การประเมินความต้านทานของข้าวพันธุ์ไทยต่อเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล

Evaluation of Thai Rice Varieties for Resistance to *Bipolaris oryzae*, the Causal Agent of Brown Spot Disease

มนัญชยา จูจิ้ว[1/] สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล[2/] พยอม โคเบลลี่[3/] จินตนา อันอาตม์งาม[1/*]

Manunchaya Chuchiw[1/] Surapong Dumrongkittikule[2/] Payorm Cobelli[3/] Jintana Unartngam[1/*]

Received 18 Mar. 2023/Revised 31 May 2023/Accepted 9 Jun. 2023

ABSTRACT

Brown spot disease of rice is caused by the fungus *Bipolaris oryzae*. This fungal pathogen could infect leaves, leaf sheaths, panicles, and seeds. The use of resistant varieties is an effective and safe way for farmers. However, the resistance will change when the new fungal strains invades the area. This study aimed to determine the resistance of rice varieties to three isolates of *B. oryzae*. The combined analysis of ITS rDNA, 28S rDNA, and GAPDH revealed that these isolates had clustered sequences similar to those of the type species of *B. oryzae*. The resistant screening of 72 rice varieties to the three isolates of *B. oryzae* and cluster analysis UPGMA showed consistent results. Results revealed that Homsuphan displayed resistance (R) and moderate resistance (MR) while RD29 and Niao Dam displayed high susceptibility (HS) to all three isolates. The information was useful for future rice breeding programs for brown spot disease resistance.

Keywords: rice, brown spot disease, disease resistance, *Bipolaris oryzae*

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

[2/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2/] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[3/] กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900

*** Corresponding author: agrjne@ku.ac.th**

บทคัดย่อ

โรคใบจุดสีน้ำตาล เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของข้าว ตั้งแต่ ใบ กาบใบ รวงข้าว รวมทั้งเมล็ด การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อเกษตรกร อย่างไรก็ตาม ความต้านทานมักเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเชื้อราสายพันธุ์ใหม่เข้าทำลาย ดังนั้น การวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวต่อเชื้อรา *B. oryzae* โดยนำเชื้อมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ ITS rDNA, 28S rDNA และ GAPDH ทำให้สามารถจำแนกเชื้อราได้ 3 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. oryzae* (type species) สำหรับการคัดแยกลักษณะต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลบนข้าว 72 พันธุ์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA แสดงผลของข้อมูลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าข้าวพันธุ์หอมสุพรรณ แสดงลักษณะต้านทาน (R) และต้านทานปานกลาง (MR) ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข29 และ เหนียวดำ แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว, โรคใบจุดสีน้ำตาล, ความต้านทานโรค, *Bipolaris oryzae*

บทนำ

โรคใบจุดสีน้ำตาลข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae* ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยแสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลขอบนอกสุดของแผลมีสีเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 มม. แผลที่มีการพัฒนาเต็มที่ขนาดประมาณ 1 - 2 × 4 - 10 มม. (ปราโมทย์และคณะ, 2562) การศึกษาเกี่ยวกับการใช้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานในการป้องกันโรคใบจุดสีน้ำตาลเป็นที่นิยมและเป็นวิธีที่ให้ผลดี และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดย รุจิรัตน์ และคณะ (2563) ได้ทำการศึกษาความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว 44 สายพันธุ์ ด้วยเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่า มีพันธุ์ข้าวที่ต้านทาน (R) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 3 พันธุ์ คือ กข59 กข61 และพิษณุโลก 2 และพันธุ์ข้าวที่ค่อนข้างต้านทาน (MR) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 4 พันธุ์ คือ เหนียวอุบล 3 กข31 กข57 และ กข71 ไม่พบพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลจากไอโซเลต BO2019_KKN_38.849

