

การจำแนกเชื้อรา *Pyricularia* species ที่แยกจากข้าวและหญ้าด้วยลักษณะ
 ลักษณะสัณฐานวิทยา และ *Pot2* rep-PCR
 Identification of *Pyricularia* Species Isolated from Rice and Grasses using
 Morphological Characteristics and *Pot2* rep-PCR

สรินนา อุ่มรุ่ง¹ ธิดา เดชฮวบ¹ เนตรนภิส เขียวขำ¹ อรอุมา เพี้ยซ้าย¹ วันวิสา ศิริวรรณ¹
 และ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง^{1,2,*}

Sarinna Umrung¹, Tida Dethoup¹, Netnapis Khewkhom¹, Onuma Piasai¹, Wanwisa Serewan¹
 and Srimek Chowpongpan^{1,2,*}

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

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

² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park, Khlong Nueng Khlong Luang, Pathum Thani 12120

รับเรื่อง: พฤศจิกายน 2560 Received: November 2017

รับตีพิมพ์: ธันวาคม 2560 Accepted: December 2017

* Corresponding author: agrsmc@ku.ac.th

ABSTRACT: Forty-two strains of *Pyricularia* were isolated from rice and grasses collected from selected areas in 16 provinces of Thailand. Fungal identification was studied on the basis of the conidial characteristics and host plant varieties. The conidial sizes of the fungal pathogens derived from rice (20.89 – 28.14 × 7.39 – 10.50 μm) are larger than those of all isolates derived from grasses (18.12 – 24.93 × 5.27 – 9.77 μm). In addition, conidial average sizes of isolates derived from neck blast (20.89 – 28.14 × 7.60 – 10.50 μm) are larger than those of the isolates isolated from leaf (18.12 – 26.51 × 5.27 – 9.77 μm). Differentiations on the basis of the conidial shape were divided into six groups, but the shape, length and width of conidia are slightly different from those groups, resulting to morphologically unsuccessful identification. Molecular data for genetic relationships using the *Pot2* rep-PCR technique revealed that five isolates of *Pyricularia grisea* were discovered from grasses, whereas thirty-seven isolates of *P. oryzae* were found from both grasses and rice. Additionally, the genetic characteristics of the fungal isolates have partially similar sequences that are highly similar among isolates. Due to the high genetic diversity of *Pyricularia* species, the data showed that the conidial characters and molecular genetic evidence are incongruent.

Keywords: Rice blast disease, morphology, *Pyricularia* spp., rice, grasses, *Pot2* rep-PCR

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Pyricularia* spp. จำนวน 42 ไอโซเลท ถูกแยกจากตัวอย่างข้าวและหญ้าที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่คัดเลือกใน 16 จังหวัดของประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดีย รวมทั้งการใช้พีชออคัยในการแยกกลุ่มของเชื้อโรคราไหม้ ผลการทดลองพบว่า ขนาดโคนิเดียของเชื้อรา (20.89 – 28.14 × 7.39 – 10.50 μm) ที่แยกได้จากข้าว มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อรา (18.12 – 24.93 × 5.27 – 9.77 μm) ที่แยกได้จากหญ้า นอกจากนี้ขนาดของโคนิเดียของโรคราไหม้คอรวง (20.89 – 28.14 × 7.60 – 10.50 μm) มีขนาดใหญ่กว่าโคนิเดียที่แยกได้จากโรคราไหม้ (18.12 – 26.51 × 5.27 – 9.77 μm) ส่วนการใช้ลักษณะทางรูปร่างโคนิเดียสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยจึงทำให้ไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ ส่วนผลการศึกษาการจำแนกทางอนุชีววิทยาเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค *Pot2 rep-PCR* พบว่า เชื้อ *Pyricularia grisea* มีจำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างหญ้า ในขณะที่เชื้อ *Pyricularia oryzae* มีจำนวน 37 ไอโซเลท ที่พบทั้งในหญ้าและข้าว ซึ่งเชื้อโรคราไหม้ในกลุ่มนี้มีทั้งเชื้อที่แยกได้จากข้าวและเชื้อที่แยกได้จากหญ้าปะปนกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อกลุ่มนี้มีบางส่วนของลำดับเบสที่คล้ายคลึงกัน เนื่องจากเชื้อราที่ถูกนำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงทำให้ผลการทดลองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดีย ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา

คำสำคัญ: โรคราไหม้ข้าว, สัณฐานวิทยา, *Pyricularia* spp., ข้าว, พีชออคัย, *Pot2 rep-PCR*

บทนำ

รา *Pyricularia* spp. เป็นสาเหตุของโรคราไหม้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้หลากหลายชนิด (Luo and Zhang, 2013) พบการระบาดของโรคในทุกพื้นที่ของการปลูกข้าวอย่างกว้างขวางและเป็นโรคที่สำคัญพบการระบาดในพื้นที่การเพาะปลูกข้าวทั่วโลก (Noriguni, 2006; Motallebi *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2017) สำหรับประเทศไทยนั้นมีการระบาดของโรคราไหม้โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและความชื้นเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคราไหม้ ทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายได้มากกว่า 30% (Skamnioti and Gurr, 2009) การเข้าทำลายของเชื้อราโรคราไหม้สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว ทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเฉพาะในระยะออกรวงมีผลให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง เชื้อรานี้สามารถจำแนกได้ 2 ชนิด คือ *P. oryzae* Cav. และ *P. grisea* (Cooke) Sacc. เชื้อราทั้งสองชนิดนี้ มีลักษณะอาการและขนาดโคนิเดียที่แตกต่างกัน โดยเชื้อ *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคราไหม้ในข้าวและหญ้าบางชนิด ส่วนเชื้อ *P. grisea* เป็นสาเหตุของโรคราไหม้ในหญ้าหลายชนิดและพืชอื่น ๆ เช่น วงศ์กล้วย (Musaceae) วงศ์พุทธรักษา (Cannaceae) วงศ์กก (Cyperaceae) และวงศ์ขิง (Zingiberaceae) (Chandrasrikul and Srijumpa, 1999) และ (Murata *et al.*, 2014) เชื้อนี้มีการสร้างโคนิเดียมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน อาจเป็น pyriform หรือ obclavate ปลายยอดของโคนิเดียมีลักษณะแหลม (tapering) มี 3 เซลล์ บางครั้งตรงผนังกัน (septate) อาจจะเว้า (constricted) เล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะใส ไม่มีสี (hyaline) (Ou, 1973) นอกจากนี้ Giatgong and Frederiksen (1969) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคราไหม้ โดยพบว่ามีความแปรปรวนมาจากการกลายพันธุ์และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ๆ ส่งผล

ให้เชื้อรามีการปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว Mekwatanakarn *et al.* (2000) ได้มีการศึกษาประชากรเชื้อโรคใหม่ในประเทศไทย พบว่า เชื้อโรคใหม่ในประเทศไทยมีความแปรปรวนและหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่น ๆ ของโลก เชื้อราที่มีความแตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกข้าว ฤดูปลูก และระยะเวลาการเจริญเติบโตของข้าว ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอย่างกว้างขวางเนื่องจากผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำ George *et al.* (1998) และ Mithrasena *et al.* (2012) ได้มีการนำไพรเมอร์ *Pot2* มาใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคใหม่ในประเทศฟิลิปปินส์ อินเดีย และศรีลังกา โดยพบว่า ไพรเมอร์ *Pot2* ในปฏิกิริยา PCR สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อโรคใหม่ที่เข้าทำลายในพืชอาศัยข้าว และหญ้าอื่น ๆ ได้

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่จำนวน 42 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ ด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) เทียบกับการใช้ลักษณะทางรูปร่างโคโคนิเดียมาช่วยในการจัดจำแนก โดยเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคใหม่ถูกเก็บรวบรวมจากพื้นที่คัดเลือกที่ปลูกข้าวของประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้น่าจะช่วยอธิบายและตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างข้าวและหญ้าที่แสดงอาการใบไหม้ไหม้คอรวง และอาการไหม้ที่กาบใบ ข้อต่อของใบและลำต้น จากแหล่งปลูกข้าวในประเทศไทย จำนวน 16 จังหวัดในปี 2554-2558 นำตัวอย่างข้าวและหญ้า

