนนการเกิดโรคเป็น 3 จากคะแนนการเป็นโรคและจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคต่อแปลง นำมาใช้คำนวณดัชนีการเกิดโรค ซึ่งเป็นตัวชี้วัดระดับความรุนแรงของโรค จากสมการ

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

เมื่อ na = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 0

nb = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 1

nc = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 2

nd = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 3

N = จำนวนของต้นที่มีการประเมิน

5. การปลูกเชื้อโรคราสนิม

การปลูกเชื้อราสนิมลงบนต้นกล้าข้าวโพดโดยวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ สามารถทำได้โดยเตรียมสปอร์ราสนิม 0.5 กรัม ลงในน้ำ 7.5 ลิตร ที่ผสม Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์บนผิวใบข้าวโพดอายุ 7-8 วัน โดยเครื่อง artish's airbrush ซึ่งวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์นั้นเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการปลูกเชื้อราสนิมลงบนต้นกล้าข้าวโพด เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของความต้านทานโรคราสนิมและเพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราสนิม ในระยะต้นกล้า (Pataky, 1987)

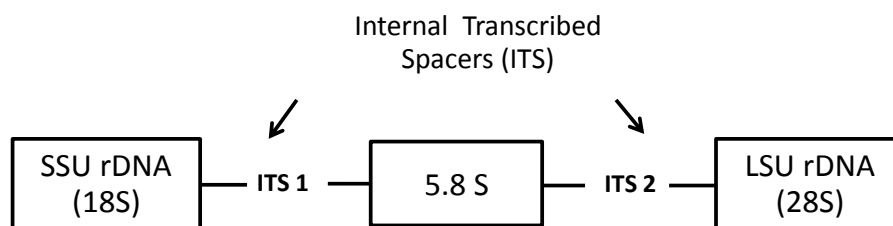
ธรรมศักดิ์ และคณะ (2540) ทำการปลูกเชื้อโรคราสนิมลงบนต้นกล้าข้าวโพดสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อทดสอบความต้านทานโรคราสนิม ในห้องปฏิบัติการโดยเริ่มจาก การปลูกข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ ในกระบะพลาสติก กระบะละ 5 แถว แถวละ 5 เมล็ด จากนั้นเตรียม spore suspension ความเข้มข้น 100,000 สปอร์/ซีซี ผสมด้วย Triton CS-7 ในอัตราส่วน 1 หยด ต่อ น้ำ 100 ซีซี ทำการฉีดพ่น spore suspension บนต้นข้าวโพดในระยะที่มีใบที่ 4 สายพันธุ์ละ 25 ซีซี ด้วย artish's airbrush (ที่ 20 psi) จากนั้นคลุมกระบะด้วยถุงพลาสติกที่พันละอองน้ำภายในถุง และไม่ใหใบข้าวโพดสัมผัสกับถุงพลาสติก เมื่อคลุมถึงพลาสติกแล้วนำมาบ่มใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 12/12 ชั่วโมง (กลางวัน / กลางคืน) หลังจากปลูกเชื้อ 1 วัน นำถุงพลาสติกที่คลุม กระบะปลูกออก และให้ต้นกล้าข้าวโพดอยู่ในสภาพแวดล้อมเดิม ภายหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ตรวจการเกิดบาดแผลราสนิมบนผิวใบและให้คะแนน

การเกิดโรคบนใบที่ 4 ภายหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน นับจำนวนแผลโดยสุ่มจากต้นที่แสดงอาการจำนวน 10 ต้น

ยุพาภรณ์ (2551) ทดสอบการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดในระยะต้นกล้า บนข้าวโพดหวานจำนวน 11 พันธุ์ ทำการปลูกเชื้อราสนิม 2 วิธี คือการหยดบริเวณยอดและการฉีดพ่นสารละลายสปอร์บนต้นกล้าข้าวโพดหวาน เติรียมสารละลายสปอร์โดย เก็บใบข้าวโพดหวานที่แสดงอาการ โรคราสนิม จากนั้นใช้เข็มเย็บสปอร์เชื้อราสนิมลงในน้ำกลั่นหนึ่งภาชนะ ปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพดหวานอายุ 7 วัน โดยการหยด 1 หยด บริเวณยอด และฉีดพ่นสารละลายสปอร์บนใบต้นกล้าข้าวโพด หลังการปลูกเชื้อแล้วเก็บต้นกล้าข้าวโพดในสภาพความชื้น 100 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังทำการปลูกเชื้อโรคราสนิมแล้ว สังเกตอาการการเกิดโรค บันทึกข้อมูลการเกิดโรค ลักษณะอาการหรือแผลของเชื้อราสนิม และจำนวนแผลบนใบ พบว่า ต้นกล้าของข้าวโพดหวานทุกสายพันธุ์ มีการแสดงอาการโรคราสนิม ซึ่งวิธีการหยดสารละลายสปอร์ที่บริเวณยอดให้ผลดีกว่าการฉีดสารละลายสปอร์บนใบ

6. การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้ข้อมูลทางอนุชีวโมเลกุล

สำหรับการศึกษาเชื้อราบางชนิดนั้น ข้อมูลพื้นฐานของเชื้อราเช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีพจักร และ พืชอาศัย ไม่พอเพียงสำหรับการจำแนกชนิด (species) เทคนิควิเคราะห์ลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence analysis) จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราหรือเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา และเป็นวิธีที่แก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากการตรวจสอบจากจีโนมไทป์ของเชื้อราโดยตรง ลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย (Weising, 1995) ได้แก่ internal transcribed spacer (ITS) ในส่วนของ ribosomal DNA โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ITS1 และ ITS 2 ซึ่งทั้ง 2 ส่วนนี้จะค้นด้วยบริเวณ 5.8S (Burnett, 2003) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence analysis) ในตำแหน่ง ITS ของ ribosomal DNA (rDNA) สามารถใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิดได้ เพราะบริเวณ ITS เป็นส่วนที่ผันแปรได้เร็วเมื่อเชื้อเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันเทคนิคนี้ก็ถูกใช้อย่างแพร่หลาย โดยจะใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วนของ ITS1 ITS2 และ 5.8S สร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์หรือจำแนกเชื้อราในระดับต่ำกว่า genus หรือ species (Fernandez, 2001 และ Deacon, 2006)



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

Brown (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. acutatum* ชนิดที่เจริญเติบโตรวดเร็วและชนิดที่เจริญเติบโตช้า ซึ่งสามารถก่อโรคแอนแทรคโนสบนพืชตระกูลส้มและมะนาว ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง CgInt และ ITS4 พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดที่เจริญเติบโตรวดเร็วและชนิดที่เจริญเติบโตช้า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราสองชนิดนี้ ด้วยค่า bootstrap ที่ 87% จึงสรุปได้ว่าเชื้อราสองชนิดนี้อาจมีบรรพบุรุษร่วมกัน

สำหรับในส่วนของ 28S หรือ large subunit (LSU), 18S หรือ small subunit (SSU) และ 5.8S จัดเป็นส่วนอนุรักษ์ (ภาพที่ 1) เหมาะสำหรับการจำแนกในระดับจีเนสขึ้นไป เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราสนิมในกลุ่ม Uredinales ซึ่งมีเชื้อราสนิมมากกว่า 7000 species ที่สามารถก่อโรคในพืชได้ พบว่าการศึกษาในส่วนตำแหน่ง 18S และ 28S ทำให้จัดหมวดหมู่ของเชื้อราสนิม Uredinales ได้ดีกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (Catherine, 2006) และในปัจจุบันมีการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วนของ ITS1 ITS2 และ 5.8S สร้าง phylogenetic tree (สุรินทร์, 2542) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราสนิมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเชื้อราสนิมเป็น obligated parasite ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณบนอาหารสังเคราะห์ได้ ดังนั้น ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอต้องแยกจากกลุ่มของสปอร์ที่เกิดบนใบพืชโดยตรง ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราในกลุ่มอื่น และวิธีการนี้ใช้ ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย ตำแหน่งยีนมีขนาดเล็ก (500-800 bp) และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนได้ง่ายและรวดเร็วด้วยเทคนิค PCR

Virtudazo (2001) รายงานว่าการใช้ลำดับเบสดำแหน่ง ITS และ 5.8S rDNA สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Puccinia kuehnii* ในอ้อย และราสนิมชนิดอื่นๆ ในพืชตระกูลหญ้าที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ลำดับเบสดำแหน่ง D1/D2 ของส่วน LSU rDNA นั้นก็สามารถแยกความแตกต่างและสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราสนิม *P. kuehnii* และราสนิมชนิดอื่นๆ ได้ดีกว่าลำดับเบสบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA

Abbasi (2005) ได้จัดหมวดหมู่ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Puccinia graminis* จากตัวอย่างแห้งของพืชสมุนไพรและวัชพืชต่าง ๆ ในประเทศอิหร่าน อเมริกาเหนือ และประเทศในแถบยุโรป โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อรา *P. graminis* ตรงลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 และเชื้อรา *P. graminis* ตัวอย่างอื่นจากฐานข้อมูล (GenBank) สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่มที่แตกต่างกัน ที่สนับสนุนด้วยค่า bootstrap 96 % ในกลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างจากประเทศอิหร่านทั้งหมด กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจากประเทศเยอรมัน อิหร่าน และสหรัฐอเมริกา และ กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างจากประเทศอิหร่าน สหรัฐอเมริกา และ เชื้อรา *P. hordei*, *P. recondite*, *P. striiformis* (out group) พบว่าเชื้อรา *P. graminis* มีความผันแปรและสามารถแพร่กระจายไปไกลข้ามทวีปได้

งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราสาเหตุโรคราสนิมข้าวโพดเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุที่เกิดขึ้นในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ และเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล (GenBank) นอกจากนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ทั้งหมด มาคัดเลือกหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมชนิดนี้ ออกจากเชื้อราสนิมที่ใกล้ชิดกัน (close related species) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ได้แก่ CLC Main workbench (version 5.5)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พัฒนารูปแบบการปลูกเชื้อราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด

1.1 การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อราสนิม เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ

การเก็บรักษา เชื้อราสนิมข้าวโพด ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ที่ 10 องศาเซลเซียส -20 องศาเซลเซียส -196 องศาเซลเซียส (ไนโตรเจนเหลว) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ในรูปแบบแห้ง (Herbarium) โดยเก็บตัวอย่างสดของใบข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคราสนิม ตัดใบข้าวโพด เป็นชิ้นเล็กๆ เก็บไว้ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ส่วนในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องแบบแห้ง ทำได้โดยนำใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรคราสนิมมาทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ และเปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวันจนกว่าใบข้าวโพดจะแห้งดี (ประมาณ 1 สัปดาห์) แล้วนำมาใส่ซอง เขียนระบุที่มาและข้อมูลของตัวอย่างไว้ข้างซองให้ละเอียด เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราสนิม

เมื่อเก็บรักษา ตัวอย่างโรคราสนิมที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ -196 , -20 , 10 องศาเซลเซียส และเก็บในรูปแบบแห้ง ทุก 30 วัน นำมาทดสอบความมีชีวิตของสปอร์ โดยใช้เข็มเย็บปลายแหลมเขี่ยสปอร์ของเชื้อรา ในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 1 แผล (single uredium) แช่ในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเริ่มสังเกตการงอกของสปอร์ เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆวัน โดยวัดเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ในแต่ละระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) โดยใช้กำลังขยายเดียวกัน (40X)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์(\%)} = \left[\frac{\text{จำนวนสปอร์ที่งอก}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมด}} \right] \times 100$$

บันทึกภาพและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เมื่อทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ(ทุก 30 วัน) เปรียบเทียบกับความมีชีวิตของ urediospore ที่เก็บเมื่ออายุ 0 วัน

1.2 การทดสอบเทคนิคการปลูกเชื้อ

1.2.1 การเตรียมต้นกล้าข้าวโพด

เตรียมเมล็ดข้าวโพดหวานสายพันธุ์การคำ(ไม่เปิดเผย) ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม ปลูกลงในกระถางขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว กระถางละ 5 เมล็ด จนกระทั่งต้นกล้าข้าวโพดมี อายุ 7-10 วัน หรือมีใบจริง 3-4 ใบ จึงใช้ในการปลูกเชื้อ จำนวน 50 ต้นต่อกรรมวิธี

1.2.2 กรรมวิธีการการปลูกเชื้อ

1.2.2.1 การปลูกเชื้อราสนิมโดยวิธีการหยดสารแขวนลอยสปอร์(Dropping method) เก็บรวบรวมตัวอย่างใบข้าวโพดในแปลงปลูกที่แสดงอาการโรคราสนิม ใช้เข็มเย็บสปอร์บนผิวใบลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ วัดความเข้มข้นของสารแขวนลอย urediospores ด้วย Haemocytometer และปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอย urediospores ให้มีความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยในขั้นตอนนี้ได้แบ่งเป็น 3 กรรมวิธีคือ

- 1) หยดน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 100 ไมโครลิตร
- 2) หยดสารแขวนลอย urediospores เข้มข้น 1 uredium (single uredium) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ผสม Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate) (Holland, 1998) เพื่อช่วยให้สปอร์มีการกระจายตัวดี และจับผิวใบดีขึ้น
- 3) หยดสารแขวนลอย urediospores ที่ความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ผสม Tween-20 (ดัดแปลงจากยุทธาภรณ์, 2551 และ Holland, 1998)

ปลูกเชื้อโดยหยดสารแขวนลอย urediospores ลงบนยอดของต้นกล้าข้าวโพด และเก็บต้นกล้าข้าวโพดในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงปล่อยให้ต้นกล้าข้าวโพดอยู่ในสภาพแวดล้อมเดิม สังเกตอาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด

1.2.2.2 การปลูกเชื้อราสนิมโดยวิธีวางกระดาษกรอง (Filter paper method)

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบข้าวโพดหวานในแปลงปลูกที่แสดงอาการโรคราสนิมรุนแรง มาล้างน้ำสะอาดและแกว่งใบเบาๆ ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อให้สปอร์บนใบหลุดในน้ำ วัดความเข้มข้นของสารแขวนลอย urediospores และปรับให้มีระดับความเข้มข้น 2 ระดับ คือ ความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Haemocytometer กรองสารแขวนลอย urediospores แต่ละความเข้มข้น ลงบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเตรียมปลูกเชื้อ ตัดกระดาษเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ปลูกเชื้อโดยวางกระดาษกรองลงบนใบจริงของต้นกล้าข้าวโพด ต้นละ 1 ชิ้น จำนวน 50 ต้นต่อความเข้มข้น หลังจากวางกระดาษกรองลงบนใบข้าวโพดแล้ว หยดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้กระดาษกรองชุ่มชื้น และเก็บต้นกล้าไว้ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำกระดาษกรองออก หลังจากนั้นเก็บต้นกล้าข้าวโพดไว้ในสภาพแวดล้อมปกติ (ภาพที่ 5) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กรรมวิธี คือ

- 1) วางกระดาษกรองชุบน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อบนใบข้าวโพด (กรรมวิธีควบคุม)
- 2) วางกระดาษกรองที่มี 1 uredium บนใบข้าวโพด
- 3) วางกระดาษที่กรองสารแขวนลอย urediospores 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรบนใบข้าวโพด
- 4) วางกระดาษที่กรองสารแขวนลอย urediospores 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรบนใบข้าวโพด

หลังจากปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพดทั้ง 4 กรรมวิธีแล้ว สังเกตการพัฒนาของเชื้อราสนิม ระยะเวลาแสดงอาการของโรค เมื่อพืชเริ่มแสดงอาการโรคราสนิม บันทึกลักษณะของแผล จำนวนแผล บันทึกภาพอาการของโรคที่พบด้วยกล้องดิจิทัล ทุกๆ วัน เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธี

2. การเปรียบเทียบผลการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดโดยวิธีการปลูกเชื้อในระยะต้นกล้าและการทดสอบโรคราสนิมในสภาพแปลงปลูก

2.1 การทดสอบโรคราสนิมของข้าวโพดหวาน ในสภาพแปลงปลูก

ปลูกข้าวโพดหวานลูกผสม (SC01 - SC10) 10 สายพันธุ์ ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ RCBD (Randomized Complete Block Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 2 แถว รอให้เกิดโรคเองตามธรรมชาติ จากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตาเมื่อพืชมีอายุ 60-70 วัน โดยการสุ่มประเมินความรุนแรงระดับความต้านทาน และดัชนีการเกิดโรค สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับระดับความรุนแรงของโรคบนใบพืช วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P=0.05$) ประเมินความรุนแรงเป็น 7 ระดับ โดยดัดแปลงจากวิธีการประเมินของ Reid (2005) ดังนี้

ระดับ 1= พืชไม่แสดงอาการ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 0

ระดับ 2= เกิดแผลบริเวณใบล่างที่ 1-2 ใบ แผลมีขนาดเล็กกระจายทั่วทั้งใบ มีการกระจายอย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 1-20 %

ระดับ 3= เกิดแผลบริเวณใบล่างที่ 1-4 ใบ แผลกระจายทั่วทั้งใบ ใบที่ 1 และ 2 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ส่วนใบที่ 3 และ 4 แผลกระจายอย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 21-40 %

ระดับ 4= เกิดแผลบริเวณใบล่างที่ 1-6 ใบ หรือครึ่งหนึ่งของลำต้น (50% ของต้น) แผลกระจายทั่วทั้งใบโดยใบล่างที่ 1-4 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ส่วนใบที่ 4-5 แผลกระจายอย่างเบาบาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 41-60 %

ระดับ 5= เกิดแผลบริเวณใบล่างที่ 1-7 ใบ หรือมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของลำต้น แผลกระจายทั่วทั้งใบโดยใบล่างที่ 1-6 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ส่วนใบที่ 7 และหรือ 8 แผลกระจายอย่างเบาบาง พบแผลตามกาบใบหรือฝัก ใบด้านล่างมีอาการแห้งตาย เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 61-80 %

