เทคนิคอย่างง่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าว

A Simple Technique for Inducing Sporulation of *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker Caused Brown Spot of Rice

พยอม โคเบลลี่[1)] ศุภลักษณา สนคงนอก[1)] ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี[2)] เมธวดี เดชหาญ[1)] พิชามญชุ์ พัฒรักษ์[1)]

Payorm Cobelli[1)] Suphalaksana Sonkhongnok[1)] Teerada Wangsomboondee[2)]

Methawadee Dejhan[1)] Phichamon Pattarak[1)]

Abstract

Brown spot of rice caused by the fungus *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker used to be considered as a minor disease in Thailand. Nowadays, it becomes a major disease of rice, due to climate change and cultivation practices. Spore morphologies are a major character for fungal taxonomy and spore inoculation is the most effective method for screening of varietal resistance to brown leaf spot. However, several research articles have reported that *B. oryzae* failed to sporulation on artificial and natural media. The spore inducing method for *B. oryzae* needs selective media with complicated environments. Therefore, it is necessary to develop a new and simple method to induce sporulation of *B. oryzae.* The aim of this research was to develop a new and simple method for inducing sporulation of *B. oryzae* for further study of morphology and screening rice varieties for resistance to brown spot disease. Two media, commercial rabbit food agar (CRFA) and potato dextrose agar (PDA) with simple and optimum environmental conditions (room temperature) were tested for inducing sporulation of five isolates of *B. oryzae*. The result revealed that PDA induced spore production 6-12 times higher than CRFA. The simple and optimum environmental condition for spore induction was the cycle of 12 hours of fluorescent light at 25±1 °C followed by 12 hours of complete darkness at 28±1 °C for five days. Then first hot scraping treatment of the mycelium culture surface with red-hot bent needle in four directions to form a fine square grid pattern was performed following by incubation at the simple and optimum environmental condition for three to four days. If the spore were not inducing at first hot scraping, then another hot scraping needed to be repeated. We found that two times hot scraping could induce spore in all isolates.

Keywords: rice, brown spot disease, inducing sporulation, *Bipolaris oryzae*

บทคัดย่อ

โรคใบจุดสีน้ำตาลสาเหตุจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker ในอดีตจัดเป็นโรคข้าวที่ไม่มีความสำคัญในประเทศไทย ปัจจุบันจัดเป็นโรคข้าวที่สำคัญโรคหนึ่ง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและวิธีการปลูกข้าว สัณฐานวิทยาของสปอร์เป็นลักษณะหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา และวิธีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล อย่างไรก็ตาม มีหลายผลงานวิจัยรายงานว่าเชื้อรา *B. oryzae* ไม่สร้างสปอร์บนอาหารสังเคราะห์และอาหารธรรมชาติ วิธีการกระตุ้น การสร้างสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ ต้องใช้อาหารเฉพาะและสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ค่อนข้างยุ่งยาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา

Received: January 20, 2023/ Revised: April 21, 2023/ Accepted: April 25, 2023

[1)] กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพ 10900 โทร. 0-2579-7892

Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-7892

[2)] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-5476

Departments of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330 Tel. 0-2218-5476

วิธีการใหม่และง่ายเพื่อการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลโดยทดสอบบนอาหาร 2 สูตร คือ commercial rabbit food agar (CRFA) และ potato dextrose agar (PDA) ภายใต้สภาวะแวดล้อมในการบ่มเชื้อที่ง่ายและเหมาะสมในการทดสอบการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. oryzae* จำนวน 5 ไอโซเลท ผลการทดสอบพบว่า อาหารสูตร PDA กระตุ้นการสร้างสปอร์ได้มากกว่าสูตร CRFA 6-12 เท่า ส่วนสภาวะแวดล้อมที่ง่ายและเหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างสปอร์คือการบ่มเชื้อต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาขูดเส้นใยที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมที่เผาจนร้อนแดงให้เป็นลายตารางละเอียด 4 ทิศทาง จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในแต่ละทิศทางที่ทำการขูดเส้นใย ทำการเผาเข็มปลายแหลมให้ร้อนแดงทุกครั้ง และบ่มเชื้อภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ง่ายและเหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างสปอร์เป็นเวลา 3-4 วัน และการขูดเชื้อจำนวน 2 ครั้ง พบว่า มีการสร้างสปอร์ในทุกไอโซเลท

คำสำคัญ: ข้าว โรคใบจุดสีน้ำตาล การกระตุ้นการสร้างสปอร์ เชื้อ *Bipolaris oryzae*

คำนำ

โรคใบจุดสีน้ำตาล เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (syns. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan) หรือ *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เชื้อราเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง ในระยะกล้า พบแผลจุดกลมขนาดเล็กสีน้ำตาล ซึ่งอาจขึ้นรอบเยื่อหุ้มต้นอ่อน และเป็นสาเหตุทำให้ใบแรกและใบที่ 2 ของต้นกล้าข้าวบิดเบี้ยว และบางครั้งอาจพบว่าทำให้รากของต้นกล้ามีสีดำ ต้นกล้าแคระแกร็นและตายในที่สุด

ส่วนลักษณะอาการบนใบข้าวในระยะแตกกอถึงระยะออกรวงพบแผลที่ใบข้าวมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลกลมหรือรูปไข่ ขอบแผลมีสีเหลือง เชื้อราอาจเข้าทำลายเมล็ด ทำให้เมล็ดข้าวแสดงอาการเมล็ดด่าง เมล็ดข้าวมีจุดสีน้ำตาลปนดำ น้ำหนักเบาและเสื่อมคุณภาพ เมื่อนำไปสีเมล็ดข้าวสารจะหักง่าย

นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลสามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne pathogen) และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด (seed transmission) ซึ่งจะทำลายต้นอ่อนหรือแพร่ไปยังต้นอื่น เชื้อเข้าทำลายผิวเมล็ดแล้วก่อให้เกิดอาการแผลไหม้ในเมล็ดข้าว (Ba and Sangchote, 2006)

ส่วนใหญ่พบการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลในพื้นที่นาที่ขาดน้ำและธาตุไนโตรเจน (Barnwal *et al*., 2013) จึงนิยมเรียกโรคใบจุดสีน้ำตาลว่า โรคคนจน หรือ “poor man’s disease”

พบรายงานการระบาดครั้งแรกของโรคใบจุดสีน้ำตาลที่ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ. 1900 หรือ ปี พ.ศ. 2443 ต่อมาพบรายงานการระบาดทั่วโลกพื้นที่ที่มีการปลูกข้าว เช่น ประเทศญี่ปุ่น จีน พม่า ศรีลังกา บังคลาเทศ อิหร่าน แอฟริกา อเมริกาใต้ รัสเซีย อเมริกาเหนือ ฟิลิปปินส์ ซาอุดิอาระเบีย ออสเตรเลีย มาเลเซีย ไทย อินเดีย เป็นต้น (Gangopadhyay, 1983; Khalili *et al*., 2012; Ou, 1985) ในประเทศอินเดียโรคใบจุดสีน้ำตาลทำให้ผลผลิตเสียหายสูงถึงร้อยละ 90

ส่วนในประเทศไทยพบรายงานการระบาดทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อปี พ.ศ. 2520 พบการระบาดของโรครุนแรงในจังหวัดอุบลราชธานี ทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้ ผลผลิตข้าวเสียหายเกือบร้อยละ 100 (Rice Research Institute, 1996) ในภาคกลางพบการระบาดเป็นประจำในจังหวัดนครนายกและปราจีนบุรี (Disthaporn, 1989) และจากการศึกษาของ Janlapha *et al*. (2014) พบการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวฉะเชิงเทราที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2554-2556 พบการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งออกรวง

ปัจจุบัน มีการปลูกข้าวพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล ประกอบกับสภาพอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ

ราสาเหตุโรค ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลรุนแรงและมีพื้นที่ระบาดขยายเพิ่มขึ้น ทั้งในนิเวศนาน้ำฝน และนาชลประทานในเขตภาคกลาง จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องหาวิธีการบริหารจัดการโรคใบจุดสีน้ำตาล ซึ่งการใช้พันธุ์ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล น่าจะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งนอกจากจะลดมลภาวะเนื่องจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแล้ว ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการยอมรับของเกษตรกรที่จะนำพันธุ์ต้านทานไปปลูกอีกด้วย

มีรายงานว่า เชื้อรา *B. oryzae* ไม่สร้างสปอร์บนอาหารสังเคราะห์และอาหารธรรมชาติภายใต้สภาพแวดล้อมและสารอาหารที่แตกต่าง (Hau and Rush, 1980; Leach, 1961; Sunder *et al*., 2014) และเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหารเฉพาะ commercial rabbit food agar (CRFA) ภายใต้สภาวะแวดล้อมเหมาะสมที่ค่อนข้างยุ่งยาก คือ การบ่มเชื้อต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างจากแสงแบล็กไลต์ (black light) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 15 วัน (Hau and Rush, 1980) นอกจากนี้มีรายงานว่า การขูดผิวเส้นใยเชื้อรา *Alternaria solani* ช่วยกระตุ้นการสร้างสปอร์ได้มากกว่าการไม่ขูด ถึง 3 เท่า โดยขนาดของสปอร์ยังคงใกล้เคียงกับวิธีการที่ไม่ขูดเส้นใย (Singh, 1967)

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการใหม่และง่ายในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* โดยการใช้แสงและการขูดเส้นใย สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลและเป็นแหล่งข้อมูลพันธุกรรมต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลข้าว ให้นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ ประเมิน บันทึก และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของข้าว

สำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลในสภาพแปลงนาข้าว (systematic survey) จังหวัดกาญจนบุรี โดยบันทึกข้อมูลเกษตรกร พันธุ์ข้าว สถานที่สำรวจ (พร้อมทั้งบันทึก พิกัด GPS เครื่องกำหนดตำแหน่งบนพื้นโลก (GPS)) วัน เดือน ปี ที่สำรวจ การระบาดของโรคต่อพื้นที่ (% disease incidence) หากตรวจพบการ

