การประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Sarocladium oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย ISSR

Evaluation of genetic variation of *Sarocladium oryzae* causal agent of rice sheath rot disease based on ISSR markers

ชนม์นิภา ดีวงษ์[1] วนิดา ธรรมธุระสาร[2] และจินตนา อันอาตม์งาม[1*]

Chonnipa Deewong[1] Wanida Thamthurasan[2] and Jintana Unartngam[1*]

Abstract: Sheath rot and dirty panicle disease of rice caused by *Sarocladium oryzae* is one of the major rice diseases. The disease decreases the quantity and quality of rice production in Thailand. The present study aimed to examine the genetic variation of *S. oryzae* strains in Thailand using ISSR markers. Survey and sampling of sheath rot disease were conducted from paddy fields in the central and northeastern regions of Thailand. Recovered fungi (257 isolates) collected from 186 paddy fields in 16 provinces were identified by using morphological characteristics. Then, 40 isolates of *S. oryzae* from different collection sites were further analyzed. DNA fingerprint analysis of S. *oryzae* was done by using five primers including P7: GTT$(TCG)_5$, $(AGG)_5$, $(GTC)_5$, $(GTG)_5$ and $(CAG)_5$; then, the data set was analyzed and clustered using the UPGMA method for genotype identification. The results revealed that these fungal isolates were genetic variants within and among fungal populations. The fungal genotype was distributed between two geographical areas, thus one genotype can be observed in more than one site. However, some genotypes occur in only one specific site. The results indicated that the fungal genotypes spread among paddy fields in different geographical areas of Thailand. The genetic diversity was observed within fungal population, however, there are some strains that are specific to the locality. These results could be used in consideration to choose the inoculum source for development of sheath rot disease resistant variety.

Keywords: Rice, Sheath rot, *Sarocladium oryzae,* ISSR

บทคัดย่อ: เชื้อรา *Sarocladium oryzae* เป็นสาเหตุโรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่างของข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญในการผลิตข้าวของประเทศ ซึ่งทำให้ปริมาณ และคุณภาพของผลผลิตข้าวในประเทศลดลง การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *S. oryzae* สายพันธุ์ ต่างๆ ที่ระบาดในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR) จากการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคกาบใบเน่าจากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติได้ 257 ไอโซเลต จากทั้งหมด 186 แปลง ใน 16 จังหวัด และทำการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้น

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

[1]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphang Sean, Kasetsart University, Kamphang Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยพืชสวนเลย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย 42160

[2]Loei Horticultural Research Center, Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Phu Ruea, Loei 42160, Thailand

*Corresponding author: agrjne@ku.ac.th

เลือกตัวแทนเชื้อรา *S. oryzae* 40 ไอโซเลต จากแหล่งต่าง ๆ มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ P7: GTT(TCG)$_5$, (AGG)$_5$, (GTC)$_5$, (GTG)$_5$ และ (CAG)$_5$ วิเคราะห์ และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรม ในบางพื้นที่พบมากกว่า 1 จีโนไทป์ และมีบางจีโนไทป์พบเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อรา *S. oryzae* จากแหล่งเพาะปลูกข้าวในภูมิภาคที่แตกต่างกันของประเทศไทย เกิดความหลากหลายภายในประชากร แต่มีเชื้อราบางสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อพื้นที่ ผลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาการเลือกเชื้อราสาเหตุไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคกาบใบเน่า

คำสำคัญ: ข้าว, โรคกาบใบเน่า, *Sarocladium oryzae*, ISSR

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญที่คนไทย และประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย ในภาคการเกษตรของประเทศไทยนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่มีอาชีพทำนา โดยมีลักษณะการปลูกเป็นแบบนาปี และนาปรัง ซึ่งมีเนื้อที่เพาะปลูก ปี 2561/62 ประมาณ 60 ล้านไร่ โดยพื้นที่ปลูกข้าวส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ในปี 2562 ประเทศไทยมีการส่งออกข้าว 7.58 ล้านตัน (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2563) ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาในการปลูกข้าวจากปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งโรคข้าวก็ถือเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่สร้างความเสียหาย และเป็นสาเหตุให้ผลผลิตข้าวลดลง

