

การเปลี่ยนแปลงเมแทบอลอเมติกส์กลุ่มปฐมภูมิที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไหม้ในข้าว

Primary Metabolomic Profiling Associated with Rice Blast Resistance

รัตนวรรณ จันทร์ศิริ^{1,*} สุพัทธา นราวัฒน์¹ ภัทรศยา สายยี่ด¹

ดวงกมล บุญช่วย² และชนินพัฒน์ ทองรอด²

Rattanawan Jansasithorn^{1,*}, Supatthra Narawattana¹, Pattarasaya Sai-yued¹

Duangkamon Boonchuay² and Chaninphat Thongrod²

¹สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ สุพรรณบุรี 72000

²ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ชัยนาท 17000

¹Thailand Rice Science Institute, Suphanburi, Thailand 72000

²Chainat Rice Research Center, Chainat, Thailand 17000

*Corresponding author: rattanawan.j@rice.mail.go.th

*ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0005-8550-2206>

Received: October 15, 2025

Revised: April 24, 2026

Accepted: May 14, 2026

Abstract

This research aimed to apply metabolomics technology to investigate changes in rice metabolites in response to infection by the rice blast pathogen *Pyricularia oryzae*. The blast-resistant rice varieties (Hangyee 71 and RD59) and blast-susceptible rice varieties (KDML 105 and PTT1) were used. The thirty-day-old rice plants were inoculated with a spore suspension of *P. oryzae* at a concentration of 5×10^4 spores·mL⁻¹. The leaf samples were collected 8 and 12 hours, and 1–7 days after inoculation. Metabolite profiling was performed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a time-of-flight mass spectrometer (GCxGC-TOFMS). The results revealed distinct metabolic profiles between the blast-resistant and blast-susceptible rice varieties. In the resistant rice varieties, a significant increase ($p \leq 0.1$) in phenylalanine, citrulline, and shikimic acid was detected three days after inoculation, whereas in the susceptible cultivars these metabolites were observed, starting five days after inoculation. These compounds are key precursors in the phenylpropanoid and shikimate pathways, which are associated with plant defense mechanisms. In addition, the resistant rice varieties showed the presence of methoxyflavone, an antioxidant compound, and salicylic acid, a plant hormone involved in defense induction. These findings provide insights into the metabolic mechanisms underlying rice blast resistance.

Keywords: blast disease, metabolomics, rice, *Pyricularia oryzae*, GCxGC-TOFMS

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำเทคโนโลยีเมแทบอลอไมกส์มาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นในข้าว เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* โดยพันธุ์ข้าวที่นำมาทดลองประกอบด้วย พันธุ์ต้านทานโรค ได้แก่ ข้าวพันธุ์หางยี 71 และ กข59 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ทำการปลูกเชื้อให้กับต้นข้าวอายุ 30 วัน ด้วยเชื้อ *P. oryzae* บริเวณใบข้าวด้วยสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 5×10^4 สปอร์ต่อมล. จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 ชม. 12 ชม. และ 1-7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารเมแทบอไลต์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GCxGC-TOFMS) ผลการทดลองพบความแตกต่างของสารเมแทบอไลต์ในข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอโดยข้าวพันธุ์ต้านทานพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.1$) ของกรดอะมิโน phenylalanine citrulline และ shikimic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่ม phenylpropanoid และ shikimate pathway ตามลำดับ หลังการปลูกเชื้อ *P. oryzae* เป็นเวลา 3 วันขึ้นไป ในขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอพบสารดังกล่าวหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วันขึ้นไป ซึ่งสารเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานโรคของพืช นอกจากนี้ในข้าวพันธุ์ต้านทานยังพบสาร methoxyflavone ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึง salicylic acid ที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการส่งสัญญาณในการสร้างความต้านทาน หลังจากเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายพืช ผลการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกความต้านทานโรคไหม้ของข้าว

คำสำคัญ: โรคไหม้ เมแทบอลอไมกส์ ข้าว
เชื้อ *Pyricularia oryzae* เครื่อง GCxGC-TOFMS

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2568/2569 พบว่าข้าวไทยมีผลผลิตถึง 26.99 ล้านตัน และมีปริมาณส่งออก 8 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 4,545 ล้านเหรียญสหรัฐ (Department of Foreign Trade, 2025) อย่างไรก็ตาม การเข้าทำลายของโรคและแมลงส่งผลต่อผลผลิตของข้าวไทย โดยโรคระบาดที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตข้าวมากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ โรคไหม้ (blast disease) สามารถพบได้ทุกภาคของประเทศไทย มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เริ่มเข้าทำลายตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยมีอาการตั้งแต่การเกิดแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตาบนใบข้าว กลางแผลมีสีเทา สามารถกระจายไปทั่วทั้งใบ ไปจนถึงอาการแห้งตายคล้ายถูกไฟไหม้ หากพบในระยะออกรวงทำให้เมล็ดลีบ พบรอยแผลข้าวบริเวณคอรวง ทำให้รวงเปราะ หักง่าย หล่นเสียหายหรือเรียกอาการในระยะนี้ว่า โรคไหม้คอรวง (Mekwatanakam and Mekwatanakam, 2016) เกษตรกรจึงนิยมเลือกปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานเพื่อลดอัตราการเกิดโรคดังกล่าว

