การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช

Disease Survey and DNA Barcoding of Plant Pathogenic Rust Fungi

ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/]
อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/] สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง[3/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคราสนิม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 จากจังหวัด เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 22 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS ของราสนิม จำนวน 2 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบสัก และใบเบญจมาศ ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Olivea tectonae* และ *Puccinia horiana*

คำหลัก : ราสนิม rust fungi barcoding

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-04-60

คำนำ

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

ในประเทศไทย ราสนิมสามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นโรคราสนิมของข้าวโพด ที่เกิดจาก *Puccinia polysora* และ *Puccinia sorghi* (ชุติมันต์ และคณะ, 2547) โรคราสนิมของกาแฟ ที่เกิดจาก *Hemileia vastatrix* โรคราสนิมของอ้อย ที่เกิดจาก *Puccinia melanocephala* (เฉลิมพล และคณะ, 2547; ธนาคร และคณะ, 2526) โรคราสนิมของข้าวสาลี ที่เกิดจาก *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* โรคราสนิมของถั่วเหลือง ที่เกิดจาก *Phakopsora pachyrhizi* โรคราสนิมของถั่วลิสง ที่เกิดจาก *Puccinia arachidis* โรคราสนิมของถั่วฝักยาวที่เกิดจาก *Uromyces phaseoli varvignae* (วิจัย, 2551) ระหว่างปี 1980-1994 มีการสำรวจโรคราสนิมในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนประมาณ 64 สปีชีส์ จาก 17 วงศ์ โดยพบบนพืชจำนวน 66 สปีชีส์ (Giatgong, 1980; Gjaerum, 1995; Kakishima *et al.*, 1988; Lohsomboon *et al.*, 1986, 1988, 1992, 1994; Lorsuwan *et al.*, 1984; Ono *et al.*, 1988a,b) ซึ่งการจำแนกชนิดใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการสำรวจล่าสุดโดย Engkhaninum *et al.* (2005) รายงานพบราสนิมจำนวน 10 สปีชีย์ จาก 7 วงศ์ ได้แก่ *Crossospora fici Crossospora zizyphi Maravalia achroa Pileolaria shiraiana Puccinia cara Ravenelia japonica Sphaerophragmium clemensiae Uredo musae Uredo operculinae Uromyces commelinae* โดยเป็นรายงานการพบครั้งแรกบนพืชจำนวน 6 ชนิด

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทาง

สัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยราชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al.*, 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของเชื้อราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้มีสามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) ทำให้มีการค้นพบราสาเหตุโรคพืชใหม่หลายชนิด รวมถึงราสนิม อย่างไรก็ตาม การถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS ในราสนิมค่อนข้างยาก (Liu *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงมีการใช้ข้อมูลของพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นประกอบเพื่อจำแนกและแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ เช่น the Small Subunit (SSU) the Large Subunit (LSU) the Intergenic Spacer (IGS) Mitochondria cytochrome oxidase subunit 3 (CO3) และอื่นๆ (Aime, 2006; Beenken *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2010; Minnis *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2011)

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

ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืชโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

- อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block

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

- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

- สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ ได้แก่

- the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1F/ITS4B (Gardes and Bruns, 1993)

- the Large Subunit (LSU) Rust2inv (Aime, 2006)/ LR7 (Vilgalys and Hester, 1990) และ ทำ nested PCR ด้วย LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990)

- the Small Subunit (SSU) NS1 (White *et al.*, 1990)/Rust18SR (Aime, 2006)

- Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3) CO3_F1/CO3_R1 (Vialle *et al.*, 2009)

Sequence assemble programs เช่น Genious version 8.1.9

วิธีการ

1. รวบรวมและปรับปรุงข้อมูลลักษณะของราสนิมสาเหตุโรคพืช

รวบรวมข้อมูลสถานะของอนุกรมวิธานของราสนิมให้เป็นปัจจุบัน ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง การจัดจำแนกชนิดของ ราสนิม โดยใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล

2. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิม

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากโรคราสนิมวงศ์ Pucciniales จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย จ.พะเยา จ.ลำพูน จ.อุตรดิตถ์ ภาคกลาง จ.สุโขทัย จ.พิษณุโลก จ. สุพรรณบุรี จ.นครสวรรค์ จ.นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.นครราชสีมา จ.ขอนแก่น จ.สุรินทร์ จ.ศรีษะเกษ จ.อุดรธานี ภาคตะวันตก จ.ตาก จ.กาญจนบุรี จ.เพชรบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ.ราชบุรี ภาคใต้

จ.ชุมพร จ.สุราษฎร์ธานี จ.ตรัง จ.กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมสืบเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

4. จำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

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

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al*., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- **การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืช ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชรวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. วิเคราะห์ผล สรุปและเขียนรายงานความก้าวหน้า

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปลูกพืชในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคราสนิม (Figure 1) จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 22 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างมาทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายตำแหน่ง ITS ของราสนิม จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบสัก และใบเบญจมาศ ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Olivea tectonae* และ *Puccinia horiana* ซึ่งสาเหตุของโรคราสนิมสัก และเบญจมาศ ตามลำดับ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ราสนิมสัก

เชื้อราสาเหตุ

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

Synonymy:

≡*Chaconia tectonae* T.S. Ramakr. & K. Ramakr., Indian Phytopathology 2 (1): 19 (1949)

≡*Olivea neotectonae* Buriticá & Salazar-Yepes, Revista, Facultad Nacional de Agronomía Medellín: 3652 (2007)

≡*Olivea tectonae* (T.S. Ramakr. & K. Ramakr.) J.L. Mulder, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 365 (1973)

=*Tegillum neotectonae* (Buriticá & Salazar-Yepes) Doweld, Index Fungorum 36: 1 (2013)

=*Tegillum tectonae* (Racib.) Doweld: 1 (2013)

=*Uredo tectonae* Racib., Parasitische Algen und Pilze Java's 1: 28 (1900)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Chaconiaceae
Genus	*Olivea*
Species	*tectonae*

พืชและส่วนที่พบ ใบสัก (*Tectona grandis* L.)

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วใบ เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วใบ หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 2)

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

พืชอาศัย สัก (*T. grandis*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

CCCGAAGGTAAACCTCCTGACCCACATGTGACCTTGTAGTTGCTTCTGTTGATTCTGTCGGCGTCTGGACGGCC
GTCGCGCCGCCCGCGACCCGGAACCAGGCGGCCGCCTGGGACCAATATCAACTCTTTGTATCCACTAGTCTTC
TGATCAGCCGCACGGCACCAAGAAATGGATCAAAACTTTCCTTACAGAAGGGAGGGATCCGTGAATTGGAAAA
CGCAACGAACCGTGAAAAGTAAAGGGAATTGTGGAATTCTAGGAATCATGCAATCTTTGAATGTTCATTGCGCC
TGCCAGCATTTTGGCGGGGATGGCTGTTCGAGGGACATTTCAACCCTCGAGCTCCCCTTTGGAAGTCCGGGAG
TTGGGACCTGTAGACTTACCGTTTGTGAAACCATGGATTTGTGGCTGTGATTCATTTACCTCCGCGTAGAATCT

ATACACCGCATCGGAAACTCGGCGGGGCCACCCCGCAAAACCCCTTAATTTGGGAACATTTATCATTGAACAAG
AAAGATTACCCGCTGAACTTAATCATAACAATGTAACGGAAG

ราสนิมขาวเบญจมาศ

เชื้อราสาเหตุ

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

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	*Puccinia*
Species	*horiana*

พืชและส่วนที่พบ ใบเบญจมาศ (*Chrysanthemum*)

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วใบ เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วใบ หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 3)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปริออก ภายในบรรจุ urediniospores รูปร่างรีคล้ายไข่ สีเหลืองส้ม ขนาดประมาณ 18-28 × 14-22 µm ผนังเซลล์ของสปอร์ใสไม่มีสีหนาประมาณ 2 µm ไม่มี germ pore มักพบปนกับ telia teliospore มีสีเหลืองใส แบบ 2 เซลล์ มีระยางค์ตรงปลายยอด

พืชอาศัย เบญจมาศ (*Chrysanthemum*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTATTAAAAGAACTAGAGTGCAC
TTTATTGTGGCTTGACCCCTTTTAAATATATCACCCAAACTATTTTAACACTTGGATGCATGAATTTTTGAAAGG
TTCATTGCAATTGAGTATAAGTAACTTCTTTTTACTAAGAAATGTTACATTACCCCCCCCCCCCTTTATTTTTTA
CCCCCTTTTTTATTATATAACACAAGTTTAAATGAATGTAAAAAACCCTTTAATTATAAAATAACTTTTAACAAT
GGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAACC
CTCTCACAAAATAATTTTTGTTAATTATTTAGTGGATGTTGAGTGTTGCTGTCATTAGCTCACTTTAAATATATC
AGTCACTTTTTTTTTTTTTTCAAATAAGTTGGATTGACTTGGTGTAATAATTTTTTCATCAAGGAAAGTAGCAAT
ACTTGCCAGCTTTTGTTTTGAAAAAAAAAAAAGAAGACTTCTAAAAACCCAAAATTAATCTTTAAGACCTCAAATC
AGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAG

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทำการศึกษาเชื้อจากตัวอย่างแห้งต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างของพืชที่เกิดจากราสนิม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 จากจังหวัด เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 22 ตัวอย่าง สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง LSU และ ITS ของราสนิม จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบสัก และใบเบญจมาศ ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Olivea tectonae* และ *Puccinia horiana* ซึ่งสาเหตุของโรคราสนิมสักและเบญจมาศ อย่างไรควรเพิ่มตำแหน่งของยีนหรือดีเอ็นเอเป้าหมายของราทั้งสองไอโซเลท เพื่อข้อมูลที่แม่นยำ รวมถึงตัวอย่างอื่น ๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่างต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อู่วานิชย์ ณัฐกฤติ พิทักษ์ วัลลิภา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทรัมพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ. 147 หน้า

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวณศิลป์. 2547. *เอกสารวิชาการโรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด* พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ. 69 หน้า

ธนาคร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศินาฏ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ ฯ. 180 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

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

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

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

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

Cline, E.T., Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E. and E.B. McCray. 2013. *Fungal Nomenclature Database, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory.* ARS, USDA. http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/nomen/Nomenclature.cfm. Accessed March 2013.

Cräutlein, M., Korpelainen, H., Pietiläinen, M. and J. Rikkinen. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers Conserv* 20: 373-389.

Cummins, G.B. and Y. Hiratsuka. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. St. Paul, Minnesota: APS, Press.

Cunningham, G.H. 1931. *The Rust Fungi of New Zealand: together with the biology cytology and therapeutics of the Uredinales*. Dunedin, New Zealand: Printed privately by J. McIndos.

Dixon, L.J., Castlebury, L.A., Aime, C.A., Glynn, N.C. and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44:25-30.

Eckardt, N.A. 2006. Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 1-3.

Engkhaninun, J., Chatasiri, S., To-anun, C., Visarathanonth, N., Kakishima, M. and Y. Ono. 2005. New geographical distribution and host records of rust fungi from northern Thailand. *Mycoscience* 46: 137-142.

Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes–applicationtotheidentificationofmycorrhizaeand rusts. *Molecular Ecology* 2:113 –118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993. tb00005.x

Giatgong, P. 1980. Host index of plant diseases in Thailand, 2nd edn. Department of Agriculture, Ministry of Agricultural Cooperative,Thailand.

Gjaerum, H.B. 1995. Rust fungi from various countries. *Lidia* 3: 145–170.

Kakishima, M., Lohsomboon, P., Ono, Y., Manoch, L. and V. Niphon. 1988. *Newinia thaiana*, a new rust fungus from Thailand. *Mycologia* 80: 397-400.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of The Fungi*. Egham, UK: CABI Bioscience. 655 pp.

Kolmer, J.A., Ordonez, M.E. and J.V. Groth. 2001. The Rust Fungi. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.

Liu, K.L., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A. and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Apply Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.

Lohsomboon, P., Kakishima, M., Ono, Y., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988. Materials for the rust flora in Thailand III. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 29: 225-234.

Lohsomboon, P., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1992. The rust fungi of Thailand 1.on Graminicolous plants. *Kasetsart Journal: Natural Science* 26: 244-256.

Lohsomboon, P., Manoch, L., Visarathanonth, N., Kakishima, M., Ono, Y. and S. Sato. 1986. Materials for the rust flora in Thailand II. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 27: 271-281.

Lohsomboon, P., Kakishima, M. and Y. Ono. 1994. A monograph of *Sphaerophragmium* (Uredinales). *Mycological Research* 98: 907–919.

Lorsuwan, C., Tontyaporn, S., Virasathanonth, N., Manoch, L. and M. Kakishima. 1984. Materials for the rust flora in Thailand I. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 25: 57-65.

Minnis, A.M., McTaggart, A.R., Rossman, A.Y. and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.

Ono, Y. and M.C. Aime. 2006. Recent advances in rust systematics. *Mycoscience* 47: 111.

Ono, Y., Kakishima, M., Lohsomboon, P., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988a. Two new species of Uredinales from Thailand. *Mycologia* 80: 261–263.

Ono, Y., Kakishima, M., Lohsomboon, P., Sato, S., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988b. Two rust fungi with pseudosuprastomatal sori collected in Thailand. *Transaction British Mycolological Society* 91: 467–472.

Petersen, R.H. 1974. The Rust Fungus Life Cycle. *Botanical Review* 40:453-513.

Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.

Shivas, R.G. and K. D. Hyde. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. In *Biodiversity of tropical microfungi*, ed. KD Hyde:47-56. Hong Kong: Hong Kong University Press. Number of 47-56 pp.