โรคกาบใบเน่า (sheath rot) เกิดจากเชื้อรา *Sarocladium oryzae* (Gams and Hawksworth, 1975) เป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งโดยเฉพาะกับข้าวต้นเตี้ย และมีการใช้ปุ๋ยปริมาณสูง (Mew et al., 2004) พบว่ามีการระบาดอย่างแพร่หลายในข้าวนาปรัง ข้าวแสดงอาการในระยะตั้งท้องบางครั้งเรียกโรคนี้ว่า ข้าวตายทั้งกลมหรือข้าวแท้ง ข้าวที่ติดเชื้อจะแสดงอาการของโรคในระยะตั้งท้อง โดยเกิดแผลสีน้ำตาลดำ บริเวณกาบหุ้มรวง ตรงกลางแผลมีกลุ่มเส้นใยสีขาวอมชมพู แผลขยายติดต่อกันทำให้บริเวณกาบหุ้มรวงมีสีน้ำตาลดำ (Giraldo et al., 2015) รวงข้าวส่วนใหญ่โผล่ไม่พ้นกาบหุ้มรวง หรือโผล่ได้เป็นบางส่วน (Lanoiselet et al., 2012) จากการสำรวจโรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่างข้าวในแปลงปลูกข้าวในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือหลายจังหวัด พบว่าทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจมีการระบาดของโรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่างข้าว สาเหตุจากเชื้อรา *S. oryzae* (วนิดา, 2561) นอกจากนี้โรคเมล็ดด่างยังส่งผลให้เมล็ดลีบ และเป็นหมัน จำนวนดอกข้าวต่อรวงลดลง เชื้อรา *S. oryzae* จึงเป็นหนึ่งในเชื้อราสาเหตุของโรคเมล็ดด่างข้าว (rice dirty panicle) (กวินธรรพ์ และคณะ, 2559) ซึ่งจะพบอาการในระยะออกรวง แผลเป็นจุดสีน้ำตาลหรือดำที่เมล็ดบนรวงข้าว เกิดความเสียหายของผลผลิต ทั้งด้าน ปริมาณ และคุณภาพ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจโรคกาบใบเน่าของข้าว และศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *S. oryzae* ในประเทศไทยที่ระบาดในแหล่งต่างๆ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และสามารถนำข้อมูลส่วนนี้ไปใช้ประโยชน์ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าของข้าว

สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าของข้าวในพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย เพิ่มเติมจากการสำรวจโดย วนิดา (2561) ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัด กาญจนบุรี ชัยนาท นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ราชบุรี สิงห์บุรี สุพรรณบุรี และอ่างทอง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเป็นตัว Z แต่ละจุดห่างกัน 10 เมตร สุ่มเก็บจุดละ 10 รวง พร้อมกาบใบ และนับจำนวนรวงต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร ประเมินการแพร่ระบาดของโรคกาบใบเน่า โดยคำนวณ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (วนิดา, 2561) และนำตัวอย่างมาแยกเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อ และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคกาบใบเน่า มาแยกเชื้อราด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำกาบใบมาตัดบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคขนาด 2×2 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนพืชมา ฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วย Clorox 10% เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 รอบ เป็นเวลารอบละ 3 นาที นำชิ้นส่วนพืชซับบนกระดาษทิชชู่ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำชิ้นส่วนพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) 4 ชิ้น สำหรับเมล็ด ทำการสุ่มเมล็ดจากรวงข้าวที่แสดงอาการด่าง ทั้งเมล็ดเปลือกเมล็ด และเมล็ดที่แกะเปลือกเมล็ดแล้ว นำไปล้างด้วย Clorox 10% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 รอบ เป็นเวลารอบละ 3 นาที นำเมล็ดแต่ละประเภทมาวางบนกระดาษทิชชู่ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 10 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ประมาณ 5 - 7 วัน จากนั้นย้ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ เมื่อเชื้อเจริญ และสร้างสปอร์แล้ว แยกปลายเส้นใย (hyphal tip isolate) โดยเริ่มจากการเตรียมสปอร์แขวนลอย โดยใช้ cork borer เจาะบริเวณโคโลนีของเชื้อรามา 4 ชิ้น ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่า จากนั้นใช้ไปเปต ดูดสปอร์แขวนลอย ของเชื้อรา ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร water agar (WA) ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง นำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope แล้วใช้เข็มเขี่ย ตัดปลายเส้นใย เชื้อรา ย้ายลงบนอาหาร PDA จานใหม่ และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาลักษณะโคโลนี และโครงสร้างต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยการทำสไลด์กึ่งถาวรเพื่อตรวจสอบ ลักษณะก้านชูโคนิเดีย ลักษณะโคนิเดีย ได้แก่ สี รูปร่าง ขนาด จำนวนเซลล์ของโคนิเดีย