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ แต่การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานในปัจจุบันใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน จึงนำมาสู่การนำเทคโนโลยีเมแทบอลอไมกส์มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความรวดเร็วมากยิ่งขึ้น โดยเมแทบอลอไมกส์เป็นการศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมแทบอไลต์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในช่วงเวลาหนึ่งที่จะนำไปสู่การพัฒนารูปร่างลักษณะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมถึงการเชื่อมโยงการทำงานกับกระบวนการอื่น ๆ ในการควบคุมการเจริญเติบโตและการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ความเข้าใจและการค้นพบกลไกการทำงานของพืชภายใต้

สภาวะแวดล้อมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา การศึกษาดังกล่าวจะทำให้เกิดความเข้าใจถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่สัมพันธ์กับลักษณะปรากฏ (phenotype) หรือคุณลักษณะเฉพาะ (characteristics) ซึ่งส่งผลให้สิ่งมีชีวิตแสดงออกภายใต้สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ (Settachaimongkon and Luangwilai, 2017) การศึกษาเมแทบอลอไมกส์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใหม่ในข้าวที่ผ่านมา พบว่าในใบข้าวที่ติดเชื้อราจะพบสารในกลุ่มเมแทบอลิไต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารในกลุ่มลิกนิน (lignin monomers) โดยเชื้อราก่อโรคชนิดนี้จะไปยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและสามารถดึงอาหารจากเนื้อเยื่อข้าวไปใช้ และมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของวิถี shikimate pathway ทำให้ข้าวอ่อนแอลง (Parker *et al.*, 2009) ซึ่งจากองค์ความรู้ทางเมแทบอลอไมกส์ดังกล่าว จะสามารถนำไปใช้ในการศึกษากลไกความต้านทานโรคใหม่ของข้าวพันธุ์ต้านทาน โดยมุ่งเน้นสารเมแทบอลิไต์ที่เกี่ยวข้องกับ shikimate pathway เป็นต้น งานวิจัยนี้เป็นการนำเทคโนโลยีเมแทบอลอไมกส์มาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอลิไต์ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในพันธุ์ต้านทาน เพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการต้านทานและนำไปสู่การค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงข้าวพันธุ์ต้านทานโรคใหม่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อสาเหตุโรคไหม้

โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ในพื้นที่จังหวัดชัยนาท นครสวรรค์ และอุทัยธานี นำตัวอย่างใบข้าวมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นตัดเนื้อเยื่อขนาด 0.5 x 1 ซม. บริเวณที่มีแผลรูปตา โดยตัดผ่ากลางแผล ให้เนื้อเยื่อที่ต้องการมีบริเวณแผลและส่วนสีเขียวอย่างละครึ่ง นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วใส่กล่องพลาสติกและให้ความชื้นโดยวิธี moist chamber method หลังจากนั้น 1-2 วัน เชื้อราสาเหตุโรคจะสร้างสปอร์บริเวณรอยตัด

ที่ผ่ากลางแผล นำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นแยกสปอร์เดี่ยวของเชื้อราด้วยวิธี single-spore technique โดยใช้เข็มพาสเจอร์ปีเปิดแก้ว ที่ลนไฟแล้วตัดให้ปลายโค้งงอแตะกลุ่มสปอร์ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร Water Agar (WA) 1-2 วัน นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อนำสปอร์ที่งอกเส้นใยบนอาหาร WA ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA (1 สปอร์ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาตรวจพิสูจน์การก่อโรคพืชตามวิธี Koch's postulates ดังนี้ 1) เก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการโรคไหม้มาแยกเชื้อสาเหตุโรค (isolation) ให้บริสุทธิ์ (pure culture) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือชีวโมเลกุลเพื่อระบุ/จำแนกชนิดของเชื้อ (identification) 3) นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาปลูกเชื้อ (inoculation) ลงบนต้นข้าวพันธุ์เดียวกับที่เก็บมาแยกเชื้อหรือพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อให้แสดงอาการของโรคเหมือนกับตัวอย่างที่เก็บมาแยกเชื้อ 4) เมื่อข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการของโรค ทำการแยกเชื้อสาเหตุจากข้าวที่แสดงอาการใหม่ (re-isolation) หากพบว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับที่แยกได้ในขั้นตอนแรกจะถือว่าเชื่อว่าเป็นสาเหตุโรคจริง (Agrios, 2005)

ดำเนินการคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อที่ทำให้ข้าวทดสอบเป็นโรคอย่างรุนแรง และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์แบบแห้งบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หรือในกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C (Piasai, 2017) สำหรับการเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *P. oryzae* ทำโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10-14 วัน จากนั้นเติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มล. และใช้เข็มเขี่ยชุดสปอร์เชื้อราบนผิวหน้าอาหาร กรองผ่านผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อกรองเส้นใยและขุ่นออก แล้วนำไปนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วย Haemocytometer ปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ 5×10^4 สปอร์ต่อมล. ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อที่เดิม สารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

