# ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวด้วยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS rDNA และเครื่องหมาย ISSR

# Genetic Relationships of *Curvularia lunata* Races Causing Rice Dirty Panicle by ITS rDNA Sequence Analysis and ISSR Markers

ทิภาพร นวลเนตร[1/] ศิริพร ดอนเหนือ[1/] ศิริพร กออินทร์ศักดิ์[2/] จินตนา อันอาตม์งาม[1/]

Thiphaphorn Naunnet[1/] Siriporn Donnua[1/] Siriporn Korinsak[2/] Jintana Unartngam[1/]

## ABSTRACT

The rice dirty panicle disease is the main problem for rice production in Thailand. Rice dirty panicle is caused by six fungal pathogens of which *Curvularia lunata* was established to be the major pathogen in previous research. The purpose of this study was to examine the genetic relationships of *C. lunata* in Thailand using ITS rDNA sequence analysis and ISSR markers. The results revealed that *C. lunata* was grouped with *C. lunata* from the NCBI database with a 100% bootstrap support. The genetic data of 40 isolates of *C. lunata* were variable and diversity was detected within and among populations by ISSR markers. Multiple ISSR band proles can be observed throughout Thailand and there are more than one band prole distributed in any given geographical location. However, certain band proles are observed in only some geographical areas. These results support genotypic flow in *C. lunata* which is genetically diverse and distributed in different geographical areas in the country.

**Key words:** rice, dirty panicle disease, *Curvularia lunata*, ITS rDNA, DNA markers

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1/] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2/] ห้องปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2/] Rice Gene Discovery Laboratory, BIOTEC, NSTDA, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

## บทคัดย่อ

โรคเมล็ดด่างข้าว (rice dirty panicle) เป็นปัญหาสำคัญของการปลูกข้าวในประเทศไทย โดยมีเชื้อราสาเหตุ 6 ชนิด โดยเชื้อราสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง *Curvularia lunata* การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA และเครื่องหมาย ISSR จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA พบว่า เชื้อรา *C. lunata* จัดกลุ่มอยู่ร่วมกับเชื้อรา *C. lunata* จากฐานข้อมูล NCBI โดยมีค่าความน่าเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มที่ 100% และข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 40 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่า แบบแผนดีเอ็นเอมีความผันแปรทั้งภายในประชากร และระหว่างประชากร แบบแผนดีเอ็นเอมีการกระจายตัวในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ในบางพื้นที่พบแบบแผนดีเอ็นเอมากกว่า 1 และมีบางแบบแผนดีเอ็นเอ พบเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ผลการทดลองนี้สนับสนุนการเกิดการเคลื่อนย้ายจีโนไทป์ ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม และการเคลื่อนย้ายของเชื้อรา *C. lunata* ในภูมิภาคที่แตกต่างกันของประเทศไทย



**คำสำคัญ:** ข้าว โรคเมล็ดด่าง *Curvularia lunata* ITS rDNA เครื่องหมายดีเอ็นเอ


## บทนำ

โรคเมล็ดด่างข้าว (rice dirty panicle) เป็นโรคที่สำคัญ เนื่องจากส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวของประเทศไทย ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ซึ่งมีรายงานเชื้อราสาเหตุ 6 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata*, *Cercospora oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium incarnatum*, *Trichoconis padwickii* และ *Sarocladium oryzae* จากข้อมูลการสำรวจ โรคเมล็ดด่างข้าวในพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2557-2560 และตรวจสอบเชื้อราบนเมล็ดด้วยวิธี blotter พบ เชื้อรา *F. incarnatum* 9.30% เชื้อรา *B. oryzae* 9.40% และเชื้อรา *C. lunata* ที่พบมากที่สุดถึง 43.43% ซึ่งการสำรวจนี้ พบว่า โรคเมล็ดด่างของข้าวในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงและการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน และมีการจำแนกสายพันธุ์ (physiological race) ของเชื้อรา *C. lunata* บนข้าวพันธุ์ทดสอบจำนวน 15 พันธุ์ สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่ม (กวินธรรพ์, 2559) นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. lunata* ด้วย เครื่องหมาย AFLP (Vos and Kuiper, 1997) พบว่า เชื้อรา *C. lunata* มีความผันแปรและความหลากหลายทางพันธุกรรม (เทิดศักดิ์, 2560) ดังนั้น การประเมินความต้านทานโรคของข้าวต่อเชื้อสาเหตุโรค (เสาวลักษณ์ และคณะ, 2553) ควรคำนึงถึงแหล่งที่มาของเชื้อที่จะนำมาทดสอบโรค ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเชื้อรา โดยมีปัจจัยสนับสนุน ได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อต่อชนิดของข้าว ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ Random Amplication of Polymorphic DNA (RAPD) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Weising *et al.,* 1995) Amplied Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos and Kuiper, 1997) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อรา *C. lunata* จากแหล่งต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