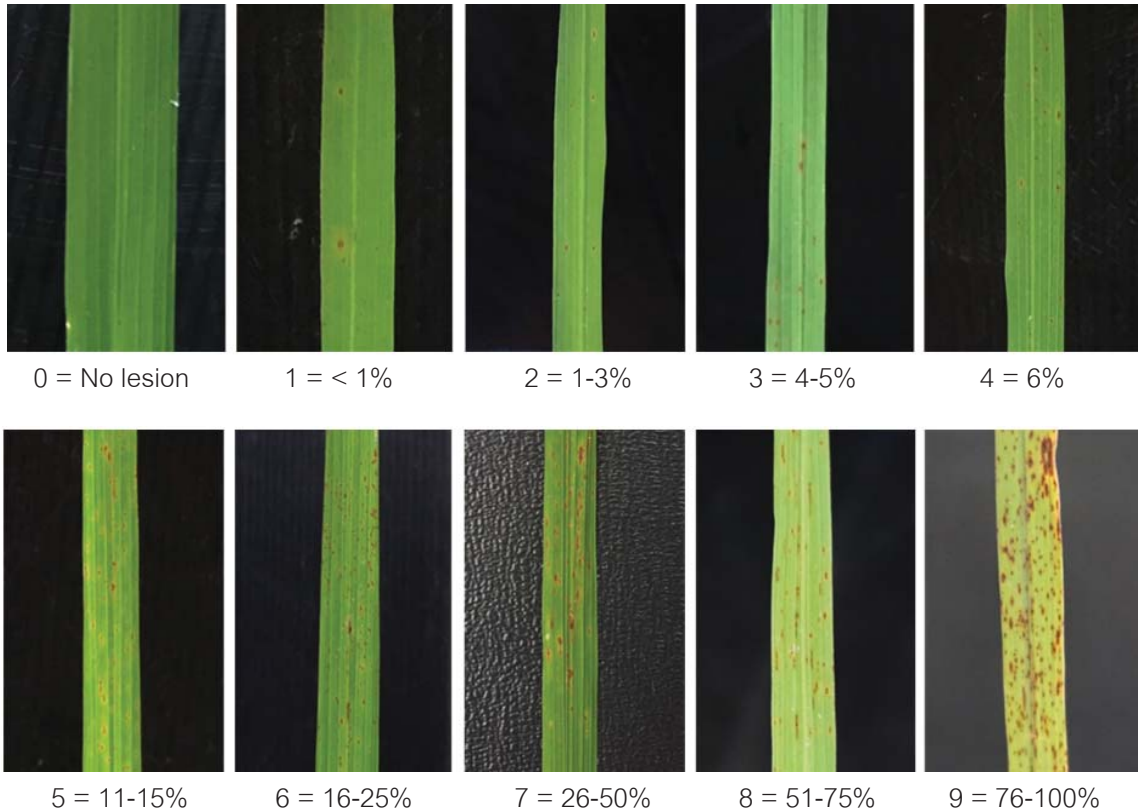

Fig. 1 Severity scale and percent of leaf area of brown spot disease

Table 1 Field key for visual assessment of brown spot severity (IRRI, 2014)

Severity scale	Description and % leaf area diseased
0	No lesion observed
1	Less than 1% leaf area diseased
2	1-3% leaf area diseased
3	4-5% leaf area diseased
4	6-10% leaf area diseased
5	11-15% leaf area diseased
6	16-25% leaf area diseased
7	26-50% leaf area diseased
8	51-75% leaf area diseased
9	76-100% leaf area diseased

ระบาดของโรคข้าว จำนวน 100 ต้นในพื้นที่สุ่มสำรวจ หมายถึง การระบาดของโรคในพื้นที่เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระดับความรุนแรงการเกิดโรค (severity scale: % leaf area diseased) แบ่งออกเป็น 10 ระดับ ตามระบบของ Standard Evaluation System for Rice (SES) (IRRI, 2014) (Fig. 1 และ Table 1) เก็บตัวอย่างใบข้าว เมล็ด และส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง และนำไปทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราจากตัวอย่างใบข้าว ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดกาญจนบุรี ด้วยเทคนิค tissue transplanting โดยเลือกใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล ตัดชิ้นส่วนที่เป็นโรคให้เป็นชิ้นสามหรือสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ขนาด 3x3 มิลลิเมตร ตรงบริเวณคาบต่อระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับส่วนที่ไม่เป็นโรค (1:3 ส่วน) ทำการฆ่าเชื้อด้วย 1% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 1-2 นาที ซับตัวอย่างใบข้าวให้แห้งด้วยกระดาษกรอง 2 ชั้นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำชิ้นส่วนใบข้าวดังกล่าวไปวางบนอาหาร water agar (WA) จำนวน 3-4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเส้นใยเจริญออกจากรอยแผลย้ายเชื้อบริเวณปลายเส้นใย (hyphae tip) ไปลงอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 วัน เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปทดสอบกระตุ้นการสร้างสปอร์ต่อไป

3. การทดสอบการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* บนอาหารสูตรต่าง ๆ

เชื้อรา *B. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จากจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท คือ BO2018_KRI_7.1, BO2018_KRI_7.2, BO2018_KRI_7.5, BO2018_KRI_7.6 และ BO2018_KRI_7.8 ย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร จำนวน 2 สูตร คือ CRFA และ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะแวดล้อมต่อเนื่อง ดังนี้ ให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 5 วัน และทำการตรวจนับการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนอาหารที่แตกต่างด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดหรือ hemacytometer

เมื่อพบว่าเชื้อราไม่มีการสร้างสปอร์ในวันที่ 5 ของการเจริญเติบโตทำการกระตุ้น การสร้างสปอร์ด้วยเทคนิคการขูดเส้นใย ดังนี้ (1) การขูดเส้นใยเชื้อให้ขาดราบติดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหรือแปรงสีฟันอ่อนๆ แล้วปิดจานเลี้ยงเชื้อด้วยพลาสติกเจาะรู

เพื่อให้อากาศถ่ายเท 4-6 รู (Mekwatanakarn and Mekwatanakarn, 2016) และ (2) การขูดเส้นใยเชื้อที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมที่เผาจนร้อนแดงให้เป็นลายตารางละเอียด 4 ทิศทาง จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในแต่ละครั้งทิศทางที่ทำการขูดเส้นใย จำนวน 4 ครั้ง จะทำการเผาเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมให้ร้อนแดงทุกครั้ง และนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิคการขูดเส้นใยทั้ง 2 วิธีการไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะแวดล้อมต่อเนื่องดังนี้ ให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 3-4 วัน