3. การเตรียมเส้นใยเชื้อราและการสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมสปอร์แขวนลอย โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อรา *S. oryzae* เจริญอยู่อายุ 14 – 21 วัน แล้วขูดบนผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่า เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง กรองเส้นใยด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (Lyophilization) เป็นเวลา 6 - 8 ชั่วโมง จากนั้นนำเส้นใยแห้งของ *S. oryzae* มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวเมื่อบดจนละเอียดเป็นผงแล้วเตรียมผงเส้นใยปริมาณ 0.5 กรัม เติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร (200 mM Tris HCl, pH 8.0, 250 mM EDTA และ 0.5% SDS) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม phenol และ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ เติม RnaseA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม chloroform: IAA 1 vol. ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ เติม 95 % ethanol ปริมาตร 2 เท่า แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 50 - 100 มิลลิลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) (ดัดแปลงวิธีมาจาก Zimand et al., 1994)

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา *S. oryzae* จำนวน 40 ไอโซเลต จากการสำรวจ และรวบรวมโดย วนิดา (2561) จำนวน 20 ไอโซเลตที่สำรวจ และเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2559 จากจังหวัด ขอนแก่น อุดรธานี

นครราชสีมา มหาสารคาม ชัยภูมิ และร้อยเอ็ด และนครปฐม ได้แก่ NPT0136, NPT0137, NPT0140, KKN0122, KKN0121, KKN0224, KKN0225, KKN0328, KKN0429, UDN0102, UDN0103, UDN0105, UDN0208, UDN0209, NMA0114, NMA0115, MKM0218, MKM0219, CPM0131 และ RET0120 และจากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าของข้าวในปีพ.ศ. 2562 – 2563 จากจังหวัดกาญจนบุรี ชัยนาท นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี อยุธยา ราชบุรี สิงห์บุรี สุพรรณบุรี และอ่างทอง จำนวน 20 ไอโซเลต ได้แก่ KRI0401, KRI0402, KRI0403, CNT0103, CNT0303, CNT0504, CNT0402, CNT0601, NBI0202, PTE0203, PTE0207, AYA0302, RBR0301, SBR0101, SBR0102, SPB0201, SPB0304, ATG0301, ATG0402 และ ATG0502 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนที่ซ้ำกัน (SSR) ด้วยไพรเมอร์ P7: GTT$(TCG)_5$, $(AGG)_5$, $(GTC)_5$, $(GTG)_5$ และ $(CAG)_5$ อย่างละ 10 pmole, 1xbuffer 2.5 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM และ 1.5 unit *Taq* DNA polymerase (Takara) โดยทำปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาแบบวนซ้ำที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อด้วยที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทั้งสิ้นจำนวน 37 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Williams et al., 1990) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle (Biometra รุ่น T-Gradient) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ DNA Ladder100s (ExcelBand™ DM2100) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard marker) และเติม gel star 0.1% ซึ่งทำการตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลบนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy system (NTSYSpc) version 2.20e (Rohlf, 1993) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) โดยวิธีของ Jaccard (Jaccard similarity coefficient) และจัดกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) แสดงผลการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ phylogenetic tree และวิเคราะห์หาค่า Bootstrap 1,000 ซ้ำด้วยโปรแกรม Win boot (Yap and Nelson, 1996)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุ และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าของข้าวในพื้นที่ภาคกลางได้แก่ จังหวัด กาญจนบุรี ชัยนาท นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ราชบุรี สิงห์บุรี สุพรรณบุรี และ อ่างทอง จำนวน 164 แปลงปลูก พบการเกิดโรคกาบใบเน่าในแปลงระหว่าง 1 – 75 % และความรุนแรงของโรคระหว่าง 1 – 65 % โดยมีจังหวัดที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุดคือ จังหวัดนนทบุรี และความรุนแรงของโรคมากที่สุดคือ จังหวัดอ่างทอง ซึ่งจะเห็นได้ว่า ทุกจังหวัดมีการระบาดของโรคกาบใบเน่าของข้าว แต่มีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค และระดับความรุนแรงของอาการโรคกาบใบเน่าของข้าวแตกต่างกัน จากการศึกษาก่อนหน้า วนิดา (2561) ที่ได้ทำการสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าของข้าวในแปลงนา จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทยพบว่า สามารถแยกและคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 20 ไอโซเลต ประกอบด้วย จังหวัด ขอนแก่น 6 ไอโซเลต อุดรธานี 5 ไอโซเลต นครราชสีมา 2 ไอโซเลต มหาสารคาม 2 ไอโซเลต ชัยภูมิ 1 ไอโซเลต ร้อยเอ็ด 1 ไอโซเลต และนครปฐม 3 ไอโซเลต โดยมีร้อยละการเกิดโรคกาบใบเน่าในแปลงอยู่ระหว่าง 1 – 50 % จากการแบ่งระดับความรุนแรงของอาการโรคกาบใบเน่าจากตัวอย่างที่สำรวจพบว่ามีความรุนแรงของโรคอยู่ระหว่าง 10 – 45.5 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค และระดับความรุนแรงของอาการโรคกาบใบเน่าของข้าวแตกต่างกัน