บริเวณ ITS rDNA (internal transcribed spacer) และจำแนกจีโนไทป์ระหว่างสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย ISSR (inter simple sequence repeat) ซึ่งข้อมูลนี้เป็นประโยชน์ต่อการจัดการโรค และสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. แหล่งที่มาของเชื้อรา *Curvularia. lunata*

ใช้เชื้อรา *C. lunata* จำนวน 14 races ได้แก่ race 1 (CNT0301, CNT0502, SKA09132), race 2 (NPT0107, SBR0416, NSN0447, NSN0142, PCT0650, RBR05123, CRI0376, SKA02127, LPG05134, LPG02137, RBR01120, ATG0337), race 3 (NPT0810, SPB0223, SPB0627, KRI01115, CMI01161), race 4 (SBR0215), race 5 (ATG0539), race 6 (PCT0952, PLG07111, KPT02177), race 7 (PLK0154, STI0666, CRI0171), race 8 (PLK0458), race 9 (STI0464, PTE01262, AYA07265), race 10 (PTE02263, NRT0599, AYA02264), race 11 (NRT07101, KPT02176), race 12 (PLG04106), race 13 (KRI01117) และ race 14 (CMI08168) และ (กวินธรรพ์, 2559) ซึ่งเก็บรวบรวมไว้ที่ Kasetsart University Kamphaeng Sean Fungal Collection (KKFC) โดยมาจากสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเมล็ดด่างข้าวจากพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ จำนวน 20 จังหวัด ได้แก่ ชัยนาท นครปฐม สิงห์บุรี สุพรรณบุรี อ่างทอง นครสวรรค์ พิจิตร พิษณุโลก สุโขทัย เชียงราย นครศรีธรรมราช พัทลุง กาญจนบุรี ราชบุรี สงขลา ลำปาง เชียงใหม่ กำแพงเพชร ปทุมธานี และพระนครศรีอยุธยา และทำการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรค จากนั้นจำแนกสายพันธุ์ (physiological race) ของเชื้อรา *C. lunata* โดยประเมินจากลักษณะการตอบสนองของพันธุ์ข้าว คือ ลักษณะ R (resistant) และ S (susceptibility) (กวินธรรพ์, 2559) (Figure 1)

### 2. การเตรียมเส้นใยและการสกัดดีเอ็นเอ

การเตรียมเส้นใยและการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. lunata* มีวิธีการดังนี้ เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อรา *C. lunata* เจริญอยู่ แล้วขูดผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าเป็นเวลา 6-8 ชม. ทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 14-18 ชม. และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ.