มาแยกเชื้อรา *Pyricularia* spp. ให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Table 1) จากนั้นทำการนำตัวอย่างดังกล่าวมาศึกษาเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง โดยใช้ moist chamber และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาส่งใส่ไลต์และถ่ายรูป พร้อมทั้งวัดขนาด ความยาวและความกว้างของโคนิเดีย

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

2.1 แยกเชื้อราจากพืชโดยการนำชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นซบให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ วางชิ้นส่วนพืชบนกระดาษทิชชูที่หยดด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อพอชื้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์และนำมาแยกสปอร์เดี่ยว (single spore) ตามวิธีการของ Yulin *et al.* (2009) โดยการเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ แล้วหยดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 100 μ l บนอาหาร Water Agar (WA) (บริษัท HiMedia , ประเทศอินเดีย) และใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) กลยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้อง stereo microscope รุ่น SZ2-ILST (บริษัท Olympus, ประเทศญี่ปุ่น) แล้วใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตักสปอร์เดี่ยวที่พบการงอก germ tube ไปเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย) ที่อุณหภูมิ 28°C เมื่อเชื้อราเจริญ และสร้างสปอร์จึงเก็บเชื้อราลงบนอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA-slant agar) รักษาเชื้อราโดยการเก็บแบบแห้งบนกระดาษกรอง

2.2 ศึกษาลักษณะอาการของโรค และแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืชโดยทำ moist chamber



บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดีย ใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หยดด้วยสารละลาย Shear's mounting ปิดทับด้วย cover slip หรือใช้ใบมีดผ่าตัด (scalpel) ตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายรูปรด้วยกล้องจุลทรรศน์รุ่น Carl Zeiss Scope A.1 (บริษัท Carl Zeiss Microscopy GmbH, ประเทศเยอรมันนี) และวัดขนาดโคนิเดียโดยส้อมโคนิเดียที่เจริญเต็มที่จำนวน 200 โคนิเดียต่อไอโซเลท วัดขนาดด้วยด้วยโปรแกรมวัดขนาด Carl Zeiss Vision Axio Vision 4

3. ศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคใหม่ในข้าวและหญ้าด้วยเทคนิค rep-PCR

3.1 การสกัด DNA จากเส้นใยของเชื้อรา เลี้ยงรา *Pyricularia* spp. จำนวน 42 ไอโซเลทบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7–10 วัน จากนั้นขูดเส้นใย และสปอร์ ปริมาณ 50 mg เพื่อสกัด DNA โดยวิธีสกัด DNA ประยุกต์มาจากวิธีของ George *et al.* (1998) โดยบดเส้นใยปริมาณ 50 mg ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ในสารละลาย (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 8.0) ปริมาตร 300 µl เติม 1% β-Mercapto-ethanol ใส่ลูกเหล็ก 2 ลูกในหลอด นำเข้าเครื่องตี เป็นเวลา 4 นาที แล้วเติม Solution II (Lysis buffer, 1M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2.25% SDS) ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอด จากนั้นเติม Solution III (Presipitation solution, 5M Potassium Acetate, 3M Glacial acetic acid) ปริมาตร 192 µl พลิกหลอด 10 ครั้งเติม chloroform : isoamyl alcohol ปริมาตร 300 µl พลิกกลับหลอด แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ของเหลวแยกชั้น ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาตร 500 µl ใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl พลิกหลอด 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วน supernatant ที่ทิ้งแล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol จำนวน