เมื่อเก็บตัวอย่างโรคกาบใบเน่าจากแหล่งปลูกข้าวทั้งหมดนี้สามารถแยกเชื้อราสาเหตุ *S. oryzae* ได้จำนวน 257 ไอโซเลต และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค แต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากส่วนของกาบหุ้มรวง เมล็ดที่มีอาการด่าง ทั้งเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และเมล็ดด้านในที่แกะเปลือกเมล็ดแล้ว มีลักษณะของโคโลนีเป็นสีชมพูอ่อนปนขาว และสีส้มอ่อนปนขาว โคนิเดียใสไม่มีสี มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ไม่มีผนังกั้นเป็นเซลล์เดียวมีขนาด 3.4 – 6 × 1.1 – 2.6 ไมโครเมตร ก้านชูโคนิเดียมี phialides แตกเป็นก้านๆ ออกมา ตรงบริเวณปลายมีลักษณะคล้ายปากแจกันสั้นๆ ในหนึ่งก้านสามารถผลิตโคนิเดียได้หนึ่งโคนิเดีย (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bigirimana et al. (2015) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพบว่าเชื้อรา *S.* oryzae เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีเป็นสีส้ม ก้านชูโคนิเดียแตกแขนง ได้โคนิเดียใสไม่มีสี เป็นรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน มีขนาด 4–7 × 1–2 ไมโครเมตร

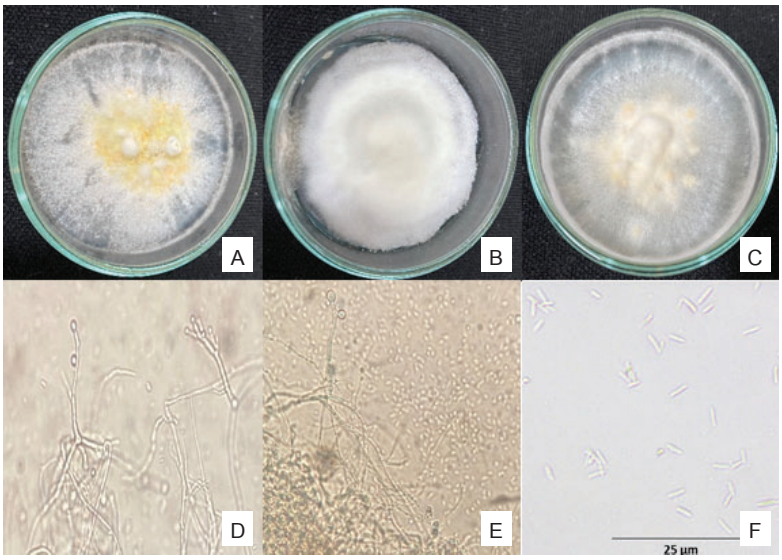

Figure 1 Morphological characteristics of *S. oryzae* A - C : colony on PDA, D -E : conidiophores and F : conidia