ระดับ 6= เกิดแผลบริเวณใบที่ 1-7 ใบ และหรือใบที่ 8 ขึ้นไปจนไปถึงปลายยอด แผลกระจายทั่วทั้งใบโดยใบล่างที่ 1-8 แผลกระจายบนใบอย่างหนาแน่น ใบส่วนบนขึ้นไปมีแผลกระจายอย่างเบาบาง พบแผลตามกาบใบหรือฟัก ใบด้านล่างมีอาการแห้งตายไป เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 81-100 %

ระดับ 7 = พืชแห้งตายทั้งต้น

สำหรับการประเมินระดับความต้านทานโรคราสนิมบนข้าวโพด แบ่งเป็น 6 ระดับ ตามวิธีการประเมินของ Reid (2005) ดังนี้

ระดับทนทาน หรือ immune (I) = ไม่แสดงอาการราสนิม

ระดับต้านทานสูง หรือ highly resistant (HR) = แสดงอาการเป็นจุดสีเหลือง

ระดับต้านทาน หรือ resistant (R) = แผลมีขนาดเล็กมาก

ระดับต้านทานปานกลาง หรือ moderately resistant (MR) = แผลมีขนาดเล็กปกคลุม cuticle ของใบเป็นส่วนมาก แสดงให้เห็น urediospores น้อย

ระดับอ่อนแอปานกลาง หรือ moderately susceptible (MS) = แผลมีขนาดใหญ่เชื่อมชนกัน แสดงให้เห็น urediospores มาก

ระดับอ่อนแอ หรือ susceptible (S) = แผลมีจำนวนมากเชื่อมชนกันเป็นแผลใหญ่ มีการแตกให้เห็น urediospores จำนวนมาก (Reid, 2005)

การเก็บข้อมูลการเกิดโรค เพื่อประกอบข้อมูลความรุนแรงของโรคบนพันธุ์ต่างๆ โดยประเมินดัชนีการเกิดโรคในแปลงปลูกมี 4 ระดับ ดัดแปลงจากวิธีการของ McMaugh (2008) ดังนี้

ระดับ 0= ไม่แสดงอาการของโรค

คะแนนการเกิดโรคเป็น 0

ระดับต่ำ = 1-30% ของต้นที่เป็นโรค

คะแนนการเกิดโรคเป็น 1

ระดับปานกลาง = 31-50% ของต้นที่เป็นโรค

คะแนนการเกิดโรคเป็น 2

ระดับรุนแรง = มากกว่า 50% ของต้นที่เป็นโรค

คะแนนการเกิดโรคเป็น 3

จากคะแนนการเป็นโรคและจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคต่อแปลง นำมาใช้คำนวณดัชนีการเกิดโรค ซึ่งเป็นตัวชี้วัดระดับความรุนแรงของโรค จากสมการ

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

เมื่อ na = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 0

nb = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 1

nc = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 2

nd = จำนวนของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 3

N = จำนวนของต้นที่มีการประเมิน

2.2. จำแนกชนิดของเชื้อราสนิมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างข้าวโพดหวานลูกผสมทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ทดสอบโรคราสนิมในข้อ 2.1 และพบอาการของโรคราสนิม โดยเก็บรักษาตัวอย่างแบบแห้ง จากนั้นนำมาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ใช้กำลังขยาย 40X วัดขนาดสปอร์โดยใช้ micrometer เป็นเครื่องวัด พร้อมทั้งบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ความกว้าง ความยาว ความหนาของผนังสปอร์ ลักษณะผิวภายนอกของสปอร์ โดยเก็บข้อมูลจากสปอร์จำนวน 20 สปอร์ ต่อตัวอย่าง

2.3 การทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดหวานในระยะต้นกล้า โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีวางกระดาษกรอง

เตรียมต้นกล้าข้าวโพดลูกผสมหวานสายพันธุ์เดียวกับที่ทดสอบในแปลงปลูก (SC01-SC10) โดยใช้ต้นกล้าข้าวโพดสายพันธุ์ละ 30 ต้น เมื่อมีอายุ 7 วัน หรือมีใบจริง 3-5 ใบ ปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวางกระดาษกรองตามขั้นตอนที่อธิบายในข้อ 1.2.2.2. โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอย urediospores 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังปลูกเชื้อสังเกตอาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด จำนวนแผลที่เกิดขึ้นบนใบ ความรุนแรงของโรค ระดับความต้านทาน และดัชนีการเกิดโรค โดยดัดแปลงจากวิธีการประเมินของ Reid (2005) และ McMaugh (2008) พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล โดยเปรียบเทียบการเกิดโรคราสนิมบนพันธุ์ต่างๆ กับการทดสอบโรคในสภาพแปลงปลูก

3. การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างและจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราสนิมบนข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ เช่น ข้าวโพดไร่ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งปลูกที่สำคัญ 6 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ ตาก เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี สงขลา และชัยภูมิ โดยเก็บรักษาตัวอย่างแบบแห้ง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ของ rDNA ด้วยเทคนิค PCR

นำตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพดข้างต้นที่พบอาการของโรคราสนิม มาสกัดดีเอ็นเอ โดยเจียสปอร์ของราสนิม (200-300 สปอร์) จาก uredium ภายใต้กล้องสเตอริโอ (Stereo microscope) บดสปอร์ให้แตกละเอียดระหว่างแผ่นสไลด์แก้วที่หนึ่งมาเชื่อมสองแผ่น จากนั้นใช้ extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% SDS) ล้างสปอร์ที่แตกบนสไลด์ทั้ง 2 แผ่น คูดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที และ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Virtudazo และคณะ, 2001) และนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

นำดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) อย่างละ 0.2 pmole และมีส่วนผสมอื่นๆ ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ 2.5 mM MgCl₂ ; 0.2 mM dNTP และ 1 u *Taq* polymerase โดยทำปฏิกิริยาที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ต่อจากนั้น ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำ PCR product มาแยกหรือทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ MicroSpin S-400 HR

columns จากนั้นส่งไปเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่ ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี อาคารศูนย์ เทคโนโลยี ดีเอ็นเอ และจีโนมิกส์ อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม

3.3 การทำ Sequence alignment และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ของตัวอย่างข้างต้น ที่ได้มารายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank (DDBJ: DNA Database of Japan) และทำการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) โดยใช้โปรแกรม CLC Main workbench (version 6.6.2) ร่วมกับลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อราสนิมข้าวโพดชนิดอื่นๆ ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำข้อมูล alignment มาสร้าง phylogenetic tree เลือกวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ทำการวิเคราะห์หาค่า bootstrap ด้วยโปรแกรมเดียวกันจำนวน 1,000 ซ้ำ

4. การคัดเลือกและการทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการจำแนกเชื้อรา *Puccinia polysora* สาเหตุโรคราสนิมข้าวโพด ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

4.1 การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการจำแนกเชื้อราสนิมข้าวโพดโดยวิธี *In silico*

นำลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อราสนิมข้าวโพด และลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อรา สนิมตัวอย่างอื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank ที่ทำการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ในข้อ 3.3 มาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธี *In silico* ด้วยโปรแกรม CLC Main workbench (version 6.6.2) เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา สนิมข้าวโพด *P. polysora*

4.2 การทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการจำแนกเชื้อรา *P. polysora* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

การเตรียมดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ของ rDNA ด้วยเทคนิค PCR

เก็บตัวอย่างเชื้อราสนิมบนข้าวโพดหวานลูกผสมทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่พบอาการของโรค ราสนิมในข้อ 2.1 มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมข้าวโพด จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 และ ITS4 โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.2 และนำผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

จากนั้นทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกจากโปรแกรมข้างต้นในข้อ 4 โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product ในข้อ 5.1) ปริมาตร 16.8 ไมโครลิตร NE 10X buffer 4 (BioLabs) 0.2 ไมโครลิตร acetylated BSA (10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ *Eco* RI (10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจสอบผลของการย่อยด้วยเอนไซม์บน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 2% ตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ผลและวิจารณ์

1. พัฒนารูปแบบการปลูกเชื้อราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด

1.1 การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อราสนิม เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลการทดสอบการมีชีวิตของ urediospores เชื้อราสนิมเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ รวมถึงตัวอย่างแห้งเมื่อระยะเวลาผ่านไปทุก 30 วัน โดยวัดเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์หลังจากแช่สปอร์ในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ สปอร์เริ่มงอกเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน จากการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์พบว่า การเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มากที่สุด รองลงมาคือการเก็บที่ 10 องศาเซลเซียส และเก็บในไนโตรเจนเหลวคือร้อยละ 53.63 34.54 และ 29 ตามลำดับ ในขณะที่เก็บรักษาแบบแห้งที่อุณหภูมิห้องนั้น มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ต่ำที่สุด คือ ร้อยละ 18.3 และเมื่อเก็บไว้นานขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 และ 90 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราสนิมในตัวอย่างสดก่อนการเก็บรักษา พบว่าตัวอย่างสดนั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกร้อยละ 71.62 (ภาพที่ 2-3)

ดังนั้นในการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ของเชื้อราสนิม จึงควรใช้สปอร์เชื้อราสนิมจากตัวอย่างสด ในการปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพด แทนการใช้เชื้อที่เก็บไว้นานๆ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำลง ซึ่งมีผลต่อการเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด

1.2 การทดสอบเทคนิคการปลูกเชื้อ

1.2.1 การปลูกเชื้อราสนิมโดยวิธีการหยดสารแขวนลอยสปอร์ (Dropping method)

การหยดสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังปลูกเชื้อ 7 -14 วัน ต้นกล้าข้าวโพดแสดงอาการของโรคราสนิมในบริเวณที่หยดสารแขวนลอย urediospores พบแผล มีลักษณะเป็นตุ่มสีเหลืองส้ม ขนาดเล็กหลายแห่งบนใบ หลังใบ ปลายใบ และกาบใบล่างของต้นกล้าข้าวโพด(ภาพที่ 4) สอดคล้องกับรายงานของยุพารักษ์ (2551) ที่ปลูก

เชื้อด้วยวิธีการหยดและวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสารแขวนลอย urediospores บนต้นกล้าข้าวโพดหวาน ซึ่งพบว่า หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์จึงพบแผลของราสนิม จากนั้นพัฒนาการของแผลเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเรื่อยๆ จนใบเริ่มเหี่ยวและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาของโรคนั้นประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า จุดสีเหลืองอ่อนเริ่มพัฒนาเป็นตุ่มนูนประมาณ 18 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 8 วัน เห็นแผลสีเหลืองอ่อนชัดเจน จำนวนแผลเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 61 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน แผลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีส้ม จำนวนแผลเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 77 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน พบว่า แผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ลักษณะของแผลเป็นแบบเปิด มีฝุ่นสนิม แผลมีจำนวนประมาณ 84 แผล และเริ่มมีอาการใบไหม้จากโรคราสนิมร่วมด้วย หลังจากปลูกเชื้อ 11-14 วัน แผลมีสีน้ำตาลเข้ม แผลพัฒนาขยายลามติดกันมีอาการของโรคใบไหม้ ใบเริ่มแห้ง และตายในที่สุด (ภาพที่ 5) และไม่พบการแสดงอาการของโรคราสนิมเมื่อปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพด ด้วยกรรมวิธีที่ใช้สารแขวนลอย urediospores ที่มีความเข้มข้น 1 uredium และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

1.2.2 การปลูกเชื้อราสนิมโดยวิธีวางกระดาษกรอง (Filter paper)

ต้นกล้าที่แสดงอาการของโรคราสนิม พบแผลมีลักษณะเป็นตุ่ม บนใบจำนวนมากในบริเวณที่วางกระดาษกรอง หากอาการของโรคราสนิมรุนแรงหลังจากที่แสดงอาการบนใบแล้ว 3-4 วัน ในตำแหน่งที่วางกระดาษกรองจะพบแผลจำนวนเล็กน้อยด้านหลังใบนั้น การปลูกเชื้อด้วยวิธีวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากปลูกเชื้อราสนิม 9 วัน พบว่าบริเวณที่วางกระดาษกรองมีสีเหลือง และเริ่มมีจุดขนาดเล็กสีเหลืองอ่อน หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน พบว่า จุดสีเหลืองอ่อนเริ่มพัฒนาเป็นตุ่มนูนประมาณ 16 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน เห็นแผลสีเหลืองอ่อนชัดเจน จำนวนแผลประมาณ 36 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 12 วัน พบว่า แผลเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม จำนวนแผลเพิ่มขึ้นลักษณะของแผลเป็นแบบเปิด มีลักษณะเป็นผงสนิม พบแผลประมาณ 46 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 13 วัน แผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นฝุ่นสนิมเพิ่มขึ้น จำนวนแผลประมาณ 50 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน แผลเป็นผงสนิมชัดเจน จำนวนแผลเพิ่มขึ้นจากเดิมไม่มากนักเนื่องจาก แผลเริ่มขยายติดกัน และเริ่มพบอาการใบไหม้ พบแผลประมาณ 53 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 15-17 วัน ใบเริ่มแห้ง แผลราสนิมขยายติดกันเป็นแผลใหญ่ทำให้จำนวนแผลลดลง พบอาการใบไหม้เนื่องจากราสนิมร่วมด้วย (ภาพที่ 6-7 และ 9) การปลูกเชื้อด้วยวิธีวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากปลูกเชื้อราสนิม 6 วัน พบว่าบริเวณที่วางกระดาษกรองมีสีเหลือง และเริ่มมีจุดขนาดเล็กสีเหลืองอ่อน หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า จุดสีเหลืองอ่อนเริ่ม

พัฒนาเป็นตุ่มนูนประมาณ 40 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 8 วัน เห็นแผลสีเหลืองอ่อนชัดเจน จำนวนแผลเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 110 แผล หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน พบว่า แผลเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม จำนวนแผลเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 130 แผล ลักษณะของแผลเป็นแบบเปิด หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน พบว่า แผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง มีลักษณะเป็นฝุ่นสนิม เนื่องจากสปอร์มีจำนวนมากขึ้นถึงประมาณ 163 แผล และเริ่มมีอาการใบไหม้ หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน แผลมีสีน้ำตาลเข้ม และเริ่มขยายขึ้นจนลามติดกัน มีลักษณะอาการใบไหม้เกิดขึ้น หลังจากปลูกเชื้อ 12-14 วัน ใบเริ่มแห้ง แผลขยายติดกันมากขึ้น มีลักษณะอาการใบไหม้ร่วมด้วย (ภาพที่ 8 และ 9)

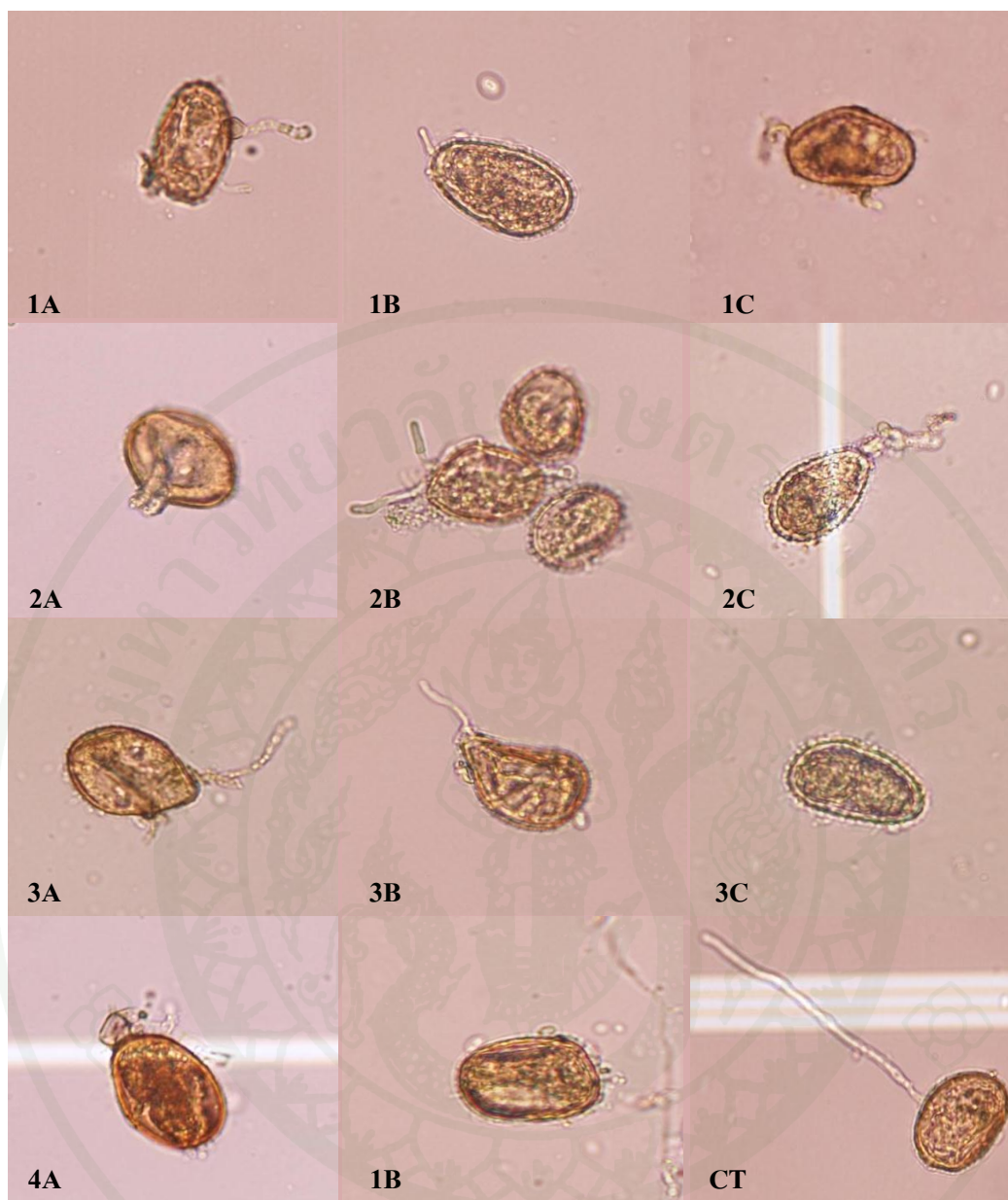
การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารแขวนลอย urediospores ในการปลูกเชื้อ โดยการวางกระดาษกรอง เมื่อปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบการแสดงอาการของโรคราสนิมทั้ง 2 ความเข้มข้น และมีอัตราการเกิดโรครามากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ แต่ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพดและความรุนแรงของโรค (จำนวนแผล) มีความแตกต่างกัน โดยการปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แสดงอาการของโรคราสนิมเร็ว และมีความรุนแรงของโรค (จำนวนแผล) มากกว่าการปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากการสังเกตแสดงอาการของโรคราสนิมพบว่า การปลูกเชื้อด้วยวิธีวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 1 uredium เมื่อระยะเวลาผ่านไปไม่พบการแสดงอาการของโรคราสนิมบนต้นกล้า อาจเป็นเพราะปริมาณความเข้มข้นที่ใช้น้อยเกินไป