2 ครั้งตากตะกอนไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและละลาย DNA ด้วยน้ำผสม RNase 10 µg/ml ปริมาตร 50 µl จากนั้นเก็บสารละลาย DNA ที่ -20°C ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 2% อะกาโรส กับ DNA มาตรฐาน GeneRuler 1 kb DNA ladder (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในสารละลาย 0.5x TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 20 นาที ย้อมและตรวจสอบความเข้มของแถบ DNA โดยใช้เครื่อง Gel documentation (บริษัท Syngene : Bio imaging systems : G-box, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค rep-PCR นำสารละลาย DNA มาเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องเทอร์มอลไซเคิลอาร์ตริก Arktik Thermal Cycler (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้ไพรเมอร์ *Pot2* ความเข้มข้นเส้นละ 200 Picomolar (*Pot2*-1; 5' CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT 3' และ *Pot2*-2; 5' CCCTCATTCGTCACAC GTTC 3') สารละลาย DNA ความเข้มข้น 100 ng, 2x PCR Master mix (*i*-Taq) (บริษัท iNtRON Biotechnology, ประเทศเกาหลี) 10 µl โดยมีปริมาตรสุดท้าย 20 µl ปฏิกริยา PCR คือ initial อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที ทำปฏิกริยาจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบขนาดชิ้น DNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 2% อะกาโรส ที่มีความยาวเจล 30 เซนติเมตร โดยเปรียบเทียบขนาดของ DNA กับ GeneRuler 1 kb (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 30 นาที และเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐานตรวจเช็คแถบแบนของ PCR โดยการย้อมเจลด้วย 10 µg/ml เอธิเดียมโบรมไนด์ และ

ตรวจสอบความเข้มของแถบ DNA โดยใช้เครื่อง Gel documentation (บริษัท Syngene: Bio imaging systems : G-box, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.02 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (บริษัท Biostatistics Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม หรือ (Genetic Similarity) ของการวิเคราะห์เป็น SimInt (similarity for interval data) โดยใช้ค่า Canberra 's similarity coefficient เพื่อสร้างแผนภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโรคใหม่ โดยใช้วิธี SHAN (Sequential, hierarchical, agglomerative, and nested clustering method) เป็นการจัดกลุ่ม จากนั้นใช้โปรแกรม Graphics ด้วยวิธี Tree plot เพื่อสร้าง dendrogram เพื่อนำมาจัดกลุ่มประชากรเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Pyricularia* spp. ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 42 ไอโซเลท จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ กข10 กข15 กข47 สุพรรณบุรี และแจ๊กเขย และหญ้าในประเทศไทย เช่น หญ้าขน หญ้าชันกาด หญ้าตีนกา หญ้าขจรจบดอกเหลือง หญ้าขจรจบดอกม่วง หญ้าเนเปีย หญ้ากระตูกไก่ หญ้าแดง และหญ้าเหล็กไผ่ เป็นต้น โดยตัวอย่างข้าวและหญ้ามารจากพื้นที่คัดเลือก ใน 16 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย นครราชสีมา บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด ลพบุรี ลำพูน ราชบุรี ศรีสะเกษ สระบุรี สุราษฎร์ธานี สุรินทร์ และอุบลราชธานี (Table 1) ผลการทดลองดังนี้

Table 1 Sample collection of rice and non-rice host plant in the rice field of 16 provinces

Region	Province	GPS	Natural host	Plant part	Isolate number	Collection date	
Northern	Chiang Rai	19°54'31"N 99°49'57"E	<i>Oryza sativa</i> (KDML105)	neck	CRIR-25	14/11/2013	
	Lamphun	18°34'41"N 99°1'14"E	<i>O. sativa</i> (RD10)	neck	LPNR-16	02/11/2014	
North-eastern	Nakhon Ratchasima	14°53'30"N 101°43'24"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	leaf	NMAR-44	18/09/2016	
		15°20'56"N 102°44'31"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	NMAR-4	20/11/2014	
	15°13'14"N 102°29'9"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	NMAR-11	20/11/2014		
	14°42'45"N 101°25'19"E	<i>Ischaemum barbatum</i>	leaf	NMAG-31	01/09/2015		
	14°25'6"N 101°51'0"E	<i>Brachiaria</i> sp.	leaf	NMAG-32	13/09/2015		
	Buri Ram	14°59'42"N 103°6'12"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	BRMR-00	20/09/2011	
Surin	Si Sa Ket	15°32'54"N 103°1'30"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	BRMR-05	20/11/2015	
		14°38'26"N 103°24'17"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	SRNR-00	13/10/2012	
	Maha Sarakham	14°38'24"N 104°39'0"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	SSKR-00	13/10/2012	
	Roi Et	16°11'3"N 103°18'4"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	MKMR-24	25/12/2013	
Central	Ubon Ratchathani	16°2'0"N 103°56'2"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	RETR-10	22/11/2014	
		15°50'37"N 103°52'44"E	<i>Penicum polystachyon</i>	leaf	RETG-13	22/11/2014	
	Ubon Ratchathani	15°25'23.2"N 104°56'13.7"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	UBNR-02, UBNR-03	21/11/2014	
		15°25'23.2"N 104°56'13.7"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	UBNR-06, UBNR-14	21/11/2014	
	Ubon Ratchathani	15°24'57.1"N 104°33'00.5"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	UBNR-08, UBNR-22	27/04/2012	
		15°14'29"N 105°5'32"E	<i>O. sativa</i> (RD15)	neck	UBNR-09	22/11/2014	
	Bangkok	Bangkok	15°25'23.2"N 104°56'13.7"E	<i>P. polystachyon</i>	leaf	UBNG-3.1	21/11/2014
			15°25'23.2"N 104°56'13.7"E	<i>P. repens</i>	leaf	UBNG-6.1	21/11/2014
		Sara Buri	13°50'54.95"N 100°34'04.98"E	<i>P. pedicellatum</i>	leaf	BKKG-20	24/10/2014
		Sara Buri	13°50'54.95"N 100°34'04.98"E	<i>P. purpureum</i>	leaf	BKKG-42	31/08/2016
Sara Buri	Sara Buri	14°33'1"N 100°51'27"E	<i>O. sativa</i> (Jek Chuey)	leaf	SRIR-33	27/09/2015	
		14°29'32"N 100°47'4"E	<i>Eleusine indica</i>	leaf	SRIG-43	17/09/2016	