การเตรียมตัวอย่างข้าวและการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้

เตรียมตัวอย่างข้าว โดยทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผสมดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อกับปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0 อัตรา 10 กรัมต่อดิน 12 กก. ปลูกในกระบะพลาสติก ขนาด 28x42x8 ซม. โดยปลูกข้าวทดสอบ จำนวน 4 พันธุ์ ดังนี้ พันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) และปทุมธานี 1 (PTT1) พันธุ์ต้านทาน ได้แก่ หางยี 71 (Hangyee 71) และ กข59 (RD59) โดยปลูกข้าวจำนวน 6 กระบะต่อ 1 พันธุ์ อัตราเมล็ดพันธุ์ 50 กรัมต่อกระบะ การปลูกเชื้อ *P. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ ดำเนินการช่วงเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม ปีพ.ศ. 2566 โดยฟอสפורแขวนลอยของเชื้อรา *P. oryzae* ความเข้มข้น 5×10^4 สปอร์ต่อมล. ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยแปรงพ่นสี (airbrush) บนต้นข้าวทดสอบอายุ 30 วัน ทิ้งทั้งต้นที่อัตรา 30 มล.ต่อกระบะ (Mekwatanakarn and Mekwatanakarn, 2016) จำนวน 2 กระบะต่อพันธุ์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่พ่นด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสมสารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ปลูกเชื้อ) จำนวน 2 กระบะต่อพันธุ์ ประเมินความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งระดับคะแนนและลักษณะอาการของโรคไหม้ ตามระบบของ Standard Evaluation System for Rice; SES (IRRI, 2013) (Table 1) จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างใบข้าว หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 ซม. 12 ซม. และ 1-7 วัน (Hata *et al.*, 2021; Zhan *et al.*, 2020) โดยเก็บใบจากต้นข้าวที่ปลูกเชื้อจำนวน 2 ต้นต่อกระบะ ๆ ละ 2-3 ใบ โดยเก็บใบตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากใบยอด เพื่อวิเคราะห์เมแทบอลอไมกส์ต่อไป

การสกัดและวิเคราะห์เมแทบอลอไมกส์ในพันธุ์ข้าวต้านทานและพันธุ์อ่อนแอโรคไหม้

ดำเนินการสกัดตัวอย่างใบข้าวจากข้อ 2 โดยบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และนำมาซึ่งปริมาณ 100 มก. เติมน้ำมันคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2:1 ที่แช่เย็นปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ Adonitol ซึ่งเป็น Internal Standard ความเข้มข้น 2 มก./มล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป Sonicate ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มและน้ำกลั่นอย่างละ 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $\times 13,200$ รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสในหลอด Eppendorf และนำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะไนโตรเจน จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้มาทำ Derivatization โดยเติม Methoxyamin hydrochloride ใน Pyridine (20 มก./มล.) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 37°C (ความเร็ว 950 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเติม N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA เขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที กรองตัวอย่างใส่ขวดและนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometer (GCxGC-TOFMS) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลสารเมแทบอลไลต์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GCxGC-TOFMS ได้รับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ChromaTOF-GC ที่ความเหมือนมากกว่าหรือเท่ากับ ร้อยละ 70 และ signal-to noise ratio เท่ากับ 100 จากนั้นนำข้อมูลไปจัดเรียงด้วยโปรแกรม Statistical compare วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) และสร้าง heatmap ด้วยโปรแกรม R โดยทำการ

เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของสารเมแทบอลิไต์ในพันธุ์ (p≤0.1) จัดเป็นสารเมแทบอลิไต์ที่มีความแตกต่างกัน
ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอ โดยสารเมแทบอลิไต์ที่มี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ปริมาณแตกต่างกันที่ระดับมากกว่า 1.5 fold change

Table 1 Field key for visual assessment of leaf blast severity

Scale	Description	Diseased leaf area
0	No typical susceptible lesion observed	0
1	Rapid observation does not reveal leaf lesions, but careful scrutiny of each row reveals few lesions.	<0.3
2	Rapid detection detects a few lesions.	0.3-0.9
3	Several lesions are randomly scattered within a plot, and the lesion number on an infected leaf ranges from 1 to 4.	1-2
4	Upper leaves are uniformly dotted with blast lesions but without necrotic (brown) leaf tips. A few to several leaves are brown.	3-7
5	Several to many lower leaves become necrotic and few dead leaves are observed. Tips of several upper leaves show brown color and begin to fold.	8-14
6	Lower leaves are uniformly exhibiting brown color and several dead leaves are visible. Tip necrosis of upper leaves is predominant.	15-24
7	Tips of most upper leaves are curling. Middle and lower leaves are brown. Several plants or tillers are stunted or dead.	25-39
8	Extensive leaf curling and browning of upper and middle leaves are prevalent. Plants are generally stunted and many plants are dead.	40-65
9	Majority of plants are severely stunted, brown and dead. Only few to several plants have green leaves with heavy infection.	>65

Disease Resistance: HR = highly resistant (scale = 0-1); R = resistant (scale = 2); MR = moderately resistant (scale = 3);

