การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวในประเทศไทย

Assessment of Genetic Diversity of the Rice Dirty Panicle Fungus *Curvularia lunata* in Thailand

เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข[1] กวินธรรพ์ บุบผา[1] รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์[2] ศิริพร กออินทร์ศักดิ์[3] และ จินตนา อันอาตม์งาม[1]

Therdsak Sawatsuk[1], Kawinthun Bubpha[1], Ratsamee Dhitikiattipong[2], Siriporn Korinsak[3] and Jintana Unartngam[1*]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย

[3] หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] Bureau of Rice Research and Development, Rice Department, Ministry of agriculture and Cooperatives, Thailand

[3] Rice Gene Discovery, BIOTEC, NSTDA, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

รับเรื่อง: สิงหาคม 2559 Received: August 2016

รับตีพิมพ์: ธันวาคม 2559 Accepted: December 2016

* Corresponding author: agrjne@ku.ac.th

ABSTRACT: Rice dirty panicle disease decreases both the quality and quantity of rice production in Thailand. *Curvularia lunata* is one of six fungal pathogens involved in the disease and the main causal agent based on disease survey data. The survey and sampling of rice dirty panicle disease were conducted in northern, eastern, central and southern Thailand including 194 fields in 20 provinces. One hundred and twenty two isolates of *C. lunata* were detected which were divided in to seven groups based on morphological characteristics. Physiological race was screened on 15 differential varieties of rice. Thirty three races from 40 isolates were identified which were divided into six groups by the CANBERRA method and UPGMA clustering using the Numerical Taxonomy System (NTSYS) pc. version 2.20e. The genetic variability of *C. lunata* was assessed by AFLP markers using nine primer combinations. The 121 polymorphic bands observed were analyzed using Dice's similarity and UPGMA clustering method in NTSYS program. Eighteen isolates of *C. lunata* were separated into three groups with a 0.95 cophenetic correlation and a highly supportive bootstrap value. The results indicated that *C. lunata* causing rice dirty panicle disease in Thailand has a high diversity, which must be taken into consideration in assessing varietal resistance.

Keywords: *Curvularia lunata*, rice, dirty panicle disease, AFLP

บทคัดย่อ

โรคเมล็ดด่างข้าวเป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการผลิตข้าวของประเทศไทยเนื่องจากมีเชื้อราสาเหตุหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่มีการสำรวจพบมากที่สุด การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเมล็ดด่างของข้าวจากพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ 20 จังหวัด จำนวน 194 แปลง สามารถแยกเชื้อรา *C. lunata* ได้ 122 ไอโซเลท จัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้ 7 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ (physiological race) ของเชื้อรา *C. lunata* บนข้าวพันธุ์ทดสอบจำนวน 15 พันธุ์ ได้ 33 races เมื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและจัดกลุ่มโดยวิธี CANBERRA และ UPGMA สามารถจัดกลุ่ม races ของเชื้อรา *C. lunata* ได้ 6 กลุ่ม นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *C. lunata* ด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 121 แถบ และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี DICE และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 18 ไอโซเลท ได้ 3 กลุ่ม (cophenetic correlation 0.95) และมีค่า bootstrap มากกว่า 90% จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. lunata* มีความผันแปรและความหลากหลาย ดังนั้นการประเมินความต้านทานโรคของข้าวต่อเชื้อสาเหตุโรค ควรคำนึงถึงแหล่งที่มาของเชื้อที่จะนำมาทดสอบโรค

คำสำคัญ: *Curvularia lunata,* ข้าว, โรคเมล็ดด่าง, AFLP

บทนำ

โรคเมล็ดด่างข้าว (dirty panicle) เป็นโรคที่มีการระบาดได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย แสดงอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กไปจนถึงแผลดำขนาดใหญ่บนเปลือกของเมล็ด และพบอาการเมล็ดลีบร่วมด้วย ในพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงจะพบอาการเมล็ดด่างแผลดำขนาดใหญ่กระจายทั้งเมล็ดและระบาดเป็นบริเวณกว้าง เชื้อสาเหตุของโรคเมล็ดด่างเข้าทำลายตั้งแต่ช่วงที่ข้าวเริ่มตั้งท้อง และมีสภาพอากาศที่เหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝนมีการระบาดของโรคเมล็ดด่างมากกว่าฤดูอื่น ๆ ซึ่งสาเหตุของโรคเมล็ดด่างนั้นเกิดจากเชื้อราสาเหตุ 6 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata* (Wakk) Boed., *Cercospora oryzae* (I.Miyake), *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan), *Fusarium incarnatum* (Berk&Rav), *Trichoconis padwickii* (Ganguly) และ *Sarocladium oryzae* (Sawada) (Parkpian, 1979) จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเมล็ดด่างของข้าวจากพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากภาคกลาง 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 ทั้งหมด 194 แปลง และตรวจสอบเชื้อราบนเมล็ดด้วยวิธี Blotter พบเชื้อรา *F. incarnatum* 9.30% เชื้อรา *B. oryzae* 9.40% และเชื้อรา *C. lunata* ที่พบมากที่สุดถึง 43.43% โดยการสำรวจโรคเมล็ดด่างของข้าวพบว่า ในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงและการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน (Kawinthun, 2016) ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเชื้อรา ซึ่งมีปัจจัยสนับสนุนได้แก่ความหลากหลายของพันธุ์ข้าว การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราโดยเกษตรกร ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราด้วยข้อมูล