Table 1 Continue

Region	Province	GPS	Natural host	Plant part	Isolate number	Collection date
Eastern	Lop Buri	15°22'58"N 100°49'21"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	leaf	LRIR-34,	
		15°4'11"N 100°43'26"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	leaf	LRIR-35, LRIR-36, LRIR-37	10/10/2015
	Chachoengsao	15°22'58"N 100°49'21"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	LRIR-00	13/12/2012
Eastern	Ratchaburi	14°51'21"N 100°59'24"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	LRIR-45	30/10/2016
		13°31'42"N 99°48'42"E	<i>O. sativa</i> (Supan Buri 1)	leaf	RBRR-23	30/09/2013
	Chachoengsao	13°50'50"N 101°3'12"E	<i>O. sativa</i> (RD47)	leaf	CCOR-18	20/01/2015
Southern	Chanthaburi	13°50'50"N 101°3'12"E	<i>O. sativa</i> (RD47)	collar	CCOR-19	20/01/2015
		13°50'50"N 101°3'12"E	<i>O. sativa</i> (RD47)	node	CCOR-29	20/01/2015
	Surat Thani	13°32'34"N 100°59'38"E	<i>Pennisetum</i> sp.	leaf	CCOG-21	11/08/2014
Southern	Surat Thani	12°40'25"N 102°11'48"E	<i>O. sativa</i> (KDML105)	neck	CTIR-26	05/12/2013
		9°18'50"N 99°41'25"E	<i>P. purpureum</i>	leaf	SNIG-40	04/06/2016
	9°09'56"N 99°28'16"E	<i>P. purpureum</i>	leaf	SNIG-17	12/02/2015	
	9°8'11"N 99°19'13"E	<i>B. mutica</i>	leaf	SNIG-27	09/01/2015	
Southern	Surat Thani	9°09'56"N 99°28'16"E	<i>Centotheca lappacea</i>	leaf	SNIG-38	26/10/2015
		9°8'11"N 99°19'13"E	<i>I. rugosum</i>	leaf	SNIG-41	24/07/2016

KDML = Khao Dawk Mali, RD = Rice Department, CRIR = Chiang Rai Rice, LPNR = Lamphun Rice, NMAG= Nakhon Ratchasima Grass, NMAR = Nakhon Ratchasima Rice, BRMR = Buri Ram Rice, SRNR = Surin Rice, SSKR = Si Sa Ket Rice, MKMR = Maha Sarakham Rice, RETR = Roi Et Rice, RETG = Roi Et Grass, UBNR = Ubon Ratchathani Rice, UBNG = Ubon Ratchathani Grass, BKKG = Bangkok Grass, SRIG = Sara Buri Grass, LRIR = Lop Buri Rice, RBRR = Ratchaburi Rice, CCOR = Chachoengsao Rice, CCOG = Chachoengsao Grass, CTIR = Chanthaburi Rice, SNIG = Surat Thani Grass

2. การจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโรครไหม้

2.1 เปรียบเทียบขนาดของโคนิเดียโดยแบ่งตามพืชอาศัยข้าวและหญ้า

จากการเปรียบเทียบขนาดของโคนิเดียโดยแบ่งตามพืชอาศัยข้าวและหญ้าพบว่าความยาวของโคนิเดียพบว่ามี 29 ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวมีความยาวของโคนิเดีย เท่ากับ $20.89 \pm 0.13 - 28.14 \pm 0.08 \mu\text{m}$ และ

ความกว้างของโคนิเดีย เท่ากับ $7.39 \pm 0.04 - 10.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ตามลำดับ ในหญ้าจำนวน 14 ไอโซเลทมีความยาวของโคนิเดีย $18.12 \pm 0.10 - 24.93 \pm 0.14 \mu\text{m}$ และความกว้างของโคนิเดีย $5.27 \pm 0.05 - 9.77 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของความยาวและความกว้างของโคนิเดียมีความแตกต่างกันโดยโคนิเดียที่แยกได้จากข้าวจะมีขนาดใหญ่กว่าที่แยกได้จากหญ้าแสดงดัง Table 2

Table 2 Conidial size of *Pyricularia* spp. from rice and grasses

Host	Isolate number	Average Size (μm)	
		Length	Width
rice	BRMR-00, BRMR-05, CCOR-18, CCOR-19, CRIR-25, CTIR-26, LPNR-16, LRIR-00, LRIR-34, LRIR-35, LRIR-36, LRIR-37, LRIR-45, MKMR-24, NMAR-4, NMAR-11, NMAR-44, RBRR-23, RETR-10, SSKR-00, SRNR-00, UBNR-22, UBNR-08, UBNR-06, UBNR-02, UBNR-03, UBNG-14, UBNR-09	20.89 ± 0.13	7.39 ± 0.04
		28.14 ± 0.08	10.50 ± 0.05
grasses	BKKG-20, BKKG-42, CCOG-21, NMAG-31, NMAG-32, RETG-13, SNIG-17, SNIG-27, SNIG-38, SNIG-40, SNIG-41, SRIG-43, UBNG-6.1, UBNG-3.1	18.12 ± 0.10	5.27 ± 0.05
		24.93 ± 0.14	9.77 ± 0.05

CRIR = Chiang Rai Rice, LPNR = Lamphun Rice, NMAG = Nakhon Ratchasima Grass, NMAR = Nakhon Ratchasima Rice, BRMR = Buri Ram Rice, SRNR = Surin Rice, SSKR = Si Sa Ket Rice, MKMR = Maha Sarakham Rice, RETR = Roi Et Rice, RETG = Roi Et Grass, UBNR = Ubon Ratchathani Rice, UBNG = Ubon Ratchathani Grass, BKKG = Bangkok Grass, SRIG = Sara Buri Grass, LRIR = Lop Buri Rice, RBRR = Ratchaburi Rice, CCOR = Chachoengsao Rice, CCOG = Chachoengsao Grass, CTIR = Chanthaburi Rice, SNIG = Surat Thani Grass

2.2 เปรียบเทียบลักษณะของโคนิเดียโดยใช้ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับพืช เช่น ใบไหม้ (leaf blast) ไหม้คอรวง (neck blast) และ กาบใบไหม้ (collar blast)

จากการเปรียบเทียบลักษณะของโคนิเดียโดยใช้ลักษณะอาการของโรคในข้าวและหญ้า พบว่า อาการของโรคใบไหม้ จำนวน 22 ไอโซเลท มีความยาวของ

โคนิเดีย $18.12 \pm 0.70 - 26.51 \pm 0.13 \mu\text{m}$ และความกว้างของโคนิเดีย $5.27 \pm 0.05 - 9.77 \pm 0.05 \mu\text{m}$ อาการของโรคไหม้คอรวงในข้าว จำนวน 21 ไอโซเลทมีความยาวของโคนิเดีย $20.89 \pm 0.20 - 28.14 \pm 0.08 \mu\text{m}$ และความกว้างของโคนิเดีย $7.60 \pm 0.07 - 10.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ตามลำดับ กาบใบไหม้ 1 ไอโซเลท (CCOR-19) ความยาวของโคนิเดีย $22.34 \pm 0.11 \mu\text{m}$