อย่างไรก็ตาม โรคใบจุดสีน้ำตาลยังคงระบาด เนื่องจาก ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อรา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวต่อเชื้อรา *B. oryzae* โดยการปลูกเชื้อทดสอบโรคบนข้าวพันธุ์ไทย 72 พันธุ์ เพื่อประเมินหาพันธุ์ข้าวสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อราและการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว ได้แก่ BO2019_UDN_42.962 (จ. อุดรธานี), BO2018_KRI_7.6 (จ. กาญจนบุรี) และ BO2020_CRI_2.7 (จ. เชียงราย) ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ กข22 กข31 และ KDML 105 ตามลำดับ โดยนำชิ้นวุ้นของเชื้อราที่เจริญเต็มหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เจาะเป็นวงกลมที่ขอบโคโลนีด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มม. วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชม. เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น บันทึกลักษณะสีของ

โคโลนีเชื้อรา และวัดขนาดของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การจำแนกเชื้อราด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

นำเชื้อรา *B. oryzae* 3 ไอโซเลต มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS rDNA), large subunit ribosomal DNA gene (28S rDNA) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อรา *B. oryzae* เจริญอยู่ จากนั้น ขูดผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าเป็นเวลา 3 - 4 วัน กรองเส้นใยด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ และเก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 ทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 14 - 18 ชม. และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ. ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยบดเส้นใยแห้งด้วยไนโตรเจนเหลว (จินตนา, 2562)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยเชื้อราที่บดละเอียดใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มล. จากนั้นเติม extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol และ chloroform: IAA อย่างละ 0.5 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากัน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: IAA ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเดิม หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วเติม RNase ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำออกมาเติม chloroform: IAA ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรเดิม หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วเติม ethanol ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 2 เท่า จากนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลาประมาณ 1 ชม. แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 % ปริมาตร 50-100 มล. และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. หรือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA) หรือน้ำ ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Zimand *et al*. (1994) และ จินตนา (2562) จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS rDNA, 28S rDNA และ GAPDH

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *B. oryzae* ในบริเวณ ITS rDNA, 28S rDNA และ GAPDH โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ (Table 1) ปฏิกิริยาปริมาตรรวมทั้งหมด 40 ไมโครลิตร และมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ $MgCl_2$ 2.5 mM dNTP 0.2 mM 10X buffer และ 2 *Taq* polymerase การทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ ทำปฏิกิริยาที่ 95°ซ. เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ Denaturing ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 55°ซ. เป็นเวลา 1 นาที สำหรับตำแหน่ง ITS rDNA และยีน GAPDH และอุณหภูมิ 52°ซ.

เป็นเวลา 1 นาที สำหรับตำแหน่ง 28S rDNA และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 30 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Microspin S-400 HR column และส่ง PCR product ที่บริสุทธิ์ให้บริษัท Solution for Genetic Technologies ประเทศเกาหลีที่รับตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ (Schoch *et al.*, 2012)

Table 1 Primer sequences used in the present study

Locus	Primer	Annealing(°C)	Sequence (5'-3')	Reference
ITS	ITS1	55.0	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White *et al.*, 1990
	ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
28S	NL1	52.0	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Kurtzman and Robnett, 1997
	NL4		GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
GAPDH	GPD1	55.0	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Deng *et al.*, 2015
	GPD2		GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ ITS rDNA 28S rDNA และ GAPDH กับลำดับนิวคลิโอไทด์ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI จากนั้น ทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA-X นำข้อมูล alignment (Clustal W Parameters) (Larkin *et al.*, 2007) มาสร้าง Phylogenetic tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และวิเคราะห์หา bootstrap ด้วยโปรแกรมเดียวกัน จำนวน 1,000 ซ้ำ (Yap and Nelson, 1996)

3. วิธีการปลูกเชื้อและการประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลข้าว

นำเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ BO2019_UDN_42.962, BO2018_KRI_7.6 และ BO2020_CRI_2.7 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชม. เป็นเวลา 14 วัน และเตรียมสปอร์แขวนลอย ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์/มล. พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปริมาตร 2 มล./ต้น ลงบนข้าว 72 พันธุ์ (Table 2) ที่ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์พื้นเมือง 23 พันธุ์ พันธุ์ข้าวรับรองจากกรมการข้าว 35 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวปรับปรุงจากหน่วยงานวิจัยข้าว 14 พันธุ์ โดยมีพันธุ์เปรียบเทียบอ่อนแอ คือ กข15 และ KDML 105 จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 3 ใบ ที่อายุ 30 วัน และใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 48 ชม. ประเมินการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน ประเมินความรุนแรงโรค (disease severity) ใบจุดสีน้ำตาล โดยดัดแปลงวิธีจาก IRRI (2013) มีระดับความรุนแรง ดังนี้

0 ไม่พบอาการของโรค
1 พบอาการใบจุดสีน้ำตาล 1 - 20% ของพื้นที่ใบ
2 พบอาการใบจุดสีน้ำตาล 21 - 40% ของพื้นที่ใบ
3 พบอาการใบจุดสีน้ำตาล 41 - 60% ของพื้นที่ใบ
4 พบอาการใบจุดสีน้ำตาล 61 - 80% ของพื้นที่ใบ
5 พบอาการใบจุดสีน้ำตาล 81 - 100% ของพื้นที่ใบ

และคำนวณดัชนีการเกิดโรค (disease index) จากสูตรการหาดัชนีการเกิดโรค (McMaugh, 2005) จากนั้น ประเมินลักษณะความต้านทานโรค (Table 3) โดยดัดแปลงวิธีจาก IRRI (2013)

$$\text{disease index (\%)} = \frac{[(na \times 0) + (nb \times 1) + (nc \times 2) + (nd \times 3) + (ne \times 4) + (nf \times 5)]}{(N \times 5)}$$

เมื่อ na = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 0 nb = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 1
nc = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 2 nd = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 3
ne = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 4 nf = จำนวนใบที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 5
N จำนวนใบทั้งหมดที่ได้จากการสุ่ม

Table 2 Source of the 72 rice varieties used in the present study

Department of rice (GS.No.)		Native rice (GS.No.)		Rice Gene Discovery (GS.No.)
RD5 (1650)	Khao' Jao Hawm Suphan Buri (23062)	Khao Phan Luang (10847)	Hom Suphan (22048)	RD51 (RGD)
RD7 (18432)	Jao Khao Chiangmai (24601)	Hang Nak (5583)	Niaw Hawm (4915)	RD19 (RGD)
RD10 (21643)	Chai Nat 1 (20712)	Khi Tom Klang (23232)	Leung Khamin (1312)	Than Si Rin (RGD)
RD15 (19326)	Ngahng Cha-lawng (2023)	Khi Tom Kamnan (7627)	Leung Yai (15906)	Pinkaset 4 (RGD)
RD17 (3999)	Pathum Thani 1 (23898)	Khi Tom Phan (22783)	Ai Thi (8100)	Hom Chon Sit (RGD)
RD21 (4791)	Prachin Buri 1 (23406)	Ngah Chahng (15548)		HomMali 802 (RGD)
RD23 (19325)	Prachin Buri 2 (24592)	Di Ngulueam (19117)		HomMali 803-1 (RGD)
RD27 (7125)	Plai Ngahm Prachin Buri (20846)	Di Si (15982)		HomMali 803-2 (RGD)
RD29 (Chai Nat 80) (24534)	Phitsanulok 60-1 (16233)	Tap Mey Dam (3238)		HomMali 805 (RGD)
RD31 (24533)	Phitsanulok 2 (24591)	Hahng Yi 71 (7613)		HomMali 822 (RGD)
RD33 (RD)	Leb Nok Pattani (21962)	Bak Muai (3257)		HomMali 823 (RGD)
RD37 (24602)	Suphan Buri 1 (13745)	Bue So Mi (23719)		HomMali 831 (RGD)
RD43 (24606)	Suphan Buri 2 (20776)	Niaw Dam (18014)		HomMali 841 (RGD)
RD47 (24609)	Hawm Kradang-ngah 59 (RD)	Phuang Nak (1691)		Riceberry (RGD)
RD49 (RD)	Niaw San Pa Tong (1370)	Yi Tae Sa Ming (15789)		
RD-Mae Jo2 (RD)	Leung Yai 148 (1705)	Hom Chan (3008)		
Khao Gaw Diaw 35 (24607)	Hantra 60 (16579)	Hom Lao (18992)		
RD57 (RD)		Bue Pha Tho (19761)		

