การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากอาการของโรคเมล็ดด่างในภาคเหนือตอนบน ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคบนกล้าข้าว

Molecular Technique Identification of *Bipolaris* spp. from Rice Seed Discoloration Disease in the Upper North of Thailand and Its Relationship to Pathogenic on Rice Seedlings

อัญชลี ตาคำ[1)] กุลชนา ดาร์เวล[2)] วันพร เข็มมุกด์[3)] ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม[2)] ทองมา มานะกุล[1)] กันติศา โมตาลี[1)]

Anchalee Takham[1)] Kulchana Darwell[2)] Wanporn Khemmuk[3)] Piyaphan Seekhum[2)]

Thongma Manakul[1)] Kantisa Motalee[1)]

Abstract

The genus *Bipolaris* is a diverse fungal group which caused seed discoloration on rice and can be seed transmitted. This research aimed to identify *Bipolaris* spp. from infected seeds that were collected in the upper north of Thailand using molecular technique and studied pathogenicity of these fungi on rice seedlings. It was found that morphological characters can classify into three groups; dark grey mycelium, greyish with white margin mycelium and fluffy greyish mycelium. The combined analysis of internal transcribed spacer (ITS) and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* were used to reconstruct the molecular phylogeny of this study. Three species were confirmed; the first group with dark grey mycelium was closely related to *Bipolaris maydis*, the second group with grey mycelium and white margin was clustered in *Bipolaris bicolor* clade. The other species with fluffy grey mycelium was grouped into *Bipolaris oryzae*. Inoculation tests on rice seedlings showed that these three species can infect plants. However, the symptoms of each species showed different spots on leaves of rice seedlings.

Keywords: rice, *Bipolaris* spp., seed discoloration disease, fungal identification, molecular technique, upper north

บทคัดย่อ

เชื้อราในสกุล *Bipolaris* เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลาย และเป็นหนึ่งในเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว ที่สามารถถ่ายทอดโรคในแปลงนาข้าวในฤดูถัดไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่ติดมากับเมล็ดข้าวที่แสดงอาการของโรคเมล็ดด่างในภาคเหนือตอนบนด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราแต่ละชนิดบนกล้าข้าว พบว่า การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถจำแนกเชื้อราได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) เส้นใยสีเทาดำ 2) เส้นใยสีเทาขอบขาว เจริญเป็นวงซ้อนกันหลายชั้น และ 3) เส้นใยสีเทาฟู เจริญซ้อนกันหลายชั้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม ในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) และ *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม สอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ กลุ่มที่มีเส้นใยสีเทาดำมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *Bipolaris maydis* กลุ่มที่มีเส้นใยสีเทาขอบขาว เจริญเป็นวงซ้อนกันหลายชั้น มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *Bipolaris bicolor* และกลุ่มที่มีเส้นใยสีเทาฟู เจริญซ้อนกันหลายชั้นมีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *Bipolaris oryzae* และพบว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถก่อให้เกิดลักษณะอาการที่แตกต่างกันบนใบข้าวระยะกล้า

คำสำคัญ: ข้าว *Bipolaris* spp. โรคเมล็ดด่าง การจำแนกเชื้อรา เทคนิคชีวโมเลกุล ภาคเหนือตอนบน

[1)] ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ 50120 โทรศัพท์ 0-5331-1033
Chiang Mai Rice Research Center, Sanpatong, Chiang Mai 50120 Tel. 0-5331-1033

[2)] ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ อ.เมือง จ.แพร่ 54000 โทรศัพท์ 0-5464-6034
Phrae Rice Research Center, Mueang, Phrae 54000 Tel. 0-5464-6034

[3)] กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2561-4741
Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchark, Bangkok 10900 Tel. 0-2561-4741

คำนำ

โรคเมล็ดด่างเป็นโรคสำคัญที่ทำให้ผลผลิตข้าวเสียหาย โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายไปกับลม ติดไปกับเมล็ด และสามารถทำให้เกิดโรคในฤดูถัดไปได้ หนึ่งในเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดและสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Bipolaris* นฤนาท และชาติชาย (2539) รายงานว่า เชื้อรา *B. oryzae* ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวและมักพบมากที่สุดชนิดหนึ่ง และสามารถถ่ายทอดเชื้อจากเมล็ดที่ติดเชื้อสู่ต้นกล้า (Vu and Sangchote, 2006) ทำให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลและโรคเมล็ดด่างในฤดูถัดไปได้

การจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของการเจริญเติบโต สีของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรูปร่างลักษณะของสปอร์อาจไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจน ปัจจุบัน การจำแนกเชื้อราด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลถูกนำมาใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดของเชื้อราให้มีความแม่นยำมากขึ้น (พรพิมล และคณะ, 2556; Motlagh and Kaviani, 2008) เมื่อทราบสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุโรคแล้วจะนำไปสู่การจัดการโรคเมล็ดด่างที่มีประสิทธิภาพต่อไป โดยการจัดการโรคที่เกษตรกรนิยมใช้มากที่สุด ได้แก่ การใช้สารเคมี ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการต้านทานของเชื้อสาเหตุโรค เนื่องจากการใช้สารเคมีไม่ถูกหลักวิชาการ และเพื่อลดการใช้สารเคมีในนาข้าว หนึ่งในวิธีการจัดการโรคที่เหมาะสม ได้แก่ การใช้พันธุ์ต้านทานโรค (อัญชลี และคณะ, 2560)

ในประเทศไทย ศิริรัตน์ (2550) ได้จำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *B. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในพื้นที่เพาะปลูกข้าวนาปรัง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล PCR-RFLP พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม และใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมและจัดการโรคใบจุดสีน้ำตาลในนาข้าวอย่างยั่งยืน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Bipolaris* ที่ติดมากับเมล็ดข้าวที่แสดงอาการของโรคเมล็ดด่าง จากการเก็บตัวอย่างในภาคเหนือตอนบน ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคชีวโมเลกุล เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่เป็นสาเหตุหลักหรือพบติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวมากที่สุด เพื่อนำไปใช้ทดสอบปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และการหาวิธีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เพื่อลดความเสียหายของผลผลิตข้าวและการระบาดของโรคข้าวในฤดูถัดไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่แยกได้จากอาการของโรคเมล็ดด่าง

แยกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการของโรคเมล็ดด่าง ที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดแพร่ น่าน อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน ลำปาง และแม่ฮ่องสอน ในฤดูนาปี 2559 จำนวน 614 ตัวอย่าง (อัญชลี และคณะ, 2560) ด้วยวิธีเพาะเชื้อบนกระดาษชื้น (blotter method) บ่มไว้เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) โดยใช้เข็มเขี่ยสปอร์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบ 3 มิติ (stereo microscope) ย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7 วัน จากนั้นคัดเลือกตัวแทนของเชื้อราจากลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 22 ไอโซเลท จากทั้งหมด 412 ไอโซเลท นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น บันทึกลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นใย บันทึกภาพ และลักษณะสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope)

2. การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่แยกได้จากอาการของโรคเมล็ดด่างด้วยลักษณะทางพันธุกรรม

นำตัวแทนเชื้อรา *Bipolaris* spp. จำนวน 22 ไอโซเลท จากที่แยกได้ทั้งหมด 412 ไอโซเลท ที่มีความแตกต่างของลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ลักษณะ มาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) และ *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง มีขั้นตอน ดังนี้

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี cetyl trimethylammonium bromide (CTAB method) ดัดแปลงจากวิธีการของศิริรัตน์ (2550) โดยการนำเส้นใยเชื้อรามาบดด้วย

Table 1 Primer sequences used in this study

Locus	Primer	Annealing temperature (°C)	Sequence (5'-3')	Reference
ITS	ITS1	58.2	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White *et al.* (1990)
	ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
GAPDH	GPD1	55.3	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Deng *et al.* (2015)
	GPD2		GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	

ITS = internal transcribed spacer, *GAPDH* = *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

ไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที สกัดแยกดีเอ็นเอจำนวน 3 ครั้ง ด้วย phenol:chloroform อัตราส่วน 1:1 และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำให้บริสุทธิ์ด้วย chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่แล้วเติม RNase 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 0.1 volume ของ 3 M sodium acetate และ 2.5 volume ของ isopropanol ที่แช่เย็น จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% แอลกอฮอล์ 50-100 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS และ GAPDH