บันทึกการสร้างสปอร์ และจำนวนสปอร์ของเชื้อราเปรียบเทียบกันทั้ง 2 วิธีการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope) หากไม่พบการสร้างสปอร์ภายหลังการขูดครั้งแรก ทำการขูดเชื้อซ้ำจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ ประเมิน บันทึก และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของข้าว

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าว ในสภาพแปลงนาข้าว จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2563 พบเฉพาะส่วนใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล และพบในระยะเก็บเกี่ยวเท่านั้น ภายใต้สภาพที่มีการระบาดในแปลงเกษตรกร อำเภอพนมทวน จังหวัดกาญจนบุรี พบแผลที่ใบข้าวมีลักษณะเป็นจุดกลมหรือรูปไข่สีน้ำตาล ขอบแผลมีสีเหลือง (Fig. 2) ทั้ง 5 แปลง ที่พบการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาล พบการระบาดของโรคเต็มพื้นที่ปลูกข้าว คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงในการทำลายของเชื้อที่ระดับ 5-7 (Table 2)

2. การแยกเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวเพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์

ผลจากการแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร WA และ PDA ได้จำนวน 5 ไอโซเลท และพบเชื้อราบริสุทธิ์ทั้ง 5 ไอโซเลท (Table 2) บนอาหาร PDA มีลักษณะเส้นใยสีขาวในระยะแรกเหมือนกัน เมื่อเชื้อราอายุ 5 วัน พบลักษณะเส้นใยสีขาวปนเทา ฟู คล้ายสำลี (Fig. 3A) และเส้นใยเป็นสีเทาเข้มถึงดำเมื่ออายุ 10 วัน (Fig. 3B) เมื่อนำเชื้อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบเฉพาะ

Fig. 2 Leaf symptoms, circular or oval spots and lesions on leaves

Table 2 List of *Bipolaris oryzae* caused brown spot disease of rice at rice fields in Kanchanaburi province, Thailand, 2019

No.	Isolate no.	Location[1)]	GPS	Symptom	Identification	Variety	Rice growth stage	% Disease incidence	Scale of disease severity	Location date
1	BO2018_KRI_7.1	Farmer-Yield Trial Field 1	N: 14.2115239 E: 99.7694226	circular or oval brown spots with a yellow halo on leaves	*B. oryzae*	BKN05044-29-5-3-1-1	mature grain	100	7	28 Nov. 2019
2	BO2018_KRI_7.2	Farmer-Yield Trial Field 2	N: 14.2114940 E: 99.7694602	circular or oval brown spots with a yellow halo on leaves	*B. oryzae*	SPR08080-20-11-6	mature grain	100	7	28 Nov. 2019
3	BO2018_KRI_7.5	Farmer-Yield Trial Field 3	N: 14.2114940 E: 99.7694600	circular or oval brown spots	*B. oryzae*	RD31	mature grain	100	7	28 Nov. 2019
4	BO2018_KRI_7.6	Farmer Field 1	N: 14.2115645 E: 99.7693227	circular or oval brown spots with a yellow halo on leaves	*B. oryzae*	RD31	mature grain	100	5	28 Nov. 2019
5	BO2018_KRI_7.8	Farmer Field 2	N: 14.087821 E: 99.708077	circular or oval brown spots with a yellow halo on leaves	B. oryzae	Suphan Buri 1	mature grain	100	5	28 Nov. 2019

[1)] Rang Wai sub-district, Phanom Thuan district, Kanchanaburi province

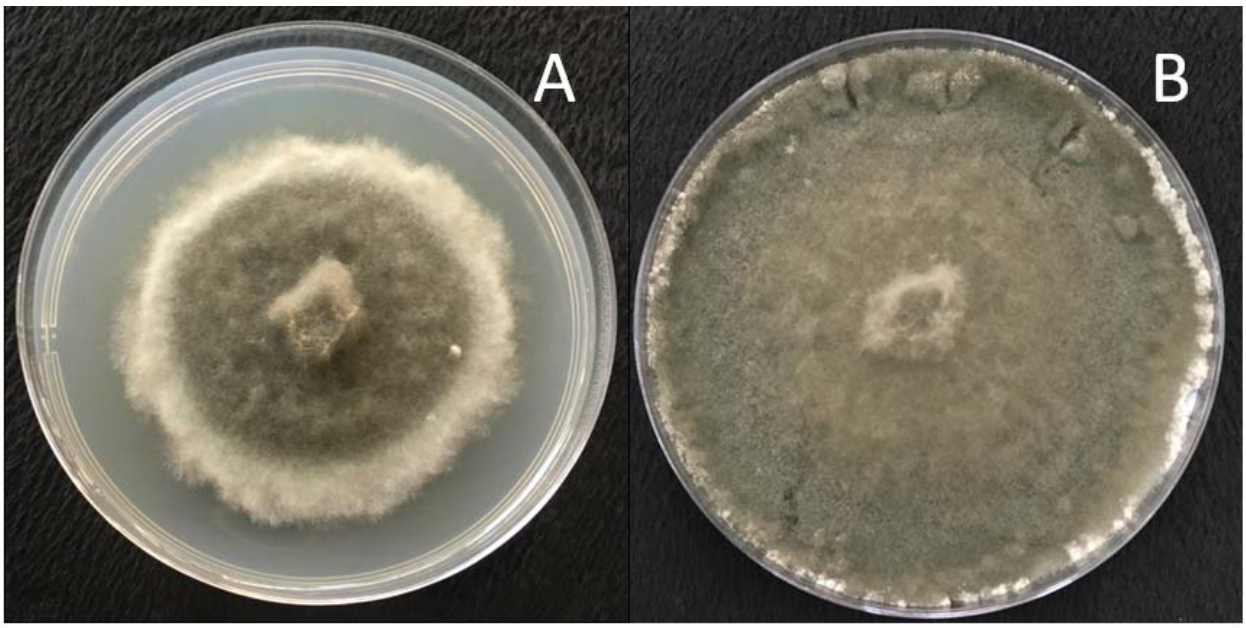

Fig. 3 Colony of *Bipolaris oryzae* on PDA at 5 days (A) and 10 days old (B)