สกัดดีเอ็นเอ นำเส้นใยแห้งมาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ชั่งเส้นใยผงละเอียด 0.05 ก. เติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร (200 mM Tris HCL, pH 8.0; 250 mM EDTA และ 0.5% SDS) บ่มที่ 65°ซ. เป็นเวลา 30 นาที สกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้ phenol และ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: IAA อัตราส่วน 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เติม ethanol 2 เท่า เก็บไว้ที่ -20°ซ. เป็นเวลาประมาณ 45-60 นาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน

ดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 50-100 มล. และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่ -20°ซ. หรือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ดัดแปลงวิธีมาจาก Zimand *et al*., (1994) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

**3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ribosomal DNA**

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS rDNA ของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ CNT0301, CNT1013, SBR0416, SBR0417, SBR0518, SPB0223, ATG0740, NSN0244, PCT0952, STI0666 และ KRI08117 ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3') (White *et al*., 1990) อย่างละ 0.2 pmole และเติมด้วย 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 1X PCR buffer และ 1uint Taq polymerase (Takara) โดยทำปฏิกิริยาที่ 95°ซ. เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ จากนั้น ทำปฏิกิริยาแบบวนซ้ำที่ 95°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที ต่อด้วยที่ 55°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และที่ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Microspin S-400 HR columm และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Solgent Sequencing Service ประเทศเกาหลี เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว วิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA7 (Sudhir *et al*., 2016) โดยนำข้อมูลมา alignment ร่วมกันด้วยวิธี Clustal W (Larkin *et al*., 2007) แล้วจัดกลุ่มด้วยวิธี Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) และหาค่า bootstrap (Felsenstein, 1985) ด้วยโปรแกรมเดียวกันจำนวน 1,000 ซ้ำ

**4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR**

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 14 races มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่อยู่ระหว่างส่วนที่ซ้ำกัน (simple sequence repeat) โดยทำปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ 7 ชุด ได้แก่ $(GTC)_5$, $P_3$: $GTG(CGA)_5$, $(CAG)_5$, $P_4$: $GCG(CGA)_5$, $P_6$: $ATC(CGA)_5$, $(GTG)_5$ และ $(AGG)_5$ อย่างละ 10 pmole ในแต่ปฏิกิริยาและเติมด้วย 1X buffer 2.5 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM และ 1 unit Taq DNA polymerase (Takara) โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 94°ซ. เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 37 รอบ ที่ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นที่ 54°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยเก็บข้อมูลในรูปแบบของการเกิดแบบแผนดีเอ็นเอ (band prole) (เบญจพล และจินตนา, 2558)

**Figure 1** Symptoms of rice dirty panicle in field (A), symptoms of dirty panicle after inoculated with *C. lunata* in greenhouse condition (B), morphological of colony and conidia of *C. lunata* (C, D)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 11 ไอโซเลต พบว่า เชื้อรา *C. lunata* มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *C. lunata* (multiple alignment) จากฐานข้อมูล NCBI จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ KU232854, KU232845 และ KF897859 เชื้อรา *C. eragostids* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ JN006772, HM053668 และ MG571759 พบว่า เชื้อรา *C. lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวจัดกลุ่มอยู่ร่วมกับเชื้อรา *C. lunata* จากฐานข้อมูล ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลข้าว และข้าวฟ่าง โดยมีค่าความน่าเชื่อมั่นในการจัดกลุ่ม (bootstrap value) ที่ 100% (Figure 3) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่แยกมาจากแหล่งต่าง ๆ และเป็นสายพันธุ์ (races) ต่าง ๆ ได้แก่ race 1, 3, 5, 11 และ 14 โดยกลุ่มของเชื้อรา *C. lunata* ได้แยกกลุ่มจาก *C. eragostids* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนบริเวณ ITS rDNA สามารถแยกความแตกต่างระดับสปีชีส์ของเชื้อราในสกุล *Curvularia* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Majeed *et al*., (2016) ที่ได้ทำการศึกษาโรคใบจุดสีน้ำตาลข้าวในประเทศปากีสถาน ซึ่งทำการจำแนกเชื้อสาเหตุ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (KC662107) พบว่า เป็นเชื้อรา *C. lunata* ซึ่งมีค่าความเหมือน (similarity) 98% และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Chaudary *et al*., (2016) โดยศึกษาโรคใบจุดมะเขือยาว ในประเทศปากีสถาน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 ITS4 และวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (KR870876) พบว่า เป็นเชื้อรา *C. lunata* ซึ่งมีค่าความเหมือน (similarity) 99% และส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล NCBI (accession no.KU836756) อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดของเชื้อรา *C. lunata* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ไม่สามารถแยกได้ในระดับสายพันธุ์ (race) กล่าวคือ เชื้อรา *C. lunata* ที่เป็นสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวจึงจัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อที่เป็นโรคใบจุดสีน้ำตาล ซึ่งไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างในการก่อโรคได้