2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *S. oryzae* ด้วยเครื่องหมาย ISSR ในการศึกษาก่อนหน้านี้โดย วนิดา (2561) ได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) โดยเชื้อรา *S. oryzae* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ NPT0136 (S1) NPT0137 (S2) KKN0225 (S7) KKN0429 (S9) และ MKM0219 (S18) พบว่า 5 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ ได้แก่ $(GTG)_5$ $(GTC)_5$ $(CAG)_5$ GTT$(TCG)_5$ และ $(AGG)_5$ ให้จำนวนขนาดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างสูงสุด จากนั้นนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *S. oryzae* จำนวน 40 ไอโซเลต โดยมีเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ NPT0810 (C8) AYA07265 (C25) และ CMI08168 (C39) เป็นเชื้อราเปรียบเทียบ จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าเชื้อรา *S. oryzae* จำนวน 40 ไอโซเลต มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300-1,500 คู่เบสในแต่ละไพรเมอร์ (Figure 2) และจากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเครื่องหมายโมเลกุล พบว่าเชื้อรา *S. oryzae* เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมาวิเคราะห์เพื่อสร้าง phylogenetic tree (UPGMA) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม โดยเชื้อรา *S. oryzae* ทั้งสองภูมิภาค คือภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง มีไอโซเลตที่มาจากภูมิภาคเดียวกันรวมกลุ่มกัน เช่นในกลุ่มที่ 1 ไอโซเลตที่แยกได้มาจากภาคกลางเหมือนกัน และไอโซเลตที่มาจากต่าง

ภูมิภาคกันรวมอยู่กลุ่มเดียวกัน เช่นในกลุ่มที่ 3 มีทั้งไอโซเลตที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และไอโซเลตที่แยกได้จากภาคกลาง (Figure 3) แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *S. oryzae* ที่แยกได้นั้นมีความผันแปรและความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลส่วนหนึ่งในการเลือกเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคกาบใบเน่าของข้าว จากการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *S. oryzae* จำนวน 40 ไอโซเลต พบว่าในแต่ละพื้นที่พบจีโนไทป์ของเชื้อรา *S. oryzae* ได้มากกว่า 1 จีโนไทป์ เช่น จีโนไทป์ A3 ที่ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ P7: GTT$(TCG)_5$ สามารถตรวจพบได้ใน 6 จังหวัด ใน 2 ภาคของประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการกระจายตัวอยู่ในพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีการเคลื่อนย้ายหรือแพร่กระจายของสปอร์เชื้อรา *S. oryzae* จากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง โดยการนำเมล็ดพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกยังแหล่งต่างๆ นอกจากนี้เชื้อรามีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศทำให้มีการแพร่กระจายจีโนไทป์จากพื้นที่หนึ่งในอีกพื้นที่หนึ่งได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทิภาพร (2561) ที่ได้ทำการ วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ (race) ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวในประเทศไทย รวม 20 จังหวัด ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ $(GTC)_5$, $(GTG)_5$, P4: GCG$(CGA)_5$, P6: ATC$(CGA)_5$, $(CAG)_5$, $(AGG)_5$ และ P3: GTG$(CGA)_5$ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* โดยมีการกระจายตัวของจีโนไทป์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