ทางสัณฐานวิทยา การก่อให้เกิดโรค และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล AFLP (amplified fragment length polymorphism) ซึ่งเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้นมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิด ได้แก่ ISSR, RFLP และ AFLP โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA polymorphic) ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (Weising *et al*., 1995) จากการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชมีประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ที่สามารถวางแผนการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างที่ได้รวบรวมไว้ไปทดสอบโรคและประเมินโรคเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อราและการแยกสปอร์เดี่ยว

จากการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าวจากภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ ของประเทศไทย ตรวจสอบเชื้อราบนเมล็ดโดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (blotter method) และแยกเชื้อราสาเหตุบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยนำเมล็ดไปล้างด้วย 10% Clorox เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อ 3 นาที แล้วนำเมล็ดไปบ่ม และแยกเชื้อราสาเหตุโดยทั้งสองวิธี แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสง near ultraviolet (NUV) ร่วมกับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope เมื่อได้เชื้อราสาเหตุทำการแยกสปอร์เดี่ยวโดยเตรียมสปอร์แขวนลอยโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ และดูดสปอร์แขวนลอย 100 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร WA (water agar) ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ 6–8 ชั่วโมง จึงนำมาตัดปลายเส้นใยภายใต้กล้อง stereo microscope และย้ายสปอร์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหาร PDA (Choi *et al*., 1999)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยว มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนี สีโคโลนี และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 20X และ 40X โดยการทำสไลด์กึ่งถาวร ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะก้านชูโคนิเดีย (conidiophores) ลักษณะโคนิเดีย (conidia) ได้แก่ สี รูปร่าง จำนวนเซลล์ของโคนิเดียซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละจีนัสและสปีชีส์ บันทึกข้อมูลลักษณะต่างๆ และวิเคราะห์จัดกลุ่มข้อมูลจากขนาดโคนิเดียของเชื้อราด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTSYS) pc. version 2.20e. (Rohlf, 1993) โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง/ความเหมือน (dissimilarity/similarity) ด้วยวิธี CANBERRA และจัดกลุ่มโดยวิธีการ UPGMA แสดงการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ Dendrogram

การจำแนก Physiological race ของเชื้อรา

เตรียมเชื้อรา *C. lunata* ทั้งหมด 40 ไอโซเลทที่รวบรวมได้จากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มปริมาณโดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน และนำมาเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 1×105 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปลูกเชื้อรา *C. lunata* ลงบนข้าว 15 พันธุ์ ได้แก่ กข9 กข31 กข49 น้ำสะกุย 19 41 พวงเตี้ย 41 พวงสูง KDML 105 ชัยนาท 1 IR 72 IR 29 สังข์หยดพัทลุงดอสามเดือน YANDON ARC 10550 และพันธุ์ IR 62266 ที่เตรียมไว้ภายใต้สภาพโรงเรือนในระยะข้าวตั้ง

ท้องโดยหยอดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ความเข้มข้น 105 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงไปในช่อดอกของข้าวที่กำลังตั้งท้อง บ่มเชื้อไว้ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินโรคเมล็ดด่างที่เกิดขึ้น 3, 5, 7, 10, 14 และ 21 วันภายหลังจากปลูกเชื้อรา โดยประเมินอาการบนเมล็ดข้าว แบ่งระดับอาการเป็น 6 ระดับ ดังนี้ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค ระดับ 1 แสดงอาการแผลจุดขนาดเล็กกว่า 0.1 มิลลิเมตร ระดับ 2 แสดงอาการแผลจุดขนาดใหญ่กว่า 0.1 มิลลิเมตร ระดับ 3 แสดงอาการแผลดำใหญ่น้อยกว่า 50% ของพื้นที่เมล็ด ระดับ 4 แสดงอาการแผลดำขนาดใหญ่ 50-75% ของพื้นที่เมล็ดหรือเมล็ดลีบ และระดับ 5 แสดงอาการดำขนาดใหญ่กว่า 75% ของพื้นที่เมล็ด และวิเคราะห์จัดกลุ่มข้อมูลจากระดับอาการของโรคเมล็ดด่างด้วยโปรแกรม NTSYS หาค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง/ความเหมือน (dissimilarity/similarity coefficient) ด้วยวิธี CANBERRA และจัดกลุ่มโดยวิธีการ UPGMA แสดงการจัดกลุ่มออกมาในรูปของ Dendrogram