การปลูกเชื้อโดยการวางกระดาษกรองสามารถใช้สารแขวนลอย urediospores ที่มีความเข้มข้นเพียง 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถพบอาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพดได้ ในขณะที่การปลูกเชื้อแบบหยดบนยอดต้องใช้สารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการปลูกเชื้อเท่านั้นจึงพบอาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด นอกจากนี้การหยดสารแขวนลอย urediospores ที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าความรุนแรงของโรค (จำนวนแผล) น้อยกว่ากรรมวิธีการวางกระดาษกรองด้วยสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 10) นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ได้ทดลองปลูกเชื้อใน 2 ช่วงเวลาที่ต่างกันเพื่อทดสอบสภาพอากาศที่เหมาะสม พบว่า ในช่วงเดือนกรกฎาคม-กันยายน (อุณหภูมิ 25-29 องศาเซลเซียส) พบอัตราการเกิดโรครามากกว่าการปลูกเชื้อในช่วงเดือน มีนาคม-พฤษภาคม (อุณหภูมิ 29-33 องศาเซลเซียส) สอดคล้องกับรายงานของ Melching (1975) และ สมเกียรติและคณะ (2521) ที่กล่าวว่า ในขณะที่ความชื้นในอากาศ 95-100% อุณหภูมิที่เหมาะสม

ต่อการงอกและเข้าทำลายพืชของ urediospores คือ 23-28 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ จีรนนท์ และคณะ (2540) พบว่า เมื่อปลูกเชื้อในต้นกล้าข้าวโพดโรคราสนิมจะแสดงอาการและปรากฏผลได้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะต่อการเกิดโรคราสนิมกับข้าวโพดทุกสายพันธุ์ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 30 องศาเซลเซียส จะมีการเกิดโรคบนข้าวโพดสายพันธุ์ต่างๆ ลดลง





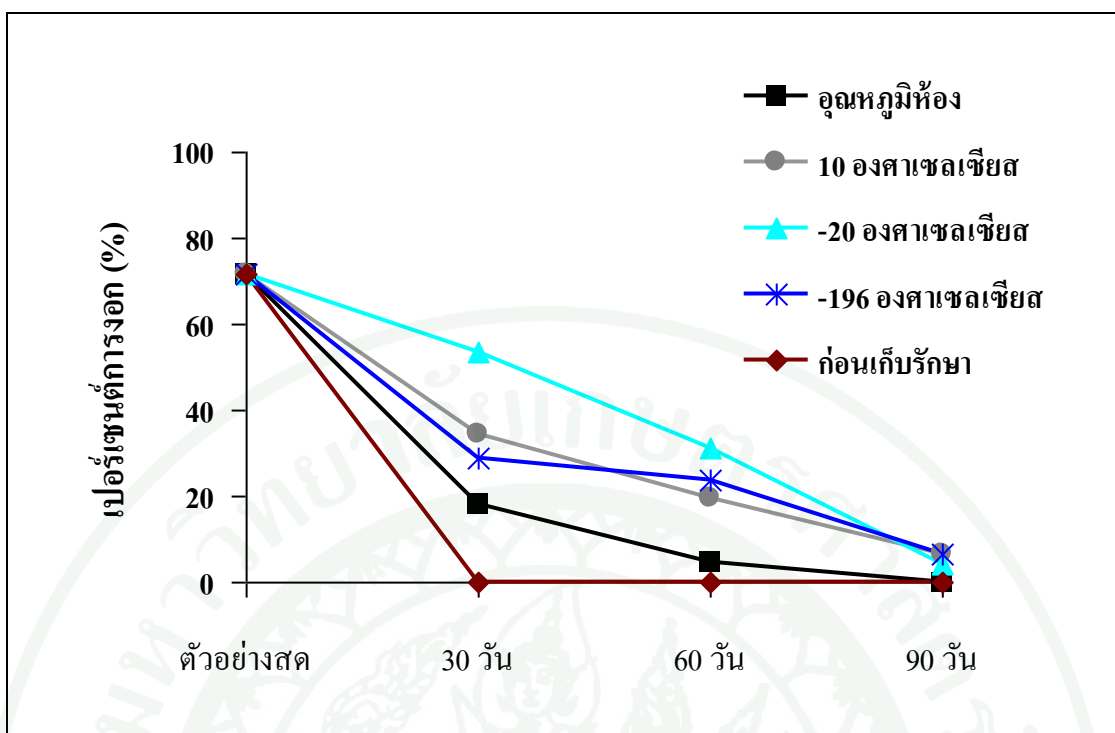
ภาพที่ 2 การงอก germ tube ของ urediospores เชื้อราสนิมหลังจากเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ 1 : 10 องศาเซลเซียส 2 : -20 องศาเซลเซียส 3 : -196 องศาเซลเซียส 4 : อุณหภูมิห้องในรูปแบบแห้ง

CT = การงอก germ tube ของ urediospore เมื่อระยะเวลา 0 วัน (ตัวอย่างสด)

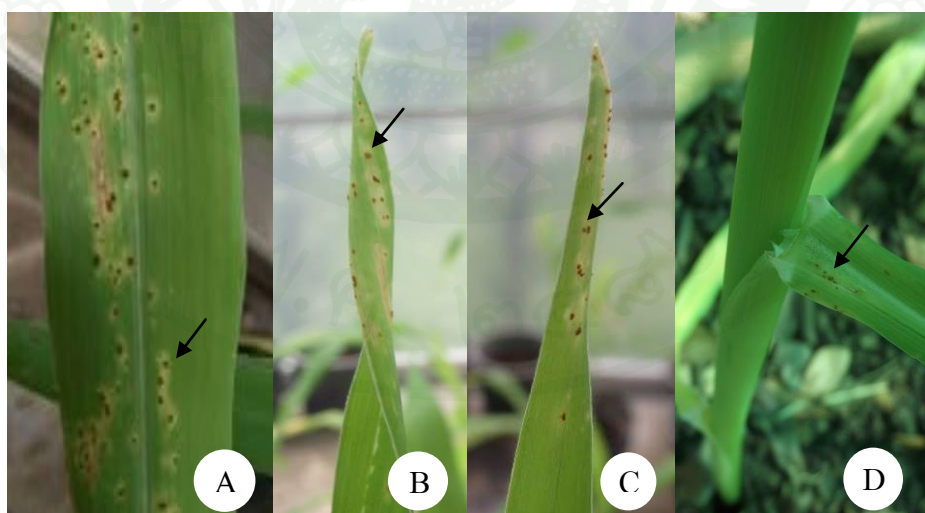
A = การงอก germ tube ของ urediospore เมื่อระยะเวลา 30 วัน

B = การงอก germ tube ของ urediospore เมื่อระยะเวลา 60 วัน

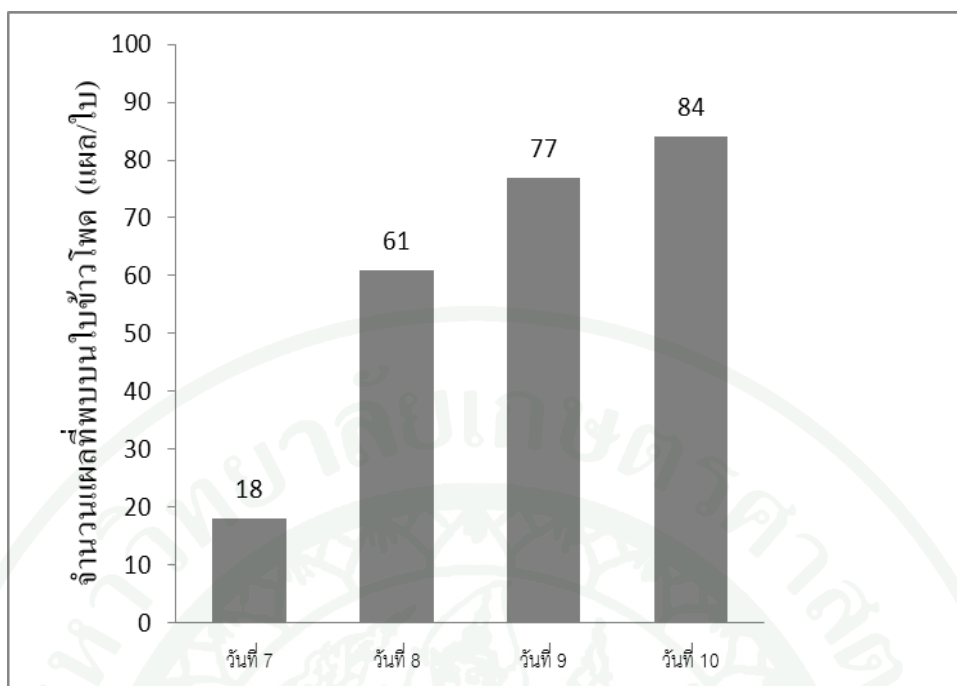
C = การงอก germ tube ของ urediospore เมื่อระยะเวลา 90 วัน



ภาพที่ 3 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของ urediospores ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0 30 60 และ 90 วัน



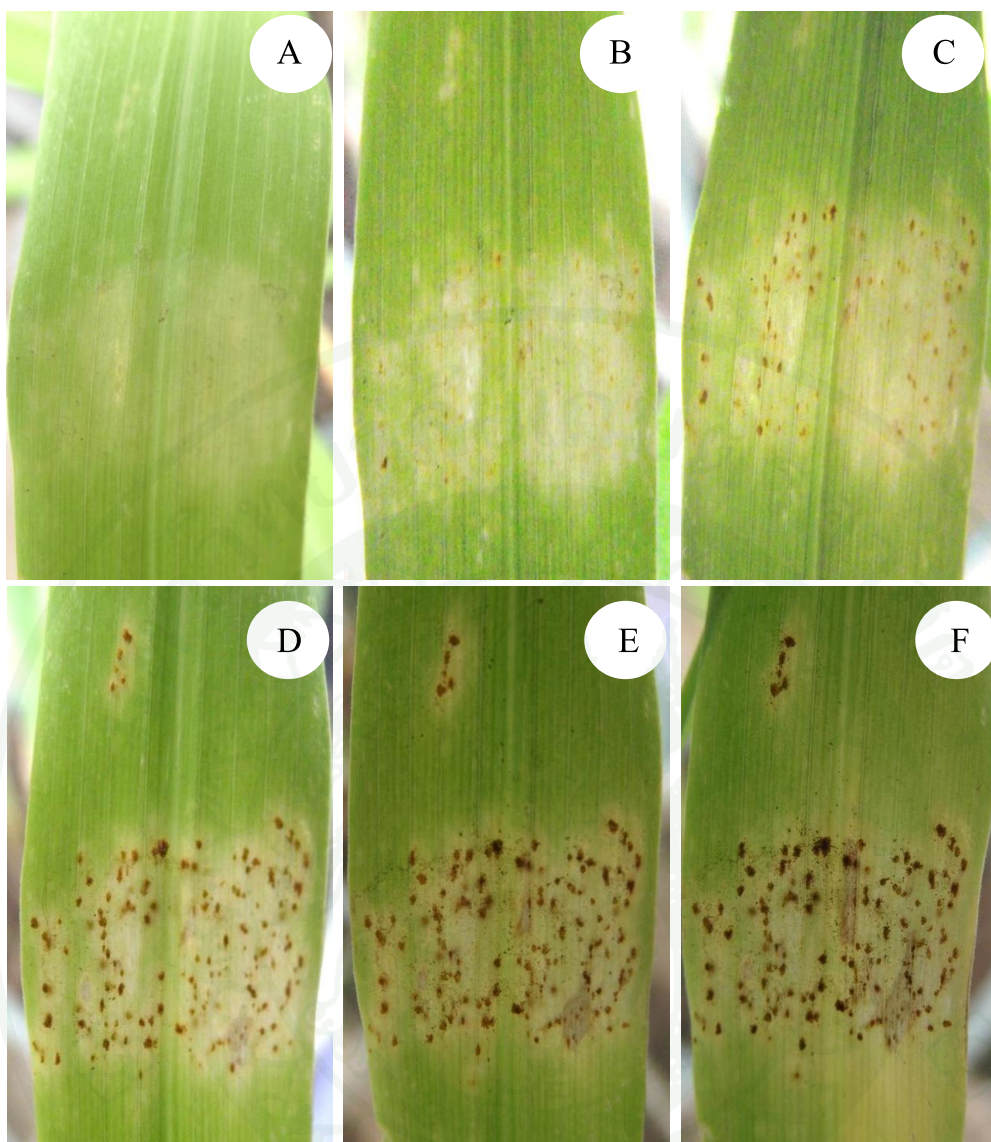
ภาพที่ 4 อาการของโรคราสนิมบนกล้าข้าวโพดที่แสดง A : บนใบ B : หลังใบ C : ปลายใบ D : กาบใบ ของต้นกล้าข้าวโพดสายพันธุ์อ่อนแอ ที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores ที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



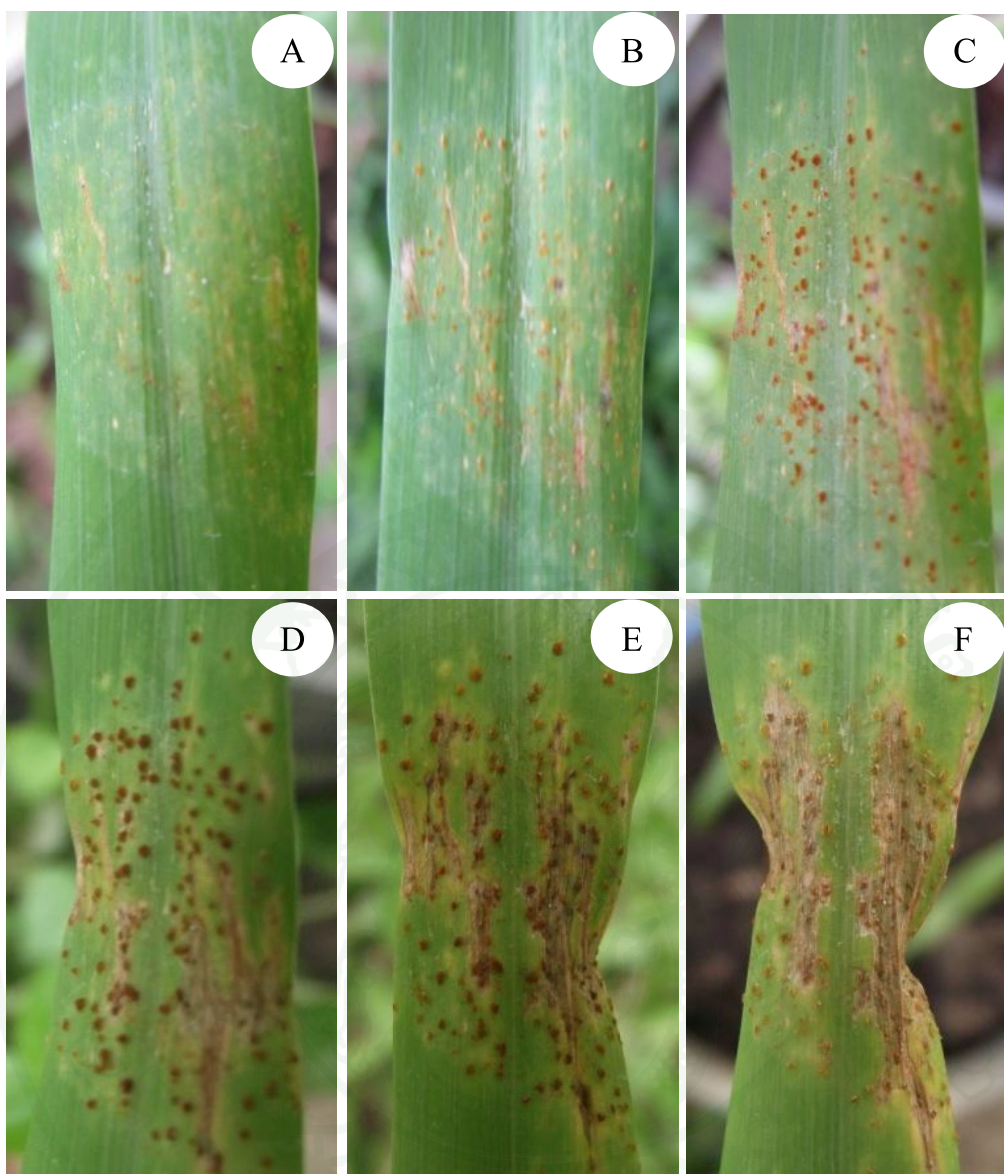
ภาพที่ 5 กราฟแสดงพัฒนาการของโรคราสนิม บนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อ 7 8 9 และ 10 วันโดยวิธีการหยดสารแขวนลอย urediospores ของเชื้อราสนิมที่ระดับความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร



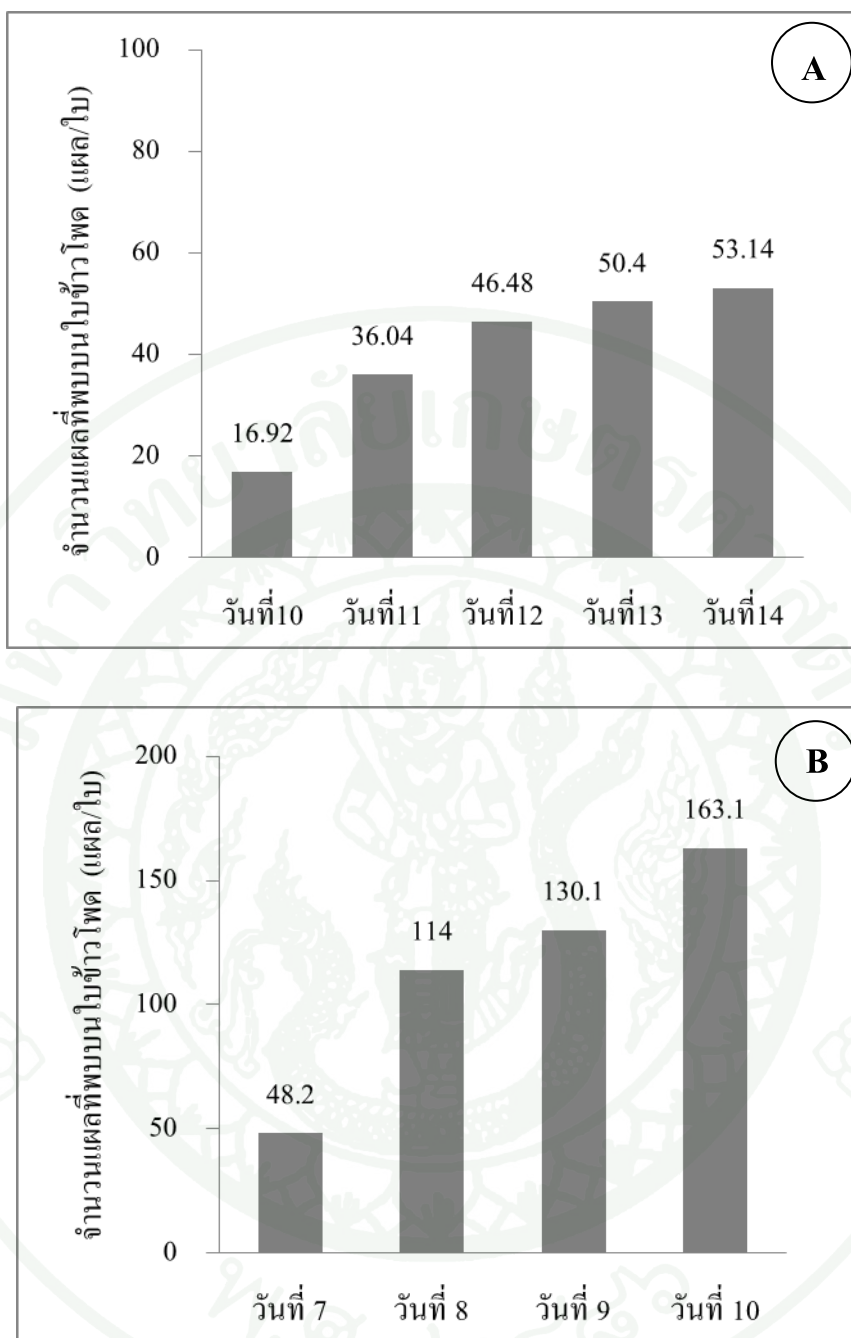
ภาพที่ 6 การปลูกเชื้อราสนิมบนใบข้าวโพดในระยะต้นกล้า ด้วยวิธีวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ของเชื้อราสนิม



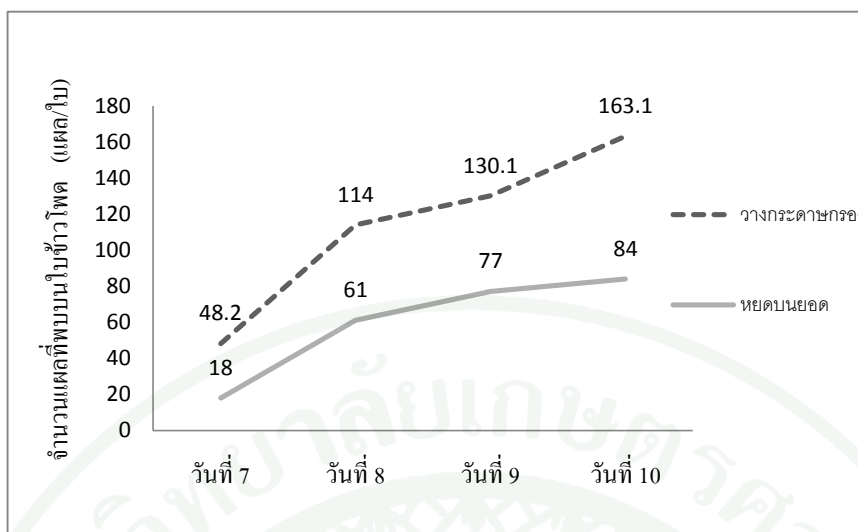
ภาพที่ 7 อาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวาง
กระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
A : 7 วัน B : 9 วัน C : 10 วัน D : 11 วัน E : 12 วัน และ F : 13 วัน



ภาพที่ 8 อาการของโรคราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพดหลังจากปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวาง
กระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
A : 6 วัน B : 7 วัน C : 9 วัน D : 10 วัน E : 11 วัน และ F : 12 วัน



ภาพที่ 9 กราฟแสดงพัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีการวางด้วย กระจาดกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ของเชื้อราสนิมเข้มข้น 10^6 (A) และ 10^8 (B) สปอร์ต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 10 กราฟแสดงจำนวนแผลของราสนิมบนต้นกล้าข้าวโพด หลังปลูกเชื้อโดยวิธีการหยดและวิธีการวางด้วยกระดากกรองที่มีสารแขวนลอย urediospores ของเชื้อรา *Puccinia polysora* เข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การเปรียบเทียบผลการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดโดยวิธีการปลูกเชื้อในระยะต้นกล้าและการทดสอบโรคราสนิมในสภาพแปลงปลูก

2.1 การทดสอบโรคราสนิมของข้าวโพดหวานในสภาพแปลงปลูก

จากการปลูกข้าวโพดหวานลูกผสม (SC 01 - SC 10) เพื่อทดสอบโรคราสนิม พบว่าเชื้อโรคราสนิมทำความเสียหายแก่ข้าวโพดทั้ง 10 พันธุ์ โดยมีอาการแผลราสนิม (uredium หรือ pustule) เกิดกระจายบนใบ และแผลบนใบล่างก่อน จำนวนแผลบนผิวใบมีมากกว่าใต้ใบ แผลมีลักษณะกลม-รี กระจายตัวเดี่ยวๆ หรือเชื่อมต่อกันจนเป็นแผลใหญ่ บางพันธุ์ที่อ่อนแอจะพบแผลราสนิมจำนวนมาก แผลราสนิม (uredium หรือ pustule) ที่พบมีการแตกและเห็น uredospore ภายในเป็นผงสีเหลืองส้ม หรือสีส้ม เมื่อแผลพัฒนารุนแรงมากขึ้นจะมีการชนกันของแผล ส่งผลให้ข้าวโพดใบไหม้และเริ่มแห้งตาย นอกจากนี้ในพันธุ์ที่อ่อนแอ จะพบอาการของโรคราสนิมลามไปยังลำต้นและกาบใบ (ภาพที่ 11-13) จากรายงานของ Pataky (1987) กล่าวว่าอาการของโรคราสนิมจะเริ่มพัฒนาที่ใบล่างๆ ก่อน หากเป็นรุนแรงจะลุกลามไปทั้งต้นข้าวโพด ระยะที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าวโพดมากที่สุดคือ ระยะที่ข้าวโพดออกดอก ทำให้ข้าวโพดแห้งตาย สอดคล้องกับรายงานที่เคยมีการสำรวจและประเมินโรคราสนิมในแปลงข้าวโพด ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา พบว่า สายพันธุ์ซึ่งอ่อนแอต่อโรคราสนิม จะพบแผลกระจายอย่างหนาแน่นทั่วใบผิวใบ (จิรนนท์และคณะ, 2540) ในสายพันธุ์ที่เป็นรุนแรงมาก แผลจะลุกลามจากผิวใบไปส่วนต่างๆทั่วทั้งต้น นอกจากนั้นยังมีการใบไหม้และใบแห้งตายจากโรคราสนิมด้วย สายพันธุ์ซึ่งต้านทานต่อโรคราสนิม นั้นจะแสดงลักษณะต้านทานต่อโรค เช่น การลดจำนวนแผลบนผิวใบ การจำกัดจำนวนของแผล (เจตษฎา และคณะ, 2552)

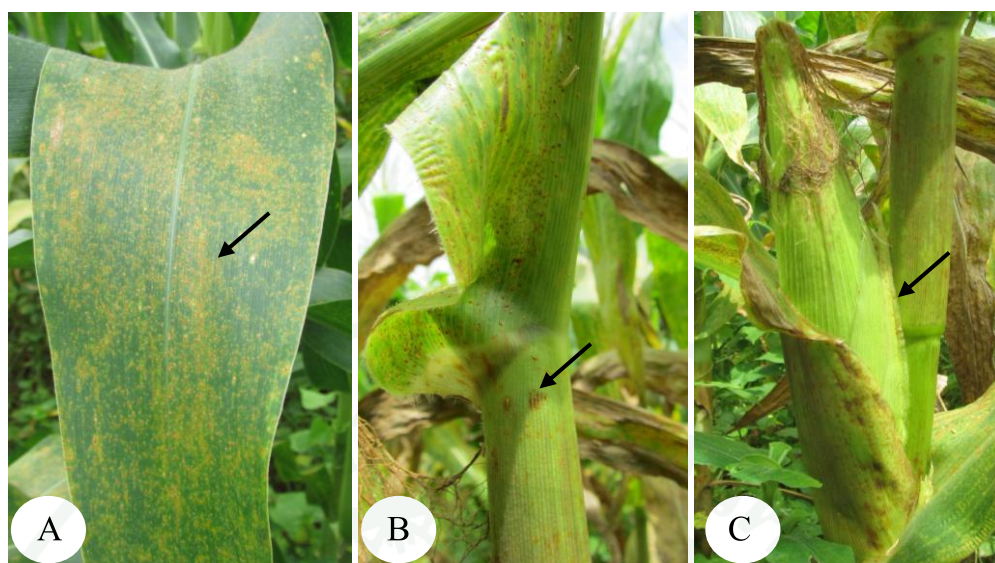
เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคราสนิม โดยแบ่งระดับความรุนแรงเป็น 7 ระดับ ตามวิธีของ Reid (2005) พบว่าการเกิดโรครุนแรงอยู่ในระดับ 5 – 6 และมีดัชนีการเกิดโรคในระดับ 55.55-100 (ตารางที่ 1) และได้ดัดแปลงจากวิธีประเมินข้างต้น สามารถจัดกลุ่มระดับความต้านทานโรค ได้ 4 ระดับ (ตารางที่ 2) คือ ระดับ 0 resistant (เปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 0%) ระดับ 1 moderately resistant (เปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 1-39%) ระดับ 2 moderately susceptible (เปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 40-59%) และระดับ 3 susceptible (เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงมากกว่า 60 %) พบว่า ข้าวโพดสายพันธุ์ SC02, SC06, SC07 และ SC09 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 38.41 38.75 36.41 และ 38.33 % ตามลำดับ จัดอยู่ในระดับ 1 moderately resistant ข้าวโพดสายพันธุ์ SC01, SC08 และ SC10 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 40.33 48.50 และ 41.33 % ตามลำดับ จัดอยู่ในระดับ 2

moderately susceptible ข้าวโพดสายพันธุ์ SC03, SC04 และ SC05 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรง 84.66 69.91 และ 70.00% ตามลำดับ จัดอยู่ในระดับ 3 susceptible (ตารางที่ 2)

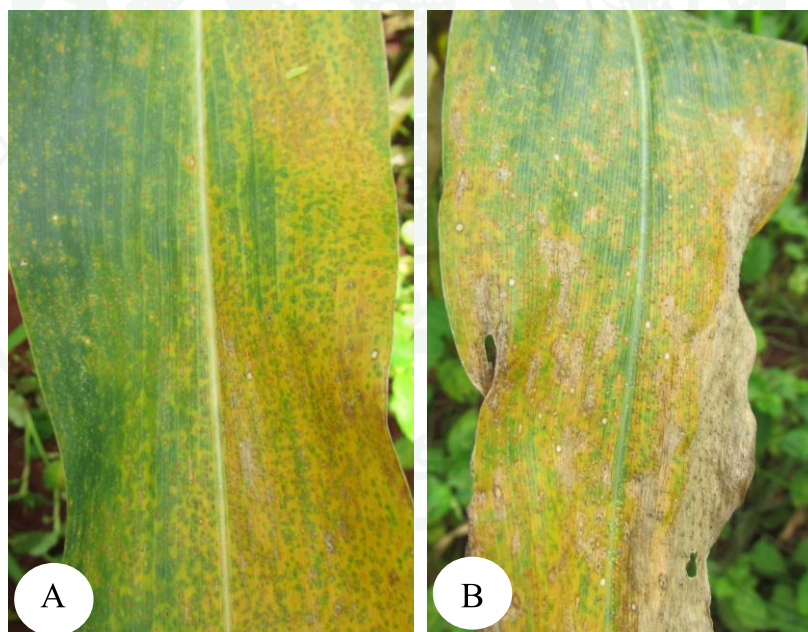
เมื่อประเมินความต้านทานและระดับความรุนแรงตามวิธีของ Reid (2005) คือ ระดับ MR (moderately resistant) คือ แผลขนาดเล็กปกคลุม cuticle ของใบเป็นส่วนมาก แสดงให้เห็น urediospores น้อย ระดับ MS (moderately susceptible) คือ แผลขนาดใหญ่มีการเชื่อมชกกันโผล่ให้เห็น cuticle ของใบ แสดงให้เห็น urediospores มาก และระดับ S (susceptible) คือ แผลขนาดใหญ่ มีการเชื่อมชกกันมากเป็นแผลใหญ่ มีการแตกให้เห็น urediospores จำนวนมาก พบว่า มีความต้านทานอยู่ที่ระดับ MR (moderately resistant) ถึง ระดับ S (susceptible) ข้าวโพดสายพันธุ์ SC06, SC07, SC09 และ SC10 จัดอยู่ในระดับ MR ข้าวโพดสายพันธุ์ SC01, SC04, SC05 และ SC08 จัดอยู่ในระดับ MR-MS ข้าวโพดสายพันธุ์ SC02 จัดอยู่ในระดับ MS ข้าวโพดสายพันธุ์ SC03 จัดอยู่ในระดับ MS-S (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 11 แปลงทดสอบโรคของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา



ภาพที่ 12 ลักษณะอาการของโรคราสนิมบนส่วนต่างๆ ของข้าวโพดหวานในแปลงทดสอบโรค
ของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา A : บนใบ
B : บนลำต้น และ C : เปลือกหุ้มฝัก



ภาพที่ 13 ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนใบข้าวโพดหวาน A : เกิดโรคระดับ 5 มีแผล
21-50 % ของพื้นที่ใบ B : เกิดโรคระดับ 6 มีแผล >50% ของพื้นที่ใบ

ตารางที่ 1 การประเมินโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Specimen (Maize Code)	Level of Resistance ¹	Disease Index ²	Level of Symptom ³	Disease severity percentage (%) ⁴
KKFC370 (SC 01)	MR-MS	62	5	40.33 ^{de}
KKFC371 (SC 02)	MS	56.11	5	38.41 ^{ef}
KKFC372 (SC 03)	MS-S	100	6	84.66 ^a
KKFC373 (SC 04)	MR-MS	96.66	6	69.91 ^b
KKFC374 (SC 05)	MR-MS	100	6	70.00 ^b
KKFC375 (SC 06)	MR	55.55	5	38.75 ^{def}
KKFC376 (SC 07)	MR	56.66	5	36.41 ^{ef}
KKFC377 (SC 08)	MR-MS	77.77	5	48.50 ^c
KKFC378 (SC 09)	MR	55.55	5	38.33 ^{ef}
KKFC379 (SC 10)	MR	66.11	5	41.33 ^d

¹ การแบ่งระดับความต้านทานของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน ตามวิธีของ Reid (2005)

I (immune) : ไม่แสดงอาการราสนิม

HR (highly resistant) : แสดงอาการเป็นจุดสีเหลือง,

R (resistant) : แผลขนาดเล็กมาก

MR (moderately resistant) : แผลขนาดเล็กปกคลุม cuticle ของใบ แสดงให้เห็น urediospores น้อย

MS (moderately susceptible) : แผลขนาดใหญ่เชื่อมชนกัน แสดงให้เห็น urediospores มาก

S (susceptible) : แผลจำนวนมากเชื่อมชนกันเป็นแผลใหญ่ มีการแตกให้เห็น urediospores จำนวนมาก

² ดัชนีการเกิดโรคราสนิมในแปลงปลูก คัดแปลงวิธีประเมินจาก McMaugh (2008)

³ ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน คัดแปลงวิธีประเมินจาก Reid (2005)

⁴ เปรียบเทียบความรุนแรงเฉลี่ยในแถวเดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามกรรมวิธีของ Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มตามระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10)
 ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา โดยดัดแปลงวิธีประเมินจาก
 Reid (2005)

Level of Resistance	Disease severity percentage (%)	Maize Variety Code
0 resistant	0	-
1 moderately resistant	1-39 %	SC02, SC06, SC07, SC09
2 moderately susceptible	40-59 %	SC01, SC08, SC10
3 susceptible	60-100 %	SC03, SC04, SC05