Table 3 Disease index and phenotype of brown spot disease

Disease index (%)	Phenotype	Reaction type
0	high resistance	HR
1 - 10	resistance	R
11 - 25	moderate resistance	MR
26 - 50	moderate susceptible	MS
51 - 75	susceptible	S
76 - 100	high susceptible	HS

Source: International Rice Research Institute (2013)

4. การวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์

วิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (cluster analysis UPGMA) โดยใช้วิธีของ Bray-Curtis โดยโปรแกรม Statistics Software Package (PAST) version 4.02 (Hammer *et al*., 2001)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris oryzae* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกเชื้อรา *B. oryzae* เบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อรามีลักษณะโคโลนีสีน้ำตาล จนถึงสีน้ำตาลเข้มปนดำ เชื้อราสร้างสปอร์ (conidia) สีน้ำตาลอ่อน-เข้ม มีลักษณะรูปร่างยาว โค้งเล็กน้อย ส่วนปลายเรียวและมน ขนาดสปอร์ของไอโซเลต BO2020_CRI_2.7 ประมาณ 44.35 – 68.73 × 12.36-20.86 ไมโครเมตร ภายในมีผนังกั้นตามขวาง 4 - 6 pseudoseptum ไอโซเลต BO2018_KRI_7.6 มีขนาดสปอร์ประมาณ 63.25 - 85.18 × 15.72 - 23.25 ไมโครเมตร ภายในมีผนังกั้นตามขวาง 5 - 6 pseudoseptum และไอโซเลต BO2019_UDN_42.962 ขนาดสปอร์ประมาณ 43.39 - 63.91 × 13.15-20.92 ไมโครเมตร ภายในมีผนังกั้นตามขวาง 4 - 7 pseudoseptum (Figure 1)