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา

การเตรียมเส้นใยแห้งและการสกัดดีเอ็นเอ เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ แล้วขูดผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้พร้อมเขย่าเป็นเวลา 10–12 ชั่วโมง ทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่อง vacuum pump และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 6–8 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการสกัดดีเอ็นเอนำเส้นใยแห้งมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม extraction buffer 500 ไมโครลิตร (200 mMTris HCL, pH 8.0; 250 mM EDTA และ 0.5% SDS) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วสกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้ phenol และ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform:IAA อัตราส่วน 1 vol. ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติม ethanol 2 vol. แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 50–100 มิลลิลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mMTris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA) โดยดัดแปลงวิธีมาจาก Zimand *et al.* (1994)

PCR-AFLP

นำดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. lunata* มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Eco*RI (5 units), *Mse*I (5 units), Buffer (1X), genomic DNA (500 ng) จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย *Eco*RI adapter (5 pmole), *Mse*I adapter (50 pmole), T4 DNA ligase (1 U), ATP (1 mM), buffer T4 DNA ligase (1X) โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR ต่อไป (Vos and Kuiper, 1997)

*Eco*RI adapter CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA

*Mse*I adapter GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT

จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อด้วย adapter ในขั้นต้นมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอน pre–selective amplification (digestion/ligation) DNA (10X), PCR buffer (1X), dNTP (0.2 mM), primer *Eco*RI+1 (5 pmole), MseI+1 (5 pmole), $MgCl_2$ (2.5 mM), Taq polymerase (0.5 U) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ *Eco*RI primer 5'–GACTGCGTACC AATTC / *MseI* primer 5'–GATGAGTCCTGAG, *Eco*RI primer / *Eco*RI primer และ *MseI* primer/ *MseI* primer เพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplification โดยใช้ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในขั้นตอน pre–amplification เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาในขั้นตอน selective–amplification โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1-2 เบส ในการคัดเลือกไพรเมอร์จะใช้คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบเช่นเดียวกับขั้นตอน pre–selective amplification คือ *Eco*RI primer NNN–3'/ *MseI* primer+NNN-3', *Eco*RI primer+NNN–3'/ *Eco*RI+NNN-3' และ *MseI* primer+NNN–3'/ *MseI* primer+NNN-3'combinations (5 pmol) $MgCl_2$ (2.5 mM), dNTP (0.2 mM), PCR buffer (1X), Taq polymerase (0.5 U) ทำปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 1 รอบของ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปรับให้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลดลง 1 องศาเซลเซียส ในทุก ๆ รอบจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบ (Vos and Kuiper, 1997) และทำการย้อมแถบ DNA โดยวิธี silver staining บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ NTSYS และวิเคราะห์ค่า bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกเชื้อรา *C. lunata* ได้ 122 ไอโซเลท จากตัวอย่างเมล็ดด่างที่ได้จากพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย จำนวน 20 จังหวัด ทั้งหมด 194 แปลง พบว่า เชื้อรา *C. lunata* มีโคโลนีสีเข้ม ก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) สีน้ำตาล โคนิเดียรูปร่าง boat shape มี 4 เซลล์ โดยเซลล์หัวท้ายใสไม่มีสี สองเซลล์ตรงกลางขนาดใหญ่สีน้ำตาลเข้ม ขนาดประมาณ 16–25 × 8–12 ไมโครเมตร (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Alex *et al*. (2013) ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. lunata* ที่แยกจากตัวอย่างพืช และดิน พบว่าเชื้อรา *C. lunata* มีโคโลนีเริ่มต้นเป็นสีเทาและกลายเป็นสีดำเมื่อเจริญเต็มที่ เส้นใยฟูและนุ่ม เมื่อตรวจสอบภายใต้ กล้องจุลทรรศน์พบว่า ก้านชูโคนิเดียสีเข้ม โคนิเดียมี 4 เซลล์ ขนาดประมาณ 21–31×8.5–12 ไมโครเมตร โดยสองเซลล์ตรงกลางมีสีน้ำตาลเข้มขนาดใหญ่ เซลล์หัวท้ายใส ไม่มีสีจากนั้นเมื่อจัดกลุ่มข้อมูลจากขนาดโคนิเดียของเชื้อรา *C. lunata* 40 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวแทนจากแต่ละภาคด้วยโปรแกรม NTSYS โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง/ความเหมือน (dissimilarity/similarity quantity) ด้วยวิธี CANBERRA และ จัดกลุ่มโดยวิธีการ UPGMA ที่ค่าความเหมือน 90% พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้เป็น