MS = moderately susceptible (scale = 4-6); S = susceptible (scale = 7); HS = highly susceptible (scale = 8-9)

ผลการวิจัย

การแยกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลต PO2020_CNT006 จากตัวอย่างใบข้าวที่เกิดโรค และทำให้ข้าวทดสอบพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอเป็นโรคไหม้อย่างรุนแรง สำหรับการปลูกเชื้อโรคไหม้ พบว่าจากการประเมินความรุนแรงของโรคไหม้หลังปลูกเชื้อ 7 วัน ข้าวทดสอบพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงปฏิกิริยาอ่อนแอมาก (HS) และปทุมธานี 1 แสดงปฏิกิริยาค่อนข้างอ่อนแอ (MS) ในขณะที่ข้าวทดสอบพันธุ์ต้านทาน

ได้แก่ พันธุ์หางยี 71 แสดงปฏิกิริยาด้านทาน (R) และ กข59 แสดงปฏิกิริยาค่อนข้างต้านทาน (MR)

การวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ในตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 (พันธุ์อ่อนแอ) และ กข59 และหางยี 71 (พันธุ์ต้านทาน) ที่ผ่านการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เป็นเวลา 8, 12 ชม. และ 1-7 วัน พบสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดจำนวน 169 สาร ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่มกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน น้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และสารอื่น ๆ ได้แก่ oxalic acid, shikimic acid, salicylic acid, phenylalanine, proline, valine, methionine, palmitic acid เป็นต้น (Figure 1)

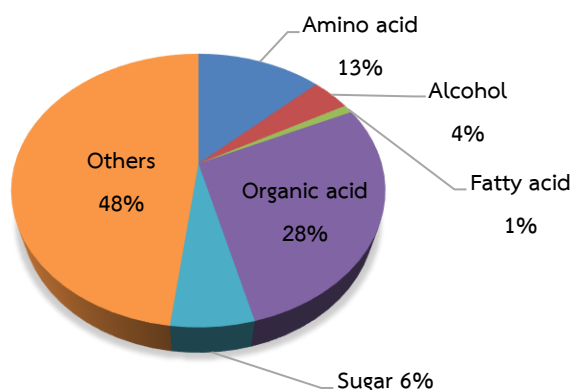


Figure 1 Metabolites found in leaves of KDML105, PTT1, RD59, and Hangyee 71 after 8-12 hours and 1-7 days of *Pyricularia oryzae* inoculation

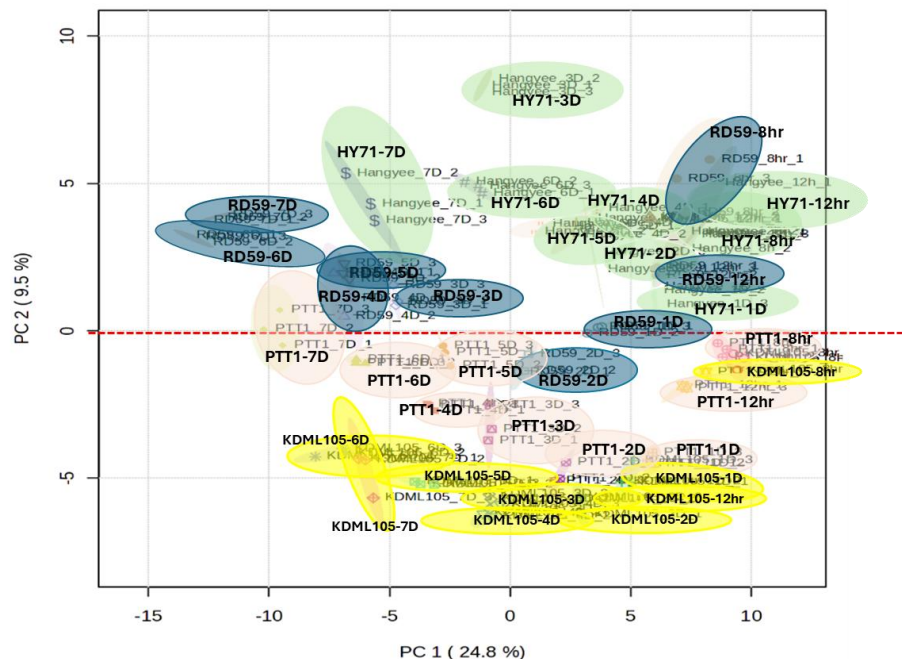


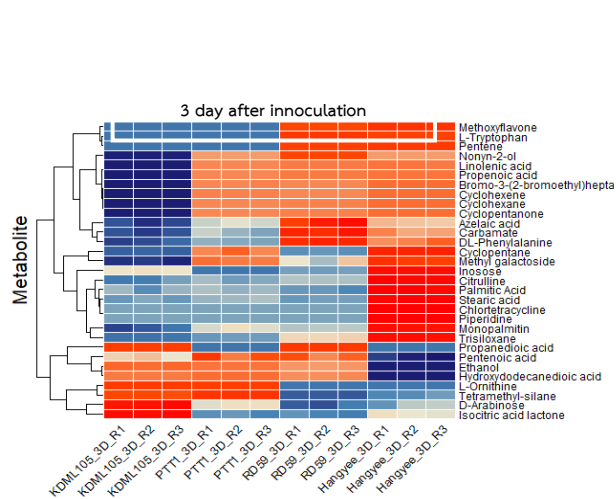
Figure 2 Principal component analysis (PCA) of metabolites found in leaves of KDML105, PTT1, RD59, and Hangyee 71 after 8 hours, 12 hours, and 1–7 days of *Pyricularia oryzae* inoculation (■ = KDML105, ■ = PTT1, ■ = RD59, ■ = Hangyee 71 (HY71))