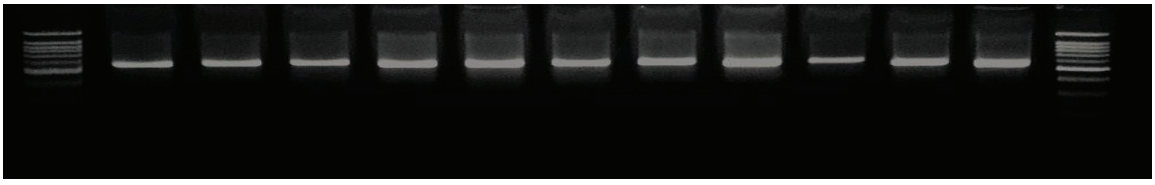

**Figure 2** ITS rDNA product of *C. lunata* generated by using primer ITS1 and ITS4

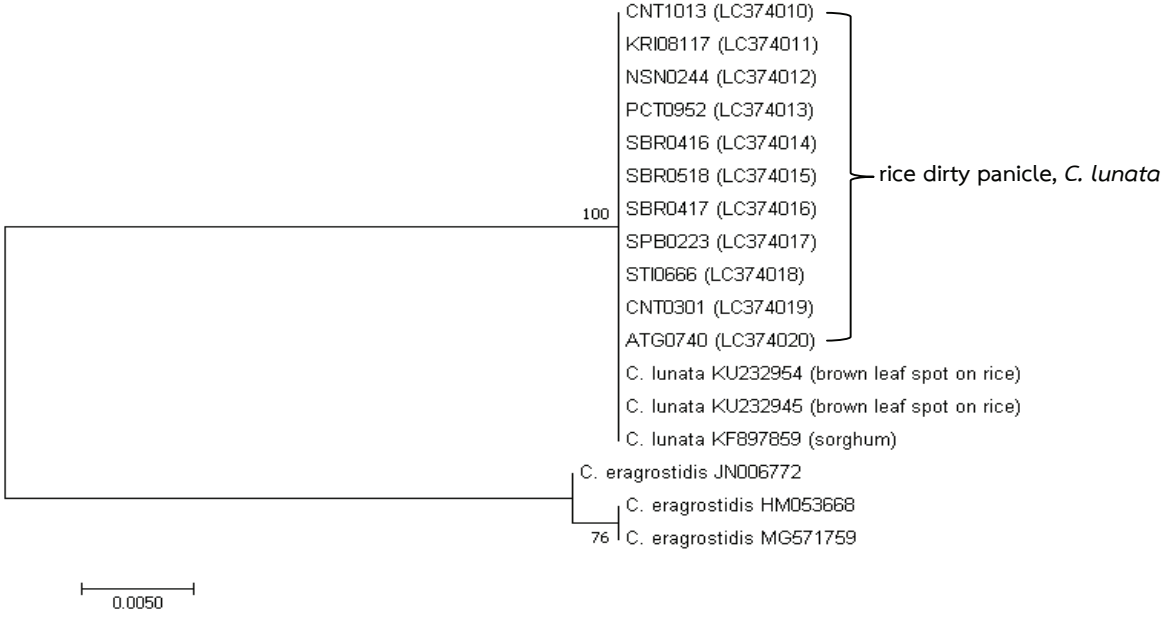


**Figure 3** The neighbor-joining tree obtained from ITS rDNA sequences *C. lunata* isolates using MEGA 7.0 program. Bootstrap values are indicated on the branches (1000 replications)