7 กลุ่ม (Figure 2) โดยกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 10 ไอโซเลท ประกอบด้วย CNT0301, NPT0810, CRI0171, NPT0107, SPB0627, CRI0376, SPB0223, KPT02177, PTE02263 และ KRI08117 กลุ่มที่ 2 มีทั้งหมด 13 ไอโซเลท ประกอบด้วย CNT0502, ATG0539, PCT0650, STI0464, RBR01120, NRT0599, NRT07101, SBR0215, PCT0952, RBR05123, PCT0447, CMI08168 และ ATG0337 กลุ่มที่ 3 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วย NSN0142, PLK0154 และ SKA09132 กลุ่มที่ 4 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วย SBR0416, CMI01161 และ PLK0458 กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย PLG04106, PTE01262 และ KRI01115 กลุ่มที่ 6 มีทั้งหมด 7 ไอโซเลท ประกอบด้วย STI0666, PLG07111, SKA02127, AYA02264, LPG02137, KPT02176 และ AYA07265 และกลุ่มที่ 7 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท คือ LPG05134 จากการจัดกลุ่มพบว่าความหลากหลายของเชื้อรา *C. lunata* มีความหลากหลายสูง บางกลุ่มพบเชื้อรา *C. lunata* จากแหล่งที่มาต่างกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น ในกลุ่มที่ 2 พบว่ามีไอโซเลทจากทั้งภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

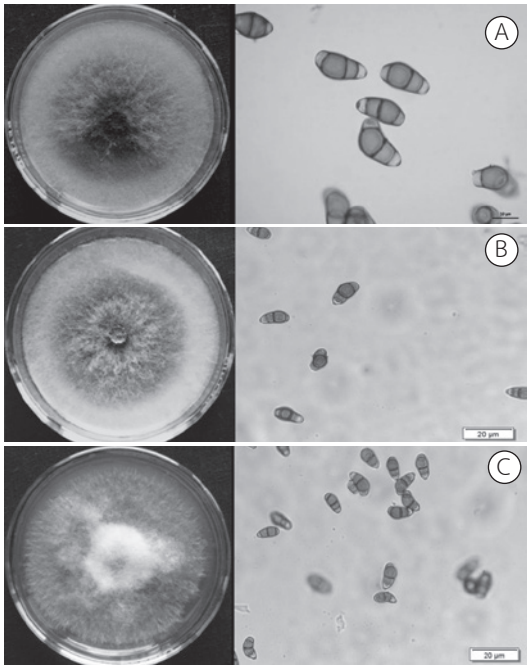

Figure 1 Colony on PDA 7 days and conidia characteristics of *Curvularia lunata* causing rice dirty panicle disease isolate CNT0806 (A) PLK0154 (B) and NPT1012 (C) (Bar: 10 µm)

