

การพัฒนาชุดไพรเมอร์สำหรับการตรวจหาเชื้อรา *Exserohilum rostratum* ก่อโรคใบจุดในข้าวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

Development of primer sets for the detection of *Exserohilum rostratum*, the fungus causing leaf spot disease on rice by polymerase chain reaction technique

ญาคี บุญก่อน¹
Yatavee Boonkorn¹

วีระณีย์ ทองศรี¹
Veeranee Tongsri¹

ปัฐวิภา สงกุมาร^{1,*}
Pattavipha Songkumarn^{1,*}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author: fagrpps@ku.ac.th

ประวัติบทความ

รับเรื่อง: 13 มิถุนายน 2567

ปรับแก้ไข: 24 กุมภาพันธ์ 2568

รับตีพิมพ์: 31 มีนาคม 2568

คำสำคัญ

ข้าว

Exserohilum rostratum

การวินิจฉัยโรคข้าว

การพัฒนาไพรเมอร์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Article History

Received: 13 June 2024

Revised: 24 February 2025

Accepted: 31 March 2025

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: *Exserohilum rostratum* คือเชื้อราสาเหตุใบจุดขนาดเล็กและเมล็ดต่างของข้าว การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทำได้ยากเนื่องจากมีอาการคล้ายคลึงกับการใบจุดจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะและไวในการตรวจจับดีเอ็นเอของ *E. rostratum* รวมถึงดีเอ็นเอของข้าวที่ติดเชื้อ *E. rostratum* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบดั้งเดิม (พีซีอาร์)

วิธีดำเนินการวิจัย: ออกแบบชุดไพรเมอร์จำนวน 5 ชุด จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ระหว่าง 18S และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ และของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Actin (*Act*), Beta-tubulin (*Tub2*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) และ Translation elongation factor (*Tef1*) ของ *E. rostratum* และตรวจสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ต้นแบบดีเอ็นเอของ *E. rostratum* ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.001–100 นาโนกรัม และของเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กับข้าว รวมถึงดีเอ็นเอของข้าวที่ติดเชื้อ *E. rostratum*

ผลการวิจัย: ชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR ซึ่งออกแบบจากยีน *Act* และยีน *GAPDH* ตามลำดับ สามารถตรวจจับดีเอ็นเอของ *E. rostratum* อย่างจำเพาะ โดยชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR มีความไวในการตรวจจับดีกว่าชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR อีกทั้งไพรเมอร์ทั้งสองชุดมีความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอของ *E. rostratum* ในข้าวหลากหลายพันธุ์ที่ติดเชื้อ *E. rostratum*

Keywords

Rice

Exserohilum rostratum

Rice disease diagnostic

Primer development

DNA barcode

การอ้างอิง

ญาติวี บุญก่อน, วีระณีย์ ทองศรี และ ปฐวิภา สงกุมาร. 2568. การพัฒนาชุดไพรเมอร์สำหรับการตรวจหาเชื้อรา *Exserohilum rostratum* ก่อโรคใบจุดในข้าวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. ว. วิทย. นวัตกรรม. 56(3): 191–204.

How to cite

Boonkorn, Y., V. Tongsri and P. Songkumarn. 2025. Development of primer sets for the detection of *Exserohilum rostratum*, the fungus causing leaf spot disease on rice by polymerase chain reaction technique. Agric. Sci. Innov. J. 56(3): 191–204.

สรุป: งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR ในการวินิจฉัยอาการใบจุดข้าวที่เกิดจากเชื้อ *E. rostratum* ด้วยวิธีพีซีอาร์

Abstract

Background and Objective: *Exserohilum rostratum* is a fungal agent that causes small leaf spots and grain discoloration in rice. Diagnosing the causative agent of the disease is difficult because its symptoms resemble those of leaf spots caused by other fungal species. This research aimed to develop primer sets that were specific and sensitive for detecting DNA of *E. rostratum* and of rice infected with *E. rostratum* using the conventional polymerase chain reaction (PCR) technique.

Methodology: Five primer sets were designed from nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) between 18S and 28S nuclear ribosomal DNA and from nucleotide sequences of four protein-encoding genes, including Actin (*Act*), Beta-tubulin (*Tub2*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), and Translation elongation factor (*Tef1*) of *E. rostratum*. These primer sets were tested for specificity and sensitivity by PCR using *E. rostratum* DNA at concentrations ranging from 0.001–100 ng, DNA from other fungal species associated with rice, and DNA from rice infected with *E. rostratum*.

Main Results: The primer sets, ER-ActF/ER-ActR and ER-GPDF/ER-GPDR, designed from *Act* and *GAPDH*, respectively, specifically detected *E. rostratum* DNA. Indeed, the ER-ActF/ER-ActR primer set was more sensitive to the DNA of *E. rostratum* than the ER-GPDF/ER-GPDR primer set. In addition, both primer sets detected *E. rostratum* DNA in different rice cultivars infected with *E. rostratum*.

Conclusions: This research demonstrates the potential of the primer sets (ER-ActF/ER-ActR and ER-GPDF/ER-GPDR) for diagnosing rice leaf spot caused by *E. rostratum* using PCR.

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลักของคนในประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2566 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นปริมาณ 8.76 ล้านตัน มีมูลค่าโดยประมาณ 178,135 ล้านบาท (Office of Agricultural Economics, 2024) ทั้งนี้ อุปสรรคสำคัญต่อการผลิตข้าวของประเทศไทย คือ โรคไหม้ (Rice blast) จากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และโรคขอบใบแห้งที่เกิดจากแบคทีเรีย (Bacterial leaf blight) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวในเชิงปริมาณ

(Disthaporn, 1994; Sombunjitt *et al.*, 2017) และด้วยสภาพภูมิอากาศโลกที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นอาจส่งผลกระทบต่อภาระของโรคพืช อาทิ เกิดการระบาดของเชื้อราออกฤดูการระบาดของโรค (Zayan, 2019) รวมถึงอาจส่งผลให้เกิดโรคพืชอุบัติใหม่ (Suddhiyam, 2016) โดยคาดการณ์ว่าโรคข้าวในกลุ่มรอง อาทิ โรคเมล็ดด่างในข้าว อาจกลายมาเป็นโรคสำคัญหลักในสถานการณ์ดังกล่าว (Silodia *et al.*, 2019) ซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวในเชิงคุณภาพเนื่องจากเมล็ดข้าวเกิดการแตกหักได้ง่าย (Raghu *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021)

