Cultivation, Inoculum Production and Inoculation of *Ustilaginoidea virens*, Causal Pathogen of False Smut of Rice

การเพาะเลี้ยง การเพิ่มปริมาณเชื้อ และปลูกเชื้อ *Ustilaginoidea virens* เชื้อสาเหตุโรคดอกกระถินของข้าว

กัลยา ประกอบทรัพย์[1], Ashizawa Taketo[2], สมศิริ แสงโชติ[1]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2]National Agriculture and Food Research Organization, Central Region Agricultural Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

E-mail: kunlaya13@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคดอกกระถินในข้าวเชื้อสาเหตุเกิดจาก *Ustilaginoidea virens* เป็นโรคที่สำคัญของข้าวทั่วโลก การเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) และข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ ลักษณะเส้นใยและ chlamydospore ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งและข้าวกล้องนึ่ง มีลักษณะคล้ายฝุ่นเป็นผงละเอียด สีของ chlamydospore จะค่อยๆเปลี่ยนเริ่มต้นจะมีสีเหลืองและเป็นสีส้ม ภายหลังการบ่มใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน ขนาดของ chlamydospore ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและข้าวกล้องนึ่ง กับ chlamydospore ที่ได้จาก false smut ball ในธรรมชาติมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 4.7 3.5 และ 4.1 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกับทั้งทางรูปร่างลักษณะและขนาดเมื่อนำ chlamydospore มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) chlamydospore จะงอกและสร้างโคนีเดีย (secondary spore หรือ secondary conidia) มีรูปร่างกลมถึงวงรีขนาด 2.25 - 6.92 x 2.59 -10.72 ไมโครเมตร โคนีเดียที่ได้จาการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่ความเข้มข้น 2.5 x 10^5 โคนีเดียต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการปลูกเชื้อด้วยวิธีใช้เข็มฉีดบนรวงในระยะตั้งท้องสามารถทำให้เกิดโรคดอกกระถินได้ 85 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โรคดอกกระถิน, ข้าว, การปลูกเชื้อ

Abstract

False smut, caused by *Ustilaginoidea virens* (telemorph: *Villosiclava virens*) is an important disease of rice worldwide. This fungus was on potato dextrose agar (PDA) and brown rice medium. The chlamydospore mass were produced with yellow velvet on the media after 1 month. Size of chlamydospore on PDA, brown rice and directly from smut ball was 4.7, 3.5 and 4.1 µm in diameter, respectively. There were no different in their morphological characteristic between chlamydospore obtained from culture and naturally smut ball. Chlamydospore produced secondary conidia in potato dextrose broth (PDB) abundantly with round to ovoid in shape, measured 2.25-6.92 × 2.59-10.72 µm. The conidial suspension obtained from 10 days in PDB and adjusted to 2.5×10^5 conidia mL^{-1} was suitable for inoculation by injection at boot stage (7 days before heading) of rice plant. The percentage of false smut disease incident was 85% (infect tillers) by this method.

Key words: false smut, rice, inoculation

คำนำ

ข้าว (rice) เป็นพืชในวงค์ Poaceae ซึ่งเป็นพืชตระกูลหญ้าชื่อวิทยาศาสตร์ของข้าวคือ *Oryza sativa* L. สายพันธุ์ข้าวทั้งโลกมีมากกว่า 120,000 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในเขตอบอุ่น (บุญหงษ์, 2557) สภาพแวดล้อม โรคและแมลงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวทั้งปริมาณและคุณภาพ

โรคดอกกระถิน (false smut) ในหนึ่งในโรคที่สำคัญในข้าวเกิดจากเชื้อรา *Ustilagionidea virens* ลักษณะอาการโรคพบว่า เมล็ดบางส่วนของรวงที่ปรากฏเป็นก้อนของเส้นใยและ chlamydospore รวมกันคล้ายกำมะหยี่ (false smut ball) ในระยะที่เจริญเต็มที่ (Tang *et al*., 2013) ประกอบด้วยกลุ่มผง chlamydospores บนรวงในระยะเมล็ดข้าวใกล้สุกแก่ จะเห็นผงสปอร์สีเหลืองและกลุ่มเส้นใยบริเวณระหว่างกลีบรองดอกชั้นบน (flowering glumes) ทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดแยกออก (Fan *et al*., 2014) ดอกข้าวไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นเมล็ดได้ ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของข้าว เนื่องจากเมล็ดข้าวที่อยู่ภายในรวงเดียวกันหรือเมล็ดใกล้เคียงเกิดการปนเปื้อน chlamydospore ของเชื้อรา รวมทั้งต้องเสียเวลาสำหรับการคัดแยกเมล็ดที่เป็นโรคและปนเปื้อนออก (Rush *et al*., 2000) ส่วนลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดข้าวมาจากแปลงที่เป็นโรคนี้มีคุณภาพลดลงจากการปนเปื้อน chlamydospore (Li *et al*., 2013) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ *U. virens* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรคดอกกระถินในข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเลี้ยงเชื้อ *Ustilaginoidea virens* บนอาหารแข็ง PDA และข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1 Potato Dextrose Ager (PDA) ฆ่าเชื้อผิวนอกของ false smut ball ใน 10% ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ทิ้งไว้ในตู้ฆ่าเชื้อจนแห้งสนิท แล้วตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตรลงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใต้หลอดไฟ near-ultraviolet 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.2 ข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่มีเชื้อ *U. virens* เจริญอยู่เป็นระยะเวลา 1 เดือน ด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตรฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 กรัมบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใต้หลอดไฟ near-ultraviolet 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของ chlamydospore ที่ได้จากรวงข้าวที่เกิดโรคในแปลงกับ chlamydospore ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร

เขี่ย chlamydospore ที่อยู่บนผิว false smut ball ในรวงข้าวที่เป็นโรค และคีบกลุ่ม chlamydospore ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร WAแล้วเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของสปอร์วัดขนาด chlamydospore และเปอร์เซ็นต์การงอกภายใต้กล้อง compound microscope

3. ความสามารถในการเกิดโรคของ *U. virens* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB

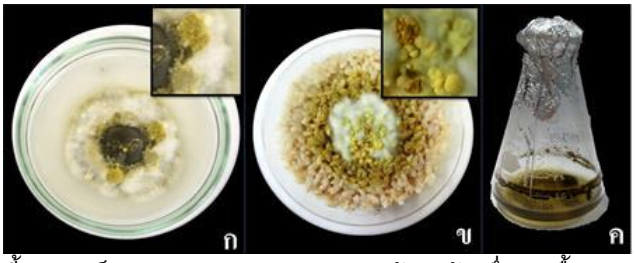
3.1 การเตรียม conidia ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่มีเชื้อ *U. virens* เจริญอยู่เป็นระยะเวลา 1 เดือน ด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตรฆ่าเชื้อแล้วใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ PDB ปริมาณ 25 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

3.2 การปลูกเชื้อ *U. virens* นำเชื้อ *U. virens* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นระยะเวลา 10 วัน ย้ายใส่ในหลอด centrifuge ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่อง mixer 1 นาที แล้วกรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง หลังจากกรองนำ suspension มาวัดจำนวนของโคนีเดีย suspension ด้วย hemocytometer นำ suspension ที่ได้ปลูกเชื้อ โดยใช้เข็มฉีดฆ่าเชื้อดูด suspension ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อรวง ฉีดเชื้อลงกาบใบของรวงในระยะตั้งท้อง

ผลการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อ *Ustilaginoidea virens* บนอาหารแข็ง PDA ข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ และอาหารเหลว PDB

U. virens เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้า เชื้อจะเริ่มจากสร้างเส้นใยสีขาวฟูรอบบริเวณชิ้น false smut ball หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใต้แสง near-ultraviolet 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 7 วัน สีโคโลนีบนอาหารค่อยๆเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มและสีเขียวเข้มตามระยะเวลาการบ่ม chlamydospore จะเกิดขึ้นเกิดจากการดันกลุ่มของเส้นใยให้แตกออก ทำให้เห็นเป็นผง chlamydospore สีเหลืองภายหลังจากการบ่ม 1 เดือนทั้งใน PDA ข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงสปอร์ *U. virens* บนอาหาร PDA ข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ และ PDB

2. การเปรียบเทียบลักษณะของ chlamydospore ที่ได้จากรวงข้าวที่เกิดโรคในแปลงกับ chlamydospore ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร

Chlamydospore ทั้งที่จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารกับสปอร์จาก false smut ball มีลักษณะคล้ายกันคือ มีรูปร่างกลม ผิวมีหนามผนังหนา จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของ chlamydospore พบว่า chlamydospore ทั้งที่จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารกับ chlamydospore จาก false smut ball ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การงอก ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) หลังจากงอก germ tube แล้วสร้างโคนีเดีย (secondary conidia) บริเวณปลายก้าน มีรูปร่างรีถึงกลมไม่มีสี ผนังเรียบ ขนาด 2.25 - 6.92 x 2.59 - 10.72 ไมโครเมตร

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาของ chlamydospore จากการเลี้ยงบนอาหารกับ chlamydospore จาก smut ball ในธรรมชาติ

แหล่งที่มาของสปอร์	ขนาดของ chlamydospore (ไมโครเมตร)	การงอกของ chlamydospore (%)
PDA	3.47 ± 0.42	23.05
ข้าวกล้องนึ่ง	3.74 ± 0.27	23.96
False smut ball	4.11 ± 0.56	27.78
F-test	ns	ns
CV(%)	13.39	30.21