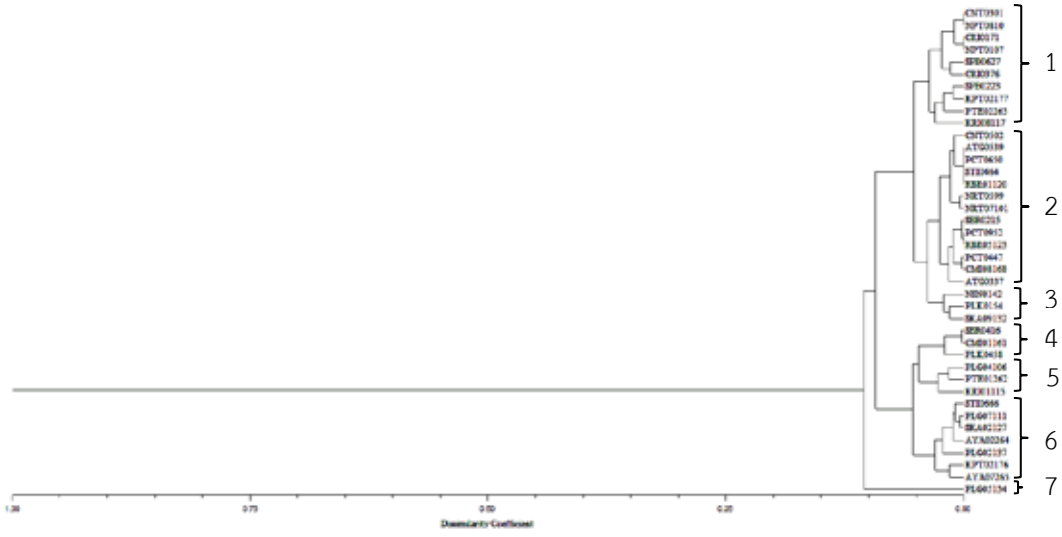

Figure 2 Dendrogram obtained from morphological observation of *Curvularia lunata* 40 isolates causing rice dirty panicle disease

การจำแนก Physiological race ของเชื้อรา

การจัดจำแนกการก่อให้เกิดโรค (physiological race) ของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 40 ไอโซเลท ที่เป็นไอโซเลทชุดเดียวกับที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยปลูกเชื้อราลงบนข้าวพันธุ์ทดสอบ 15 พันธุ์ พบว่า สามารถจำแนกได้เป็น 33 (สายพันธุ์) races ตามลักษณะการตอบสนองของข้าวหรืออาการของโรคระดับต่าง ๆ บนพันธุ์ทดสอบซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. lunata* มีความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งสามารถก่อโรคและทำให้พืชแสดงอาการที่ระดับรุนแรงได้แตกต่างกันหลายลักษณะ และบาง race พบว่ามีเชื้อราที่ต่างแหล่งที่มาแต่จัดอยู่ใน race เดียวกัน เช่น race22 ประกอบด้วยไอโซเลท PLG07111 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดพัทลุง และไอโซเลท KPT02177 ตัวอย่างจากจังหวัดกำแพงเพชร และเมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มข้อมูลของทั้ง 33 races ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง/ความเหมือน (coefficient) ด้วยวิธี CANBERRA และจัดกลุ่มโดยวิธีการ UPGMA สามารถจัดกลุ่มของ race ได้เป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 5 races ได้แก่ races1, race8, race13, race22 และ race30 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัด ชัยนาท นครสวรรค์ พิษณุโลก และกำแพงเพชร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 races ได้แก่ race3 และ race4 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม และสิงห์บุรี กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 1 race ได้แก่ race25 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 12 races ได้แก่ race2, race17, race18, race5, race26, race27, race16, race33, race9, race 31, race14 และ race15 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม สิงห์บุรี อ่างทอง พิษณุโลก เชียงราย สงขลา ลำปาง ปทุมธานี และพระนครศรีอยุธยา กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 7 races ได้แก่ race6, race10, race11, race28, race23, race7 และ race12 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสุพรรณบุรี นครสวรรค์ พิจิตร ราชบุรี และกาญจนบุรี กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 6 races ได้แก่ race20, race2, race29, rac19, race24 และ race32 โดยกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสุพรรณบุรี นครศรีธรรมราช พัทลุง กาญจนบุรี เชียงใหม่ และพระนครศรีอยุธยา จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. lunata* มีความหลากหลาย สามารถแบ่งระดับสายพันธุ์ได้จำนวนหลายกลุ่ม และภายในกลุ่มประกอบด้วยเชื้อที่มาจากแหล่งต่าง ๆ (Figure 3; Table 1) จากผลการศึกษาการก่อให้เกิดโรคอื่น ๆ ของ เชื้อราในข้าว Nawarat and Nonglak (2014) ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและจัดกลุ่มปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวบนข้าวพันธุ์ทดสอบด้วยโปรแกรม NTSYS เพื่อสร้างแผนภาพความหลากหลายของความรุนแรงของเชื้อรา *P. grisea* ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย พบว่า สามารถแยกความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ จำนวน 57 ไอโซเลท กับ พันธุ์ข้าวทดสอบทั้งหมด 25 พันธุ์ แยกได้เป็น 14 pathotypes จากการจัดกลุ่มพบว่า เชื้อราที่มีดัชนีความรุนแรงและลักษณะการก่อโรคใกล้เคียงกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกันจะมีดัชนีความรุนแรงใกล้เคียงกันอีกด้วย