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความแปรปรวนของสารเมแทบอลิไทด์ในข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อในเวลาที่แตกต่างกัน โดยพบว่าองค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2 (PC1 และ PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมของข้อมูลได้ร้อยละ 34.9 เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของตัวอย่างแกน PC1 (แกน X) พบว่า ข้าวพันธุ์หางยี 71 และ กข59 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานมีรูปแบบองค์ประกอบของสารเมแทบอลิไทด์ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะในระยะเริ่มต้นหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งสะท้อนจากการจัดกลุ่มที่มีการซ้อนทับกันของตัวอย่างข้าวในช่วงเวลา 8 และ 12 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ มีแนวโน้มแสดงรูปแบบองค์ประกอบของสารเมแทบอลิไทด์ที่ใกล้เคียงกันในช่วงระยะเริ่มต้น (8 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ) เช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาภาพรวมของการกระจายตัวของข้อมูล พบว่าข้าวกลุ่มพันธุ์ต้านทานและพันธุ์

อ่อนแอมีแนวโน้มแยกกลุ่มกันอย่างชัดเจนตามแกน PC2 โดยข้าวพันธุ์ต้านทานมีแนวโน้มกระจายตัวอยู่ในช่วงค่าบวก ขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอมีแนวโน้มอยู่ในช่วงค่าลบ ซึ่งสะท้อนถึงความแตกต่างของรูปแบบสารเมแทบอลิไทด์ระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอภายหลังการตอบสนองต่อการปลูกเชื้อ (Figure 2)

เมื่อนำข้อมูลสารเมแทบอลิไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยเลือกเฉพาะสารที่มีความแตกต่างกันที่ระดับมากกว่า 1.5 fold change ของข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข59 และหางยี 71 และนำมาสร้าง heatmap เพื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของสารเมแทบอลิไทด์ในข้าวแต่ละพันธุ์ด้วยโปรแกรม R โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอลิไทด์หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3, 5, 6 และ 7 วัน (Figure 3–4) โดยข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นพันธุ์ข้าวอ่อนแอต่อโรคไหม้ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข59 เป็นข้าวที่ได้รับการพัฒนาให้มี

ความต้านทานต่อโรคไหม้ จากผลการวิเคราะห์พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสารเมแทบอไลต์ประเภทกรดอะมิโน กรดไขมัน และน้ำตาล ได้แก่ asparagine, alanine, linolenic acid, palmitic acid และ ribofuranose โดยเฉพาะกรดอะมิโน phenylalanine และ citrulline ในข้าวพันธุ์หางยี 71 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน โดยทั้งสองสารเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสร้างสารในกลุ่ม phenylpropanoids และ polyamines ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน L-ornithine หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน นอกจากนี้ พบการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม flavonoid ซึ่งเป็น natural plant polyphenols ได้แก่ methoxyflavone ในข้าวพันธุ์ต้านทานหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 และ 5 วัน แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวในข้าวพันธุ์อ่อนแอ (Figure 3)



หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 6 วัน พบการเพิ่มขึ้นหรือ up-regulation ของสารเมแทบอไลต์กลุ่ม ketoglutaric acid ในข้าวพันธุ์หางยี 71 และพบในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งสารดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชและเหนี่ยวนำความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว ในขณะที่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข 59 พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน phenylalanine และ citrulline หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5-6 วัน ตามลำดับ ซึ่งสารดังกล่าวพบในข้าวพันธุ์หางยี 71 ตั้งแต่ 3 วันหลังปลูกเชื้อ นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มขึ้นของ salicylic acid และ shikimic acid ในข้าวพันธุ์หางยี 71 และ กข59 หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้เป็นเวลา 6 วันขึ้นไป โดยทั้งสองสารมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานหลังจากที่เชื้อสาเหตุเข้าทำลาย (Figure 4)

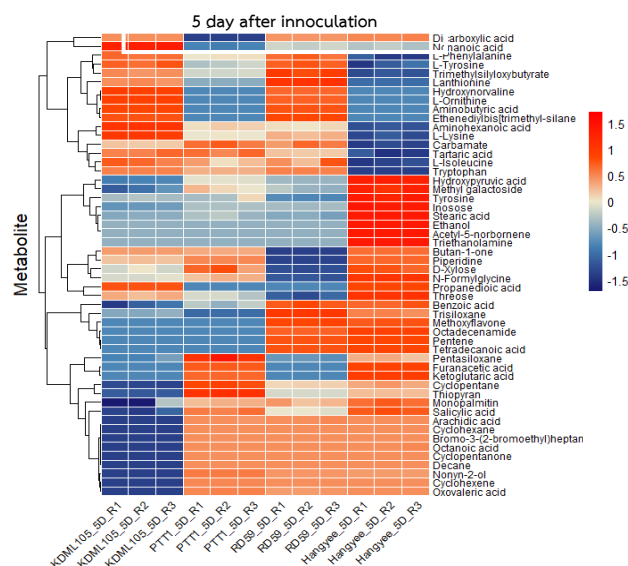


Figure 3 Heatmap of metabolites found in leaves of KDML105, PTT1, RD59, and Hangyee 71 after 3 and 5 days of *Pyricularia oryzae* inoculation