**2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. lunata* ด้วยเทคนิค ISSR**

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 40 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ (race) ต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวในประเทศไทย รวม 20 จังหวัด ด้วยเทคนิค ISSR (inter simple sequence repeat) (Figure 4) โดยใช้ไพรเมอร์ $(GTC)_5$, $(GTG)_5$, $P_4$: GCG$(CGA)_5$, $P_6$: ATC $(CGA)_5$, $(CAG)_5$, $(AGG)_5$ และ $P_3$: GTG$(CGA)_5$ ให้ แบบแผนดีเอ็นเอ (genotype) จำนวน 19, 19, 16, 13, 11, 10 และ 9 รูปแบบตามลำดับ จากไพรเมอร์ทั้งหมดที่ศึกษา พบว่า แบบแผนดีเอ็นเอ มีความหลากหลายมาก โดยจีโนไทป์มีการกระจายตัวอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย แต่บางจีโนไทป์พบเฉพาะพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเท่านั้น ซึ่งในแต่ละพื้นที่พบจีโนไทป์ของ *C. lunata* ได้มากกว่า 1 จีโนไทป์ เช่น จีโนไทป์ A6 ที่ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ $(AGG)_5$ สามารถตรวจพบได้ใน 13 จังหวัด ในทุกภาคของประเทศไทย เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และ race พบว่า ในจีโนไทป์ A6 สามารถตรวจพบได้ใน race 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12 และ 13 (Table 1) โดยจากการศึกษา physiological