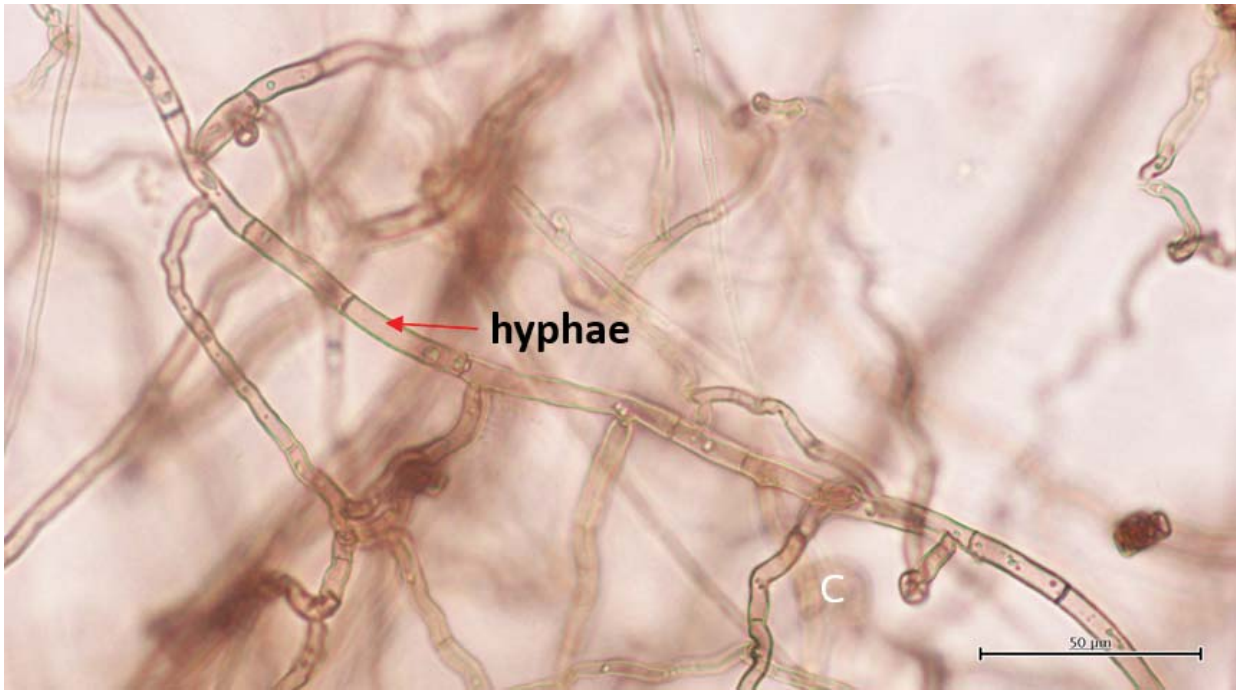

Fig. 4 Microscopic morphology of hyphae of *Bipolaris oryzae* grown in PDA medium at five days

เส้นใยสีเข้มมีผนังกั้น แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ (Fig. 4) เหมือนกันทั้ง 5 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าเชื้อรา *B. oryzae* ไม่สร้างสปอร์บนอาหารสังเคราะห์และอาหารธรรมชาติภายใต้สภาพแวดล้อมและสารอาหารที่แตกต่าง (Hau and Rush, 1980; Leach, 1961; Sunder *et al*., 2014)

3. การทดสอบกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* บนอาหารสูตรต่าง ๆ

การทดสอบกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* จำนวน 5 ไอโซเลท (BO2018_KRI_7.1, BO2018_KRI_7.2, BO2018_KRI_7.5, BO2018_KRI_7.6 และ BO2018_KRI_7.8) บนอาหาร จำนวน 2 สูตร คือ CRFA และ PDA โดยย้ายส่วนปลายของเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงบน PDA ที่อายุ 5 วัน ด้วยการเจาะส่วน