Exserohilum rostratum หรือในระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศรู้จักในนาม *Setosphaeria rostrata* เป็นเชื้อราในแฟมิลี Pleosporaceae ในไฟลัม Ascomycota (Hernández-Restrepo *et al.*, 2018) ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถก่ออาการจุด (Spot) รวมถึงอาการไหม้ (Blight) บนใบพืชมากกว่า 30 ชนิด ทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว โดยรวมไปถึงพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ อาทิ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี อ้อย ถั่ว และมะเขือเทศ เป็นต้น (Korra *et al.*, 2023) การเข้าทำลายของเชื้อราดังกล่าวในข้าวก่อให้เกิดอาการใบจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมแดงบนใบข้าว รวมถึงเชื้อรายังสามารถทำให้เกิดอาการเมล็ดต่าง (Cardona and González, 2007; Kusai *et al.*, 2016) ทั้งนี้ *E. rostratum* จัดเป็นเชื้ออุบัติใหม่โดยมีรายงานการปรากฏของเชื้อชนิดนี้ในหลายประเทศ (Cardona and González, 2007; Kusai *et al.*, 2016; Majeed *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Kaboré *et al.*, 2022; Mahmad-Tohe *et al.*, 2022) และคาดการณ์ว่าการระบาดของเชื้ออาจเกิดขึ้นได้จากสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลก (Korra *et al.*, 2023) ในประเทศไทยมีการรายงานการตรวจพบเชื้อราชนิดนี้ในเมล็ดข้าว (Jaroenthai, 2001) รวมถึงการพบเชื้อราในสภาวะการดำรงชีพแบบเอนโดไฟต์บนใบข้าว (Su-Han *et al.*, 2019) Boonkorn *et al.* (2024) ได้สำรวจเก็บตัวอย่างใบข้าวแสดงอาการจุดขนาดเล็กจากแปลงนาในเขตพื้นที่ภาคกลางและแยกเชื้อราจากอาการดังกล่าว พร้อมกับพิสูจน์โรคตามหลักการของ Koch พบว่า *E. rostratum* เป็นหนึ่งในเชื้อราสาเหตุการใบจุด นอกเหนือจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ อาทิ *Curvularia* spp.

อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุการใบจุดขนาดเล็กมีข้อจำกัด เนื่องจากลักษณะอาการจุดที่แสดงบนใบข้าวจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่กล่าวไปข้างต้นมีความคล้ายคลึงกัน โดยการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมที่อาศัยการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อราพัฒนาเส้นใย โครงสร้างการสืบพันธุ์และผลิตภัณฑ์ของเชื้อราเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรานั้น เป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองเวลา วัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ รวมถึงกำลังคน (Oechsler *et al.*, 2009) ดังนั้น การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรคพืชเพื่อกำหนดชนิดจำแนกดังกล่าว (Hoang *et al.*, 2019) ทั้งนี้ Kusai *et al.* (2016) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *E. rostratum* ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโมเลกุลโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของนิวคลีโอไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (18-28S) และ

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีนกำหนดการสร้าง Beta-tubulin (BT2) พบว่าไอโซเลตของเชื้อรา *E. rostratum* ที่รวบรวมได้ในงานวิจัยดังกล่าวสามารถจัดอยู่ในกลุ่ม (Clade) เดียวกัน โดยสามารถแยกเชื้อราดังกล่าวออกจาก *Exserohilum* สปีชีส์อื่น ๆ รวมถึงเชื้อราในสกุลอื่น ๆ นอกจากนี้ Hernández-Restrepo *et al.* (2018) อาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณตำแหน่งต่าง ๆ จำนวน 9 ตำแหน่ง ประกอบด้วย Internal transcribed spacer (ITS) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอหน่วยย่อยใหญ่ (Large subunit ribosomal RNA, LSU) และยีนกำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Actin (*Act*), Beta-tubulin (*Tub2*), Calmodulin (*Cam*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Histone H3 (*His*), Translation elongation factor 1 alpha (*Tef1*) และ RNA polymerase II second largest subunit (*Rpb2*) โดยจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีนดังกล่าวทำให้ประสบความสำเร็จในการจัดแบ่งชนิดของเชื้อราในสกุล *Exserohilum* ได้ถูกต้องมากขึ้น ดังนั้น จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีนนั้นมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อรา *E. rostratum* เพื่อใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยอาการใบจุดที่เกิดจาก *E. rostratum* รวมถึงใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อแบบรวดเร็วโดยอาศัยเทคนิคทางดีเอ็นเอต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจหาเชื้อรา *E. rostratum* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิม (Conventional polymerase chain reaction, PCR) โดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมใช้เบ็ดดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ในการบ่งชี้ชนิดเชื้อรา ซึ่งชุดไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดกรองตัวอย่างโรคใบจุดของข้าวที่เข้าทำลายโดยเชื้อรา *E. rostratum* จากตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ ต่อไปและเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยอาการใบจุดขนาดเล็กในข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

ไอโซเลตเชื้อราและพันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

ชนิดและจำนวนไอโซเลตเชื้อราที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้ เชื้อรา *E. rostratum* ก่อโรคใบจุด จำนวน 5 ไอโซเลต เชื้อรา *Bipolaris oryzae* ก่อโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 4 ไอโซเลต เชื้อรา *P. oryzae* ก่อโรคไหม้ จำนวน 3 ไอโซเลต เชื้อรา *Curvularia lunata* จำนวน 4 ไอโซเลต เชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต และเชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 3 ไอโซเลต โดย

เชื้อราทุกไอโซเลตมีแหล่งที่มาจากข้าว สำหรับพันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์เจ้าหอมนิล พันธุ์ กข31 และพันธุ์ กข41 (Table 1) โดยเริ่มดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ณ ห้องปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา (ห้อง 514) ภาควิชาโรคพืช อาคารจรัล สุนทรสิงห์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

การเตรียมตัวอย่างข้าวที่ปลูกเชื้อรา *E. rostratum*

แช่เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล กข31 และ กข41 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ย้ายเมล็ดไปยังภาชนะใหม่ที่มีรองฐานภาชนะด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกน้ำเพียงเล็กน้อยเพื่อคงความชื้น และบ่มเมล็ดข้าวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน นำไปปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว แบ่งพื้นที่การปลูกในแต่ละกระถางออกเป็น 5 ส่วน แต่ละส่วนปลูกข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 5 ต้น ปลูกในสภาพโรงเรือน จนอายุครบ 30 วัน

ก่อนปลูกเชื้อรา 1 สัปดาห์ เลี้ยงเชื้อรา *E. rostratum* ไอโซเลต SBR1 บนอาหาร potato dextrose agar (HiMedia; Bangalore, India) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *E. rostratum* โดยใช้ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อผสมกับ tween 20 ให้มีความเข้มข้น 0.01% เติมน้ำลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ ให้สปอร์เชื้อราหลุดจากผิวหน้าอาหาร กรองของเหลวที่มีสปอร์เชื้อราผ่านกระดาษเช็ดทำความสะอาด (Kimwipe, KIMTECH science) เพื่อกำจัดส่วนเส้นใยของเชื้อรา จากนั้น คูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับสปอร์แขวนลอยของเชื้อราให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ hemocytometer