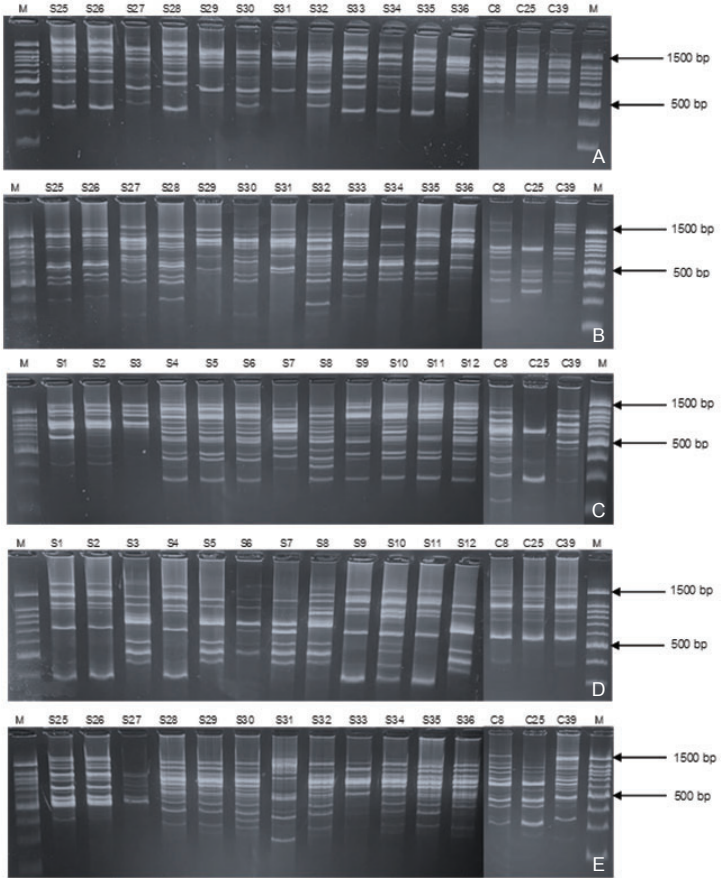

Figure 2 DNA fingerprint patterns of *S. oryzae* using ISSR technique with primers GTT$(TCG)_5$ (A) $(AGG)_5$ (B) $(GTC)_5$(C) $(GTG)_5$ (D) and $(CAG)_5$(E) on agarose gel electrophoresis.

Table 1 Genotypic data of *Sarocladium oryzae* generated by ISSR primers

Primer	Genotype (no. of isolate)
P7: GTT(TCG)$_5$	A1 (2), A2 (1), A3 (12), A4 (1), A5 (4), A6 (8), A7 (1), A8 (1), A9 (4), A10 (4), A11 (1), A12 (1)
(AGG)$_5$	B1 (3), B2 (1), B3 (3), B4 (11), B5 (1), B6 (1), B7 (3), B8 (1), B9 (5), B10 (7), B11 (2), B12 (1), B13 (1)
(GTC)$_5$	C1 (1), C2 (2), C3 (14), C4 (1), C5 (1), C6 (2), C7 (2), C8 (6), C9 (7), C10 (1), C11 (1), C12 (2)
(GTG)$_5$	D1 (4), D2 (1), D3 (18), D4 (1), D5 (2), D6 (2), D7 (1), D8 (3), D9 (8)
(CAG)$_5$	E1 (2), E2 (1), E3 (22), E4 (1), E5 (2), E6 (1), E7 (9), E8 (1), E9 (1)