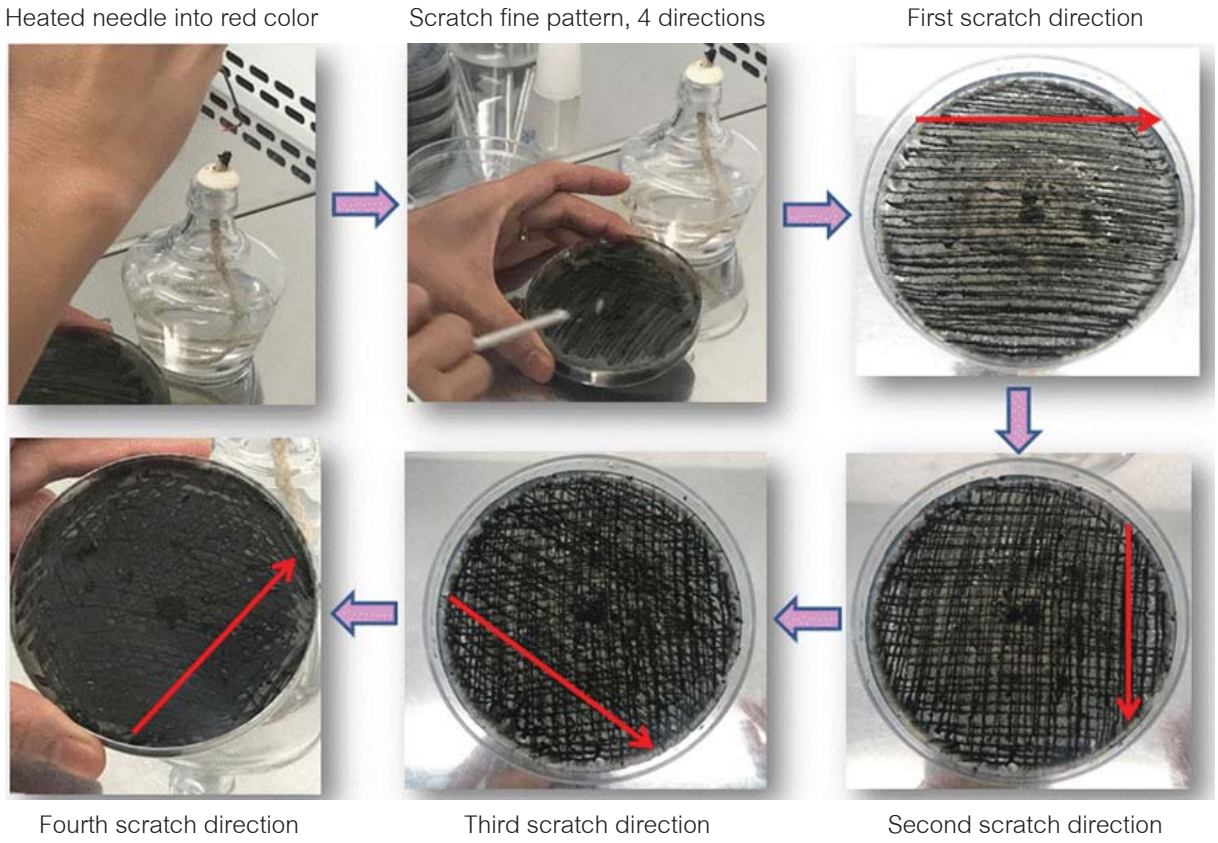

Fig. 5 A simple technique for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*

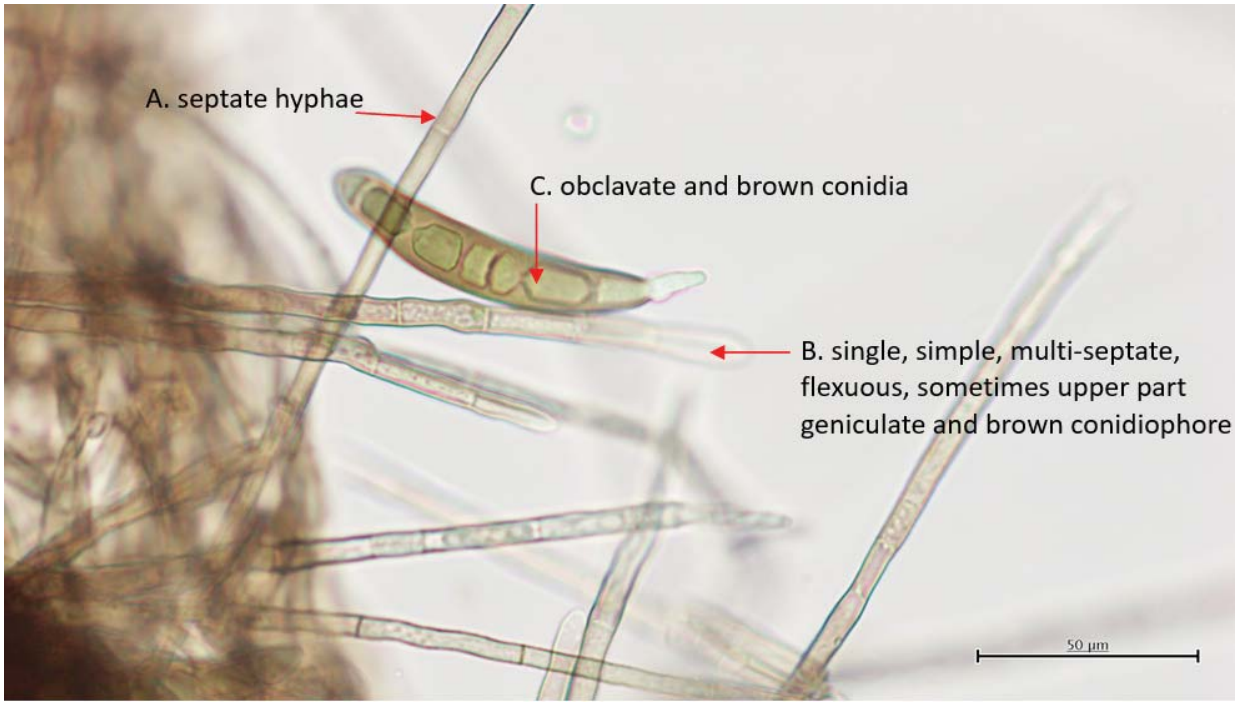

Fig. 6 Microscopic morphology of septate hyphae (A), single, simple, multi-septate, flexuous sometimes upper part geniculate and brown conidiophore (B) and obclavate and brown conidia (C) of *Bipolaris oryzae* grown in PDA medium. Scale bar = 50 µm