นำดีเอ็นเอเชื้อรา *Bipolaris* spp. มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS และ *GAPDH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง ITS และยีน *GAPDH* (Table 1) โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer (10x) 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 1.2 ไมโครลิตร dNTPs (10 mM) 0.6 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 0.08 ไมโครลิตร forward primer (10 mM) 0.6 ไมโครลิตร reverse primer (10 mM) 0.6 ไมโครลิตร DNA template 1 ไมโครลิตร และ dH_2O 11.92 ไมโครลิตร โดยดัดแปลงขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่ขั้นตอนที่ 2 ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1) denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 2) annealing ที่อุณหภูมิ 58.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สำหรับตำแหน่งของ ITS และที่อุณหภูมิ 55.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สำหรับตำแหน่งของยีน *GAPDH* ขั้นตอนที่ 3) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1-3 จำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR product มาแยกขนาดดีเอ็นเอใน 1.5% agarose gel electrophoresis และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ด้วยวิธี Sanger sequencing ที่บริษัท Macrogen Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้

2.3 การวิเคราะห์ phylogenetic analysis

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตำแหน่งมาทำ consensus sequence โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime (Biomatters Ltd.) จากนั้นทำ alignment ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) และ MEGA5 software package (Kumar *et al.*, 2002) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v.7.2.6 โดยใช้ GTRGAMMA เป็น model of evolution (Stamatakis, 2006) กำหนด command -f a เพื่อวิเคราะห์แบบ rapid bootstrap โดยใช้ random starting tree และ 1,000 maximum likelihood bootstrap replicates จำนวน 4

ครั้ง เพื่อยืนยันความสอดคล้องของ phylogenetic tree ศึกษาความสัมพันธ์หรือความหลากหลาย phylogenetic tree ที่ได้ด้วยโปรแกรม FigTree (Morariu *et al.*, 2008)

3. การศึกษาความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *B. oryzae, B. bicolor* และ *B. maydis*

นำตัวแทนของเชื้อราชนิดละ 1 ไอโซเลท ได้แก่ *B. oryzae* (BPY37), *B. bicolor* (BPY11) และ *B. maydis* (BU01) ที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนต้นกล้าข้าว โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร rabbit food agar (RFA) เป็นเวลา 5 วัน กระตุ้นการสร้างสปอร์โดยการขูดเส้นใยบนผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล นำไปบ่มไว้ใต้แสง near UV สลับที่มืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ความเข้มข้น $5x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นลงบนข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล อายุข้าว 21 วัน ปลูกโดยการโรยเมล็ดข้าวลงในกล่องพลาสติกขนาด กว้าง 12 เซนติเมตร ยาว 17 เซนติเมตร

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 4 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการพ่นเชื้อรา 3 ชนิด กับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บันทึกผล โดยให้คะแนนการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลตามมาตรฐานของ Standard Evaluation System for Rice (SES) (IRRI, 2014) หลังจากปลูกเชื้อ 7 และ 14 วัน จากนั้นนำแผลที่แสดงอาการไปแยกเชื้อกลับด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บันทึกลักษณะสีเส้นใย ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสี รูปร่าง และขนาดของสปอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่แยกได้จากอาการของโรคเมล็ดด่าง

การนำเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 412 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า เชื้อรามีลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA แตกต่างกัน 3 ลักษณะ ได้แก่ 1) เส้นใยสีเทาเข้มถึงดำ ปลายเส้นใยตรงกลางโคโลนีมีสีเทาฟูเล็กน้อย (ร้อยละ 0.73 ของเชื้อทั้งหมด) 2) เส้นใยสีเทา ขอบสีขาว ลักษณะเส้นใยเจริญเป็นวงซ้อนกันหลายชั้น (ร้อยละ 44.67 ของเชื้อทั้งหมด) และ 3) เส้นใยสีเทาฟู ขอบหยัก เจริญทับซ้อนกันคล้าย