2.2 จำแนกชนิดของเชื้อราสนิมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสนิมบนตัวอย่างข้าวโพดหวานทั้ง 10 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 X และบันทึกลักษณะต่างๆ สปอร์เชื้อราสนิมที่พบมีเพียงสปอร์ชนิดเดียว คือ urediospores มีลักษณะกลมรี ผนังหนา (ellipsoid: E) มีสีเหลืองอ่อนไปจนถึงส้ม ผิวสปอร์เป็นหนาม (echinulate) ที่เกิดภายในแผล (uredium) และพบ germ pore กระจายรอบสปอร์ สปอร์มีขนาด $30.75\text{--}33.96 \times 21.06\text{--}24.81$ ไมครอน ผนังสปอร์ขนาด $1.26\text{--}1.94$ ไมครอน แผลมีลักษณะกลมรี (Elongate) และทุกตัวอย่างพบ paraphysis ภายในแผล เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ urediospores ที่พบจากตัวอย่างทั้ง 10 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Puccinia polysora* (William, 1984) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Puccinia polysora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า ; Uredium (U) Urediospores (Us) และ paraphysis (P)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Puccinia polysora* บนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ที่เก็บรวบรวมจากแปลงทดสอบโรค ของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Specimen Voucher (Code)	Uredium			Urediospores				Identified species
	Color	Paraphysis	Shape	Size ¹ (μ)	Wall ¹ Thickness(μ)	Wall surface	Shape	
KKFC370 (SC01)	orange/yellow	Present	Elongate	32.00×21.71	1.26	Echinulate	Ellipsoid	<i>Puccinia polysora</i>
KKFC371 (SC02)	orange/yellow	Present	Elongate	31.25×21.06	1.45	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC372 (SC03)	orange/yellow	Present	Elongate	31.11×24.31	1.33	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC373 (SC04)	orange/yellow	Present	Elongate	33.63×24.56	1.26	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC374 (SC05)	orange/yellow	Present	Elongate	33.96×26.38	1.81	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC375 (SC06)	orange/yellow	Present	Elongate	33.49×24.79	1.89	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC376 (SC07)	orange/yellow	Present	Elongate	31.64×24.81	1.69	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC377 (SC08)	orange/yellow	Present	Elongate	31.75×23.94	1.88	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC378 (SC09)	orange/yellow	Present	Elongate	30.75×22.63	1.94	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>
KKFC379 (SC10)	orange/yellow	Present	Elongate	31.18×24.33	1.81	Echinulate	Ellipsoid	<i>P. polysora</i>

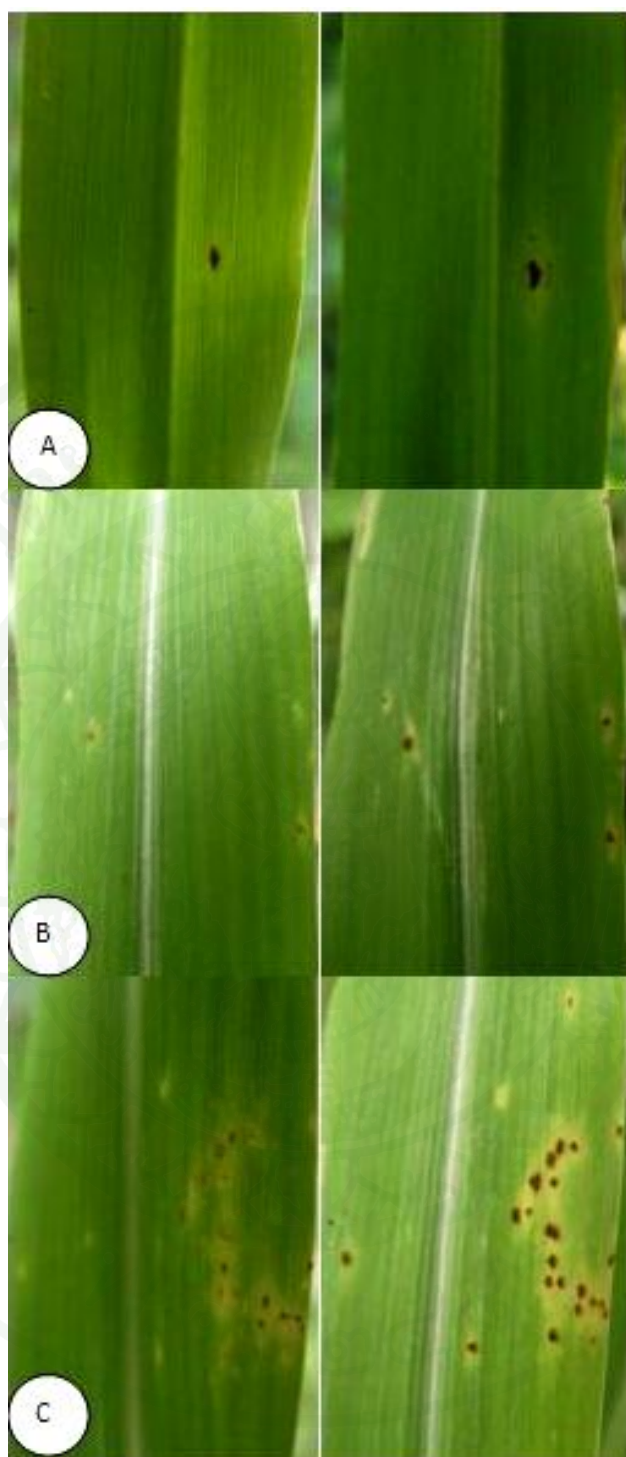
หมายเหตุ ¹ หน่วยเป็น ไมครอน หรือ ไมโครเมตร

KKFC = Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Fungal Collection

2.3 การทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดหวานในระยะต้นกล้า โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีวางกระดาษกรอง

หลังจากการทดสอบโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน 10 สายพันธุ์ (SC01-SC10) ในแปลงปลูก จึงนำข้าวโพดทั้ง 10 สายพันธุ์มาทดสอบโรคโดยการปลูกเชื้อราสนิมในระยะต้นกล้าด้วยวิธีวางกระดาษกรอง พบว่า ต้นกล้าสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิมเมื่อทดสอบในแปลงปลูก จะแสดงอาการของโรคราสนิมภายใน 7-10 วัน สำหรับต้นกล้าสายพันธุ์ที่ต้านทานโรค ราสนิมเมื่อทดสอบในแปลงปลูก อาการของโรคแสดงให้เห็นหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 11-14 วัน จากผลการทดสอบโรคในระยะต้นกล้า สามารถแบ่งระดับการเกิดโรคราสนิม ได้ 4 ระดับ (ตารางที่ 4) คือ ระดับ 0 resistance ไม่พบแผล ระดับ 1 moderately resistant มีการปรากฏของแผลจำนวน 1-4 แผล และไม่มีการพัฒนาของแผลเพิ่มขึ้น ระดับ 2 moderately susceptible มีการปรากฏของแผลจำนวน 4-8 แผล และมีการพัฒนาของแผลเกิดขึ้นไม่เกิน 1 เท่าตัว ระดับ 3 susceptible มีการปรากฏของแผล จำนวน มากกว่า 10 แผล และมีการพัฒนาของแผลอย่างต่อเนื่อง โดยในข้าวโพดสายพันธุ์ SC02 SC06 SC07 และ SC09 มีจำนวน แผล 1-2 แผล และไม่มีการพัฒนาของแผล ซึ่งจัดอยู่ใน ระดับ 1 ข้าวโพดสายพันธุ์ SC01 SC08 และ SC10 มีจำนวนแผล 3-4 แผล แต่พบการพัฒนาของแผลเล็กน้อย จึงจัดอยู่ในระดับ 2 สำหรับข้าวโพดสายพันธุ์ SC03 SC04 และ SC05 มีจำนวนแผล 8-16 แผล และ แผลพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจัดอยู่ในระดับ 3 (ตารางที่ 4-5 และภาพที่ 15)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบโรคราสนิมในแปลงปลูกและการปลูกเชื้อในระยะต้นกล้าพบว่า การทดสอบโรคในแปลงปลูก ข้าวโพดสายพันธุ์ SC02 SC06 SC07 และ SC09 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคราสนิมระหว่าง 36.41-38.75% มีความสอดคล้องกับการทดสอบโรคในระยะต้นกล้า ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่ม ระดับ 1 moderately resistant ข้าวโพดสายพันธุ์ SC01 SC08 และ SC10 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในแปลงปลูกระหว่าง 40.33-48.50% และสอดคล้องกับการทดสอบโรคในระยะต้นกล้าซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่ม ระดับ 2 moderately susceptible สำหรับข้าวโพดสายพันธุ์ SC03 SC04 และ SC05 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในแปลงปลูกระหว่าง 69.91-84.66 % เช่นเดียวกับการทดสอบโรคในระยะต้นกล้า ซึ่งจัดเป็น susceptible (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 15 อาการของโรคราสนิมหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีวางกระดาศกรองบนต้นกล้า A : ระดับ 1 moderately resistant, B : ระดับ 2 moderately susceptible และ C : ระดับ 3 susceptible

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่มตามระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) จาก
การปลูกเชื้อในระยะต้นกล้า โดยดัดแปลงวิธีประเมินจาก Reid (2005)

Level of Resistance	Number of pustules	Maize Variety Code
0 resistant	ไม่พบแผล	-
1 moderately resistant	1-4 แผล ไม่มีการพัฒนาของแผลเพิ่มขึ้น	SC02, SC06, SC07, SC09
2 moderately susceptible	4-8 แผล การพัฒนาของแผลเกิดขึ้น ไม่เกิน 1 เท่าตัว	SC01, SC08, SC10
3 susceptible	> 10 แผล มีการพัฒนาของแผลอย่างต่อเนื่อง	SC03, SC04, SC05

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเกิดโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (SC01-SC10) ที่ทดสอบโรคในแปลงปลูกและที่ปลูกเชื้อในระยะต้นกล้า

Maize Variety Code	Disease severity percentage in field (%) ¹	Level of Resistance ²	Disease severity on seedling	
			Level of Resistance ³	Number of pustules
SC01	40.33 ^{de}	2	2	4
SC02	38.41 ^{ef}	1	1	1
SC03	84.66 ^a	3	3	8
SC04	69.91 ^b	3	3	16
SC05	70.00 ^b	3	3	12
SC06	38.75 ^{def}	1	1	1
SC07	36.41 ^{ef}	1	1	1
SC08	48.50 ^c	2	2	4
SC09	38.33 ^{ef}	1	1	2
SC10	41.33 ^d	2	2	3

¹ เปรี่เซนต์ความรุนแรงเฉลี่ยในแถวเดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามกรรมวิธีของ Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

² ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (ตารางที่ 2) ดัดแปลงวิธีประเมินจาก Reid (2005)

³ ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน (ตารางที่4) ดัดแปลงวิธีประเมินจาก Reid (2005)

3. การจำแนกชนิดของเชื้อราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญ 6 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ ตาก เพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี สงขลา และชัยภูมิ รวม 21 ไอโซเลต ได้แก่ KKFC 0081, KKFC 0083, KKFC 0084, KKFC 0093, KKFC 0094, KKFC 0096, KKFC 0105, KKFC 0031, KKFC 0043, KKFC 0211, KKFC 0212, KKFC 0215, KKFC 0012, KKFC 0014, KKFC 0056, KKFC 0058, KKFC 0063, KKFC 0208, KKFC 0023, KKFC 0025 และ KKFC 0026 (ตารางที่ 6) จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของตัวอย่างทั้งหมด 21 ไอโซเลต และตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่ามีขนาดชิ้นส่วนประมาณ 400-600 คู่เบส (base pair) (ภาพที่ 16) หลังจากทำให้บริสุทธิ์และนำส่งเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า ชิ้นส่วนที่วิเคราะห์ได้ประกอบด้วยบางส่วนของบริเวณ ITS1 ITS2 และบริเวณ 5.8S ประมาณ 360-700 คู่เบส (ตารางที่ 7) นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ที่ของเชื้อรา *P. polysora* ทั้ง 21 ไอโซเลต รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 7) และการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ของตัวอย่างทั้ง 21 ไอโซเลต ร่วมกับลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อราสนิมชนิดอื่นๆ ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *P. polysora* จำนวน 14 ไอโซเลต และ *P. sorghi* (common rust) จำนวน 3 ไอโซเลต รวมทั้ง 38 ไอโซเลต (ตารางที่ 7) โดยใช้โปรแกรม CLC Main workbench (version 6.6.2) แล้วนำข้อมูลมาสร้าง phylogenetic tree เลือกวิธี unweighted pair group arithmetic mean method (UPGMA) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราสนิมข้าวโพด ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่ม A และ B (ภาพที่ 17)

กลุ่ม A ประกอบด้วย เชื้อรา *P. sorghi* (L08734), *P. sorghi* (HQ154038) และ *P. sorghi* (AY114291) ที่ค่าความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่ม (bootstrap value) สูงสุดที่ 100%

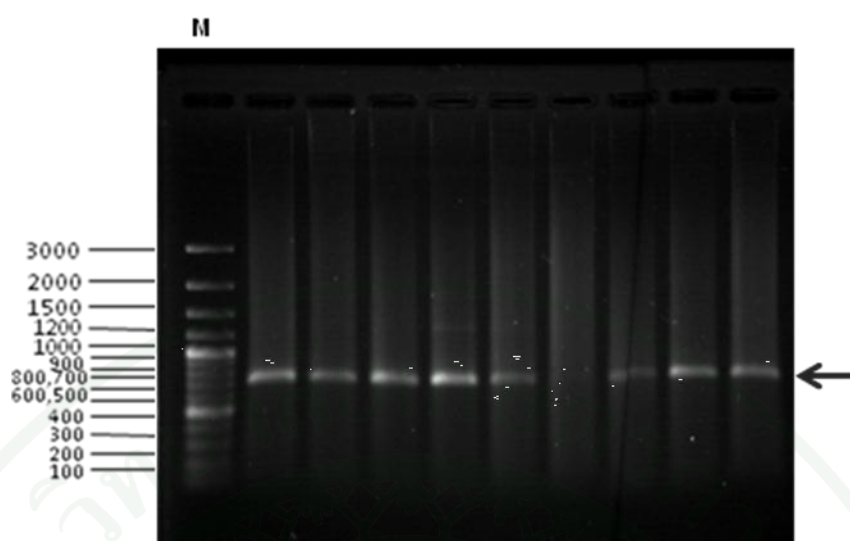
กลุ่ม B สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย (sub group) ได้แก่ กลุ่ม BI ประกอบด้วย เชื้อรา *P. polysora* (AB599959, AB599960, AB599968, AB599962, AB599969, AB599971, AB599958, AB536715, AB599970, AB599972, AB599965, AB599961, AB599966, AB599963, AB599967, AB599964, AB599975, AB599974, HQ154025, HQ154030, HQ154027, HQ154033, HQ154035, HQ154031, HQ154037, HQ154023, HQ154021, HQ154034, HQ154036, HQ154029, HM467909, HQ154032 และ AB599973) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ค่าความน่าเชื่อถือ 74.7 % bootstrap

กลุ่ม BII และกลุ่ม BIII มีเพียงตัวอย่างเดียวคือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599957) และ เชื้อรา *P. polysora* (AB599976) โดยมีค่าความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่ม 99.9% และ 100% ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์จะพบว่า เชื้อรา *P. sorghi* ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่ม A และ เชื้อรา *P. polysora* ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่ม B ซึ่งสามารถแยกเชื้อราทั้งสองนี้ออกจากกันได้ชัดเจน โดยทั้งสองกลุ่ม สนับสนุนด้วยค่า bootstrap สูงสุด 100% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จินตนา (2552) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ ribosomal DNA ในส่วน internal transcribed spacer (ITS) เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพด จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของลำดับเบสบริเวณ ITS พบว่า ตัวอย่างของ *P. polysora* ที่ศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และแยกกลุ่มจากลำดับเบสของ *P. sorghi* ที่ได้จากฐานข้อมูล จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสบริเวณ ITS นั้นสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ได้ นอกจากนี้ Virtudazo *et al.*, (2001) พบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสตำแหน่ง ITS และ 5.8S rDNA สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Puccinia kuehnii* ในอ้อย และราสนิมชนิดอื่นๆ ในพืชตระกูลหญ้าที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เช่นเดียวกับ Hyde *et al.*, (2009) ที่รายงานว่า การจำแนกความแตกต่างเชื้อรา *Collerotrichum boninense* ออกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ประสบความสำเร็จโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในการจำแนก แสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสบริเวณ ITS สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์เช่นเดียวกับเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ได้

ตารางที่ 6 ชื่อราสนิมข้าวโพด ชนิดของข้าวโพด และแหล่งที่เก็บรวบรวมราสนิม ที่ใช้สำหรับ
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

Specimen	Corn Type	Location
KKFC 0081	ข้าวโพดไร่	ต.หนองบัวโคก อ. จัตุรัส จ. ชัยภูมิ
KKFC 0083	ข้าวโพดไร่	ต. บ้านขาม อ. จัตุรัส จ. ชัยภูมิ
KKFC 0084	ข้าวโพดไร่	ต. บ้านขาม อ. จัตุรัส จ. ชัยภูมิ
KKFC 0093	ข้าวโพดไร่	ต.นิคม อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี
KKFC 0094	ข้าวโพดไร่	ต.ช่องสาริกา อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี
KKFC 0096	ข้าวโพดหวาน	ต.โคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี
KKFC 0105	ข้าวโพดหวาน	ต.โคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี
KKFC 0031	ข้าวโพดไร่	ต.พยุหะ อ.วิเชียร จ.เพชรบูรณ์
KKFC 0043	ข้าวโพดไร่	ต.บึงคล้า อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
KKFC 0211	ข้าวโพดไร่	ต.บึงคล้า อ.หล่มสัก จ. เพชรบูรณ์
KKFC 0212	ข้าวโพดไร่	ต.บึงคล้า อ.หล่มสัก จ. เพชรบูรณ์
KKFC 0215	ข้าวโพดไร่	ต.บึงคล้า อ.หล่มสัก จ. เพชรบูรณ์
KKFC 0012	ข้าวโพดข้าวเหนียว	อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี
KKFC 0014	ข้าวโพดหวาน	อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี
KKFC 0056	ข้าวโพดหวาน	ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
KKFC 0058	ข้าวโพดหวาน	ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
KKFC 0063	ข้าวโพดหวาน	ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
KKFC 0208	ข้าวโพดไร่	ต.รวมไทย อ.แม่สอด จ.ตาก
KKFC 0023	ข้าวโพดไร่	ต.รวมไทย อ.แม่สอด จ.ตาก
KKFC 0025	ข้าวโพดไร่	ต.รวมไทย อ.แม่สอด จ.ตาก
KKFC 0026	ข้าวโพดไร่	ต.รวมไทย อ.แม่สอด จ.ตาก