นำกระถางข้าวที่มีอายุ 30 วัน ซึ่งมีพันธุ์ข้าวทั้ง 4 ชนิด มาบรรจุในถุงพลาสติก เติมน้ำลงไปในถุงปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความชื้นเพียงพอระหว่างการปลูกเชื้อรา โดยจัดเตรียมชุดการทดลองจำนวน 2 ชุด ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราให้ปกคลุมบนใบข้าว เมื่อเสร็จแล้วมัดปากถุงพลาสติกทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนย้ายกระถางข้าวไปวางในกระบะ วางไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดลองจนครบเวลา 72 ชั่วโมง ระหว่างนั้นฉีดพ่นน้ำสม่ำเสมอเพื่อให้มีสภาพความชื้นสูง สำหรับชุดการทดลองที่ 2 ฉีดพ่นด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อที่มีการผสมกับ tween 20 ให้มีความเข้มข้น 0.01% ลงบนใบข้าวและดำเนินการเช่นเดียวกับชุดการทดลองแรก ซึ่งชุดการทดลองนี้จัดเป็นชุดควบคุมแบบลบ (Negative control) เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ใบข้าวที่พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราแสดงอาการจุดขนาดเล็ก และใบ

ข้าวที่พ่นด้วยน้ำผสม tween 20 มีสภาพปกติไม่แสดงอาการโรค ในแต่ละชุดการทดลองนั้นดำเนินการตัดใบข้าวแต่ละพันธุ์ที่แสดงอาการโรคหรือต้นปกติแยกส่วนจากกัน จากนั้น บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด และเก็บตัวอย่างพืชปกติและพืชที่ปลูกเชื้อซึ่งบดเป็นผงละเอียดไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเข้าสู่กระบวนการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Act*, *Tub2*, *GAPDH* และ *Tef1* ของ *E. rostratum* ผ่านฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์จากเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> จากนั้น ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับเชื้อรา *E. rostratum* โดยอาศัยเครื่องมือ Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนใส่ในช่องที่ระบุว่าเป็น PCR template จากนั้น กำหนดขนาดไพรเมอร์ให้มีความยาว 250–500 คู่เบส กำหนดค่า melting temperature (T_m) ต่ำสุดที่ 57 องศาเซลเซียส T_m ที่เหมาะสม 60 องศาเซลเซียส และ T_m สูงสุดที่ 63 องศาเซลเซียส และเลือกรูปร่างข้อมูล nr (Nucleotide) นอกนั้นใช้ค่าตั้งโปรแกรมตามมาตรฐานที่กำหนด (Default) ยกเว้นในส่วนของการ exclusion organism กำหนดค่าโดยการใส่ชื่อชนิดของเชื้อราที่ก่อโรคหรือมีความสัมพันธ์กับข้าว ได้แก่ *Bipolaris oryzae* ATCC 44560 (Taxid: 930090), *Magnaporthe oryzae* 70–15 (Taxid: 242507), *Curvularia lunata* (Taxid: 5503), *Curvularia* sp. (Taxid: 1715225), *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (Taxid: 983506) และ *Fusarium fujikuroi* species complex (Taxid: 171627) รวมถึง *Oryza sativa* Japonica Group (Taxid: 39947) และ *Oryza sativa* Indica Group (Taxid: 39946) เพื่อให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบหลักเลี่ยงการจับกับส่วนของดีเอ็นเอของเชื้อราดังกล่าวและดีเอ็นเอของข้าว โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ซึ่งออกแบบด้วยวิธีดังกล่าวปรากฏใน Table 2

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการวิจัยโดยนำ stock ของเชื้อราที่อยู่ในรูปแบบเส้นใยหรือเก็บบนกระดาษกรองมาวางบนจานอาหาร potato dextrose agar (HiMedia; Bangalore, India) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ถ่ายเส้นใยเชื้อราไปเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (HiMedia; Bangalore, India)

Table 1 The fungal isolates used in this study

Fungal species and isolate	Nearest BLAST match, accession number (% identity)	Source of material or reference
<i>Exserohilum rostratum</i>		
ER-SB1, ER-CN1, ER-AT1, ER-SBR1, ER-NB1	<i>E. rostratum</i> , MT524320 (100%)	Boonkorn <i>et al.</i> (2024)
<i>Bipolaris oryzae</i>		
BO-SBR93, BO-SBR92, BO-PT1, BO-CN7	<i>B. oryzae</i> , OQ733351 (100%)	Chaijuckam <i>et al.</i> (2019)
<i>Pyricularia oryzae</i>		
PO-001	<i>Magnaporthe oryzae</i> , OR492543 (100%)	Klarum (2020)
PO-002	<i>M. oryzae</i> , KY967404 (98.39%)	Klarum (2020)
PO-003	<i>M. oryzae</i> , MH714733 (98.03%)	Klarum (2020)
<i>Curvularia lunata</i>		
C-NP11	<i>C. lunata</i> , KP638342 (100%)	The Fungal Laboratory, Department of Plant Pathology, Kasetsart University (unpublished data)
C-NP12, CN22	<i>C. lunata</i> , MH010917 (99.82%)	The Fungal Laboratory, Department of Plant Pathology, Kasetsart University (unpublished data)
C-NB4	<i>C. lunata</i> , MK174964 (99.48%)	The Fungal Laboratory, Department of Plant Pathology, Kasetsart University (unpublished data)
<i>Rhizoctonia</i> spp.		
RS-Ppath	Data not available	Contributed by Tida Dethoup, Kasetsart University
RS-DOA	Data not available	Contributed by Department of Agriculture
<i>Fusarium</i> spp.		
F-Ppath	Data not available	Contributed by Tida Dethoup, Kasetsart University
F-PTL1	<i>F. oxysporum</i> , ON795989.1 (97.65%)	The Fungal Laboratory, Department of Plant Pathology, Kasetsart University (unpublished data)
F-PTL2	<i>Fusarium</i> sp., MT135013 (100%)	The Fungal Laboratory, Department of Plant Pathology, Kasetsart University (unpublished data)

Table 2 Sequences of primer sets designed corresponding to each DNA barcode locus obtained from the *Exserohilum rostratum* nucleotide database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)

DNA barcode	Primer sequence (5' -> 3')	Original DNA sequence source for primer design (Accession no.)	PCR product size (bps)	Tm (°C)
18S-28S internal transcribed spacer	ER-18S-28S ITSF: CTGCGGAGGGATCATTACACAA ER-18S-28S ITSr: CGAGTCTCCCCCAACAAGG	KP340122	417	61.7
Actin encoding gene (<i>Act</i>)	ER-ActF: CTCGACTTCGAGCAGGAGA ER-ActR: TGTGTTAGCTGCCTGTGCTCGA	HE664079	286	59.5
Beta-tubulin encoding gene (<i>Tub2</i>)	ER-BtubF: TCCTGGATGGAGGTGGAGT ER-BtubR: CTCCACTTCTTCATGGTTGGATT	KT832856	341	59.2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene (<i>GAPDH</i>)	ER-GPDF: TTCTTTTCGTCAGGACCGTGG ER-GPDR: GAGCACCTCAATGTCGGACT	KP311328	348	59.9
Translation elongation factor encoding gene (<i>Tef1</i>)	ER-Tef1aF: CGGTACTGGTGAGTTCGAGG ER-Tef1aR: GATACCGGTCTCGACACGAC	HE664086	451	59.8

ในหลอดทดลองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยมีอาหารเหลวปริมาตร 15 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่าต่อเนื่องที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเก็บเกี่ยวเชื้อราและขับอาหารเหลวที่ติดมากับเส้นใยเชื้อราบนกระดาษทิชชูแบบหนาที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวหรือจากข้าวที่ปลูกเชื้อราทำโดยชั่งตัวอย่างพืชที่บดเป็นผงละเอียดจำนวน 100 มิลลิกรัม และย้ายไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร

จากนั้น ใส่ลูกบอลสแตนเลส (Stainless bead) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 มิลลิเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3

ลูก ในหลอดดังกล่าว และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดยเติมสารละลาย CTAB สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), 100 mM TrisHCl (pH 8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% beta-mercaptoethanol) จากนั้น เขย่าลูกเหล็กโดยใช้เครื่องเขย่าความเร็วสูงเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงพร้อมลูกเหล็กบดตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เศษชิ้นส่วนของเส้นใยเชื้อราหรือเศษเซลล์ของพืชตกตะกอน

จากนั้น ย้ายของเหลวไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อและเติมสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร

เท่ากับปริมาณของเหลวดีเอ็นเอลงไปในหลอด ผสมสารละลาย ดีเอ็นเอและคลอโรฟอร์มเข้าด้วยกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงย้าย ของเหลวที่มีลักษณะใสซึ่งอยู่ส่วนบนโดยแยกชั้นออกมาจากส่วน คลอโรฟอร์มและเศษซากของเซลล์สิ่งมีชีวิตไปยังหลอดปั่นเหวี่ยง หลอดใหม่ที่มีขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไอโซโพรพานอล ที่เย็นจัดปริมาณเท่ากับของเหลวดีเอ็นเอและเติมสารละลาย โซเดียมอะซิเตด (3 M) ปริมาณ 1 ใน 10 เท่าของสารละลาย ดีเอ็นเอ ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยการเขย่าหลอดเบา ๆ

นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวในหลอดให้หมดไป ใน ขั้นตอนนี้ ตะกอนดีเอ็นเอปรากฏอยู่ตรงส่วนก้นหลอด จากนั้น เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวออกจากหลอด พักหลอดปั่นเหวี่ยง ให้แห้ง แล้วเติมน้ำชนิด ultra-pure ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ วัดปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA)

การตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอเข้ารหัสจาก internal transcribed spacer (ITS) region และจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวจากยีน *OsActin* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของตัวอย่างดีเอ็นเอเข้ารหัส ทุกไอโซเลตด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังวิธีการที่อธิบายข้าง ต้น โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1: GCCGTAGGTTAACCTGCGC และ ไพรเมอร์ ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนนิวเคลียร์ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (ITS1–5.8S–ITS2) ที่มีศักยภาพในการตรวจสอบเข้ารหัส ส่วนใหญ่ โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส และเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ของข้าวด้วยไพรเมอร์ *OsActinF*: CAGCACATTCCAGCAGAT และ *OsActinR*: GGCTTAGCATTCTTGGGT (Duan *et al.*, 2014) ที่ออกแบบจากยีน *OsActin* (Os03g50890) ของข้าว โดยใช้ อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิต ดีเอ็นเอขนาด 190 คู่เบส เพื่อยืนยันว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง เข้ารหัสทุกไอโซเลตและจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวมีปริมาณและ คุณภาพได้มาตรฐานเพียงพอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ของ *E. rostratum* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เตรียมส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 50 ไมโครลิตร โดยนำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ ตัวอย่างเข้ารหัสทุกไอโซเลตซึ่งระบุใน Table 1 รวมถึงจีโนมิกส์ของ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์เจ้าหอมนิล ที่มีระดับความ เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใช้ เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้น เติมสารละลายไพรเมอร์ forward และไพรเมอร์ reverse ของ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละชนิด (Table 2) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร สารละลาย 10X Taq บัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ FIREPol® DNA polymerase (Solis BioDyne; Tartu, Estonia) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร จากนั้น เติมน้ำชนิด ultra pure ให้ครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปใส่ในเครื่อง มือสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 2 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ขั้นตอน annealing โดยใช้อุณหภูมิ T_m ที่ ระบุไว้ใน Table 2 ตามชนิดของดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบ 29 รอบของขั้นตอนดังกล่าวแล้วตามด้วยขั้นตอน สุดท้ายคือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำผลผลิต จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่สารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมสีย้อม (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจลที่มีความเข้มข้นของเจล 1% และใช้ DNA ladder (Solis BioDyne; Tartu, Estonia) ขนาด 100 คู่เบส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมเจลเพื่อใช้ติดตามขนาดของ ดีเอ็นเอเป้าหมาย ดำเนินการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อครบเวลาแล้วจึงตรวจสอบและ บันทึกภาพเจลด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพเจลรุ่น iBright™ CL1500 Imaging system (Thermo Fisher scientific; Waltham, MA USA)

การตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ต่อจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *E. rostratum* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เจือจางความเข้มข้นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเข้ารหัส *E. rostratum* ไอโซเลต SBR1 ให้มีระดับความเข้มข้นที่ 0.001,

0.01, 0.1, 1, 10, 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้น ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากงานวิจัยโดยทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์ มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนที่อธิบายข้างต้น ยกเว้นในขั้นตอนการดูดสารละลายดีเอ็นเอตั้งต้นควบคุมปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในแต่ละหลอดให้มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 นาโนกรัม ตามลำดับ ดำเนินการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่แสดงความจำเพาะสูง ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพตามขั้นตอนที่ได้อธิบายไว้ในวิธีการข้างต้น

การประเมินศักยภาพของไพรเมอร์ในการตรวจหา *E. rostratum* ในใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบจุด

นำสารละลายจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละพันธุ์ที่ปลูกเชื้อราและจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละพันธุ์ที่ฉีดพ่นด้วยน้ำผสม tween ความเข้มข้น 0.01% ที่ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัม มาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่แสดงความจำเพาะสูง ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในวิธีการข้างต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *E. rostratum* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ก่อนดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัยนี้ งานวิจัยนี้นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของโอไฮโอเชื้อราชนิดต่าง ๆ รวมถึงจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด ITS1 และ ITS4 ที่จำเพาะกับเชื้อราส่วนใหญ่และไพรเมอร์ OsActinF และ OsActinR ซึ่งออกแบบจากยีนอ้างอิง (Reference gene) ชนิด Actin ของข้าว ผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์พบว่า จีโนมิกส์ของตัวอย่างทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย ได้แก่ 600–650 คู่เบสโดยประมาณ ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายของบริเวณนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอในเชื้อราแต่ละชนิด และประมาณ 190 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายของบริเวณอินเตอร์ยูน OsActin ในข้าว (Figure 1) ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ดำเนินการตรวจสอบในงานวิจัยนี้มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อรา *E. rostratum* จำนวน 5 ชุดไพรเมอร์ พบว่า มีชุดไพรเมอร์ 2 ชุดที่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับเชื้อรา *E. rostratum* ได้แก่ ชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR ที่ออกแบบจากส่วนยีน Act ของเชื้อรา *E. rostratum* โดยสามารถเพิ่มผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 286 คู่เบส ในตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อรา *E. rostratum* ทุกโอไฮโอเลตที่ตรวจสอบ แต่ไม่พบผลผลิตดีเอ็นเอจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ และในข้าว ยกเว้น *Curvularia lunata* ที่พบผลผลิตดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดประมาณ 500 และ 1,000 คู่เบส ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างไปจากผลผลิตดีเอ็นเอของ *E. rostratum* (Figure 2A) ทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Actin สามารถแยกความแตกต่างเชื้อราทั้งสองชนิดออกจากกันได้ นอกจากนี้ ในงานวิจัยยังพบว่าชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR ที่ออกแบบจากส่วนยีน GAPDH ของเชื้อรา *E. rostratum* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะเท่ากับ 348 คู่เบส ในกลุ่มตัวอย่าง *E. rostratum* ทุกโอไฮโอเลต ในขณะที่ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จากตัวอย่างเชื้อราชนิดอื่น ๆ อาทิ *B. oryzae* แสดงขนาดผลผลิตดีเอ็นเอที่ 500 คู่เบส ซึ่งแตกต่างไปจาก *E. rostratum* (Figure 2B)

สำหรับไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ internal transcribed spacer ระหว่าง 18S และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ยีน *Tub2* และยีน *Tef1* พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตดีเอ็นเอในเชื้อราชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อรา *E. rostratum* (Figure 3) ทำให้ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวไม่สามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อรา *E. rostratum* ดังนั้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR ที่ออกแบบจากงานวิจัยนี้มีศักยภาพในการนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อรา *E. rostratum* โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบดั้งเดิมด้วยสภาวะการดำเนินปฏิกิริยาที่ระบุในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ The International Fungal Barcoding Consortium ได้แนะนำให้ใช้บริเวณตำแหน่ง internal transcribed spacer ในส่วนของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอบริเวณ ITS เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดหลักในการบ่งชี้เชื้อรา (Schoch *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณ internal transcribed spacer ระหว่าง 18S และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของเชื้อรา *E. rostratum* นั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราในสกุลอื่น ๆ ได้อีกด้วย ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมจะเป็นบริเวณที่นิยมสำหรับการจัดทำผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิต (Phylogenetics) แต่ดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดที่ออกแบบจากบริเวณดังกล่าวมีความสามารถในการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตของเชื้อราในบาง taxa เท่านั้น (Schoch *et al.*, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bradshaw *et al.* (2022) ที่ได้อาศัยการวิเคราะห์ตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณชิ้นส่วนของ ITS ในการแบ่งกลุ่มเชื้อราแบ่ง แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการจัดกลุ่มเชื้อราดังกล่าวแม้ว่าจะมีฐานฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด โดยเชื้อราแบ่งหลายชนิดยังคงรวมอยู่ในกลุ่ม species complex ซึ่งไม่สามารถแบ่งแยกชนิดได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ออกแบบจากชิ้นส่วนยีน *GAPDH* และ *Act* ร่วมกับยีนอื่น ๆ นอกเหนือจากบริเวณ ITS ประสบความสำเร็จในการจัดกลุ่มเชื้อราซึ่งอยู่ในกลุ่ม species complex ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ดังเช่นงานวิจัยของ Hernández-Restrepo *et al.* (2018) ซึ่งสามารถจัดแยกชนิดของเชื้อราในสกุล *Exserohilum* ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น

ความไวของชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR ในการตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *E. rostratum* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เนื่องจากชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/

ER-GPDR แสดงความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อรา *E. rostratum* ดังนั้น จึงนำชุดไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบความไวในการตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของตัวแทนไอโซเลตเชื้อรา *E. rostratum* (ไอโซเลต SBR1) ซึ่งพบว่าชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR แสดงความไวในการตรวจสอบได้ดีกว่าชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR ในสถานการณ์การดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามที่ระบุในงานวิจัยนี้ โดยพบว่าปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอตั้งต้นในระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR สามารถตรวจสอบได้คือที่ระดับความเข้มข้น 0.01 นาโนกรัม ในขณะที่ชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR สามารถตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอในตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัม (Figure 4) ทั้งนี้ การที่ชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR มีความไวในการตรวจสอบต่ำกว่าชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR นั้นอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น ๆ อาทิ ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนที่ตรวจสอบในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (Bastien *et al.*, 2008) รวมถึงจำนวนซ้ำของยีนที่พบในจีโนมที่แตกต่างกัน เป็นต้น สำหรับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิมนั้นเป็นวิธีการที่มีความไวในการตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตต่ำสุดเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น ๆ ดังแสดงในงานวิจัยของ Khan *et al.* (2018)

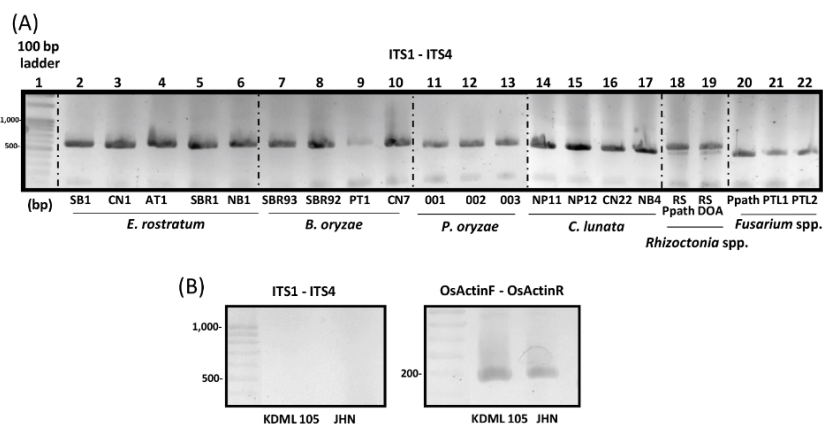


Figure 1 Validation of genomic DNA from all samples utilized in this study through conventional polymerase chain reaction (PCR) prior to conducting the *Exserohilum rostratum*-specific primer screening experiment. (A) PCR with ITS1-ITS4 primer set to amplify genomic DNA from *E. rostratum* (Lane 2–6: isolate ER-SB1, ER-CN1, ER-AT1, ER-SBR1, and ER-NB1), *Bipolaris oryzae* (Lane 7–10: isolate BO-SBR93, BO-SBR92, BO-PT1, and BO-CN7), *Pyricularia oryzae* (Lane 11–13: isolate PO-001, PO-002, and PO-003), *Curvularia lunata* (Lane 14–17: C-NP11, C-NP12, CN22, and C-NB4), *Rhizoctonia* spp. (Lane 18–19: RS-Ppath and PR-DOA) and *Fusarium* spp. (Lane 20–22: F-Ppath, F-PTL1, and F-PTL2), 100 bp DNA ladder was shown in lane 1. (B) PCR with ITS1-ITS4 primer set to amplify genomic DNA from rice cultivar Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) and Jao Hom Nin (JHN) (leaf) and PCR with OsActF-OsActR primer set to amplify genomic DNA from rice cultivar KDML 105 and JHN (right), with 100-bp DNA ladder shown in the first lane of each gel.