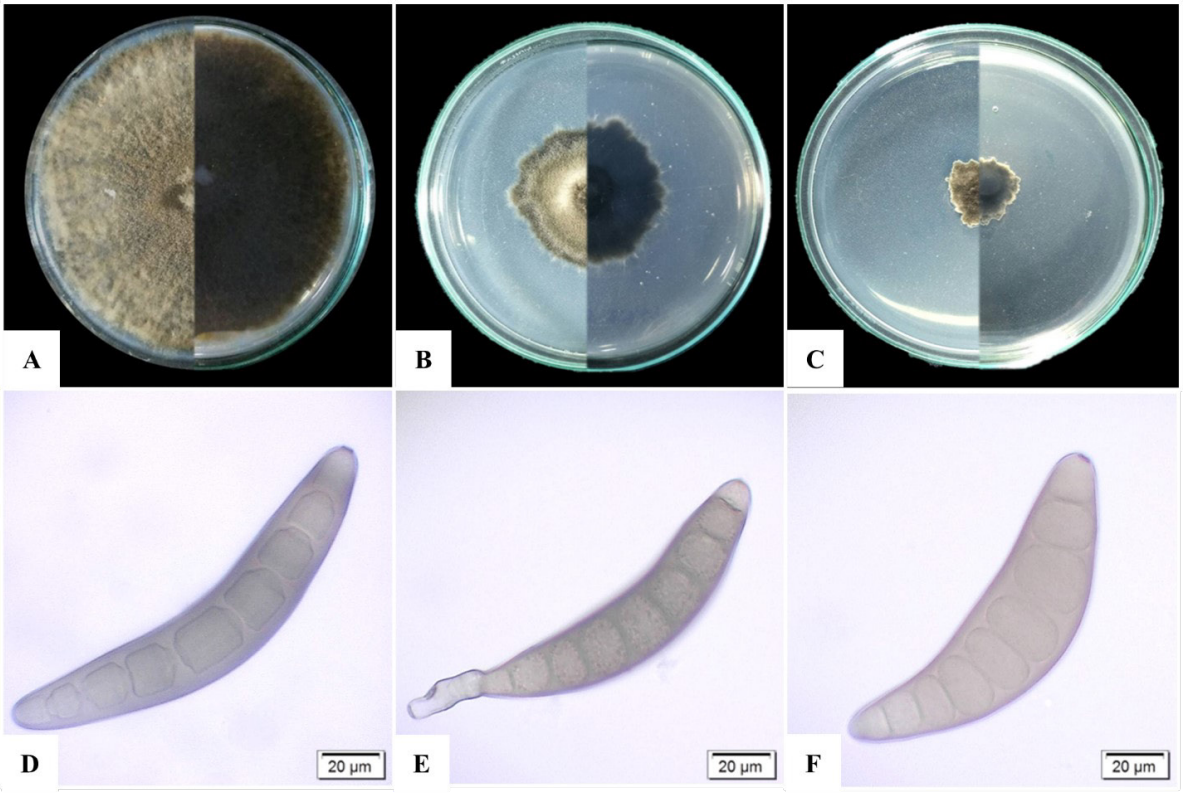

Figure 1 Colony and conidia morphology of 3 isolates of *Bipolaris oryzae* after 14 days of growth on PDA. Colony appearance (surface and reverse) of isolate BO_2020_CRI_2.7 (A), BO_2018_KRI_7.6 (B), and BO2019_UDN_42.962 (C), Conidial shape and size under a compound microscope at 400X magnification of isolate BO_2020_CRI_2.7 (D), BO_2018_KRI_7.6 (E), and BO2019_UDN_42.962 (F)

2. การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris oryzae* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของบริเวณ ITS rDNA, 28S rDNA และ GAPDH เปรียบเทียบกับสปีชีส์ต้นแบบ (type species) คือ *B. oryzae* CBS 157.50 และสปีชีส์อื่น ๆ ในสกุล *Bipolaris* ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง และใช้เชื้อรา *Curvularia lunata* เป็น outgroup พบว่า เชื้อรา *Bipolaris* ทั้ง 3 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. oryzae* (type species) โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มเท่ากับ 100% (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Manamgoda *et al.* (2012) ที่ศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการและอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Bipolaris, Cochliobolus* และ *Curvularia* จำนวน 35 ไอโซเลต โดยใช้ข้อมูลในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ ITS rDNA, 28S rDNA, GAPDH และ EF-1 alpha พบว่า เชื้อรา *Bipolaris* และ *Cochliobolus* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *B. oryzae* (type species) โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มเท่ากับ 80% ในขณะที่อัญชลี และคณะ (2563) ที่ได้ทำการศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากอาการของโรคเมล็ดด่างในภาคเหนือตอนบนด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคบนกล้าข้าว โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ ITS rDNA และ GAPDH พบว่า เชื้อรา *Bipolaris* spp. ที่ใช้ทดสอบ จำนวน 22 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกได้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. oryzae*, *B. bicolor* และ *B. maydis* โดยพบว่าเชื้อรา *B. oryzae* เป็นสปีชีส์ที่พบได้มากที่สุด (50%)