3. ความสามารถในการเกิดโรคของ *U. virens* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณโคนีเดียใน PDB ใช้สำหรับการปลูกเชื้อ (artificial inoculation) มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม 2 4 6 8 และ 10 วัน มีปริมาณโคนีเดียดังนี้ 6.8×10^4 12.8×10^4 14.3×10^4 18.0×10^4 และ 2.5×10^5 โคนีเดียต่อลิตร การทดสอบความสามารถให้ก่อโรค พบว่าการใช้โคนีเดียที่ความเข้มข้น 2.5×10^5 โคนีเดียต่อลิตร สามารถทำให้เกิดโรคดอกกระถินได้ 85 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 ลักษณะพัฒนาการอาการโรคดอกกระถิน

ลักษณะอาการโรคดอกกระถินสามารถเห็นอาการหลังการปลูกเชื้อ 10 วัน ในระยะออกรวงเป็นกลุ่มเส้นใยสีขาวอยู่ระหว่าง lemma กับ palea จึงดันให้แยกออกจากกันแล้ว ขนาดของกลุ่มเส้นใยค่อย ๆหุ้มดอกข้าว กลายเป็นเม็ดกลมสีขาวเมื่อ false smut ball ขยายขนาดใหญ่ขึ้นส่วนผนังจะแตกและหลุดออกให้เห็นกลุ่มของ chlamydospore จำนวนมากอยู่ภายใน chlamydospore สามารถฟุ้งกระจายคล้ายกำมะหยี่ สีของ false smut ball จะเริ่มจากสีเหลือง ส้ม และเขียวเข้ม ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เชื้อ *U. virens* เป็นเชื้อราที่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *U. virens* เป็นเชื้อที่เติบโตช้า ต้องใช้ระยะเวลา 1 เดือน chlamydospore ทั้งบนอาหาร PDA และข้าวกล้องนึ่งฆ่าเชื้อ เทียบกับ chlamydospore จาก false smut ball ในธรรมชาติมีลักษณะรูปร่างและขนาดของ chlamydospore ไม่แตกต่างกัน คือรูปร่างกลม มีผิวขรุขระ รวมทั้งขนาดในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim and Park (2005) ที่รายงานว่าขนาดของเชื้อ *U. virens* มีขนาดอยู่ระหว่าง 3-5 ไมโครเมตร นอกจากนี้การพัฒนาสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้การเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นมีความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากในระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้นใช้เวลานานทำให้ง่ายในการปนเปื้อน (contamination) งานวิจัยในครั้งที่รายงานครั้งแรกในการเตรียมและเลี้ยงโคนีเดียที่ได้จาก chlamydospore ที่เลี้ยงใน PDA แล้วย้ายลง PDB เพื่อให้ได้โคนีเดียสำหรับการปลูกเชื้อ โดยการเข็มฉีด suspension ลงกาบใบในระยะตั้งท้องของข้าว Ashizawa *et al*., (2012) พบว่าทำให้เกิดโรคได้มากถึง 85 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนรวงทั้งหมดที่ปลูกเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

บุญหงส์ จงคิด. (2557). **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Ashizawa, T., M. Takahashi., M. Arai and T. Arie. (2012). Rice false smut pathogen, *Ustilaginoidea virens*, invades through small gap at the apex of a rice spikelet before heading. **Journal General of Plant Pathology**. 78: 225-259.

Fan, J., Y. Guo., F, Huang., Y. Li., F, Liu., L, Li., Y.J. Xu., J.Q. Zhao., H. Xiong., J.J. Yu., and W. Wang. (2014). Epiphytic Colonization of *Ustilaginoidea virens* on Biotic and Abiotic Surfaces Implies the Widespread Presence of Primary Inoculums for Rice False Smut Disease.**Plant Pathology**.63:937-945.

Li, W., L. Li., A. Feng., X. Zhu., and J. Li. (2013). Rice False Smut Fungus, *Ustilaginoideavirens*, Inhibits Pollen Germination and Degrades the Integuments of Rice Ovule. **American Journal of Plant Sciences**. 4: 2295-2304.

Kim, K.W. and E.W. Park. (2007). Ultrastructure of spined conidia and hyphae of the rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*. **Micron**. 38: 626–631.

Rush, M. C., A. K. M. Shahjahan, J. P. Jones, D. E. Groth. (2000). Outbreak of false smut of rice in Louisiana. **Plant Disease**. 84-100.

Tang, Y.X., J. Jin., D.W. Hu., M.L. Yong., Y. Xu., and H.P. He. (2013). Elucidation of the infection process of *Ustilaginoidea virens* (teleomorph: *Villosiclava virens*) in rice spikelets. **Plant Pathology**. 62: 1–8.