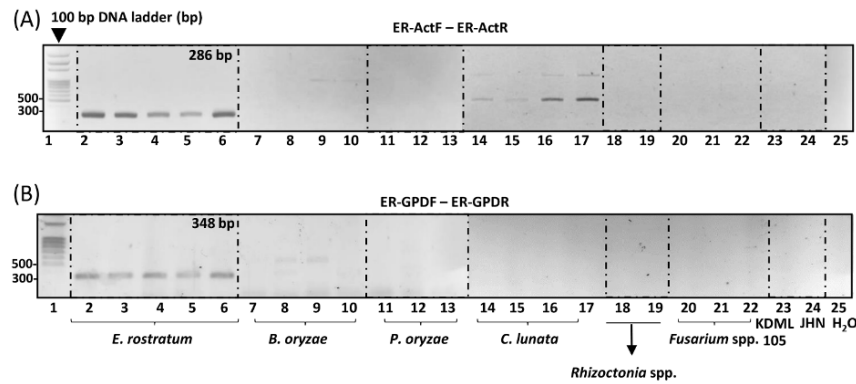


Figure 2 Specificity of the ER-ActF/ER-ActR and ER-GPDF/ER-GPDR primer sets to *Exserohilum rostratum* through conventional polymerase chain reaction (PCR). PCR with ER-ActF/ER-ActR primer set (A) and with ER-GPDF/ER-GPDR primer set to amplify genomic DNA from *E. rostratum* (Lane 2–6: isolate ER-SB1, ER-CN1, ER-AT1, ER-SBR1, and ER-NB1), *Bipolaris oryzae* (Lane 7–10: isolate BO-SBR93, BO-SBR92, BO-PT1, and BO-CN7), *Pyricularia oryzae* (Lane 11–13: isolate PO-001, PO-002, and PO-003), *Curvularia lunata* (Lane 14–17: C-NP11, C-NP12, CN22, and C-NB4), *Rhizoctonia* spp. (Lane 18–19: RS-Ppath and PR-DOA), *Fusarium* spp. (Lane 20–22: F-Ppath, F-PTL1, and F-PTL2), rice cultivar Khao Dawk Mali 105 (KDML105, lane 23) and cultivar Jao Hom Nin (JHN, lane 24), and pure water as a negative control (Lane 25). A 100-bp DNA ladder was shown in lane 1.

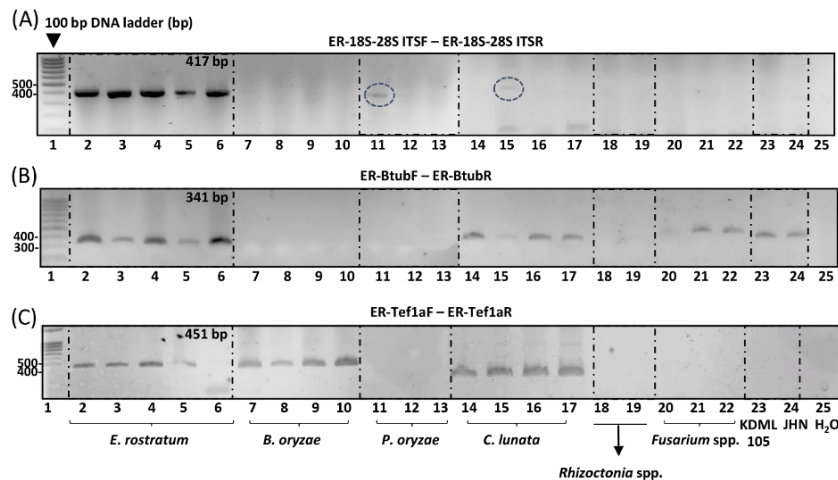


Figure 3 Specificity of the ER-18S-28S ITSF/ER-18S-28S ITS, ER-BtubF/ER-BtubR and ER-Tef1aF/ER-Tef1aR primer sets to *Exserohilum rostratum* through conventional polymerase chain reaction (PCR). PCR with ER-18SrRNAF/ER-18SrRNAR primer set (A), with ER-BtubF/ER-BtubR primer set (B) and with ER-Tef1aF/ER-Tef1aR primer set (C) to amplify genomic DNA from *E. rostratum* (Lane 2–6: isolate ER-SB1, ER-CN1, ER-AT1, ER-SBR1, and ER-NB1), *Bipolaris oryzae* (Lane 7–10: isolate BO-SBR93, BO-SBR92, BO-PT1, and BO-CN7), *Pyricularia oryzae* (Lane 11–13: isolate PO-001, PO-002, and PO-003), *Curvularia lunata* (Lane 14–17: C-NP11, C-NP12, CN22, and C-NB4), *Rhizoctonia* spp. (Lane 18–19: RS-Ppath and PR-DOA), *Fusarium* spp. (Lane 20–22: F-Ppath, F-PTL1, and F-PTL2), rice cultivar Khao Dawk Mali 105 (KDML105, lane 23) and cultivar Jao Hom Nin (JHN, lane 24), and pure water as a negative control (Lane 25). A 100-bp DNA ladder was shown in lane 1.