Table 2 Colony characteristics of 22 isolates of *Bipolaris* spp. on PDA

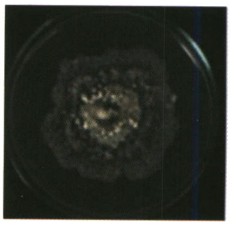
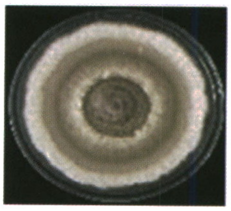
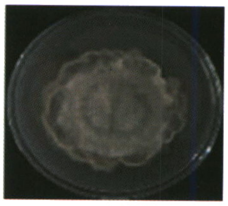
Group	Isolate in groups	Colony diameter (cm)	Mycelium on PDA	Spore (400x)
1	BU01	7-8		
2	BC48, BN41, BN43, BN69, BN84, BN86, BP20, BP21, BPY05, BPY11	5-9		
3	BN18, BL34, BL40 BPY37, BPY38, BPY39, BC01, BC41, BC43, BC44, BC53	6-9		

Table 3 Sizes of spore of *Bipolaris* spp. in this study

Isolate	Length (µm)	Width (µm)	No. of pseudoseptate
B. oryzae	47.74-70.77	17.06-31.14	5-9
B. bicolor	33.91-64.91	13.98-22.86	4-6
B. maydis	58.15-105.40	15.46-22.54	6-10

ดอกไม้ (ร้อยละ 54.37 ของเชื้อทั้งหมด) จากนั้นสุ่มตัวอย่างเชื้อราแต่ละลักษณะตามเปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อจากแต่ละสถานที่ โดยสุ่มลักษณะที่ 1 จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ BU01 ลักษณะที่ 2 จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ BC48, BN41, BN43, BN69, BN84, BN86, BP20, BP21, BPY05 และ BPY11 และลักษณะที่ 3 จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ BN18, BL34, BL40, BPY37, BPY38, BPY39, BC01, BC41, BC43, BC44 และ BC53

การศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายรวม 400 เท่า โดยการสุ่มนับสปอร์จำนวน 30 สปอร์ต่อไอโซเลท พบว่า เชื้อรามีลักษณะสปอร์ที่คล้ายกันและมีลักษณะเฉพาะของเชื้อราในสกุล *Bipolaris* คือ มีรูปร่างกระสวย (fusoid) หรือโค้ง และพบว่าแต่ละไอโซเลทมีความกว้าง ความยาว และจำนวน pseudoseptate ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1) ลักษณะเส้นใยสีเทาเข้มถึงดำ ปลายเส้นใยตรงกลางโคโลนีมีสีเทาฟูเล็กน้อย สปอร์ยาว 58.15-105.40 ไมครอน กว้าง 15.46-22.54 ไมครอน และมี 6-10 pseudoseptate 2) เส้นใยสีเทา ขอบสีขาว ลักษณะเส้นใยเจริญเป็นวงซ้อนกันหลายชั้น สปอร์ยาว 33.91-64.91 ไมครอน กว้าง 13.98-22.86 ไมครอน และมี 4-6 pseudoseptate และ 3) เส้นใยสีเทาฟู ขอบหยัก เจริญทับซ้อนกันคล้ายดอกไม้ สปอร์ยาว 47.74-70.77 ไมครอน กว้าง 17.06-31.14 ไมครอน และมี 5-9 pseudoseptate (Table 2 และ 3)

ลักษณะสัณฐานวิทยาที่บันทึก ได้แก่ ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สี รูปร่าง และขนาดของสปอร์ รวมถึงรูปภาพตัวอย่าง พบว่า สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่บันทึกในบัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพ รา (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2555) ดังนี้ ลักษณะที่ 1 มีความใกล้เคียงกับ *B. maydis* ลักษณะที่ 2 มีความใกล้เคียงกับ *B. bicolor* และลักษณะที่ 3 มีความใกล้เคียงกับ *B. oryzae*

2. การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่แยกได้จากอาการของโรคเมล็ดด่างด้วยลักษณะทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Bipolaris* spp. โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณ ITS และยีน *GAPDH* ขนาด 587 และ 445 คู่เบส ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสปีชีส์ต้นแบบ (type species) ในสกุล *Bipolaris* 16 สปีชีส์ และใช้เชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสปีชีส์เปรียบเทียบนอกกลุ่ม (outgroup) พบว่า เชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่ใช้ทดสอบจำนวน 22 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกได้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. oryzae, B. bicolor* และ *B. maydis* (Fig. 1) โดยพบว่าเชื้อรา *B. oryzae* เป็นสปีชีส์ที่พบได้มากที่สุด (50%) ประกอบด้วย BN18, BL34, BL40, BPY37, BPY38, BPY39, BC01, BC41, BC43, BC44 และ BC53 รองลงมา คือ *B. bicolor* (45%) ประกอบด้วย BC48, BN41, BN43, BN69, BN84, BN86, BP20, BP21, BPY05 และ BPY11 และ *B. maydis* (5%) พบไอโซเลทเดียว คือ BU01 ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มเชื้อราตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นจากข้อ 1