และขนาดของความกว้างโคนินเดีย $8.28 \pm 0.03 \mu\text{m}$ จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของความยาวและความกว้างโคนินเดียจะมีความแตกต่างกันโดยโคนินเดียที่แยกได้โรคไหม้คอรวงมีขนาดใหญ่ที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทที่แยกได้จากโรคใบไหม้ ในส่วนของกาบใบหรือข้อต่อของใบไหม้ และ 1 ไอโซเลท ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้แสดงดัง Table 3

Table 3 Comparison of conidial characteristics based on the disease symptoms

Symptoms	Isolate number	Average Size (μm)	
		Length	Width
Leaf blast	BKKG-20, BKKG-42, CCOG-21, CCOR-18, LRIR-34, LRIR-35, LRIR-36, LRIR-37, NMAG-31, NMAG-32, NMAR-44, RBRR-23, RETG-13, SNIG-17, SNIG-27, SNIG-38, SNIG-40, SNIG-41, SRIG-43, UBNG-6.1, UBNG-3.1	18.12 ± 0.10	5.27 ± 0.05
		26.51 ± 0.13	9.77 ± 0.05
Neck blast	BRMR-00, BRMR-05, CRIR-25, CTIR-26, LPNR-16, LRIR-00, LRIR-45, MKMR-24, NMAR-4, NMAR-11, RETR-10, SSKR-00, SRNR-00, UBNR-22, UBNR-08, UBNR-06, UBNR-02, UBNR-03, UBNG-14, UBNR-09	20.89 ± 0.20	7.60 ± 0.07
		28.14 ± 0.08	10.50 ± 0.05
Collar blast	CCOR-19	22.34 ± 0.11	8.28 ± 0.03

CRIR = Chiang Rai Rice, LPNR = Lamphun Rice, NMAG = Nakhon Ratchasima Grass, NMAR = Nakhon Ratchasima Rice, BRMR = Buri Ram Rice, SRNR = Surin Rice, SSKR = Si Sa Ket Rice, MKMR = Maha Sarakham Rice, RETR = Roi Et Rice, RETG = Roi Et Grass, UBNR = Ubon Ratchathani Rice, UBNG = Ubon Ratchathani Grass, BKKG = Bangkok Grass, SRIG = Sara Buri Grass, LRIR = Lop Buri Rice, RBRR = Ratchaburi Rice, CCOR = Chachoengsao Rice, CCOG = Chachoengsao Grass, CTIR = Chanthaburi Rice, SNIG = Surat Thani Grass

2.3 เปรียบเทียบลักษณะของโคนินเดียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยประเมินลักษณะของรูปร่าง (conidial shape) จำนวนผนังกัน (septation) รวมทั้งลักษณะของ hilum ที่ฐานโคนินเดียและลักษณะของเซลล์ที่ปลายโคนินเดีย จากการทดลองเปรียบเทียบลักษณะของโคนินเดียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยประเมินจากลักษณะทางรูปร่าง พบโคนินเดีย 6 กลุ่มแสดงดัง Table 4 และ Figure 1 คือ

กลุ่มที่ 1 โคนินเดียมีรูปร่าง pyriform มี hilum บริเวณฐานโคนินเดียสั้นและลักษณะของเซลล์บริเวณปลายโคนินเดียยาวและแหลม มีจำนวน 8 ไอโซเลท

คิดเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนไอโซเลททั้งหมด ซึ่งแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากหญ้า ในกลุ่มของหญ้า ขจรจบ

กลุ่มที่ 2 โคนินเดียมีรูปร่าง pyriform มี hilum บริเวณฐานโคนินเดียสั้นและลักษณะของเซลล์ที่ 2 จะกว้าง ตรงผนังกันจะเว้าเล็กน้อย บริเวณปลายโคนินเดียแหลม มีจำนวน 3 ไอโซเลท (7 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากไหม้คอรวงข้าว