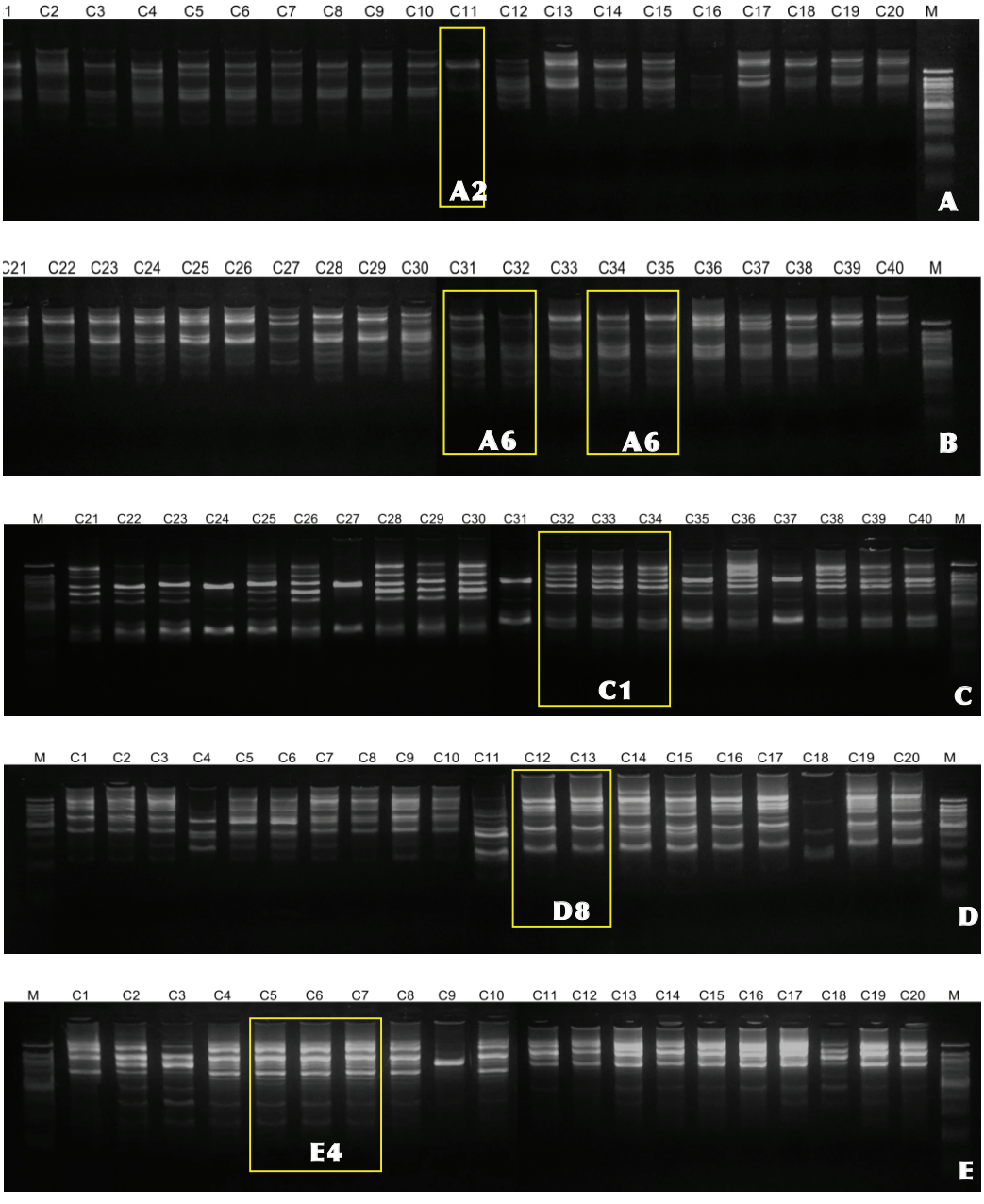


**Figure 4** Band proles of *C. lunata* generated by using primer $(AGG)_5$ (A,B), $P_3$: $GTG(CGA)_5$ (C) $(GTG)_5$ (D) and $(GTC)_5$ (E)

race ของ กวินธรรพ์ (2559) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR ของเชื้อรา *C. lunata* พบว่า เชื้อรา *C. lunata* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Zhan *et al*., 2003) และกระจายอยู่ในพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันของประเทศไทย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเกิดการเคลื่อนย้ายจีโนไทป์ของเชื้อรา *C. lunata* จากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (genotype flow) โดยอาจจะมาจากการนำเมล็ดพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกยังแหล่งต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อราในกลุ่ม Ascomycotina

**Table 1** Band proles of *Curvularia lunata* generated using SSR primer

| Primer | Locality No. (Band proles) |
|---|---|
| $(AGG)_5$ | 1 locality (A2, A7, A8, A9, A10) |
| | >1 locality (A1, A3, A4, A5, A6) |
| $(CAG)_5$ | 1 locality (B3, B4, B7, B9, B10) |
| | >1 locality (B1, B2, B5, B6, B8, B11) |
| $P_3$: $GTG(CGA)_5$ | 1 locality (C2) |
| | >1 locality (C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9) |
| $(GTG)_5$ | 1 locality (D2, D4, D5, D6, D7, D10, D11, D12, D15, D18, D19) |
| | >1 locality (D1, D3, D8, D9, D13, D14, D16, D17) |
| $(GTC)_5$ | 1 locality (E3, E7, E10, E11, E15, E17, E18, E19) |
| | >1 locality (E1, E2, E4, E5, E6, E8, E9, E12, E13, E14, E16) |
| $P_6$: $ATC(CGA)_5$ | 1 locality (F3, F5, F6, F10, F12, F13) |
| | >1 locality (F1, F2, F4, F7, F8, F9, F11) |
| $P_4$: $GCG(CGA)_5$ | 1 locality (G2, G3, G6, G9, G10) |
| | >1 locality (G1, G4, G5, G7, G8, G11, G12, G13, G14, G15, G16) |

ชนิดอื่น เช่น การศึกษาของ El Chartouni *et al*., (2011) พบว่า ประชากรของ *Mycosphaerella graminicola* มีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้นจากเดิมในประเทศฝรั่งเศส โดยการใช้ microsatellite markers และ PCR-SSCP analysis จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการปรับตัวของเชื้อให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ซึ่งนำไปสู่เกิดการเคลื่อนย้ายจีโนไทป์ (genotype flow) หรือพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อรา และการศึกษาของเทิดศักดิ์ (2560) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. lunata* ด้วยเครื่องหมาย AFLP จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนด้วยวิธี DICE และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *C. lunata* ได้ 3 กลุ่ม (cophenetic correlation 0.95) และมีค่า bootstrap มากกว่า 90% แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. lunata* มีความผันแปรและความหลากหลาย ดังนั้น การประเมินความต้านทานโรคของข้าวต่อเชื้อสาเหตุโรค ควรคำนึงถึงแหล่งที่มาของเชื้อที่จะนำมาทดสอบโรค นอกจากนี้ การศึกษาของ Zhang *et al*., (2017) โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Magnaporthe oryzae* กับข้าว ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศจีน โดยศึกษาความถี่ ดัชนีความหลากหลาย ความจำเพาะ และสายพันธุ์ที่พบทั่วไปของ *M. oryzae* สายพันธุ์ต่าง ๆ (race) พบว่า ประชากรเชื้อโรคที่อยู่ในภาคใต้มีความหลากหลายมากกว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

## สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA พบว่า เชื้อรา *C. lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวในประเทศไทยจัดกลุ่มอยู่ร่วมกับ

เชื้อรา *C. lunata* จากฐานข้อมูล NCBI โดยมีค่าความน่าเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มที่ 100% และจากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม และความแตกต่างของจีโนไทป์ของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 40 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค ISSR แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* โดยมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย ซึ่งในหนึ่งพื้นที่พบเชื้อรา *C. lunata* มากกว่า 1 จีโนไทป์ แต่บางจีโนไทป์มีความเฉพาะเจาะจงต่อพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเท่านั้น ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงการเคลื่อนย้ายของเชื้อราจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง และมีเชื้อราบางสายพันธุ์ที่ยังคงความเฉพาะต่อพื้นที่อยู่

## คำขอบคุณ

ผลการวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว (สวทช.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน กรมการข้าว ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

กวินธรรพ์ บุบผา. 2559. *การจำแนก Physiological races ของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว และการประเมินโรคบนข้าวพันธุ์ต่าง ๆ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 164 หน้า.

เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข. 2560. *การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมและการแปรปรวนของเชื้อรา ก่อโรคเมล็ดด่างข้าว ในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 175 หน้า.

เบญจพล ศรีทองคำ และจินตนา อันอาตม์งาม. 2558. การจำแนกเชื้อรา Fusarium species จากพืชอาศัยต่าง ๆ ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และเครื่องหมาย ISSR. *วิทยาศาสตร์เกษตร* 46(3): 309-320.

เสาวลักษณ์ อัคราช ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2553. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่. หน้า 581-588. *ใน:* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Chaudary, T., A. A. Shahid, M. Asif, F. Asghar, R. A. Majeed, M. Ali and W. Anwar. 2016. First report of *Curvularia lunata causing* leaf spot disease of Solanum melongena (eggplant) in Lahore, Pakistan. *Plant Dis* 100(11): 2326.

El Chartouni, L., B. Tisserant, A. Siah, F. Duyme, J. B. Leducq, C. Deweer, C. F. Roisin, J. Sanssene, R. Durand, P. Halama and P. Reignault. 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 103(4): 764-774.

Felsenstein J. 1985. Condence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Majeed, R. A., A. A. Shahid, M. Ashfaq, M. Z. Saleem and M. S. Haider. 2016. First report of *Curvularia lunata causing* brown leaf spots of rice in Punjab, Pakistan. *Plant Dis* 100(1): 219.

Saitou N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. and Evo.* 4: 406-425.

Sudhir, K., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Bio. Evol.* 33(7): 1870-1874.

Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP anslysis. pp. 115-131. *In:* G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff (eds.). DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 322 p.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications 18(1): 315-322.

Zhan, J., R. E. Pettway and B. A. McDonald. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene ow. *Fungal Genet. Biol.* 38(3): 286-297.

Zhang, Y., Q. Zhu, Y. Yao, Z. Zhao, J. C. Correll, L. Wang and Q. Pan. 2017. The race structure of the rice blast pathogen across southern and northeastern China. *Rice* 10(1): 46.

Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis.1994. Use of the RAPD procedure for the identication of *Trichoderma* strains. *Myco. Res.* 98(5): 531-534.