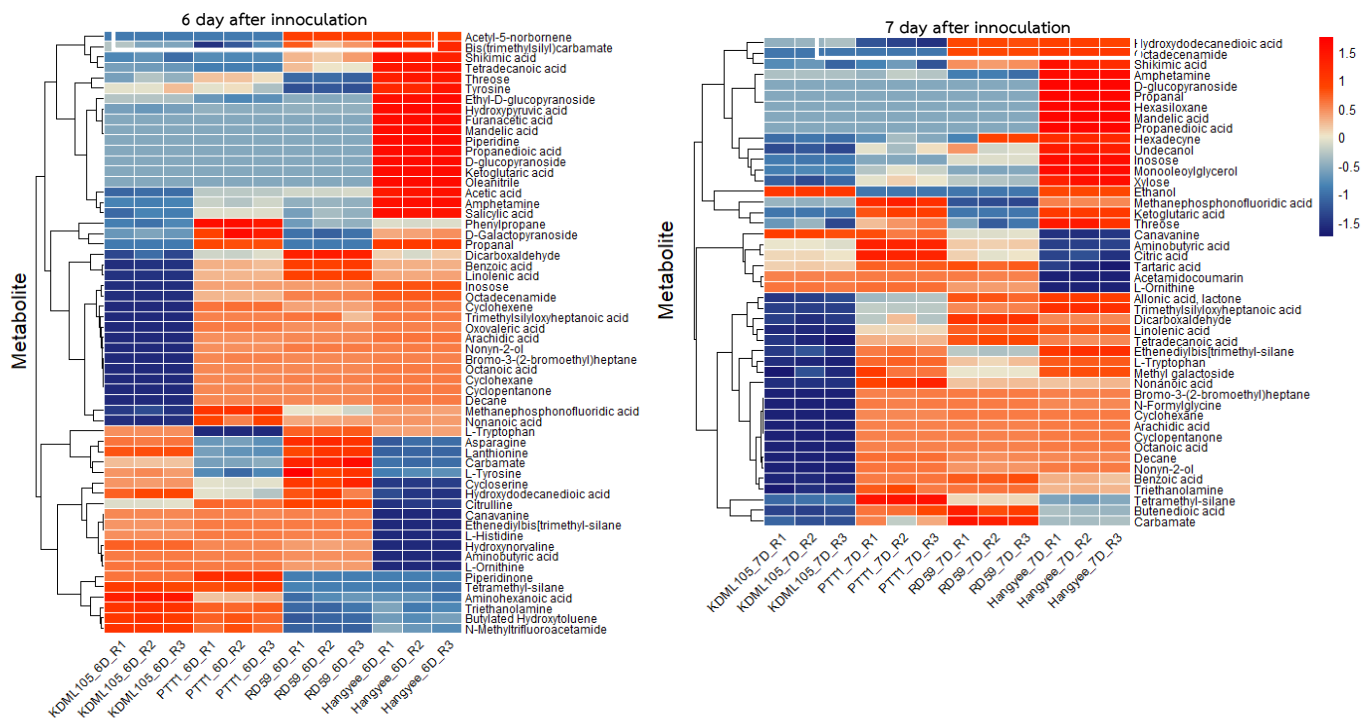


Figure 4 Heatmap of metabolites found in leaves of KDML105, PTT1, RD59, and Hangyee 71 after 6 and 7 days of *Pyricularia oryzae* inoculation

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอไลต์ในใบข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ ที่ผ่านการทดสอบเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เป็นเวลา 8 ชม. 12 ชม. และ 1-7 วัน โดยพบสารเมแทบอไลต์ประเภท กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน น้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดไขมัน เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบสารเมแทบอไลต์ จำนวน 99 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม primary metabolites ได้แก่ สารในกลุ่ม aromatic amino acids, phenylpropanoids, polyamines และน้ำตาลต่าง ๆ เมื่อข้าวถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *P. oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Madhavan *et al.*, 2019) และเมื่อนำสารเมแทบอไลต์มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก พบว่าข้าว

พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอมีการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอไลต์แตกต่างกัน โดยพบการเพิ่มขึ้นของสารเมแทบอไลต์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเอง ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลาตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป โดยเฉพาะพันธุ์ต้านทาน จากการรายงานที่ผ่านมา พบว่าข้าวพันธุ์ Hwacheong เมื่อได้รับเชื้อโรคไหม้ *Magnaporthe grisea* สายพันธุ์แบบ compatibility (KJ201) และแบบ incompatibility (KJ401) มีการสร้างสารเมแทบอไลต์ไม่แตกต่างกันในช่วงแรกหลังการปลูกเชื้อ (24 ชม.) จากนั้นพบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน alanine ในข้าวที่มีการเข้าทำลายของเชื้อแบบ compatibility รวมทั้งสารเมแทบอไลต์อื่น ๆ ได้แก่ malate, glutamine, proline และ cinnamate เป็นต้น (Jones *et al.*, 2011) และเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ในข้าวพันธุ์ต้านทาน พบว่าการ

เพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนพวก phenylalanine และ citrulline ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืชในกระบวนการ phenylpropanoids pathway โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้เมื่อเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายพืช ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อการเข้ารุกรานของเชื้อโรค เช่น การสร้างสารลิกนินและซูเบอร์ินที่ทำให้ผนังเซลล์ที่อยู่รอบบริเวณแผลหนาและแข็งแรงขึ้นเพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ หรือมีการสร้างสาร phytoalexins เพื่อต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค เป็นต้น (Yadav *et al.*, 2020)

นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มขึ้นของสารในกลุ่ม methoxyflavone ในข้าวพันธุ์หางยี 71 และ กข59 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 และ 5 วัน โดยสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่มีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และคาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับสาร sakuranetin ซึ่งเป็น phytoalexins ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในข้าว โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรค (Shimizu *et al.*, 2012; Valletta *et al.*, 2023) และมีรายงานพบการเพิ่มขึ้นของสาร sakuranetin ในข้าวที่มีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Kodama *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 1997; Stomp, 2020) ซึ่งนำไปสู่การวิเคราะห์หาสารดังกล่าวในพันธุ์ข้าวไทยต่อไป

นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มขึ้นของสาร ketoglutaric acid และ shikimic acid ในข้าวพันธุ์หางยี 71 หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 6 วันขึ้นไป ซึ่งมีการรายงานพบความเกี่ยวข้องของ ketoglutaric acid กับการสร้างความต้านทานและการตอบสนองต่อความเครียดของพืชที่สภาวะต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lei and Huang, 2022) ในขณะที่พบความเกี่ยวข้องของ shikimic acid กับกลไกความต้านทานของพืชที่ส่งผลให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Wu *et al.*, 2021) โดยใน shikimic pathway ประกอบด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในพืชหลากหลายชนิดที่มีความ

เกี่ยวข้องกับการเกิดสี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การส่งสัญญาณ และกลไกการป้องกันตัวเองของพืช เป็นต้น (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019) สำหรับการเพิ่มขึ้นของ salicylic acid ในข้าวพันธุ์หางยี 71 กข59 และปทุมธานี 1 ตั้งแต่วันที่ 5 หลังปลูกเชื้อ มีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ benzoic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ salicylic acid ในเซลล์แขวนลอย (suspension cultured cell) ของข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ (CO39) ภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคไหม้ *P. oryzae* (Madhavan *et al.*, 2019) โดย salicylic เป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณในการสร้างความต้านทานหลังจากเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายพืช หรือที่เรียกว่า Systemic Acquired Resistance (SAR) ซึ่งเป็นระบบป้องกันตัวเองตามธรรมชาติของพืชได้รับการกระตุ้นให้เกิดขึ้นเมื่อเชื้อโรคทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัสเข้าทำลาย (Moselhy *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการพบ salicylic acid ในข้าวพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ พบกลไกควบคุมความต้านทานในข้าวทั้งสองพันธุ์ (Sun *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ด้วยเครื่อง GCxGC-TOFMS ในงานวิจัยนี้ เป็นเพียงการวิเคราะห์สารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต่าง ๆ จึงควรมีการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ในกลุ่มทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพื่อหาสารที่มีความจำเพาะและสามารถเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์เมแทบอไลต์ในข้าวพันธุ์ต้านทาน (หางยี 71 และ กข59) และพันธุ์อ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1) ต่อโรคไหม้ พบสารเมแทบอไลต์กลุ่มปฏิกิริยาประเภท กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน น้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดไขมัน เป็นต้น จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักพบว่า ข้าวพันธุ์ต้านทานมีองค์ประกอบ