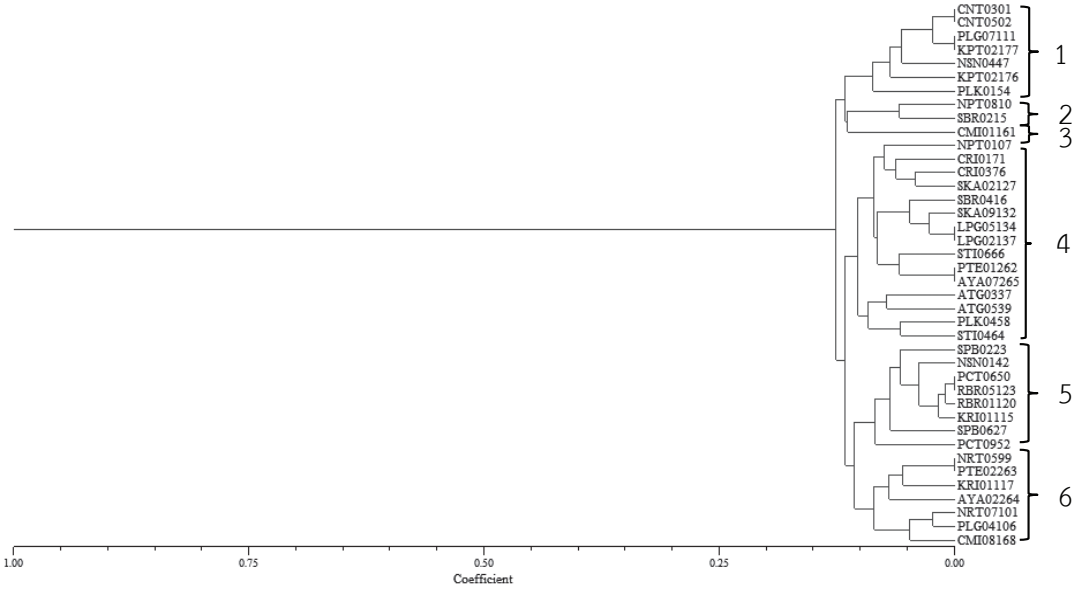

Figure 3 Dendrogram obtained from physiological race identification of *Curvularia lunata* 40 isolates causing rice dirty panicle disease

Table 1 Physiological races of *Curvularia lunata* causing rice dirty panicle disease on 15 differential varieties of rice

Group	Races (Isolate No.)
1	race1 (CNT0301, CNT0502) race8 (NSN0447) race13 (PLK0154) race22 (PLG07111, KPT02177) race30 (KPT02176)
2	race3 (NPT0810) race4 (SBR0215)
3	race25 (CMI01161)
4	race2 (NPT0107) race5 (SBR0416) race9 (ATG0539) race14 (PLK0458) race15 (STI0464) race16 (STI0666) race17 (CRI0171) race18 (CRI0376, SKA02127) race26 (SKA09132) race27 (LPG05134, LPG02137) race31 (ATG0337) race33 (PTE01262, AYA07265)
5	race6 (SPB0223) race7 (SPB0627) race10 (NSN0142) race11 (PCT0650, RBR05123) race12 (PCT0952) race23 (KRI01115) race28 (RBR01120)
6	race19 (PTE02263, NRT0599) race20 (NRT07101) race21 (PLG04106) race24 (KRI01117) race29 (CMI08168) race32 (AYA02264)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย AFLP

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ของเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 18 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 9 คู่ ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกมา พบว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง ทั้งหมด 121 แถบดีเอ็นเอ เมื่อนำข้อมูล binary data (0/1) มาวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree โดยการหาค่า similarity ด้วยวิธี DICE และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยมีเชื้อรา Fusarium verticillioides และ *F. oxysporum* เป็น out group ซึ่งพบว่า ตัวอย่าง เชื้อรา *C. lunata* ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ สามารถแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท CNT0502 (ชัยนาท) NRT0599 (นครศรีธรรมราช) PCT0952 และ PCT0650 (พิจิตร) CRI1297 และ CRI0757 (เชียงราย) SKA09132 (สงขลา) NPT0502, NPT10121 และ NPT0107 (นครปฐม) SPB0224 และ SPB0426 (สุพรรณบุรี) PLG04106 (พัทลุง) และ NSN0142 (นครสวรรค์) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท KRI01115 (กาญจนบุรี) SPB0223 (สุพรรณบุรี) และ ATG0234 (อ่างทอง) ส่วนกลุ่มที่ 3 พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวคือ RBR01120 (ราชบุรี) โดยมีค่า bootstrap มากกว่า 90% เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลในการจัดกลุ่ม (matrix correlation) ได้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.95 จากการจัดกลุ่มการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า ในแต่ละกลุ่มนั้นรวมตัวอย่างที่แยกมาจากต่างพื้นกันหรือการจัดกลุ่มไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อ (Figure 6) เช่นเดียวกับ Mohmed *et al*. (2003) ได้ใช้การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย AFLP สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ภายในประชากรและระหว่างประชากรของเชื้อรา *Fusarium* spp. 4 สปีชีส์ ได้แก่ *F. oxysporum*, *F. solani, F. moniliforme* และ *F. semitectum* ที่แยกจากแหล่งต่างๆ ในประเทศอียิปต์ ผลการศึกษาพบว่า เครื่องหมาย AFLP สามารถจัดกลุ่มประชากรเชื้อราได้ 5 กลุ่ม โดยไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อและจีโทไทป์ของพืชอาศัย นอกจากนี้ Benjapon (2015) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium* spp. 6 สปีชีส์ ได้แก่ *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. verticerticilliodes*, *F. proliferatum* และ *F. semitectum* โดยใช้เครื่องหมาย ISSR และเครื่องหมาย AFLP พบว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกจากโรคและพืชอาศัยต่างกัน มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเกิดขึ้นจำนวนมากระหว่างไอโซเลท และมีความหลากหลายสูงเมื่อเทียบกับ *Fusarium* spp. ชนิดอื่น ๆ ซึ่งข้อมูลในส่วนนี้สนับสนุนได้ว่าเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกมาจากพืชอาศัยที่ต่างกันและก่อให้เกิดโรคต่างกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย

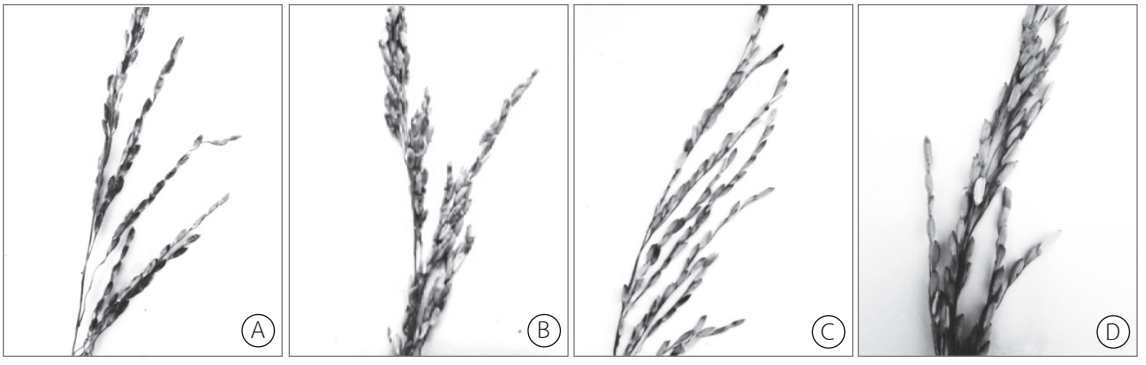

Figure 4 Disease severity of rice dirty panicle caused by *Curvularia lunat*a on different varieties of rice (race 13) level 5 (A) level 4 (B) level 3 (C) and level 2 (D)

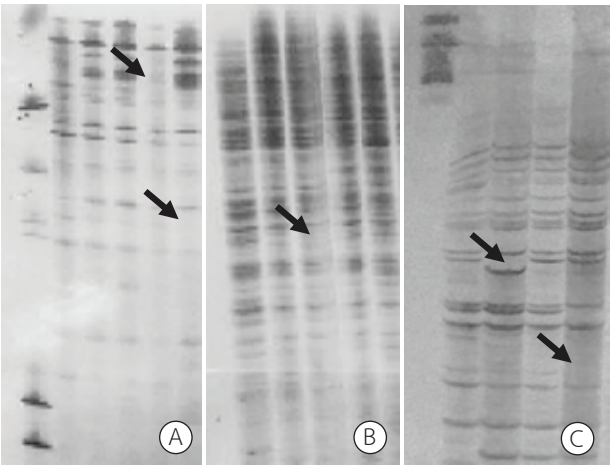

Figure 5 AFLP fingerprinting profile of *Curvularia lunata* generated by using primer combinations *Eco*RI+AC/*Eco*RI+G (A) *Mse*I+C/ *Mse*I+GTA (B) *Eco*RI+ACG/ *Mse*I+C (C)