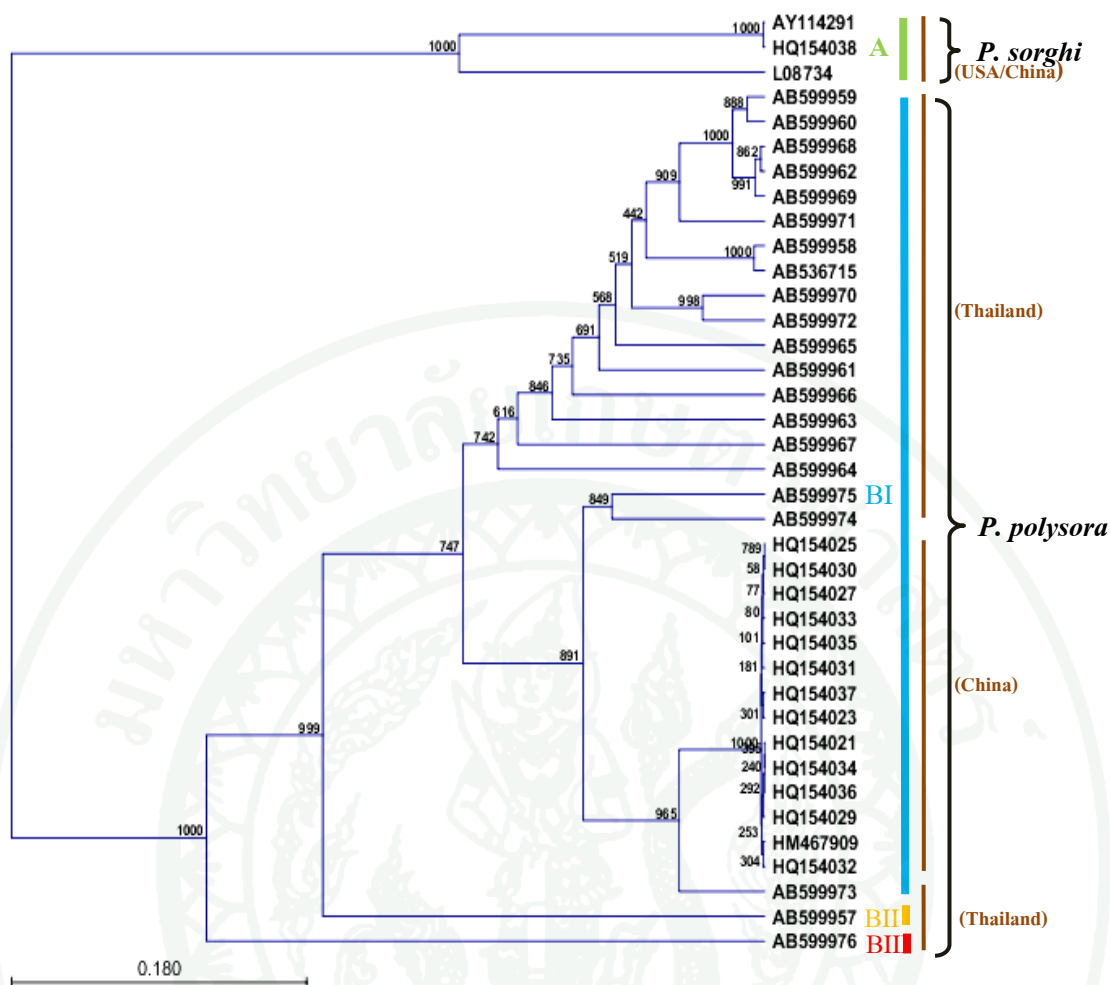
ภาพที่ 16 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Puccinia polysora* โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 500-600 คู่เบส (บริเวณลูกศรชี้) M : 100 bp plus DNA Ladder

ตารางที่ 7 เชื้อรา *Puccinia polysora* ในประเทศไทย และเชื้อราชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

Specimen	GenBank accession number	Country	Species
KKFC 0023	AB536715	Thailand	<i>Puccinia polysora</i>
KKFC 0208	AB599976	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0211	AB599973	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0212	AB599974	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0215	AB599975	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0105	AB599964	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0093	AB599967	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0094	AB599963	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0083	AB599966	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0025	AB599961	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0096	AB599958	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0031	AB599959	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0043	AB599960	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0084	AB599965	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0026	AB599962	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0014	AB599968	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0012	AB599969	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0056	AB599970	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0058	AB599971	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0063	AB599972	Thailand	<i>P. polysora</i>
KKFC 0081	AB599957	Thailand	<i>P. polysora</i>

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Specimen	GenBank accession number	Country	Species
-	HQ154037	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154033	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154025	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154021	China	<i>P. polysora</i>
-	HM467909	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154030	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154027	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154035	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154034	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154032	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154036	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154023	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154031	China	<i>P. polysora</i>
-	HQ154029	China	<i>P. polysora</i>
-	L08734	USA	<i>P. sorghi</i>
-	HQ154038	China	<i>P. sorghi</i>
-	AY114291	USA	<i>P. sorghi</i>



ภาพที่ 17 UPGMA tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา *Puccinia polysora* และ *P. sorghi* โดยวิธี UPGMA ค่าที่แสดงบนกิ่ง คือค่า bootstrap ที่คำนวณจาก 1,000 ซ้ำ โดยโปรแกรม CLC Main Workbench (version 6.6.2)

4. การคัดเลือกและการทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการจำแนกเชื้อรา *Puccinia polysora* สาเหตุโรคราสนิมข้าวโพด ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

4.1 การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการจำแนกเชื้อราสนิมข้าวโพดโดยวิธี *In silico*

เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อรา *P. polysora* และเชื้อรา *P. sorghi* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 38 ไอโซเลท มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) และนำมาทดสอบย่อยการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธี *In silico* ด้วยโปรแกรม CLC Main workbench (version 6.6.2) เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ได้แก่ เอนไซม์ *Eco* RI, *Taq* I และ *Sal* I พบว่า เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (HQ154037) มีขนาด 87 197 และ 290 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599975) มีขนาด 25 254 และ 268 เบส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (AB536715) ขนาด 200 และ 281 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599976) มีขนาด 184 และ 287 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599973) มีขนาด 244 และ 289 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599974) มีขนาด 262 และ 304 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599964) มีขนาด 190 และ 251 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599967) มีขนาด 167 และ 198 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599963) มีขนาด 204 และ 244 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599966) มีขนาด 203 และ 280 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599961) มีขนาด 218 และ 244 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599958) มีขนาด 202 และ 283 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599959) มีขนาด 235 และ 204 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599960) มีขนาด 201 และ 233 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599965) มีขนาด 203 และ 262 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599962 และ AB599969) มีขนาด 203 และ 233 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599968 และ AB599972) มีขนาด 204 และ 233 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599970) มีขนาด 203 และ 242 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599971) มีขนาด 200 และ 236 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154033 และ HQ154029) มีขนาด 280 และ 288 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HM467909) มีขนาด 280 และ 288 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154021 HQ154025 HQ154027 HQ154030 HQ154031 HQ154034 HQ154035 และ HQ154036) มีขนาด 280 และ 289 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154023 และ HQ154032) มีขนาด 280 และ 290 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (L08734) มีขนาด 127 และ 281 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (HQ154038) มีขนาด 282 และ 291 เบส และเชื้อรา *P. sorghi* (AY114291) มีขนาด 282 และ 292 เบส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599957) มีขนาด 402 เบส (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 18)

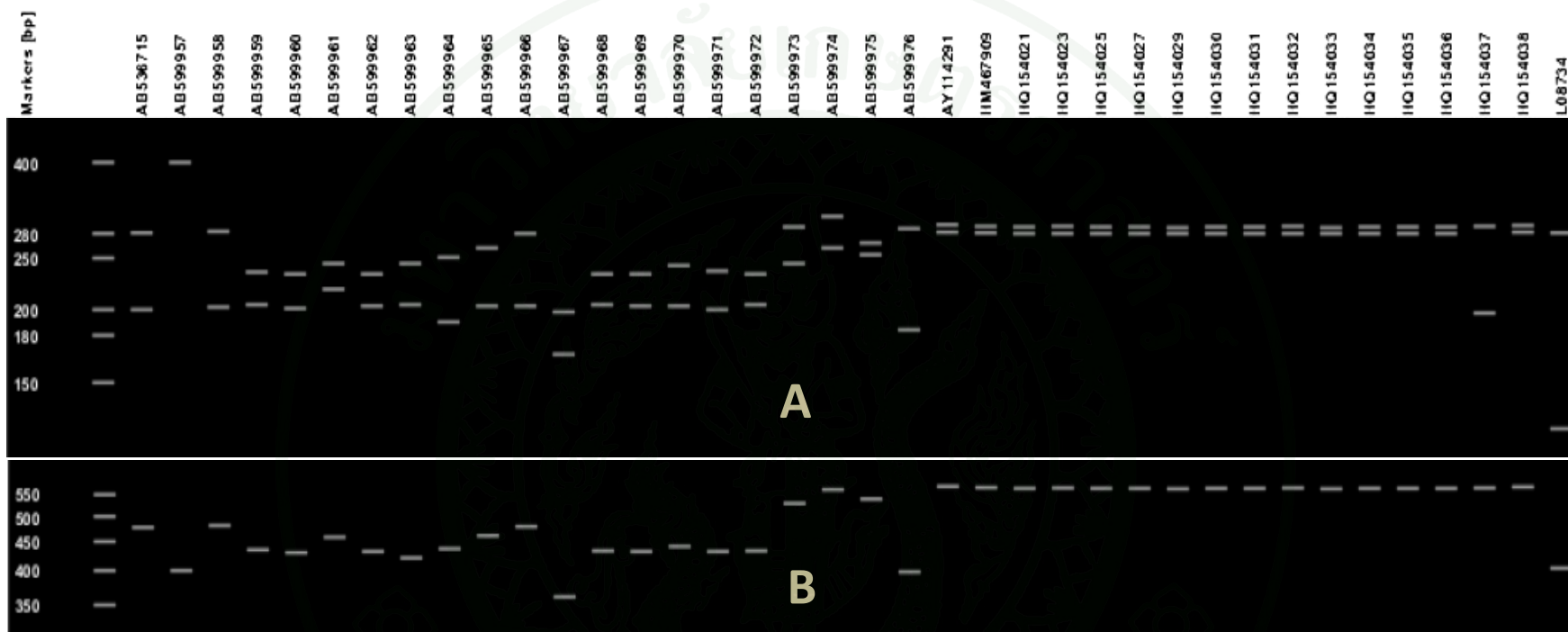
ทดสอบการย่อยดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal I* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599976) มีขนาด 73 และ 398 เบส และเชื้อรา *P. polysora* (AB599963) มีขนาด 27 และ 421 เบส ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 ชิ้นคือ เชื้อรา *P. polysora* (AB536715) มีขนาด 477 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599973) มีขนาด 562 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599974 HQ154029 และ HQ154033) มีขนาด 564 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599975) มีขนาด 539 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599964) มีขนาด 437 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599967) มีขนาด 361 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599966) มีขนาด 479 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599961) มีขนาด 458 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599958) มีขนาด 481 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599959) มีขนาด 435 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599960) มีขนาด 430 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599965) มีขนาด 461 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599962 AB599969 และ AB599971) มีขนาด 432 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599968 และ AB599972) มีขนาด 433 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599970) มีขนาด 441 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599957) มีขนาด 400 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154023 HQ154032 และ HQ154037) มีขนาด 566 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154021 HQ154025 HQ154027 HQ154030 HQ154034 HQ154035 และ HQ154036) มีขนาด 565 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154031) มีขนาด 568 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HM467909) มีขนาด 567 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (HQ154038) มีขนาด 569 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (L08734) มีขนาด 404 เบส และเชื้อรา *P. sorghi* (AY114291) มีขนาด 570 เบส (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 18)

ทดสอบการย่อยดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq I* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599976) มีขนาด 60 72 169 และ 172 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599957) มีขนาด 9 45 105 และ 247 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (HQ154038) มีขนาด 18 61 229 และ 267 เบส ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นคือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599966) มีขนาด 38 198 และ 247 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599961) มีขนาด 71 195 และ 196 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599970) มีขนาด 40 158 และ 247 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599971) มีขนาด 23 169 และ 244 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (L08734) มีขนาด 61 81 และ 266 เบส เชื้อรา *P. sorghi* (AY114291) มีขนาด 61 229 และ 267 เบส ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นคือ เชื้อรา *P. polysora* (AB599973) มีขนาด 198 และ 333 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599974) มีขนาด 216 และ 348 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599975) มีขนาด 208 และ 333 เบส เชื้อรา (AB599964) มีขนาด 205 และ 234 เบส เชื้อรา

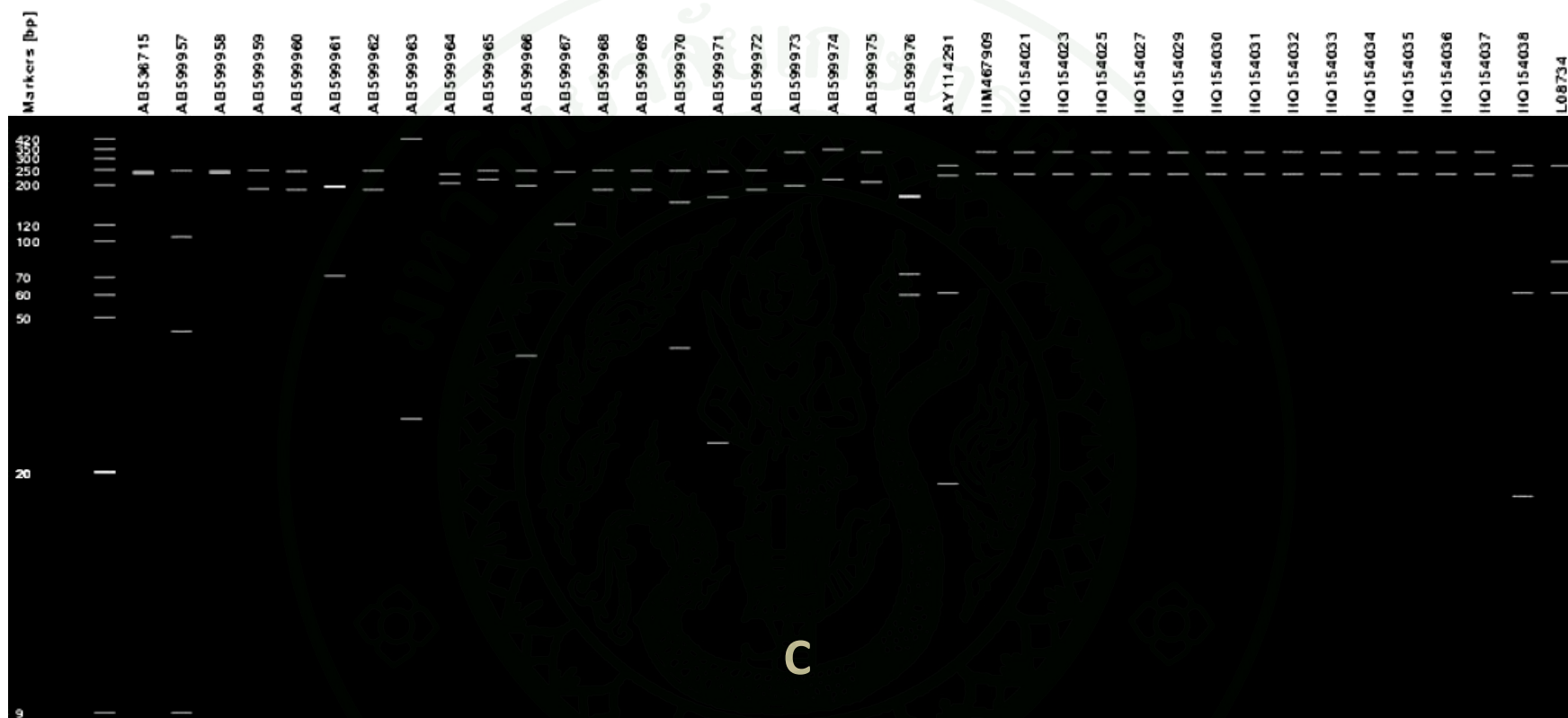
P. polysora (AB599967) มีขนาด 121 และ 242 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599963) มีขนาด 24 และ 420 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599958) มีขนาด 237 และ 246 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599959) มีขนาด 189 และ 248 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599960) มีขนาด 187 และ 245 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599965) มีขนาด 216 และ 247 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599962 และ AB599969) มีขนาด 187 และ 247 เบส เชื้อรา *P. polysora* (AB599968 และ AB599972) มีขนาด 187 และ 248 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154033 และ HQ154029) มีขนาด 234 และ 332 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154021 HQ154027 HQ154030 HQ154031 และ HQ154034) มีขนาด 234 และ 333 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154023 HQ154032 และ HQ154037) มีขนาด 234 และ 334 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154025) มีขนาด 333 และ 343 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154035) มีขนาด 233 และ 334 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HM467909) มีขนาด 235 และ 334 เบส เชื้อรา *P. polysora* (HQ154036) มีขนาด 324 และ 333 เบส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 ชิ้น คือ เชื้อรา *P. polysora* (AB536715) มีขนาด 244 เบส (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 19)

การคัดเลือกเอนไซม์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา โดยวิธี *In silico* ได้แก่ เอนไซม์ *Eco* RI, *Sal* I และ *Taq* I พบว่า เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ(DNA Fragment site) จำนวน 3 2 และ 1 ชิ้น เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal* I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 และ 1 ชิ้น เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 3 2 และ 1 ชิ้น นอกจากนี้ขนาดของชิ้นส่วนที่ย่อยได้จากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้นมีขนาดที่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ด้วยขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แม้ว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ในเชื้อราได้ เช่น การใช้เทคนิค ITS PCR-RFLP สามารถจำแนกความสัมพันธ์และวิเคราะห์ความผันแปรของเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* ในหลายไอโซเลทที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Martin and Garcia-Figueres, 1999 ; Tapia-Tussell *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ซึ่งก่อโรคแอนแทรคโนสของมะละกอในประเทศเม็กซิโก โดยใช้เทคนิค ITS PCR-RFLP (Balardin 1999) แต่สำหรับการจำแนกเชื้อราบางชนิด การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สามารถนำมาใช้ได้ สอดคล้องกับ Maharaj and