ซึ่งพบว่าการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิมนั้นสามารถตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อรา *Alternaria solani* จากการใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 13.6 นาโนกรัม ซึ่งน้อยกว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ real-time (Real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) ถึง 10,000 เท่า ดังนั้น การพัฒนาไพรเมอร์เพื่อใช้ร่วมกับวิธี

real-time PCR ในการใช้ตรวจเชื้อรา *E. rostratum* รวมถึงใช้วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราในงานวิจัยต่อไปจะช่วยพัฒนาวิธีการตรวจ *E. rostratum* อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงนำไปใช้ประโยชน์ในการประเมินปริมาณเชื้อราในพืชอาศัยเพื่อประเมินความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อราต่อไป

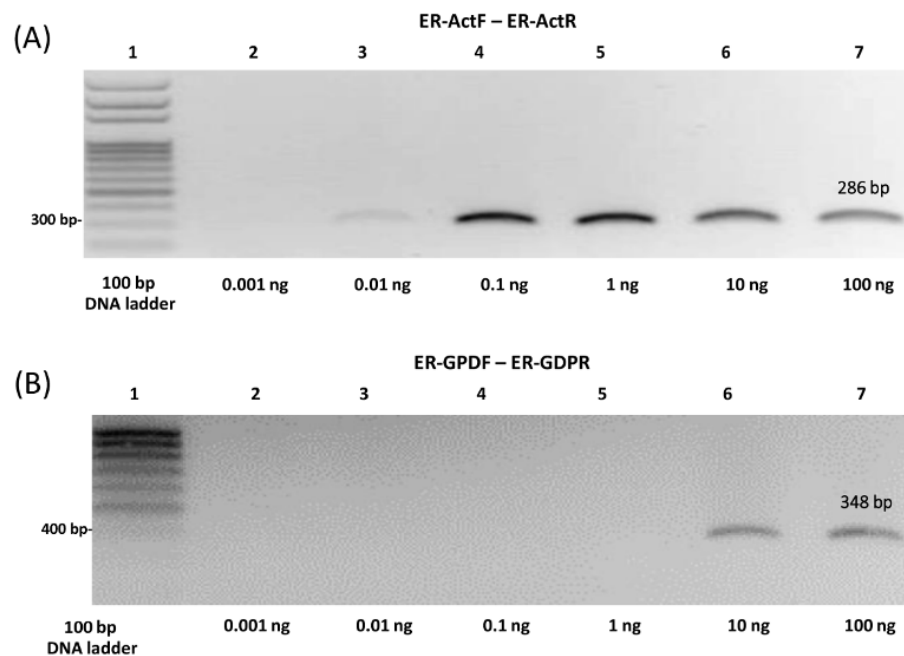


Figure 4 Sensitivity of the ER-ActF/ER-ActR and ER-GPDF/ER-GPDR primer sets to *Exserohilum rostratum* through conventional polymerase chain reaction (PCR). PCR with ER-ActF/ER-ActR primer set (A) and with ER-GPDF/ER-GPDR (B) to amplify genomic DNA from *E. rostratum* isolate SBR1 with different concentration of DNA templates: 0.001 ng (Lane 2), 0.01 ng (Lane 3), 0.1 ng (Lane 4), 1 ng (Lane 5), 10 ng (Lane 6) and 100 ng (Lane 7). A 100-bp DNA ladder was included for sizing the amplicons (Lane 1).

ศักยภาพของชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR สำหรับการตรวจ *E. rostratum* ในใบข้าวที่แสดงอาการใบจุดจาก *E. rostratum*

ประเมินศักยภาพชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR โดยตรวจเชื้อรา *E. rostratum* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในตัวอย่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข31 กข41 และเจ้าหอมนิลที่ได้รับการปลูกเชื้อ *E. rostratum* ไอโซเลต SBR1 และแสดงอาการโรคใบจุดภายใน

หลังการปลูกเชื้อราเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR และ ER-GPDF/ER-GPDR ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณขึ้นส่วนยีน *Act* และบริเวณยีน *GAPDH* ของเชื้อรา *E. rostratum* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่แสดงอาการจุดจากเชื้อราดังกล่าวโดยใช้สภาวะการดำเนินปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสตามที่เหมาะสมในงานวิจัย (Figure 5) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดในการนำไปใช้สำหรับวินิจฉัยอาการใบจุดของข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *E. rostratum*

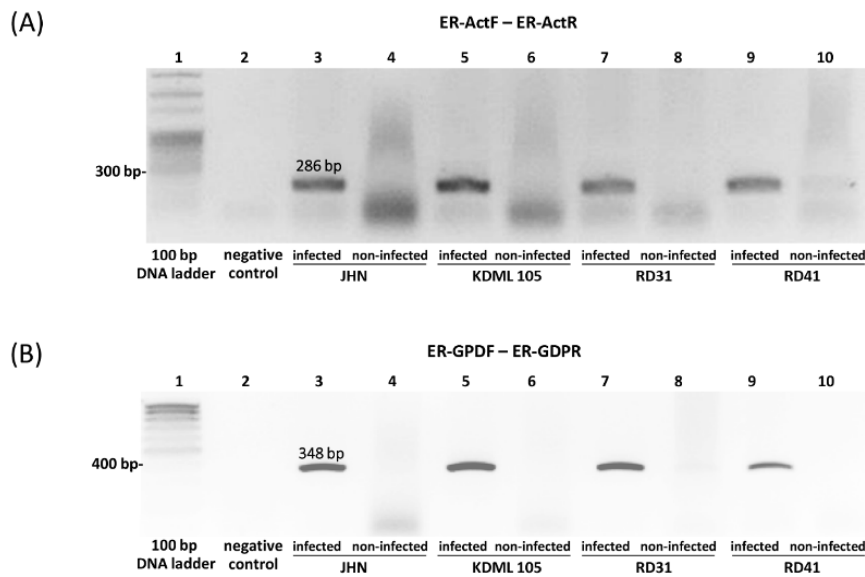


Figure 5 Conventional polymerase chain reaction (PCR) of *Exserohilum rostratum* isolate SBR1 using primer sets of ER-ActF/ER-ActR (A) and of ER-GPDF/ER-GPDR (B) in rice cultivar Jao Hom Nin (JHN), Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Rice Department31 (RD31), and Rice Department41 (RD41) after 72 hours of *E. rostratum*-infection and water solution (+0.01% tween20). A 100-bp DNA ladder was shown in lane 1.

สรุป

การพัฒนาชุดไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบ *E. rostratum* ที่เป็นเชื้อราก่ออาการใบจุด ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิม พบว่า ชุดไพรเมอร์ ER-ActF/ER-ActR ที่ออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีนกำหนดการสร้างโปรตีน Actin (Act) และชุดไพรเมอร์ ER-GPDF/ER-GPDR ออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีนกำหนดการสร้างโปรตีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ของ *E. rostratum* มีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *E. rostratum* รวมถึงชุดไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีศักยภาพในการตรวจสอบเชื้อราในใบข้าวที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจาก *E. rostratum* อนึ่งในงานวิจัยนี้จำนวนไอโซเลตเชื้อรา *E. rostratum* ที่ใช้ในการตรวจสอบ

ยังคงมีจำนวนจำกัด ดังนั้น ควรขยายการทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด โดยเพิ่มจำนวนไอโซเลตของเชื้อรา *E. rostratum* ทดสอบที่มาจากพื้นที่ปลูกข้าวในภูมิภาคต่าง ๆ เพื่อขยายผลการทดสอบความแม่นยำของชุดไพรเมอร์ทั้งสองชนิดในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อตรวจหาเชื้อรา *E. rostratum* สำหรับการวินิจฉัยอาการใบจุดในข้าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากศูนย์ประสานงานนักเรียนรู้บาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Bastien, P., G.W. Procop and U. Reischl. 2008. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. J. Clin. Microbiol. 46(6): 1897–1900. <https://doi.org/10.1128/jcm.02258-07>.
- Boonkorn, Y., V. Tongsrir, O. Piasai and P. Songkumarn. 2024. Characterization, pathogenicity and fungicide response of *Exserohilum rostratum* causing leaf spot on rice in Thailand. Eur. J. Plant Pathol. 170: 549–566. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02918-w>.