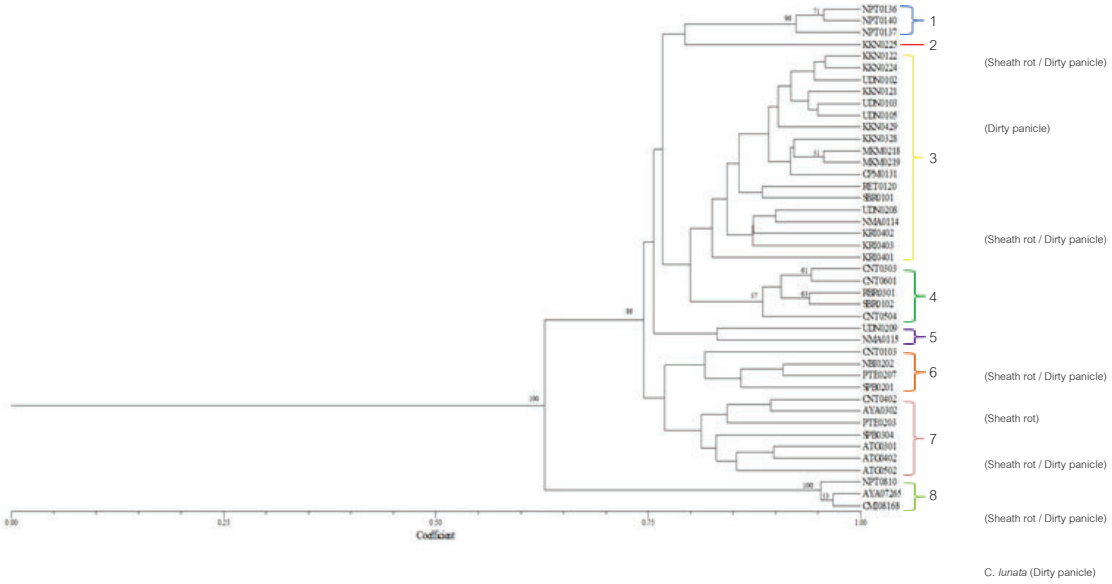

Figure 3 Phylogenetic tree derived from ISSR markers analysis of *S. oryzae* isolates from Northeastern and Central regions of Thailand.

สรุป

จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและการจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อรา *S. oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าของข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ (GTG)$_5$ (GTC)$_5$ (CAG)$_5$ GTT(TCG)$_5$ และ (AGG)$_5$ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *S. oryzae* ซึ่งมีการกระจายตัวของจีโนไทป์อยู่ในพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันของประเทศไทย โดยบางพื้นที่พบเชื้อรา *S. oryzae* มากกว่า 1 จีโนไทป์ และบางจีโนไทป์พบเฉพาะพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเท่านั้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *S. oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายในประชากร แต่มีบางสายพันธุ์ที่ยังคงมีความจำเพาะต่อพื้นที่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โครงการ P-18-51456 ที่สนับสนุนทุนในการศึกษา

เมล็ดพันธุ์ข้าว และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ ต่างๆ ตลอดจนพื้นที่สำหรับการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กวินธรรพ์ บุบผา เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ ศิริพร กออินทร์ศักดิ์ และจินตนา อันอาตม์งาม. 2559. การสำรวจโรคเมล็ดด่างข้าวที่เกิดจากเชื้อราและการพัฒนาวิธีการประเมินโรคในสภาพโรงเรือน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 47(3): 339-349.

ทิภาพร นวลเนตร. 2561. การศึกษาความต้านทานต่อโรคเมล็ดด่างข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 161 หน้า.

วนิดา ธรรมธุระสาร 2561. การศึกษาการก่อโรคของเชื้อรา *Sarocladium oryzae* สาเหตุโรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่างข้าว และการคัดเลือกแหล่งความต้านทานโรค วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 125 หน้า.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2563. สถิติส่งออกข้าว. แหล่งที่มา: http://www.thairiceexporters.or.th, 2 ตุลาคม 2563.

Ayyadurai N., Kirubakaran S. I., Srisha S., Sakthivel N. (2005). Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L.). Curr. Microbiol. 50 319–323. 10.1007/s00284-005-4509-6.

Bigirimana Vde, P., Hua, G. K., Nyamangyoku, O. I., & Hofte, M. (2015). Rice Sheath Rot: An Emerging Ubiquitous Destructive Disease Complex. *Front Plant Sci*, 6, 1066. doi:10.3389/fpls.2015.01066.

Gams, W. and D.L. Hawksworth. 1975. Identity of *Acrocylindrium oryzae* Sawada and a similar fungus causing sheath-rot of rice. Kavaka 3: 57-61.

Giraldo, A., J. Gené, D.A. Sutton, H. Madrid, G.S. de Hoog, J. Cano, C. Decock, P.W. Crous and J. Guarro. 2015. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales).Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 34: 10-24.

Lanoiselet, V., M. P. You, Y. P. Li, C. P. Wang, R. G. Shivas and M. J. Barbetti. 2012. First report of *Sarocladium oryzae* causing sheath rot on rice (*Oryza sativa*) in Western Australia. Plant Disease 96(9): 1382.

Mew, T. W., H. Leung, S. Savary, C. M. Vera Cruz and J. E. Leach. 2004. Looking ahead in rice disease research and management. Critical Reviews in Plant Sciences 23(2): 103-127.

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system. Exeter Software, New York. 206 p.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.L. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucl. Acids Res. 18: 6231- 6235.

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. Mycological Research 98: 531-534.