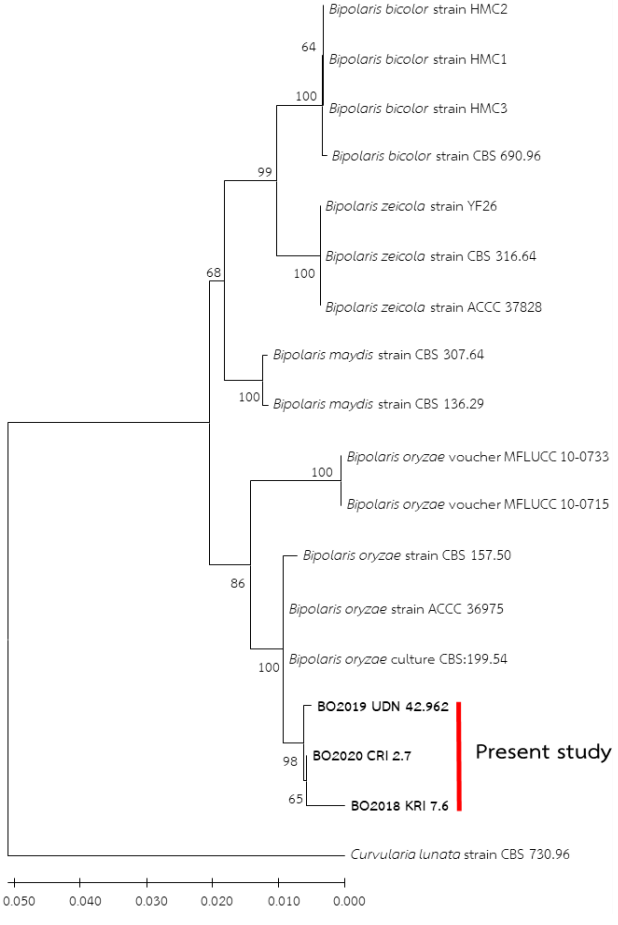

Figure 2 Phylogenetic tree of *Bipolaris* species using a neighbor-joining (NJ) analysis based on the combination of ITS rDNA, 28S rDNA, and GAPDH sequences. Numerals at nodes indicate bootstrap percentages derived from 1,000 replications

3. การประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลข้าว

จากการประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลบนข้าว 72 พันธุ์ พบว่า เมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อราไอโซเลต BO2020_CRI_2.7 พบข้าวที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) 1 สายพันธุ์ แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง (MR) 7 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) 35 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) 23 สายพันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) 6 พันธุ์ ในขณะที่เมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อราไอโซเลต BO2018_KRI_7.6 ไม่พบพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) แต่พบข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง (MR) 8 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) 43 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) 19 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) 2 พันธุ์ และเมื่อปลูกเชื้อด้วยเชื้อราไอโซเลต BO2019_UDN_42.962 ไม่พบพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) แต่พบข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง (MR) 7 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) 48 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) 12 พันธุ์ แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) 5 พันธุ์ และพบว่า ข้าวพันธุ์หอมสุพรรณแสดงลักษณะต้านทาน (R) ต่อไอโซเลต BO2020_CRI_2.7 และแสดงลักษณะต้านทานปานกลาง (MR) ต่อไอโซเลต BO2018_KRI_7.6 และ ไอโซเลต BO2019_UDN_42.962 และพบพันธุ์ข้าว จำนวน 22 พันธุ์ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) และพันธุ์ข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ข้าวพันธุ์ กข29 (ชัยนาท 80) และเหนียวดำแสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต (Table 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต มีความรุนแรงในการก่อโรคแตกต่างกัน (Figure 3)

Table 4 Phenotypes of 72 rice varieties after inoculation with three isolates of *Bipolaris oryzae*

Phenotype	No. of varieties		
	BO2020_CRI_2.7	BO2018_KRI_7.6	BO2019_UDN_42.962
high resistance (HR)	0	0	0
resistance (R)	1	0	0
moderate resistance (MR)	7	8	7
moderate susceptible (MS)	35	43	48
susceptible (S)	23	19	12
high susceptible (HS)	6	2	5

Figure 3 Brown spot symptom caused by *Bipolaris oryzae* (BO2019_UDN_42.962) at 14 days after inoculation; Homsuphan: R (A), Ai Thai: MR (B), HomMali 805: MS (C), Pathum Thani 1: S (D), and Nang Chalong: HS (E)

4. การวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้วิธีของ Bray-Curtis และใช้ข้อมูลดัชนีการเกิดโรคของเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้อที่ 2 วิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) และต้านทานปานกลาง (MR) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ หอมสุพรรณ กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยสายพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) จำนวน 40 7 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยในกลุ่มที่ 2 พบสายพันธุ์ข้าว จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) จำนวน 14 พันธุ์ โดยในกลุ่มนี้พบสายพันธุ์ข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต และกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) จำนวน 6 พันธุ์ และในกลุ่มนี้พบพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะอ่อนแอมาก (HS) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ กข29 (ชัยนาท 80) และเหนียวดำ (Figure 4)

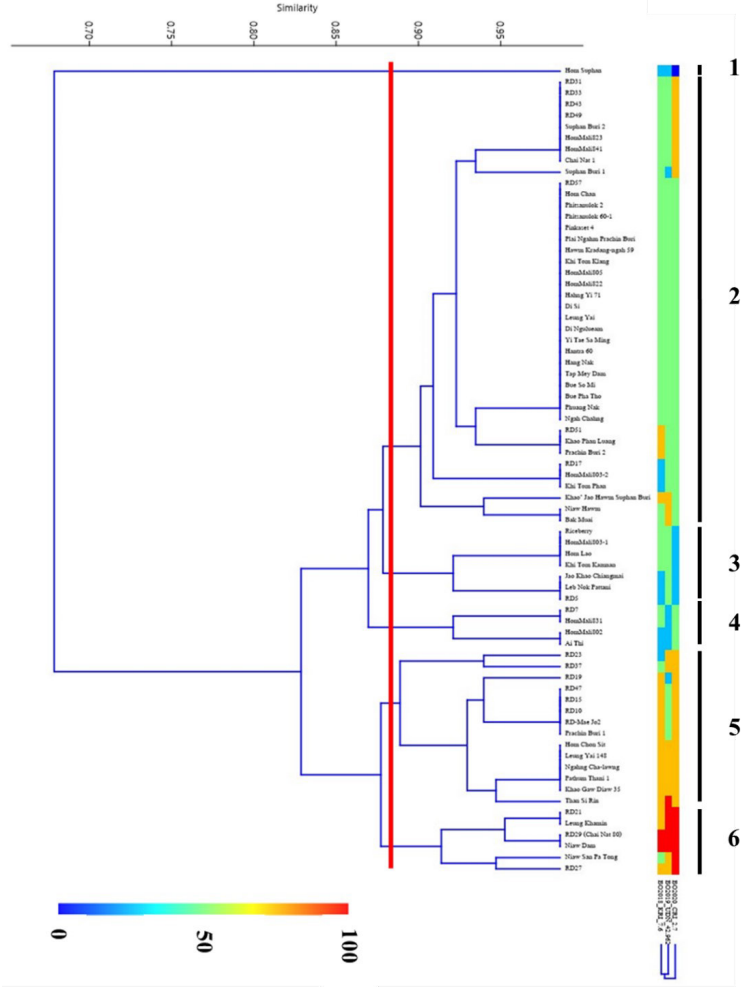

Figure 4 Dendrograms were constructed by cluster analysis UPGMA using the percent disease index on 72 rice varieties after being inoculated with three isolates of *Bipolaris oryzae*. The results showed that six groups had a cophenetic correlation of 0.7787

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการประเมินความต้านทานโรคและการจัดกลุ่มความสัมพันธ์แสดงผลของข้อมูลที่สอดคล้องกัน โดยพบพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) และค่อนข้างต้านทาน (MR) คือ หอมสุพรรณ ข้าวจำนวน 22 พันธุ์ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (MS) และข้าวจำนวน 5 พันธุ์ที่แสดงลักษณะอ่อนแอ (S) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต และพบพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะอ่อนแอมาก (HS) ได้แก่ กข29 และเหนียวดำ รวมทั้งข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เคยมีการรายงานโดย ดารา และคณะ(2550) ว่าเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล แต่ในผลการประเมินครั้งนี้พบว่าแสดงลักษณะอ่อนแอ (S) ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต นอกจากนี้ รุจิรัตน์ และคณะ (2563) ที่ได้ศึกษาความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว 44 พันธุ์ ด้วยเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่า ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แสดงลักษณะต้านทาน (R) ต่อไอโซเลต BO2019_SKN_43.1014 และข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองและหางยี 71 ที่มีลักษณะต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน แต่เมื่อทดสอบกับ *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ พบว่า มีลักษณะอ่อนแอ (S) – อ่อนแอมาก (HS) จากผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อรามีความผันแปรเกิดขึ้นภายในประชากร ทำให้พันธุ์ข้าวที่เคยมีลักษณะต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นอ่อนแอต่อโรค