- Bradshaw, M.J., G.X. Guan, L. Nokes, U. Braun, S.Y. Liu and D.H. Pfister. 2022. Secondary DNA barcodes (CAM, GAPDH, GS, and RpB2) to characterize species complexes and strengthen the powdery mildew phylogeny. *Front. Ecol. Evol.* 10: 918908. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.918908>.
- Cardona, R. and M.S. González. 2007. First report of *Exserohilum rostratum* associated with rice seed in Venezuela. *Plant Dis.* 91(2): 226. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0226C>.
- Chaijuckam, P., P. Songkumarn and J.J.G. Guerrero. 2019. Genetic diversity and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in north-central Thailand. *Appl. Sci. Eng. Prog.* 12(2): 116–125. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2019.03.004>.
- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand, pp. 333–342. *In* R.S. Zeigler, S.A. Leong and P.S. Teng, eds. *Rice Blast Disease*. CAB International, Wallingford, UK.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19(1): 11–15.
- Duan, C., J. Yu, J. Bai, Z. Zhu and X. Wang. 2014. Induced defense responses in rice plants against small brown planthopper infestation. *Crop J.* 2(1): 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2013.12.001>.
- Hernández-Restrepo, M., H. Madrid, Y.P. Tan, K.C. da Cunha, J. Gené, J. Guarro and P.W. Crous. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia*. 41: 71–108. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.05>.
- Hoang, M.T.V., L. Irinyi, S.C.A. Chen, T.C. Sorrell and W. Meyer. 2019. Dual DNA barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections. *Front. Microbiol.* 10: 1647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01647>.
- Jaroenthai, K. 2001. Dematiaceous Hyphomycetes on Rice, Corn, Narrowleaf Weed and Rhizosphere Soil. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Kaboré, K.H., D. Diagne, J. Milazzo, H. Adreit, M.H. Lebrun and D. Tharreau. 2022. First report of rice brown spot caused by *Exserohilum rostratum* in Mali. *Plant Dis.* 106(6): 1747. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0662-PDN>.
- Khan, M., R. Wang, B. Li, P. Liu, Q. Weng and Q. Chen. 2018. Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Front. Microbiol.* 9: 2089. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02089>.
- Klarum, R. 2020. Pathogenicity Analysis of Thai Rice Blast Isolates Toward Rice Containing Resistance Gene *Pik* or *Pi9* and Study on Its Defense Mechanism. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Korra, T., S. Navathe, S. Biradar and R. Chand. 2023. Pathogenicity and infection behaviour of *Exserohilum rostratum* on wheat and associated collateral hosts. *J. Plant Pathol.* 105(3): 695–709. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01358-5>.
- Kumar, J., B. Kumar, M.K. Prajapati, C. Bihari and A. Rai. 2021. Seed discoloration in rice: Causes and their effect on seed quality. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 10(1): 2644–2649.
- Kusai, N.A., M.M. Azmi, N.A. Zainudin, M.T. Yusof and A.A. Razak. 2016. Morphological and molecular characterization, sexual reproduction, and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. *Mycologia*. 108(5): 905–914. <https://doi.org/10.3852/15-175>.
- Mahmad-Toher, A.S., N. Govender, D. Dorairaj and M.Y. Wong. 2022. Effects of silica soil amendment against *Exserohilum rostratum*, the fungal pathogen of rice brown spot disease in Peninsular Malaysia. *Sci. Rep.* 12(1): 15690. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19308-z>.

- Majeed, R.A., A.A. Shahid, G.A. Liaqat, K. Saleem, M. Asif, M. Shafiq, M.S. Haider and M. Noreen. 2016. First report of *Setosphaeria rostrata* causing brown leaf spot of rice in Pakistan. Plant Dis. 100(10): 2162. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0220-PDN>
- Oechsler, R.A., M.R. Feilmeier, D.R. Ledee, D. Miller, M.R. Diaz, M.E. Fini, J.W. Fell and E.C. Alfonso. 2009. Utility of molecular sequence analysis of the ITS rRNA region for identification of *Fusarium* spp. from ocular sources. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50(5): 2230–2236. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2757>.
- Office of Agricultural Economics. 2024. Thailand foreign agricultural trade statistics. Available Source: <https://impexpth.oae.go.th/export>, May 1, 2024. (in Thai)
- Raghu, S., M.S. Baite, N.B. Patil, P. Sanghamitra, M.K. Yadav, S.R. Prabhukarthikeyan, U. Keerthana, G. Gurupirasanna-Pandi, S. Aravindan and P.C. Rath. 2020. Grain discoloration in popular rice varieties (*Oryza sativa* L) in eastern India, associated mycoflora, quality losses and management using selected biocontrol agents. J. Stored Prod. Res. 88: 101682. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101682>.
- Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109(16): 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Silodia, K., M.S. Bhale and G.K. Koutu. 2019. Prevalence of dirty panicle disease of rice (*Oryza sativa* L.) in Madhya Pradesh. Int. J. Chem. Stud. 7(4): 767–772.
- Silva, F.J.A., S.L.P. Maich, P.R. Meneses, C. Bellé, D.R. de Barros and C.R.J. Farias. 2016. First report on *Exserohilum rostratum* pathogenicity causing brown spot to rice in Brazil. Plant Dis. 100(12): 2531. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0709-PDN>.
- Sombunjitt, S., T. Sriwongchai, C. Kuleung and V. Hongtraku. 2017. Searching for and analysis of bacterial blight resistance genes from Thailand rice germplasm. Agric. Nat. Resour. 51(5): 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.11.001>.
- Su-Han, N.H., P. Songkumarn, S. Nuankaew, N. Boonyuen and O. Piasai. 2019. Diversity of sporulating rice endophytic fungi associated with Thai rice cultivars (*Oryza sativa* L.) cultivated in Suphanburi and Chainat provinces, Thailand. Curr. Res. Environ. Appl. Mycol. (J. Fungal Biol.) 9(1): 1–14. <https://doi.org/10.5943/cream/9/1/1>.
- Suddhiyam, P. 2016. Climate Change Impact to the Field and Energy Renewable Crop Production. Available Source: <https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2888>, May 1, 2024. (in Thai)
- 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. Sninsk and T.J. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Zayan, S.A. 2019. Impact of climate change on plant diseases and IPM strategies, pp. 1–12. In S. Topolovec-Pintarić, ed. Plant Diseases: Current Threats and Management Trends. IntechOpen, London, UK.