Swann, E.C., Frieders, E.M. and D.J. McLaughlin. 2001. Urediniomycetes. In *The Mycota*, ed. DJ McLaughlin, EG McLaughlin, PA Lemke, 7B:37-55. Verlag, Berlin: Springer. Number of 37-55 pp.

Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M., Martin, F., Moncalvo, J. and R.C. Hamelin. 2009. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Molecular Ecology Resourses* 9:99–113

Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.

Webster, J. and Weber, W.S. 2007. *Introduction to fungi*. New York: Cambridge University Press.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. M Innis, D Gelfand, J Shinsky, T White:315-22: Academic Press. Number of 315-22 pp.

Yun, Y.H., Minnis, A.M., Kim, Y.H., Castlebury, L.A. and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommee'lla* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103:1451-1463.

Table 1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2017)

Host	Locations
หญ้าขน	บ้านห้วยหวาย ต.ลุ่มลำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ ต.ป่าตึง อ.แม่จัน จ.เชียงราย
	บ้านชุมชนป่าตึงริมกก อ.แม่จัน จ.เชียงราย บ้านท่าต้มปุย ต.อินทขิล อ.แม่แตง
ถั่วฝักยาว	จ.เชียงใหม่
หม่อน	บ้านแม่คำ ต.แม่คำ อ.แม่จัน จ.เชียงราย
	ต.แม่สูน อ.ฝาง จ.เชียงราย บ้านบางเนียน ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง
	จ.นครศรีธรรมราช
พุทธรักษา	บ้านดง ต.บ้านเป้า อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ บ้านทุ่ง อ.เขาคาม อ.เมือง จ.กระบี่
มะยม	ต.แม่สูน อ.ฝาง จ.เชียงราย
ข้าวโพด	บ้านห้วยพลับพลา ต.โป่งแพร่ อ.แม่ลาว บ้านเล่าฟู ต.ป่าตึง อ.แม่จัน จ.เชียงราย
	บ้านหัวเมืองงาม อ.ท่าตอน อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่
หญ้าแห้วหมู	บ้านทุ่ง อ.เขาคาม อ.เมือง จ.กระบี่
หญ้าปากควาย	บ้านทุ่ง อ.เขาคาม อ.เมือง จ.กระบี่
มะรุม	บ้านบางปอ ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
ลีลาวดี	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
พุทธรักษา	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
ถั่วลิสง	ต.ห้วยทรายเหนือ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
เบญจมาศ	ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

Figure 1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2017)

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

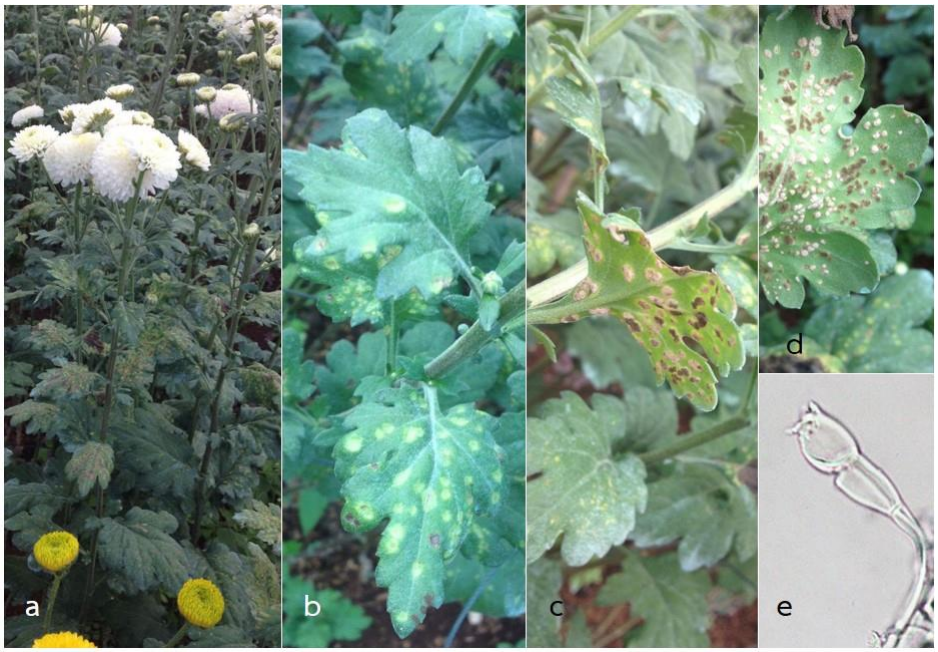

Figure 3 Rust disease symptom on *Chrysanthemum* (a-d) teliospore of *P. horiana* (e)