ปลายของเส้นใยด้วย cork borer มาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 ซ้ำ หรือ 5 จานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 5 วัน

ผลการตรวจนับการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนสูตรอาหาร พบว่า อาหารทั้ง 2 สูตร ไม่กระตุ้นการสร้างสปอร์ในระยะเวลา 5 วัน แต่พบการกระตุ้นการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิคการขูดเส้นใยเชื้อด้วยความร้อน โดยขูดเส้นใยที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออายุ 5 วัน ด้วยเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมที่เผาจนร้อนแดงให้เป็นลายตารางละเอียด 4 ทิศทาง จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในแต่ละทิศทางที่ทำการขูดเส้นใย ทำการเผาเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมให้ร้อนแดงทุกครั้ง (Fig. 5) แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 3-4 วัน พบเชื้อราไอโซเลท BO2018_KRI_7.5 มีการสร้างสปอร์หรือโคนิเดีย (Fig. 6C) บนอาหารทั้ง 2 สูตร ในการขูดเส้นใยเชื้อด้วยความร้อนในครั้งแรก ส่วนเชื้อราไอโซเลทอื่นๆ พบสร้างสปอร์เมื่อทำการขูดเชื้อซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง

อย่างไรก็ตาม ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* จะขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละไอโซเลทเช่นกัน ซึ่งอาหารสูตร PDA จะให้ปริมาณสปอร์มากกว่าอาหารสูตร CRFA 6-12 เท่า (Table 3) และพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบริสุทธิ์ ที่แยกได้สร้างเส้นใยแบบที่มีผนังกั้น (Fig. 6A) และสร้างสปอร์ มีก้านชูสปอร์สีน้ำตาล ชูขึ้นเป็นแบบก้านตรงและอยู่เดี่ยวๆ (arising singly and simple) มีผนังกั้นหลายผนัง (multi-septate) ก้านชูสปอร์คดไปคดมา (flexuous) บางครั้งพบด้านบนของก้านชูสปอร์จะงอคล้ายเข่า (geniculate) (Fig. 6B) และโคนิเดียมีสีน้ำตาล (brown conidia) รูปร่างคล้ายเรือ (navicular) หรือฐานโค้งใหญ่เรียวไปทางปลาย (obclavate) (Fig. 6C) จึงจำแนกว่าเป็นเชื้อรา *B. oryzae* ได้จำนวน 5 ไอโซเลท (Table 2) สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อรา *B. oryzae* ตามรายงานของ Manamgoda *et al.* (2014) ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ให้ผลแตกต่างจากรายงานของ Hau and Rush (1980) ที่ว่าเชื้อรา *B. oryzae* สามารถสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหารเฉพาะ CRFA เนื่องจากการสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CRFA ต้องบ่มเชื้อภายใต้สภาวะสิ่งแวดล้อมเหมาะสมที่ค่อนข้าง

Table 3 The number of spores of *Bipolaris oryzae* 5 isolates on 2 media commercial rabbit food agar and potato dextrose agar after incubation at room temperature (the cycle of 12 hours of fluorescent light at 25±1 °C followed by 12 hours of complete darkness at 28±1 °C) for 5-10 days. Then first hot scraping treatment of the mycelium culture surface with red-hot bent needle in four directions to form a fine square grid pattern was performed following by incubation at the room temperature for three to four days.

No.	Isolate	Average number of spores or conidia/field of compound microscopic view at 400x		No. of hot scraping
		CRFA	PDA	
1	BO2018_KRI_7.1	1	6	2x
2	BO2018_KRI_7.2	1	7	2x
3	BO2018_KRI_7.5	1	12	1x
4	BO2018_KRI_7.6	1	6	2x
5	BO2018_KRI_7.8	1	8	2x

CRFA = commercial rabbit food agar, PDA= potato dextrose agar

ยุ่งยาก คือ การบ่มเชื้อต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างจากแสงแบล็กไลต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มืด 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 15 วัน

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงบรรลุวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการใหม่และง่ายในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ โดยการขูดเส้นใยด้วยความร้อน ที่ไม่พบรายงานมาก่อน เนื่องจากความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งต่อการสร้างสปอร์ การงอกและความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์เชื้อรา (Fernando *et al*., 2000) ความร้อนที่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส อาจช่วยกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ เนื่องจากความร้อนมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา ดังนั้น เพื่อการอยู่รอดของรุ่นลูก เชื้อรารุ่นพ่อแม่ จึงจำเป็นต้องสร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ในรุ่นลูก เพราะในรุ่นพ่อแม่อาจจะตายได้จากความร้อน และเป็นเทคนิคที่ง่าย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ที่เป็นอาหารทั่วไปที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา ไม่ใช่อาหารเฉพาะหรืออาหารพิเศษ นอกจากนั้น ยังเป็นเทคนิคที่ประหยัด เพราะการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการโรคพืชทั่วไป ที่เปิดเครื่องปรับอากาศในช่วงเวลากลางวัน ที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ นาน 12 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มืดซึ่งเป็นเวลากลางคืนที่ในห้องปฏิบัติการโรคพืช ที่ไม่มีการทำงานและไม่ได้เปิดเครื่องปรับอากาศ อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องใช้ตู้บ่มเชื้อที่ปรับอุณหภูมิได้ และติดตั้งแสงแบล็กไลต์ที่มีราคาแพง