Rampersad (2011) ที่รายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ในพริกและมะละกอนั้น เมื่อทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS1, 5.8S และ ITS2 และการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด มีเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเท่านั้นที่สามารถแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* จากในพริกออกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ในมะละกอออกจากกันได้ เช่นเดียวกับสุพจน์ (2555) ที่การวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Pseudoplagiostoma eucalypti* และคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 ชนิด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อจำแนกชนิดของ *Ps. eucalypti* ออกจากเชื้อราชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน (close related species) พบว่าจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu I* และ *Hin CII* สามารถแยก *Ps. eucalypti* และ *Ps. oldii*. ออกจาก *Ps. variable* ได้อย่างชัดเจน ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ctr 10I*, *Eco RI*, *Hae II*, *Hae III*, *Hin fI*, *Mse I*, *Stu I* และ *Taq I* ไม่สามารถแยกไอโซเลต ของ *Ps. eucalypti*, *Ps. oldii* และ *Ps. variable* ออกจากกันได้



ภาพที่ 18 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Puccinia polysora* เปรียบเทียบกับเชื้อรา *P. sorghi* ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank วิเคราะห์แบบ PCR-RFLP ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (A) และ *Sal* I (B) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 6.6.2)



ภาพที่ 19 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Puccinia polysora* เปรียบเทียบกับเชื้อรา *P. sorghi* ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank วิเคราะห์แบบ PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Taq I* (C) โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench (version 6.6.2)

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

Puccinia polysora จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI *Sal* I และ *Taq* I

Specimen	GenBank accession number	Species	DNA fragment site (bp)		
			<i>Eco</i> RI	<i>Sal</i> I	<i>Taq</i> I
KKFC 0023	AB536715	<i>Puccinia polysora</i>	200, 281	477	244
KKFC 0208	AB599976	<i>P. polysora</i>	184, 287	73, 398	60,72,169,172
KKFC 0211	AB599973	<i>P. polysora</i>	244, 289	562	198, 333
KKFC 0212	AB599974	<i>P. polysora</i>	262, 304	564	216, 348
KKFC 0215	AB599975	<i>P. polysora</i>	25, 254, 268	539	208, 333
KKFC 0105	AB599964	<i>P. polysora</i>	190, 251	437	205, 234
KKFC 0093	AB599967	<i>P. polysora</i>	167, 198	361	121, 242
KKFC 0094	AB599963	<i>P. polysora</i>	204, 244	27, 421	24, 420
KKFC 0083	AB599966	<i>P. polysora</i>	203, 280	479	38, 198, 247
KKFC 0025	AB599961	<i>P. polysora</i>	218, 244	458	71, 195, 196
KKFC 0096	AB599958	<i>P. polysora</i>	202, 283	481	237, 246
KKFC 0031	AB599959	<i>P. polysora</i>	235, 204	435	189, 248
KKFC 0043	AB599960	<i>P. polysora</i>	201, 233	430	187, 245
KKFC 0084	AB599965	<i>P. polysora</i>	203, 262	461	216, 247
KKFC 0026	AB599962	<i>P. polysora</i>	203, 233	432	187, 247
KKFC 0014	AB599968	<i>P. polysora</i>	204, 233	433	187, 248
KKFC 0012	AB599969	<i>P. polysora</i>	203, 233	432	187, 247
KKFC 0056	AB599970	<i>P. polysora</i>	203, 242	441	40, 158, 247
KKFC 0058	AB599971	<i>P. polysora</i>	200, 236	432	23, 169, 244
KKFC 0063	AB599972	<i>P. polysora</i>	204, 233	433	187, 248
KKFC 0081	AB599957	<i>P. polysora</i>	402	400	9,45,105,247

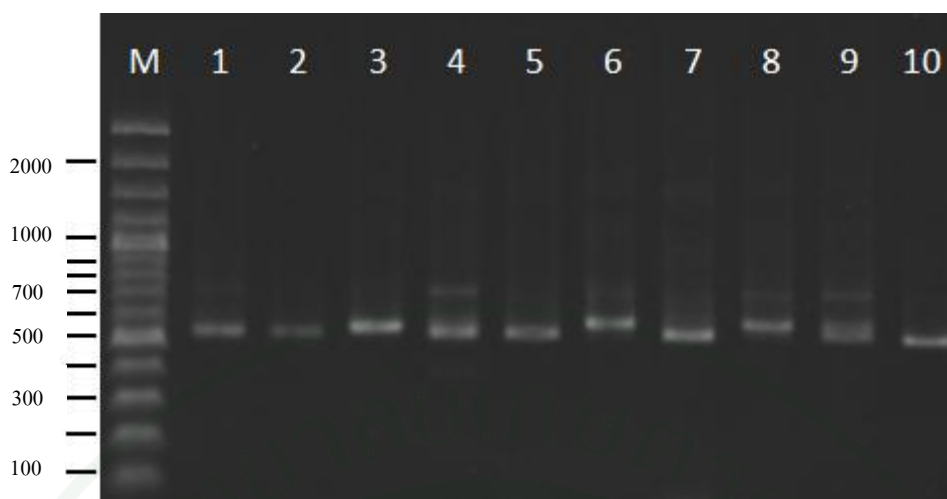
ตารางที่ 8 (ต่อ)

Specimen	GenBank accession number	Species	DNA Fragment site (bp)		
			<i>Eco</i> RI	<i>Sal</i> I	<i>Taq</i> I
-	HQ154037	<i>P. polysora</i>	87, 197, 290	566	234, 334
-	HQ154033	<i>P. polysora</i>	280, 288	564	234, 332
-	HQ154025	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	333, 343
-	HQ154021	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	234, 333
-	HM467909	<i>P. polysora</i>	281, 290	567	235, 334
-	HQ154030	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	234, 333
-	HQ154027	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	234, 333
-	HQ154035	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	333, 334
-	HQ154034	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	234, 333
-	HQ154032	<i>P. polysora</i>	280, 290	566	234, 334
-	HQ154036	<i>P. polysora</i>	280, 289	565	324, 333
-	HQ154023	<i>P. polysora</i>	280, 290	566	234, 334
-	HQ154031	<i>P. polysora</i>	280, 289	568	234, 333
-	HQ154029	<i>P. polysora</i>	280, 288	564	234, 332
-	L08734	<i>P. sorghi</i>	127, 281	404	61, 81, 266
-	HQ154038	<i>P. sorghi</i>	282, 291	569	18,61,229,267
-	AY114291	<i>P. sorghi</i>	282, 292	570	61, 229, 267

4.2 การทดสอบเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการจำแนกเชื้อรา *P. polysora* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราสนิมบนข้าวโพดหวานลูกผสมทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมข้าวโพด นำดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 และ ITS4 และนำผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis บน agarose gel ได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 500 – 600 เบส (ภาพที่ 19)

เมื่อทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกจากโปรแกรมข้างต้นในข้อ 4 โดยใช้ผลผลิตดีเอ็นเอ มาย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และตรวจสอบผลของการย่อยด้วยเอนไซม์บน agarose gel electrophoresis พบว่า ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นคือ เชื้อรา *P. polysora* บนข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC01-SC08 มีขนาดประมาณ 260 และ 280-300 เบส เชื้อรา *P. polysora* บนข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC09 มีขนาดประมาณ 290-300 และ 300-320 เบส เชื้อรา *P. polysora* บนข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC10 มีขนาดประมาณ 260 และ 300-320 เบส (ภาพที่ 20) จากผลการทดสอบเอนไซม์ ในเชื้อราชนิดเดียวกัน ให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ไม่เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบใน *In silico* แสดงให้เห็นว่า การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาย่อยชิ้นส่วนบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Puccinia* spp. ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ แต่การนำชิ้นส่วนบริเวณ ITS ไปวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบทีละเบสและให้ข้อมูลที่ละเอียดมากกว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้



ภาพที่ 20 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS ของเชื้อรา *Puccinia polysora* โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 M ; 100 bp Plus DNA Ladder ตัวเลขด้านบนเจล 1-10 คือ ตัวอย่างเชื้อรา *P. polysora* จากข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC 01-SC 10



ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Puccinia polysora* ที่ย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ *Eco* RI M ; 100 bp Plus DNA Ladder บริเวณที่ถูกสกรีน คือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของเชื้อรา, ตัวเลขด้านบนเจล 1-10 คือ ตัวอย่างเชื้อรา *P. polysora* จากข้าวโพดหวานสายพันธุ์ SC 01-SC 10

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ในการทดสอบการมีชีวิตของเชื้อราสนิม ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า การเก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 53.63 แต่เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราสนิมในตัวอย่างสดก่อนการเก็บรักษา พบว่าตัวอย่างสดนั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกร้อยละ 71.62 ดังนั้นในการปลูกเชื้อราสนิมในระยะต้นกล้าควรใช้ urediospores จากตัวอย่างสดมากกว่าจากตัวอย่างแห้ง หรือที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ การพัฒนาเทคนิคการปลูกเชื้อจาก 2 วิธีการ คือ การหยดสารแขวนลอยสปอร์และการวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอยสปอร์ พบว่า วิธีการวางกระดาษกรอง (Filter paper method) มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการหยดสารแขวนลอยสปอร์ (Dropping method) โดยสามารถใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเกิดโรคมากกว่า และระยะเวลาในการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อสั้นกว่าวิธีการหยดสารแขวนลอยสปอร์ นอกจากนี้เวลาในการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ด้วยการวางกระดาษกรอง สามารถทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยกว่า ดังนั้นการปลูกเชื้อราสนิมด้วยวิธีการวางกระดาษกรอง จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมจะนำมาใช้ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพด

2. จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคการปลูกเชื้อโดยวิธีการวางกระดาษกรองบนต้นกล้าข้าวโพด โดยเปรียบเทียบผลการปลูกเชื้อและการทดสอบโรคในแปลงปลูก พบว่า ให้สอดคล้องกัน โดยข้าวโพดหวาน SC03, SC04 และ SC05 มีระดับการเกิดโรคที่รุนแรงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เมื่อทดสอบโรคทั้งในระยะต้นกล้าและในแปลงปลูก ในขณะที่ข้าวโพด SC02, SC06, SC07 และ SC09 จัดอยู่ในระดับความต้านทานปานกลาง เมื่อทดสอบโรคทั้งในระยะต้นกล้าและในแปลงปลูก

3. สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อราสนิม *P. polysora* ที่คัดเลือกจากแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญในประเทศไทยรวม 21 ไอโซเลต และตัวอย่างราสนิม *P. polysora* 14 ไอโซเลต จากที่มีรายงานในฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของเชื้อรา *P. polysora* มี

ความต่างจากเชื้อรา *P. sorghi* และสามารถแยกคนละกลุ่มด้วยค่า bootstrap ที่สูง 100 เปอร์เซนต์ แสดงว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ได้

4. การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ *Eco* RI, *Taq* I และ *Sal* I โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*In silico*) พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI, *Taq* I และ *Sal* I ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ในเชื้อรา *P. polysora* และ *P. sorghi* ได้

ข้อเสนอแนะ

1. การปลูกเชื้อราสนิมบนต้นกล้าเพื่อทดสอบโรคราสนิมนั้น ควรใช้สปอร์เชื้อราสนิมจากตัวอย่างสดมากกว่าการใช้สปอร์ที่ผ่านการเก็บไว้ เพื่อให้ผลการทดสอบเป็นไปตามความจริง เนื่องจากอัตราการงอกที่ต่ำลงมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อ
2. การคัดเลือกข้าวโพดสายพันธุ์ต้านทานโรคในระยะต้นกล้า ด้วยเทคนิคการปลูกเชื้อ โดยวิธีการวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย urodiospores ความเข้มข้น 10^8 บนต้นกล้าข้าวโพดอายุ 7-10 วัน หลังจากวางกระดาษกรองลงบนใบต้นกล้าข้าวโพดแล้ว หยคน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้กระดาษกรองชุ่มชื้น และเก็บต้นกล้าไว้ที่สภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำกระดาษกรองออก หลังจากนั้นเก็บต้นกล้าไว้ที่สภาพแวดล้อมปกติ เป็นการคัดเลือกในเบื้องต้น ก่อนการปลูกจริงในแปลงปลูก ซึ่งช่วยลดต้นทุน ลดเวลาและแรงงานในการผลิต เนื่องจากโดยปกติ การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในแปลงปลูกสำหรับโรคราสนิม ต้องรอให้เชื้อเข้าทำลายและแสดงอาการหลังจากออกดอก หรือเกิน 60 วันแล้ว การคัดเลือกเบื้องต้นในระยะต้นกล้า สามารถประเมินพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอได้ก่อน
3. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไม่สามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดของราสนิมข้าวโพดได้ ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ร่วมกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2524. ข้าวโพด. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 4, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
กรุงเทพฯ. 185 หน้า.

กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. 2554. ข้อมูลการค้าและการส่งออก. ข้อมูลเป็นราย
สินค้าและบริการ. แหล่งที่มา: <http://www.depthai.go.th/>, เมษายน 2554.

กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. 2555. ข้อมูลการค้าและการส่งออก. ข้อมูลเป็นราย
สินค้าและบริการ. แหล่งที่มา: <http://www.depthai.go.th/>, มกราคม 2555.

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด**. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จินตนา อันอาดมงาม. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุล
ของสายพันธุ์เชื้อราสนิมข้าวโพดในประเทศไทย. ใน รายงานการวิจัย พัฒนาและ
วิศวกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

จิรนนท์ แหม่มสูงเนิน สุชาติพิทย์ แสงกุล ประชุม จุฑาวรรณ และธรรมศักดิ์ สมมาตรย์. 2540.
การศึกษาโรคราสนิม (rust) ของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา, กรุงเทพฯ.

เจตษฎา อุดรพันธ์ ทวีศักดิ์ ภู่อำ เณิมพล ภูมิไชย์ และ ประภา ศรีพิจิตร. 2552. การวิเคราะห์
พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราสนิมในข้าวโพดหวาน.การประชุมทาง
วิชาการ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

โชคชัย เอกทัศนาวรรณ สรรเสริญ จำปาทอง ชไมพร เอกทัศนาวรรณ จัตรพงศ์ บาลลา นพพงศ์
จุลจอหอ ทศพล ทองลาภ ชำนาญ จัตรแก้ว สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ และ สุจินต์ จินายน.
2546. การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดไร่ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ใน นิทรรศการ
งานวิจัย 60 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “พัฒนาคน พัฒนาชาติ ศาสตร์แห่งแผ่นดิน”. 31

มกราคม - 8 กุมภาพันธ์ 2546. ณ อาคารจักรพันธ์เพ็ญศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.

ธรรมศักดิ์ สมมาตรย์ ประชุม จุฬารวณะ สุราทิพย์ แสงกุล และจิรนนท์ แหม่มสูงเนิน. 2540.

การศึกษาโรคราสนิม (rust) ของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* Underw. ใน
รายงานผลงานวิจัยประจำปี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2525. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชศาสตร์. คณะ
ทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 303 หน้า.

ยุพกรณ์ ศรีวิเชียร. 2551. การศึกษาระดับความรุนแรงของโรคราสนิมบนข้าวโพดหวาน. ปัญหา
พิเศษระดับปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สรเสริญ จำปาทอง. 2552. พันธุ์: สิ่งที่เกี่ยวข้อง. 1-12 น. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม
เรื่องการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้ได้ผลผลิตคุ้มค่า. 21-22 เมษายน 2552. ศูนย์วิจัยข้าวโพด
และข้าวฟ่างแห่งชาติ สถาบันอิทธิจันทรสถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมเกียรติ จิตะฐาน ดิลก อัญชลิสังกาศ วีระ แจ่มกระจ่าง และนิยม จิวจัน. 2521. โรคข้าวโพด.
เอกสารวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 22 หน้า.

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5. 2539. การปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภาคกลาง. สำนักวิจัย
และพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชัยนาท.
53 หน้า.

สุพจน์ เหลืองประพจน์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudoplagiostoma*
eucalypti สาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ในยูคาลิปตัส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี.**
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.

Abbasi, M.· Goodwin, S. B. and Scholler, M. 2005. Taxonomy, phylogeny, and distribution of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. **Mycoscience** 46:241–247.

Balardin, R. S., Smith, J. J., & Kelly, J. D. 1999. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Myco-logical Research**. 103, 841–848.

Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., and Timmer, L. W. 1996. Molecular Characterization of Slow-Growing Orange and Key Lime Anthracnose Strains of *Colletotrichum* from Citrus as *C. acutatum*. The American Phytopathological Society. **Phytopathology**. 86:523-527.

Burnett, J. H. 2003. **Fungal Populations and Species**. Oxford University Press Inc., New York, USA.

Cammack, R.H. 1958. Studies on *Puccinia polysora* Underw. I. The world distribution of forms of *Puccinia polysora*. Trane. Brit. **Mycol. Soc.**41(1) : 89-94.

Catherine, M. A. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). **The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo**. 47:112–122.

Christensen, J.J. 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monograph No. 2 Am. **Phytopathol. Soc.** St. Paul, Minnesota.

Cummins, G.B. 1941. Identify and distribution of three rusts of corn. **Phytopathol.** 31 : 856-857.

_____. and Y. Hiratsuka. 1991. **Illustrated Genera of Rust Fungi**. 2nd ed. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA.

- Deacon, J. W. 2006. **Fungal Biology**. Blackwell Publishing Ltd. 4th ed. Oxford, UK. 371p.
- Fernandez A., T. garcia, L. asensio, M.Á. rodriguez, I. gonzalez, P.E. hernandez and R. martin. 2001. PCR-RFLP Analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region for Identification of 3 Clam Species. **J. of food sci.** 66: 657-651.
- Fisher, D.E., Hooker, A.L., Lim,S.m. and Smith, D.R. 1976. Leaf infection and yield loss caused by four Helminthosporium leaf diseases of corn. **Phytopathology** 66: 942-944.
- Giatgong, P. 1980. **Host Index of Plant Disease in Thailand**, 2nd edn. Department of Agriculture, Ministry of Agricultural Cooperative, Thailand.
- Hee Chung Ji. 2006. Epidermal Cell Response to Rust Hyphae and the Resistance Mode of Tropical Maize to Southern Corn Rust (*Puccinia polysora* Underwood).**Journal of Plant Biology**, 49(5) : 392-397.
- Holland, J.B., D.V. Uhr, D. Jeffers and M.M. Goodman. 1998. **Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical by corn belt maize populations**. Theor. Appl. Genet. 96: 232-241.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., & Prihastuti, H. 2009. Colletotrichum: A catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, 39, 1–17.
- Maharaj, A., and Rampersad S. N. 2011. Genetic Differentiation of Colletotrichum gloeosporioides and C. truncatum Associated with Anthracnose Disease of Papaya (Carica papaya L.) and Bell Pepper (Capsium annuum L.) Based on ITS PCR-RFLP Fingerprinting. **Springer Science**, 50:237–249.
- Martin, I.F., Mc Carthy, T.E. and Persley, D.M.1993. Inheritance of husk numbers and ear insect damage in maize. **Crop Science** 19: 32-36.