จากข้อมูลใน Table 2 และ 3 คือ 1) กลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีเทาเข้มถึงดำ ปลายเส้นใยตรงกลางโคโลนีมีสีเทาฟูเล็กน้อย ได้แก่ BU01 จำแนกเป็นเชื้อรา *B. maydis* 2) กลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีเทา ขอบสีขาว ลักษณะเส้นใยเจริญเป็นวงซ้อนกันหลายชั้น ได้แก่ BC48, BN41, BN43, BN69, BN84, BN86, BP20, BP21, BPY05 และ BPY11 จำแนกเป็นเชื้อรา *B. bicolor* และ 3) กลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีเทาฟู ขอบหยัก เจริญทับซ้อนกับคล้ายดอกไม้ ได้แก่ BN18, BL34, BL40, BPY37, BPY38, BPY39, BC01, BC41, BC43, BC44 และ BC53 จำแนกเป็นเชื้อรา *B. oryzae* (สำนักงาน

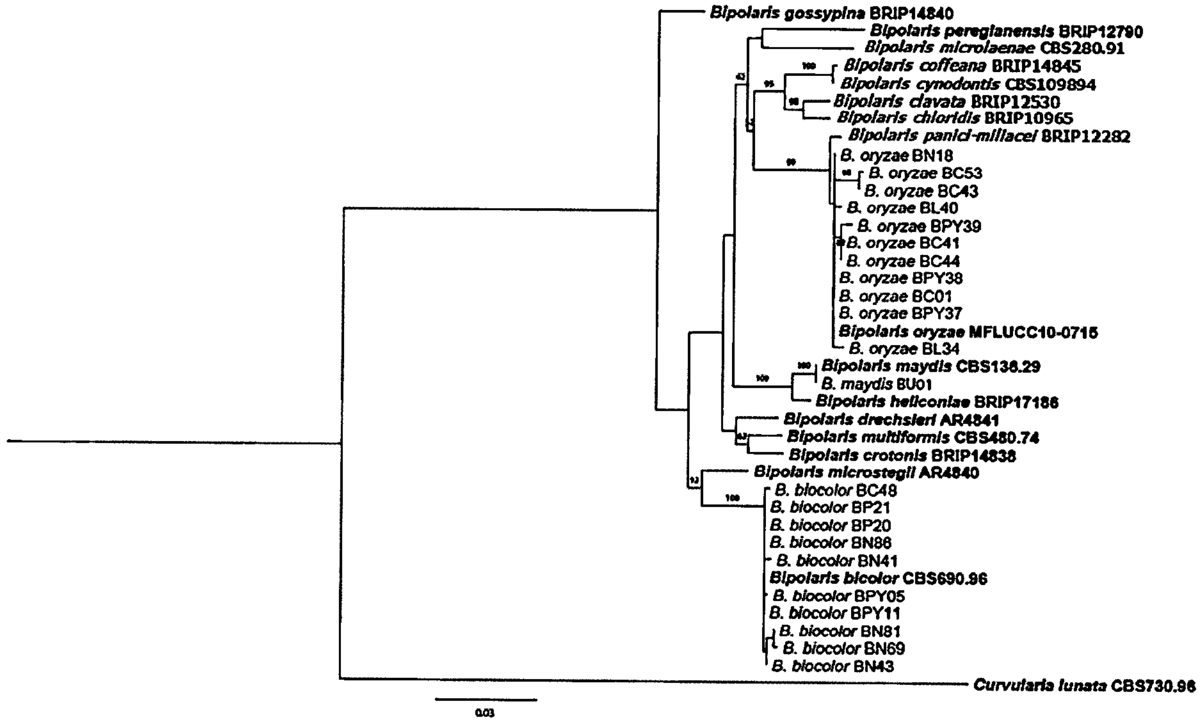


Fig. 1 Phylogeny relationship of 22 isolates of *Bipolaris* spp. from the maximum likelihood analysis of the combined dataset of ITS and *GAPDH*. Bootstrap support (≥70%) values from 1,000 replicates are shown above nodes. Type species or ex-type species are in bold.

พัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2555)

จากผลการทดลองพบว่า การจำแนกเชื้อราจากลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับการจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ช่วยให้การระบุสปีชีส์มีความแม่นยำ เพื่อให้ได้ข้อมูลชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากอาการของโรคเมล็ดด่างที่สำคัญ และนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคต่อไป

3. ความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *B. oryzae*, *B. bicolor* และ *B. maydis*

จากการนำเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์ ที่จำแนกได้จากการทดลองที่ 2 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นกล้าข้าว โดยวิธีพ่นสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น $5x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บนข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 อายุ 21 วัน พบว่า เชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้เกิดลักษณะอาการใบจุดได้ หลังการปลูกเชื้อ 7-14 วัน บนใบข้าวในระยะต้นกล้า สอดคล้องกับรายงานของสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) (2555) ดังนี้

เชื้อรา *B. oryzae* พบว่า เป็นสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลและโรคเมล็ดด่างในข้าว เมื่อนำมาปลูกเชื้อบนใบข้าว ทำให้ข้าวเกิดลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลขอบเหลืองชัดเจนกระจายบนใบ ที่ระดับความรุนแรง 3-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 80 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นข้าวทดสอบ เช่นเดียวกับศิริรัตน์ (2550) ที่รายงานว่า การก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *B. oryzae* เป็นแบบ biotrophic คือ ก่อให้เกิดโรค โดยทำให้เกิดอาการจุด สีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลถูกล้อมรอบด้วยบริเวณสีเหลือง รูปร่างของแผลเป็นรูปไข่ หรือจุดกลมรี

เชื้อรา *B. bicolor* มีรายงานพบในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด วัชพืช และในดิน สามารถสร้างสารพิษที่มีผลยับยั้งการเจริญของรากข้าวและข้าวฟ่างได้ เมื่อนำมาปลูกเชื้อบนใบข้าว พบว่า ทำให้ข้าวเกิดลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ที่ระดับความรุนแรง 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33-40 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นข้าวทดสอบ

เชื้อรา *B. maydis* มีรายงานการระบาดในข้าวโพด เมื่อนำมาปลูกเชื้อบนใบข้าว พบว่า ทำให้ข้าวเกิดลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกระจายบนใบ ที่ระดับความรุนแรง 10-15 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นข้าวทดสอบ (Table

Table 4 Disease incidence and severity of brown spot disease on Phitsanulok 2 at 7 and 14 days after inoculation

Pathogen	7 days after Inoculation		14 days after Inoculation		Symptom
	Severity (%)*	Incidence (%)*	Severity (%)*	Incidence (%)*	
B. oryzae	3-15	80	5-25	80	Brown spot with yellow margin
B. bicolor	1-5	33.33	1-5	40	Small brown spot
B. maydis	10-15	10	10-15	10	Small brown spot

*Standard Evaluation System for Rice (SES) (IRRI, 2014)