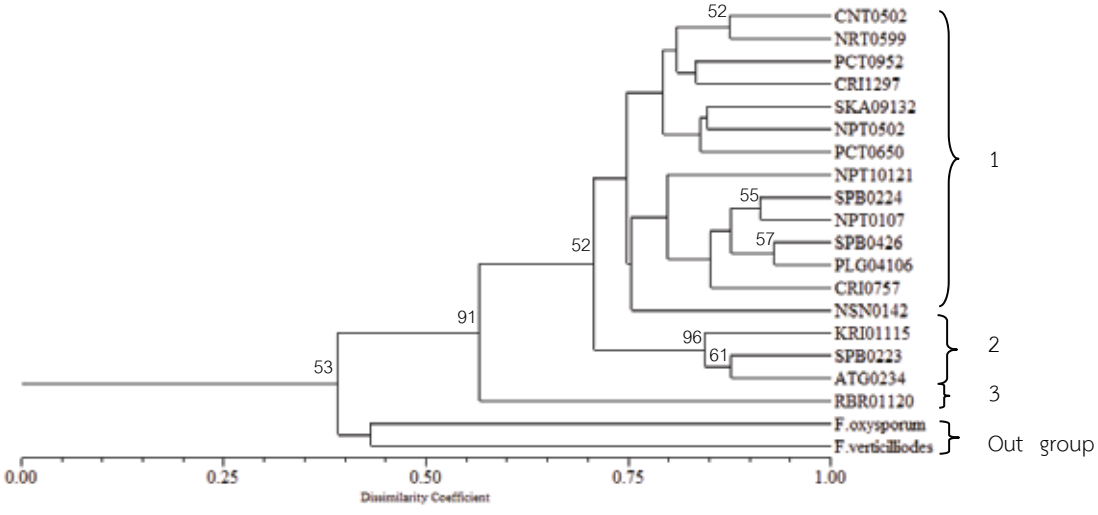

Figure 6 UPGMA tree obtained from AFLP fingerprint analysis of *Curvularia lunata* isolates using Dice and UPGMA clustering method in NTSYS program. The numbers on branch indicated the bootstrap value (1,000 replications)

สรุป

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเมล็ดด่างของข้าวจากพื้นที่เพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยสามารถแยกเชื้อรา *C. lunata* โดยอาศัยขนาดโคนิเดียได้ 7 กลุ่มโคนิเดียมีขนาดประมาณ 16–25 × 8–12 ไมโครเมตร มี 4 เซลล์ จัดจำแนก physiological race ได้ 33 race แบ่งกลุ่มของ races ได้ 6 กลุ่มและวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย AFLP พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 121 แถบ และสามารถจัดกลุ่ม เชื้อรา *C. lunata* ได้เป็น 3 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา การก่อให้เกิดโรคบนข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *C. lunata* มีความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรหรือระหว่างประชากร ดังนั้น การนำเชื้อรา *C. lunata* ที่รวบรวบไว้ ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทาน ควรคำนึงถึงแหล่งที่มาของเชื้อราสาเหตุและประชากรของเชื้อรา

กิตติกรรมประกาศ

ผลการวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ขอขอบคุณปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว กรมการข้าว ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐมที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Alex, D, D. Li, R. Calderone and S.M. Peters. 2013. Identification of *Curvularia lunata* by polymerase chain reaction in a case of fungal endophthalmitis. Medstar Georgetown University Hospital, Washington DC 20007, USA.

Benjapon, S. 2015. Genetic Relationships of Fusarium Species Based on Morphological Characteristics and and Molecular Data. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Choi, Y.W., K.D. Hyde and W.H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Divers. 3: 29–38.

Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131(2): 479–491.

Karen, K., N. Stephen, W. Peterson and Shung-Chang Jong. 2004. Biodiversity Fungi Inventory and Monitiring Methods. ISBN: 0–12509551–1.

Kawinthun, B. 2016. Physiological Races Identification of Rice Dirty Panicle Fungi and Disease Assessment on Different Rice Varieties. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Mohmed, A., S. Mohmed, I.N. Mohmed I, A. Kamel and A. Joseph 2003. Molecular phylogeny of Fusarium species by AFLP fingerprint. Afr. J. Biotechnol. 2(3): 51–55.

Nawarat, J. and P. Nonglak. 2014. Disease Assessment and Cluster Analysis of Rice Blast Fungus Collected in Thailand. *In* Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Plants. February 4–7. (in Thai)

Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. Center for Demographic and Population Genetics, University of Texas at Houston, Texas, USA.

Parkpian, A., S. Arunee, S. Wichit, N. Nopporn and P. Kanjana 1979. Studies on rice seed discoloration disease. *In* Research Report in 1979. Plant Pathology and Microbiology Division. Department of Agriculture, Bangkok. (In Thai)

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS–pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York, USA.

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

Weising, K., N. Hilde, W. Kirsten and M. Wieland 1995. DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. Boca Raton, Florida, USA.

Yap, I.V. and R.J. Nelson. 1996 Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Se-ries No. 14. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.

Zimand, G., L. Valinsky and Y. Elad. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycol. Res. 98: 531–534.