- Martin, M. P., & Garcia-Figueres, F. (1999). *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, 105, 733–741.
- McMaugh, T. 2008. **Guidelines for surveillance for plant pests in Asia and the Pacific**. Australian Center for International Agricultural Research: 192.
- Melching, J.S. 1975. Corn Rusts: types, races and destructive potential. Proceedings of the 13th Annual Corn and Sorghum Research Conference. Publication No. 30. **American Seed Trade Association**: 24p.
- Pataky, J.K., Gonzalez M., Brewbaker, J.L. and Kloppers, F.J. 2001. Reactions of Rp-resistant, processing sweet corn hybrids to populations of *Puccinia sorghi* virulent on corn with the Rp1-D gene. **Hort Sci.** 36 : 324-327.
- Raid, R. and Kucharek, T. 2005. Florida Plant Disease Management Guide: Sweet Corn. Report no. PDMG-V3-48, Department of Plant Pathology, Florida Cooperative Extension Service, **Institute of Food and Agricultural Sciences**, University of Florida.
- Reid, L.M. and Zhu, X. 2005. Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada. **Agriculture and Agri-Food**. Canada: 27 p.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velaquez, A., Lappe, P., Larque-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2008). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. **Molecular Biotechnology**, 40, 293–298.
- Shurtleff, M.C. 1980. **Compendium of Corn Diseases**. The American Phytopathological Society. Society. Paul, Minnesota: 105 p.

- Virtudazo, E. V., Nakamura, H. and Kakishima, M. 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.
- Virtudazo, E. V., Nakamura, H. and Kakishima, M. 2001. Ribosomal DNA-ITS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehnii*. *Mycoscience*. 42: 447-453.
- Wellman, F.L. 1972. **Rust problem in Tropical American Plant Disease (Neotropical Phytopathology Problems)**. The Scarcrow Press, Inc., Metuchen, New Jersey: 576 p.
- Weising K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- White, D. G. 2000. **Compendium of Corn Diseases: Third edition**. The American Phytopathological Society. Minnesota 55121-2097, USA.
- White, T. J., T. Bruns, S. B. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In : **PCR Protocols**, (ed. By Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.), pp. 315-322.
- William R. B. and A. P. Roelfs. 1984. **The Cereal Rusts** . U.S. Department of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul, Orlando, Florida : 546 p.



ภาคผนวกที่ 1 แผนผังแปลงปลูกข้าวโพด ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ RCBD (Randomized Complete Block Design)

ซ้ำที่	ข้าวโพดหวานลูกผสมสายพันธุ์ SC01 - SC10									
1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
2	07	04	02	01	06	10	08	03	05	09
3	04	01	10	06	07	02	09	03	05	08

ภาคผนวกที่ 2 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อ 7 8 9 และ 10 วัน โดยวิธีการหยดสารแขวนลอย uredospores ของเชื้อราสนิมที่ระดับความเข้มข้น 10⁸ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

วันหลังการปลูกเชื้อ	Mean ¹	Std. Error Mean ²
7	18.0	.894
8	61.0	2.497
9	77.0	2.559
10	84.0	1.814

¹ ค่าเฉลี่ยจำนวนแผลราสนิมบนใบข้าวโพด 50 ต้น

² ส่วนคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวกที่ 3 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อ 7 8 9 และ 10 วัน
โดยวิธีการวางกระดาษกรองที่มีสารแขวนลอย uredospores ของเชื้อราสนิมที่ระดับ
ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

วันหลังการปลูกเชื้อ	Mean	Std. Error Mean ¹
10	16.92	2.913
11	36.04	1.163
12	46.48	0.814
13	50.40	2.535
14	53.14	3.497

¹ ค่าเฉลี่ยจำนวนแผลราสนิมบนใบข้าวโพด 50 ต้น

² ส่วนคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวกที่ 4 พัฒนาการของโรคราสนิมบนใบข้าวโพด หลังจากปลูกเชื้อ 7 8 9 และ 10 วัน
โดยวิธีการหยดสารแขวนลอย ureiospores ของเชื้อราสนิมที่ระดับความเข้มข้น 10^8
สปอร์ต่อมิลลิลิตร

วันหลังการปลูกเชื้อ	Mean	Std. Error Mean ¹
7	48.2	2.535
8	114	3.163
9	130.1	2.913
10	163.1	4.733

¹ ค่าเฉลี่ยจำนวนแผลราสนิมบนใบข้าวโพด 50 ต้น

² ส่วนคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

```

      20      40      60
      |      |      |
HQ154032 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154034 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154029 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154021 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154036 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154030 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154025 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154023 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154027 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154033 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154035 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154037 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HQ154031 -gcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 61
HM467909 tgcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 62
AB599973 .....caccctat---caataaaatttgt-aca 23
AB536715 tgcactt-aattgtggctcaccaattttatcttt-aatttttcaactccat---caataaaatt-t-aca 62
AB599958 tgcacttgaattgtggctcaccaatttcattcttcaatttgcaccccat---caataaaatt-t-aca 64
AB599974 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 27
AB599962 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599969 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599968 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599975 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599960 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599959 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 15
AB599971 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599972 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 21
AB599970 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 28
AB599965 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 31
AB599961 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 14
AB599966 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 29
AB599964 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 41
AB599967 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 10
AB599957 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 58
AB599976 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 15
AB599963 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 15
HQ154038 -gcacttaattgtggctcgaccccttttaaaactc---accccaaaactttcaaa 49
AY114291 tgcacttaattgtggctcgaccccttttaaaactc---accccaaaactttcaaa 50
L08734 .....accccaaaactttcaaa 50

      80      100      120      140
      |      |      |      |
HQ154032 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154034 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154029 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154021 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154036 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154030 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154025 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154023 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154027 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154033 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154035 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154037 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HQ154031 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 113
HM467909 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 114
AB599973 aagacttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 77
AB536715 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 114
AB599958 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 116
AB599974 aagacttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 87
AB599962 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 66
AB599969 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 66
AB599968 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 66
AB599975 aagacttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 86
AB599960 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 66
AB599959 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 67
AB599971 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 67
AB599972 aatcgt-----tgatcgaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 64
AB599970 aatcgt-----tgatcgaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 76
AB599965 caaagtcgtagttgact--gaagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 89
AB599961 aa-acttg--ttgacatg-aagaa-gaa--att-ct-tcattgttt-tc-----agg-tataagtagt 71
AB599966 ta-----gctctcgacatgtaagaacgaga-attgctgttcatgtgtctctactccagcgatcacaggt 93
AB599964 a-----tactgttgacttaagaaaatcgca-attgttttca-----agg-tataagtagt 88
AB599967 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 10
AB599957 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 58
AB599976 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 15
AB599963 .....caccctatgcaataccaagattgt-aca 15
HQ154038 -gcacttaattgtggctcgaccccttttaaaactc---accccaaaactttcaaa 49
AY114291 tgcacttaattgtggctcgaccccttttaaaactc---accccaaaactttcaaa 50
L08734 .....accccaaaactttcaaa 50

```

ภาพผนวกที่ 5 Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อ *Puccinia polysora*

ร่วมกับเชื้อ *P. polysora* และ *P. sorghi* จากฐานข้อมูล(GenBank) ด้วยโปรแกรม

CLC Main Workbench (version 6.6.2)

```

160      180      200
HQ154032  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154034  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154029  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154021  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154036  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154030  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154025  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154023  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154027  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154033  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154035  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154037  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HQ154031  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 161
HM467909  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 162
AB599973  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 125
AB536715  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 162
AB599958  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 164
AB599974  gtaat-ccaag---tccttggaatct-gcatta-tccccccc--aacacttggtatgtata--at 143
AB599962  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 114
AB599969  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 114
AB599968  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 114
AB599975  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacacttggtat-tata--at 135
AB599960  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 114
AB599959  ---t-ttcaa---tctt-gaaatct-gcatta-tccccccc--aacacttggtat-tata--at 116
AB599971  ---t-ttcaa---atacttgaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 117
AB599972  ---t-ttcaa---tccttgaaatct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 114
AB599970  ---t-ttcaa---tttct-gaaatcg-c--tta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 124
AB599965  taa---tccaa---tactt-gaaatct-gcattgtatccccccc--aacacttttat-tata--at 143
AB599967  ---t-ttcaa---tccttgcaaatcct-gcatta-tccccccc--aacactt-ttat-tata--at 122
AB599966  ggtgtatcaagtcctctgtaaaaatctggcattgattcccccccccaaacacttgctatgtata--at 160
AB599964  ccc-----atcttgaaatctgctgattccccccccaacactt-ttat-tata--at 133
AB599967  -----tcccatcccgaaatccc-gccttatccccccc--aacactt-ttat-tata--at 48
AB599957  -----gaaattcgactgata----ccccccacaac-----tctatatcata 81
AB599976  ---t-ttcaa---tcttgaaatct-gcattatccccccc--aacacttttatata----at 168
ccccaatcc-----cgaaatctc-gcattatccccccc--aacacttttat-tata--at 121
HQ154038  attcttgattgaatgttacattaccaccccccttttatttttccaaaacttttttttacacatacacac 169
AY114291  attcttgattgaatgttacattaccaccccccttttatttttccaaaacttttttttacacatacacac 170
L08734  -----acac 4

220      240      260      280
HQ154032  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154034  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154029  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154021  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154036  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154030  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154025  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154023  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154027  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154033  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154035  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154037  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HQ154031  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
HM467909  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 226
AB599973  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 189
AB536715  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 226
AB599958  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 228
AB599974  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 207
AB599962  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 178
AB599969  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 178
AB599968  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 178
AB599975  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 199
AB599960  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 178
AB599959  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 180
AB599971  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 178
AB599972  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 181
AB599970  acac-tatgaaact-g-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 187
AB599965  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 207
AB599961  acac-tatgaaacttgcaatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 187
AB599966  acac-tatgaaacttgtaatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 225
AB599964  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 196
AB599967  atacatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaa-caatggatctc-ttggct 112
AB599957  atacacatgaaacc-gaaatgatcatatataa--atgatac-taacttaggaacaatggatctccttggct 146
AB599976  acac-tatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaactttcaacaatcgatctc-ttggct 233
AB599963  acccctatgaaacttg-aatgatcatatataa--attatcataaacttttaacaatggatctc-ttggct 187
HQ154038  aagtttaaaagaatgtaaacaccacctttaattataaaa-taacttttaa-caatggatctc-taggt 236
AY114291  aagtttaaaagaatgtaaacaccacctttaattataaaa-taacttttaa-caatggatctc-taggt 237
L08734  aagtttaaaagaatgtaaacaccacctttaattataaaa-taacttttaa-caatggatctc-taggt 72

```

ภาพผนวกที่ 5 (ต่อ)

[illegible]

```

440                                     460                                     480
HQ154032 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154034 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154029 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154021 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154036 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154030 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154025 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154023 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154027 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aagatg 412
HQ154033 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154035 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154037 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HQ154031 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
HM467909 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 413
AB599973 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 376
AB536715 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 413
AB599958 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 415
AB599974 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 394
AB599962 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 365
AB599969 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 365
AB599968 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 365
AB599975 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 386
AB599960 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 365
AB599959 tcatgaaa--cccttctcattgattaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 368
AB599971 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 368
AB599972 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 366
AB599970 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 374
AB599965 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 395
AB599961 tcatgaaaaccccttctcatttattaaaattttatttcttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 391
AB599966 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 412
AB599964 tcatgaaa--cccttctcata--taaa--tttattt--caatat-ggatgt-gaatgt-gc-aaaaatg 375
AB599967 tcatgaaa--cccttctcatt-attaaa--tttattt-ttaatatggatgttgaaatgttgc-aaaaatg 299
AB599957 tcatgaaaaccccttctcc--attataaattctatttttataa-tggatgt-gaatgtgcgc-aaaaatg 336
AB599976 -tatgaaaaccccttctcatattataatca-----tttcaata-tggatgtc-aatgttgcaaatgaa 413
AB599963 tcatgaaa--cccttctcattattaaaa--tttattt-ttaatatggatgt-gaatgtcgcccaaatg 380
HQ154038 tcatgaaaaccccttcacaaaataaataattttattatgatttttggatgttgagtgctgctgtgtta 431
AY114291 tcatgaaaaccccttcacaaaataaataattttattatgatttttggatgttgagtgctgctgtgtta 432
L08734 tcatgaaaaccccttcacaaaataaataattttattatgatttttggatgttgagtgctgctgtgtta 267

500                                     520                                     540                                     560
HQ154032 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 480
HQ154034 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154029 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 478
HQ154021 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154036 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154030 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154025 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 480
HQ154023 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154027 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154033 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 478
HQ154035 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HQ154037 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 480
HQ154031 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 479
HM467909 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 481
AB599973 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac 443
AB536715 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 477
AB599958 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaac- - 481
AB599974 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaac tcc 462
AB599962 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaaggaacac tcc 432
AB599969 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc- 432
AB599968 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc 433
AB599975 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc 454
AB599960 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc- 430
AB599959 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc- 435
AB599971 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 432
AB599972 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc- 433
AB599970 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaac tcc- 441
AB599965 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaac- 461
AB599961 aagttcatttttgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 458
AB599966 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaaacccc- 479
AB599964 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 437
AB599967 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 361
AB599957 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 400
AB599976 tatagctctttatgcacagtatataggaaaaa- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 467
AB599963 aagttcattt-tgctcat-tttaaatgcaacaaagtataattcaggaaaagaaaaaaagggaa- - - 444
HQ154038 cacatagctcactttaaatgtataagtcactctctttatataagcaaaaagagaagagatggattga- - - 496
AY114291 cacatagctcactttaaatgtataagtcactctctttatataagcaaaaagagaagagatggattga- - - 497
L08734 cacatagctcactttaaatgtataagtcactctctttatataagcaaaaagagaagagatggattga- - - 332

```

ภาพผนวกที่ 5 (ต่อ)

580 600 620

HQ154032 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 539

HQ154034 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154029 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 537

HQ154021 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154036 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154030 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154025 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154023 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 539

HQ154027 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154033 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 537

HQ154035 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HQ154037 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 539

HQ154031 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 538

HM467909 aga--tggagtggtg-tgacttgatg-tgtaata---atgtttttaactgagatcacatt---gaggag 540

AB599973 aga--tgaatggat-tgacctgatg-tgttatt---atgtttttaactgaaatctcatt---gaagaa 502

AB536715 477

AB599958 481

AB599974 acaatgggaatggatagaactgatggtgttatataatgtttttaaccgagaataccattggagggaag 532

AB599962 432

AB599969 432

AB599968 433

AB599975 aaat-----gaatgaatgaactgaatgtttattatgttttaaccggaaatcccftgaaggaggaa 516

AB599960 430

AB599959 435

AB599971 432

AB599972 433

AB599970 441

AB599965 461

AB599961 458

AB599966 479

AB599964 437

AB599967 361

AB599957 400

AB599976 467

AB599963 444

HQ154038 cttgatgtgtaataattttttttca-----tcacattgaggaaagta 539

AY114291 cttgatgtgtaataattttttttca-----tcacattgaggaaagta 540

L08734 cttgatgtgtaataatttttttt-ca-----tcacattgaggaaagta 374

640 600

HQ154032 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 566

HQ154034 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154029 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 564

HQ154021 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154036 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154030 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154025 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154023 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 566

HQ154027 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154033 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 564

HQ154035 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HQ154037 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 566

HQ154031 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 565

HM467909 gaagttctt---ggagctttgccacttttc 567

AB599973 gaagttctt---ggaaccttgcccttttc 529

AB536715 477

AB599958 481

AB599974 gaagttccttgggaacctttgccccctttt 562

AB599962 432

AB599969 432

AB599968 433

AB599975 ttcctggaaccttgccacttttc 539

AB599960 430

AB599959 435

AB599971 432

AB599972 433

AB599970 441

AB599965 461

AB599961 458

AB599966 479

AB599964 437

AB599967 361

AB599957 400

AB599976 467

AB599963 444

HQ154038 gcaatacttgccatctttatatttttgt 569

AY114291 gcaatacttgccatctttatatttttgt 570

L08734 gcaatacttgccatctttatatttttgt 404

ภาพผนวกที่ 5 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวประณิศา พรหมศรี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 มีนาคม 2530
สถานที่เกิด	151/55 หมู่ที่ 8 ตำบลรอบเมือง อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จนครปฐม
ประสบการณ์การทำงาน	ผู้ช่วยสอนรายวิชาโรคพืชเบื้องต้น ปีการศึกษา 2553 ผู้ช่วยสอนรายวิชาคลินิกสุขภาพพืช ปีการศึกษา 2553-2554 ผู้ช่วยสอนรายวิชาหลักการควบคุมโรคพืช ปีการศึกษา 2554
การนำเสนอผลงาน/ การประชุมวิชาการ	1. Promsri, P., Janruang, P., Jumpathong, S. and Unartngam, J. 2011. Screening for Rust Disease Resistance Variety of Corn in Different Geographical Area. Interaction between Plant and Environment. 21-24, Qingdao, China. 2. Pranita Promsri and Jintana Unartngam. 2012. Development of Inoculation Techniques for Screening of Corn Rust Disease Resistance Varieties. The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012, Chiang Mai, Thailand. 3. ประณิศา พรหมศรี และ จินตนา อันอาดม้งาม, 2555. การพัฒนาวิธีคัดเลือกข้าวโพดพันธุ์ต้านทานโรครา สนิม. วารสารโรคพืช. ปีที่ 26 เล่ม 1-2.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุนบัณฑิตศึกษา ภาควิชาโรคพืช ปีการศึกษา 2553 - ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีการศึกษา 2555