นอกจากนี้ เทคนิคนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวได้ทุกไอโซเลท และพบว่าการขูดเส้นใยด้วยความร้อน จำนวน 2 ครั้ง สามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ในทุกไอโซเลท อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ภายในระยะเวลาที่สั้นกว่า คือ 8-11 วัน ซึ่งปกติเชื้อรา *B. oryzae* จะสามารถสร้างสปอร์บนอาหารเฉพาะและบ่มเชื้อภายใต้สภาวะแวดล้อมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากแสงแบล็กไลต์ นาน 12 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มืด นาน 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน (Hau and Rush, 1980)

ด้วยเทคนิคใหม่ ง่าย ประหยัด และรวดเร็วในการกระตุ้นการสร้างสปอร์หรือโคนีเดียของเชื้อรา *B. oryzae* นี้จะทำให้นักวิจัยโรคข้าว สามารถศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการคัดเลือกพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ในทุกห้องปฏิบัติการโรคข้าว

สรุปผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวในระยะเก็บเกี่ยวที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล จากจังหวัดกาญจนบุรี มาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ จำนวนเชื้อบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท ทำการกระตุ้นการสร้างปอร์เชื้อรา *B. oryzae* บนอาหาร จำนวน 2 สูตร คือ CRFA และ PDA พบว่าอาหารทั้ง 2 สูตร ไม่กระตุ้นการสร้างสปอร์ในระยะเวลา 5 วัน แต่การกระตุ้นการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิคการขูดเชื้อด้วยความร้อน โดยการขูดเส้นใยเชื้อที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเข็มเขี่ยปลายโค้งแหลมที่เผาจนร้อนแดงให้เป็นลายตารางละเอียด 4 ทิศทาง จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในแต่ละครั้งทิศทางที่ทำการขูดเส้นใยจำนวน 4 ครั้ง จะทำการเผาเข็มปลายแหลมให้ร้อนแดงทุกครั้ง ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงสว่างจากแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 3-4 วัน พบว่ามีการสร้างสปอร์ บนอาหารทั้ง 2 สูตร โดยอาหารสูตร PDA ให้ปริมาณสปอร์มากกว่า สูตร CRFA 6-12 เท่า และเทคนิคการขูดเชื้อจำนวน 2 ครั้ง พบมีการสร้างสปอร์ในทุกไอโซเลท

อย่างไรก็ตาม เทคนิคอย่างง่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวครั้งนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้น ดังนั้น จึงต้องมีการทดสอบปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวชนิดนี้ในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากเงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยและส่งเสริมด้านข้าว กรมการข้าวครั้งที่ 1 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และครั้งที่ 2 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ภายใต้โครงการ “แหล่งพันธุกรรมยีนต้านทานความหลากหลายทางลักษณะการทำให้เกิดโรคและพันธุกรรมของประชากรเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลและใบขีดโปร่งแสง เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว”

เอกสารอ้างอิง

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

Barnwal, M.K., A. Kotasthane, N. Magculia, P.K. Mukherjee, S. Savary, A.K. Sharma, H.B. Singh, U.S. Singh, A.H. Sparks, M. Variar and N. Zaidi. 2013. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. European Journal of Plant Pathology 136: 443-457.

Disthaporn, S. 1989. Suppression of rice disease by farmers. Funny Publishing Ltd., Bangkok. 116 p. (in Thai)

Fernando, T.H.P.S., C.K. Jayasinghe and R.L.C. Wijesundera. 2000. Factors affecting spore production, germination and viability of *Collectotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. Mycological Research 104: 681-685.

Gangopadhyay, S. 1983. Current Concepts on Fungal Diseases of Rice. Today and Tomorrow's Printers & Publishers. New Delhi, India. 349 pp.

Hau, F.C. and M.C. Rush. 1980. A system for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*. Plant Disease 64: 788-789.

Janlapha, W., T. Katenate, A.N.L. Noenplab, S. Seewisut, C. Chalermpolyotin and R. Wattanasuchat. 2014. The effects of climate change on rice disease epidemics in the Eastern area. pp. 73-83. *In*: Proceeding of the Rice Annual Meeting 2013 from Center East and West Groups, Bureau of Rice Research and Development. March 26-28, 2014. Aek Pailin River Kwai Hotel, Kanchanaburi province. (in Thai)

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

Khalili, E., M. Sadravi, S. Naeimi, and V. Khosravi. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. Brazil Journal Microbiology 43: 297-305.

Leach, C.M. 1961. The sporulation of *Helminthosporium oryzae* as affected by exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. Canada Journal Botany 39: 705-715.

Manamgoda, D.S., A.Y. Rossman, L.A. Castlebury, P.W. Crous, H. Madrid, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2014. The genus *Bipolaris*. Studies of Mycology 79: 221-288.

Mekwatanakarn, P. and W. Mekwatanakarn. 2016. Rice Blast Disease. 2nd ed. One O Graphic, Nonthaburi province. 157 p. (in Thai)

Ou, S.H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, UK. 380 pp.

Rice Research Institute. 1996. Rice: farmer's knowledge bank. *In*: Proceeding of 80th Anniversary of Pathum Thani Rice Research Center. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 191 p. (in Thai)

Singh, B. 1967. Inducing sporulation in different strains of *Alternaria solani*. Mycopathologia et mycologia applicata 32(2): 163-171.

Sunder, S., R. Singh and R . Agarwal. 2014. Brown spot of rice: an overview. Indian Phytopathology 67: 201-215.