สรุปผลการทดลอง

การประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลบนข้าว 72 พันธุ์ โดยใช้เชื้อรา *B. oryzae* 3 ไอโซเลต พบว่า ข้าวพันธุ์หอมสุพรรณแสดงลักษณะต้านทาน และค่อนข้างต้านทานต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ในขณะที่ข้าวพันธุ์กข29 และเหนียวดำ แสดงลักษณะอ่อนแอมาก ต่อเชื้อรา *B. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ซึ่งข้าวพันธุ์หอมสุพรรณนี้ สามารถนำไปใช้เป็นตัวเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในอนาคตต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ขอขอบคุณกรมการข้าวที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *B. oryzae* ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จินตนา อันอาตม์งาม. 2562. เทคนิควิจัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์ส่งเสริมและศึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ดารา เจตนะจิตร นงรัตน์ นิลพานิชย์ พากเพียร อรัญนารถ วิชิต ศิริสันธนะ วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ วันชัย โรจนหัสดิน และธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. 2550. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ เข็มขาว ปวีณา คนยงค์ และ นิธิมา รัตติโชติ. 2562. โรค แมลงศัตรูข้าวและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรมส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

รุจิรัตน์ วงษ์จันทร์แดง สมใจ สาลีโท พุธชาติ ศรีพนมพรพิมล ต่ออำนาจ และพยอม โคเบลลี่. 2563. การประเมินความต้านทานของพันธุ์สายพันธุ์ข้าวต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae*. หน้า 25 - 28 *ใน*: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2563. กรมการข้าว วันที่ 18 - 20 กุมภาพันธ์ 2563. ณ โรงแรมราชาวดี รีสอร์ท แอนด์โฮแทล อ. เมือง จ. ขอนแก่น.

อัญชลี ตาคำ กุลชนา ดาร์เวล วันพร เข็มมุกด์ ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม ทองมา มานะกุล และ กันติศา โมตาลี. 2563. การจำแนกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากอาการของโรคเมล็ดด่างในภาคเหนือตอนบนด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคบนข้าว. *วารสารวิชาการข้าว*. 11: 80-88.

Deng, H., Y.P. Tan, R.G. Shivas and Y.C. Niu. 2015. *Curvularia tsudae* comb. nov. et nom. nov., 88 Thai Rice Research Journal, Vol. 11 No. 1, January - June 2020 formerly *Pseudocochliobolus australiensis*, and a revised synonymy for *Curvularia australiensis*. *Mycoscience*. 56(1): 24-28.

Hammer, O., D. A. Harper, and P. D. Ryan. 2001. Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1): 9.

International Rice Research Institute (IRRI). 2013. Standard Evaluation System (SES) for Rice. 5th ed. IRRI, Manila.

Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the S'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Microbiol*. 35(5): 1216-1223.

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. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.

Manamgoda, D.S., L, Cai, EHC, McKenzie, P. W. Crous, H. Madrid, E. Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan and K. D. Hyde. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* complex. *Fungal Diversity*. 56: 131–144.

McMaugh, T. 2005. Guidelines for Surveillance for Plant Pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No. 119, ACIAR, Canberra.

Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen and Fungal Barcoding Consortium Author List. 2012. Nuclear ribosomal internal spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (16): 6241-6246.

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.

Yap, I. and R.J. Neison. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms. IRRI Discussion Paper Series 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

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