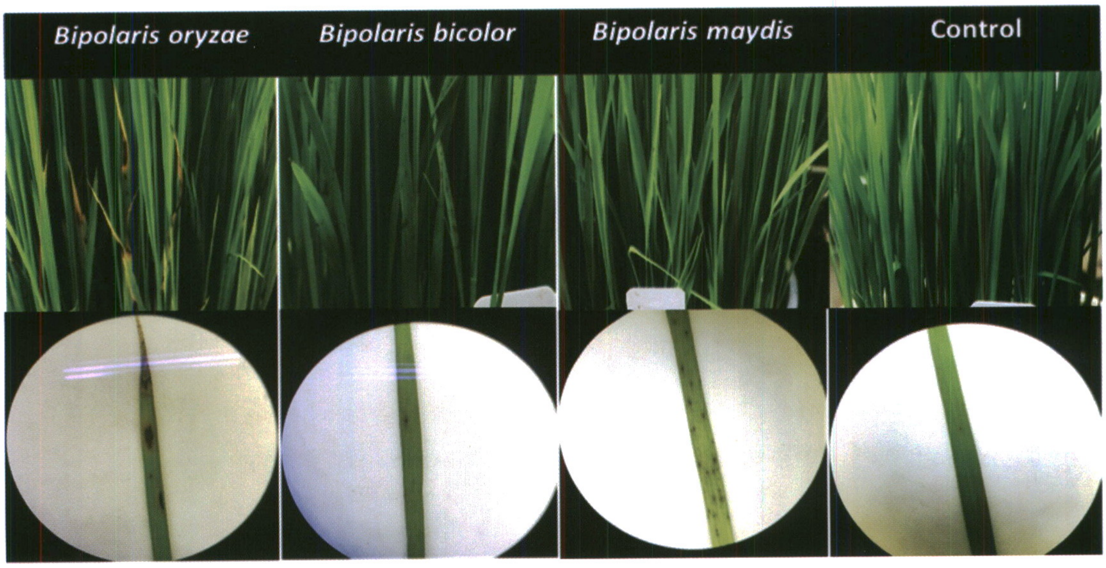


Fig. 2 Symptoms of brown spot disease inoculated with *B. oryzae, B. bicolor* and *B. maydis* on Phitsanulok 2 at 14 days after inoculation

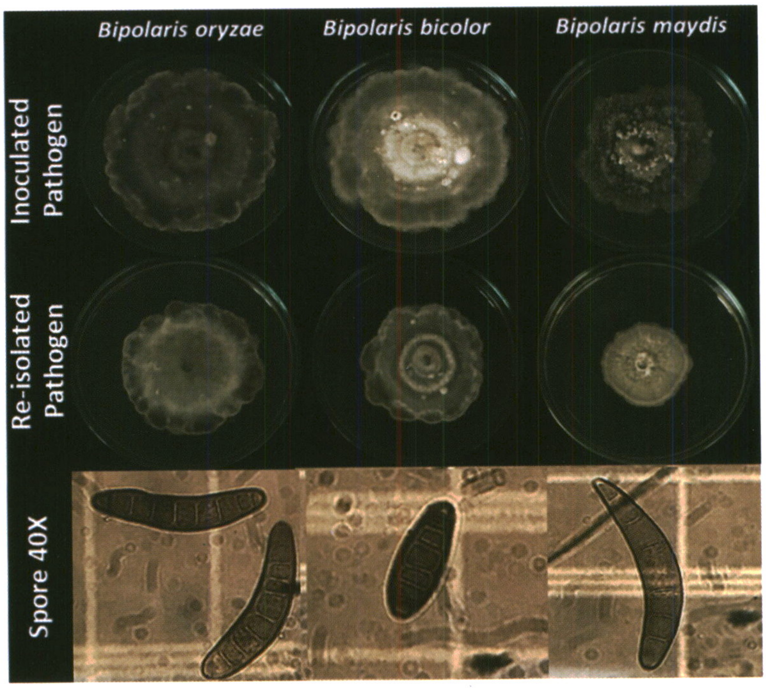


Fig. 3 Colonies and spores of *Bipolaris* spp. on PDA used in the inoculation test and spores under compound microscope at 400x

4 และ Fig. 2)

จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค พบว่า *B. oryzae* สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุดเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว จึงควรใช้ *B. oryzae* เป็นหลัก สอดคล้องกับ Motlagh และ Kaviani (2008) ที่รายงานว่า เชื้อรา *B. oryzae* เป็นสปีชีส์หลักที่พบก่อโรคในข้าว

นอกจากนี้ เชื้อราแต่ละสปีชีส์สามารถทำให้เกิดลักษณะอาการแตกต่างกัน ดังนี้ เชื้อรา *B. oryzae* ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลขอบเหลือง ส่วนเชื้อรา *B. bicolor* และ *B. maydis* ทำให้เกิดลักษณะอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก โดยสามารถสังเกตการเกิดแผลได้เร็วกว่า *B. oryzae* สอดคล้องกับรายงานของ Motlagh และ Kaviani (2008) ที่ปลูกเชื้อรา *B. oryzae* และ *B. bicolor* พบว่า *B. bicolor* ทำให้ใบข้าวแสดงอาการเริ่มแรก คือ แผลจุดบนใบหลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน ส่วน *B. oryzae* ทำให้ใบข้าวแสดงอาการเริ่มแรกคือ แผลจุดบนใบหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน จากนั้นนำแผลดังกล่าวไปแยกเชื้อกลับด้วยวิธี tissue transplanting พบว่า สามารถพบเชื้อราที่แยกได้ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อราที่ใช้ปลูกเชื้อลงบนใบข้าว (Fig. 3)