ของสารเมแทบอลิต์แตกต่างจากข้าวพันธุ์อ่อนแอ โดยในข้าวพันธุ์ต้านทาน พบการเพิ่มขึ้นของสารเมแทบอลิต์ประเภท phenylalanine citrulline methoxyflavone ketoglutaric acid และ shikimic acid หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลาตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป โดยสารดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานและการป้องกันตนเองของพืช เช่น กระบวนการ phenylpropanoid หรือ shikimate pathway ตามลำดับ รวมไปถึงพบสาร salicylic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชสำคัญที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณในการสร้างความต้านทานโรค หลังการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ในขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอ พบการเพิ่มขึ้นของสารเมแทบอลิต์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทาน หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วันขึ้นไป จากผลการทดลองข้างต้นทำให้นักวิจัยทราบถึงกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไหม้ของข้าว อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสารเมแทบอลิต์ที่มีความจำเพาะในการสร้างความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว เพื่อเชื่อมโยงหาพื้นที่เกี่ยวข้องและใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ส่งเสริมและสนับสนุนงบประมาณ ทีมงานวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัยจากสถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ กรมการข้าว ในการดำเนินงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology**. 5th. New York: Academic Press. 922 p
- Department of Foreign Trade. 2025. **World and Thai rice situation December, 2025**. Retrieved from <https://www.dft.go.th/th-th/Service-DFT/Service-Information/DATA-Group-Product/Detail-DATA-Group-Product/ArticleId/29927/29927> [in Thai]
- Dillon, V.M., J. Overton, R.J. Grayer and J.B. Harborne. 1997. Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. **Phytochemistry** 44: 599–603.
- Francenia Santos-Sánchez, N., R. Salas-Coronado, B. Hernández-Carlos and C. Villanueva-Cañongo. 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. **IntechOpen** 83815.
- Hata E.M., M.T. Yusof and D. Zulperi. 2021. Induction of systemic resistance against bacterial leaf streak disease and growth promotion in rice plant by *Streptomyces shenzhenesis* TKSC3 and *Streptomyces* sp. SS8. **The Plant Pathology Journal** 37(2): 173–181.
- International Rice Research Institute (IRRI). 2013. **Standard Evaluation System (SES) for Rice**. 5th. ed. Manila: IRRI. 65 p.

- Jones, O., M. Maguire, J. Griffin, J. Young-Ho, J. Shibato, R. Rakwal, G. Agrawal and N.S. Jwa. 2011. Using metabolic profiling to assess plant-pathogen interactions: an example using rice (*Oryza sativa*) and the blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **European Journal of Plant Pathology** 129: 539–554.
- Kodama, O., J. Miyakawa, T. Akatsuka and S. Kiyosawa. 1992. Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. **Phytochemistry** 31: 3807–3809.
- Lei, S. and B. Huang. 2022. Metabolic regulation of α -Ketoglutarate associated with heat tolerance in perennial ryegrass. **Plant Physiology and Biochemistry** 190: 164–173.
- Madhavan, S., V. Paranidharan, A. Erban, A.M. Al-sadi, J. Kopka and R. Velazhahan. 2019. The metabolic response of suspension-cultured cells from blast-resistant and -susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to a *Pyricularia oryzae* elicitor. **Indian Phytopathology** 72: 195–202.
- Mekwatanakarn, P. and W. Mekwatanakarn. 2016. **Thai Rice Blast**. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani University Press. 157 p. [in Thai]
- Moselhy, S.S., T. Asami, K.O. Abualnaja, A.L. Al-Malki, H. Yamano, T. Akiyama, R. Wada, T. Yamagishi, M. Hikosaka, J. Iwakawa, K. Okada, M. Mori and T.A. Kumosani. 2016. Spermidine, a polyamine, confers resistance to rice blast. **Journal of Pesticide Science** 41(3): 79–82.
- Parker, D., M. Beckmann, H. Zubair, D. Enot and Z. Caracuel-Rios. 2009. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Journal** 59: 723–737.
- Piasai, O. 2017. **Aquatic and Soil Fungi**. Bangkok: Text and Journal Publication Co., Ltd. 251 p. [in Thai]
- Settachaimongkon, S. and M. Luangwilai. 2017. Application of metabolomics technology for investigation of biomolecular profile of milk and dairy products. **Journal of Food Technology, Siam University** 12(1): 1–16. [in Thai]
- Shimizu, T., F. Lin, M. Hasegawa, H. Nojiri, H. Yamane and K. Okada. 2012. The potential bioproduction of the pharmaceutical agent sakuranetin, a flavonoid phytoalexin in rice. **Bioengineered** 3(6): 352–357.

- Stompor, M. 2020. A review on sources and pharmacological aspects of sakuranetin. **Nutrients** 12: 513.
- Sun, R., S. Qin, T. Zhang, Z. Wang, H. Li, Y. Li and Y. Nie. 2019. Comparative phosphoproteomic analysis of blast resistant and susceptible rice cultivars in response to salicylic acid. **BMC Plant Biology** 19: 454.
- Valletta, A., L.M. Iozia, L. Fattorini and F. Leonelli. 2023. Rice phytoalexins: half a century of amazing discoveries; part I: distribution, biosynthesis, chemical synthesis, and biological activities. **Plants** 12(2): 260.
- Wu, Z., G. Wang, B. Zhang, T. Dai, A. Gu, X. Li, X. Cheng, P. Liu, J. Hao and X. Liu. 2021. Metabolic mechanism of plant defense against rice blast induced by probenazole. **Metabolites** 11(4): 246.
- Yadav, V., Z. Wang, C. Wei, A. Amo, B. Ahmed, X. Yang and X. Zhang. 2020. Phenylpropanoid pathway engineering: an emerging approach towards plant defense. **Pathogens** 9: 312.
- Zhan, S.W., Y. Yang, Z.M. Wu and K.T. Li. 2020. Induced defense responses against *Rhizoctonia solani* in rice seedling by a novel antifungal mycin N₂ from *Streptomyces* sp. N₂. **Australasian Plant Pathology** 49: 267–276.