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกเชื้อราที่ติดมากับอาการของโรคเมล็ดด่างในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรม สามารถจำแนกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. oryzae, B. bicolor* และ *B. maydis* เมื่อนำเชื้อรามาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยการปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 อายุ 21 วัน พบว่าเชื้อราทั้ง 3 สปีชีส์สามารถก่อให้เกิดโรคบนต้นกล้าข้าวได้ และเมื่อทราบข้อมูลชนิดของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าว ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคในนาข้าวในฤดูถัดไป สามารถนำมาเป็นข้อมูลเพื่อหาวิธีการจัดการโรคข้าวที่เหมาะสมต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้บังคับบัญชา และคณะทำงานโครงการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* และ *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างและการพัฒนาวิธีการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานของข้าวต่อเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดด่างทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในการดำเนินงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นฤนาท จันทรมงคล และชาติชาย ชุมสาย ณ อยุธยา. 2539. เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวและคุณภาพบางประการของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรจังหวัดเชียงรายให้ทำพันธุ์. สืบค้นจาก: http://www.phtnet.org/research/view-abstract.asp?research_id=ag 101. (19 กรกฎาคม 2562)

พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และชนินทร ดวงสะอาด. 2556. การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม. หน้า 2055-2063. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2550. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* และความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลในพื้นที่ปลูกข้าวนาปรัง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา. สืบค้นจาก: http://asi.aru.ac.th/wp-content/uploads/2016/09/Sirirat_Report.pdf. (13 กันยายน 2562)

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพ รา. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 760 หน้า.

อัญชลี ตาคำ, กุลชนา เกสสุวรรณ์, พันนิภา ยาใจ, ปิยะวรรณ ใยดี, ผกากานต์ ทองสมบุญ, พิชชาทร เรืองเดช, นุจรินทร์ จังขันธ์, สุมาลี จิตรคำ, จารุวี อันเซตา, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และรัศมี ฐิติเกียรติพงศ์. 2560. การสำรวจการระบาดของโรคเมล็ดด่างของข้าว ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุและประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในเขตภาคเหนือตอนบน. หน้า 196-210. *ใน:* รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ประจำปี 2560. 28-30 มีนาคม 2560, โรงแรมดิอิมเพรส น่าน, จังหวัดน่าน.

Deng, H., Y.P. Tan, R.G. Shivas and Y.C. Niu. 2015. *Curvularia tsudae* comb. nov. et nom. nov.,

formerly *Pseudocochliobolus australiensis*, and a revised synonymy for *Curvularia australiensis*. Mycoscience 56(1): 24-28.

IRRI. 2014. Standard Evaluation System for Rice (SES). 5th ed. International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila 130, Philippines. 57 p.

Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Briefings in Bioinformatics 9(4): 286-298.

Kumar, J., P. Schäfer, R. Hückelhoven, G. Langen, H. Baltruschat, E. Stein, S. Nagarajan and K.H. Kogel. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Molecular Plant Pathology 3: 185-195.

Morariu V.I., B.V. Srinivasan, V.C. Raykar, R. Duraiswami and L.S. Davis. 2008. Automatic online tuning for fast Gaussian summation. Advances in Neural Information Processing Systems (NIPS). Available source: https://papers.nips.cc/paper/3420-automatic-online-tuning-for-fast-gaussian-summation. (August 20, 2019)

Motlagh, S. and B. Kaviani. 2008. Characterization of new *Bipolaris* spp.: the causal agent of rice brown spot disease in the north of Iran. International Journal of Agriculture and Biology 10(6): 638-642.

Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22(21): 2688-2690.

Vu, V.B. and S. Sangchote. 2006. Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the causal pathogen of brown spot of rice. Kasetsart Journal: Natural Science 40: 353 - 360.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. 482 p.