กลุ่มที่ 3 โคนินเดียมีรูปร่าง pyriform มี hilum บริเวณฐานโคนินเดียสั้น โคนินเดียขนาดเล็ก มีจำนวน 7 ไอโซเลท (15 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแยกเชื้อรา

สาเหตุโรคได้จากไหม้คอรวงข้าวและใบไหม้หญ้า

กลุ่มที่ 4 โคนิเดียมีรูปร่าง pyriform มี hilum บริเวณฐานโคนิเดียยาวและลักษณะของเซลล์บริเวณปลายโคนิเดียแหลม มีจำนวน 5 ไอโซเลท (11 เพอร์เซ็นต์) ซึ่งแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากใบไหม้ไหม้คอรวงกาบใบหรือข้อต่อของใบไหม้ และข้อต่อของลำต้นไหม้ในข้าว

กลุ่มที่ 5 โคนิเดียมีรูปร่าง pyriform มี hilum บริเวณฐานโคนิเดียสั้นและลักษณะของเซลล์

บริเวณปลายโคนิเดียแหลม มีจำนวน 21 ไอโซเลท (47 เพอร์เซ็นต์) ซึ่งแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากใบไหม้ไหม้คอรวงกาบใบหรือข้อต่อของใบไหม้ และข้อต่อของลำต้นไหม้ในข้าว

กลุ่มที่ 6 โคนิเดียมีรูปร่าง narrowly obclavate มี hilum บริเวณฐานโคนิเดียสั้น โคนิเดียเซลล์ที่ 1-3 มีความกว้างใกล้เคียงกัน มีจำนวน 1 ไอโซเลท (2 เพอร์เซ็นต์) ซึ่งแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากหญ้าเหล็กไผ่ยังไม่มีการรายงานในประเทศไทย

Table 4 Conidial shape of *Pyricularia* spp. Isolates

Group	Conidia shape	Isolate number	Average Size (µm)	
			Length	Width
I	pyriform shape with hilum at the base of conidia, and the third cell is long and tapering	BKKG-20, BKKG-42, CCOG-21,	21.80 ± 0.20	7.64 ± 0.03
		NMAG-32, RETG-13, SNIG-27, SNIG-40, UBNG-3.1	27.47 ± 0.23	8.03 ± 0.03
II	pyriform shape with hilum at the base of conidia, and the second cell is constricted	BRMR-00, SRNR-00, UBNR-22	26.65 ± 0.16 28.14 ± 0.08	8.42 ± 0.05 10.50 ± 0.05
III	pyriform shape with a hilum on the small conidia	CTIR-26, NMAG-31, NMAR-44, SNIG-17, SNIG-41, SRIG-43, UBNG-6.1	18.12 ± 0.10 21.02 ± 0.12	6.83 ± 0.04 9.77 ± 0.05
		IV	pyriform shape with long hilum at the base of the conidia	LRIR-34, LRIR-37, LRIR-45, SSKR-00
V	pyriform shape with short hilum at the base of the conidia	BRMR-05, CCOR-18, CCOR-19, CRIR-25, LPNR-16, LRIR-00, LRIR-35, LRIR-36, MKMR-24, NMAR-4, NMAR-11, RBRR-23, RETR-10, UBNR-08, UBNR-06, UBNR-02, UBNR-03, UBNG-14, UBNR-09	21.20 ± 0.12 27.25 ± 0.19	7.60 ± 0.07 9.51 ± 0.05
		VI	narrowly obclavate with hilum 1-3 cells similar width	SNIG-38

CRIR = Chiang Rai Rice, LPNR = Lamphun Rice, NMAG = Nakhon Ratchasima Grass, NMAR = Nakhon Ratchasima Rice, BRMR = Buri Ram Rice, SRNR = Surin Rice, SSKR = Si Sa Ket Rice, MKMR = Maha Sarakham Rice, RETR = Roi Et Rice, RETG = Roi Et Grass, UBNR = Ubon Ratchathani Rice, UBNG = Ubon Ratchathani Grass, BKKG = Bangkok Grass, SRIG = Sara Buri Grass, LRIR = Lop Buri Rice, RBRR = Ratchaburi Rice, CCOR = Chachoengsao Rice, CCOG = Chachoengsao Grass, CTIR = Chanthaburi Rice, SNIG = Surat Thani Grass

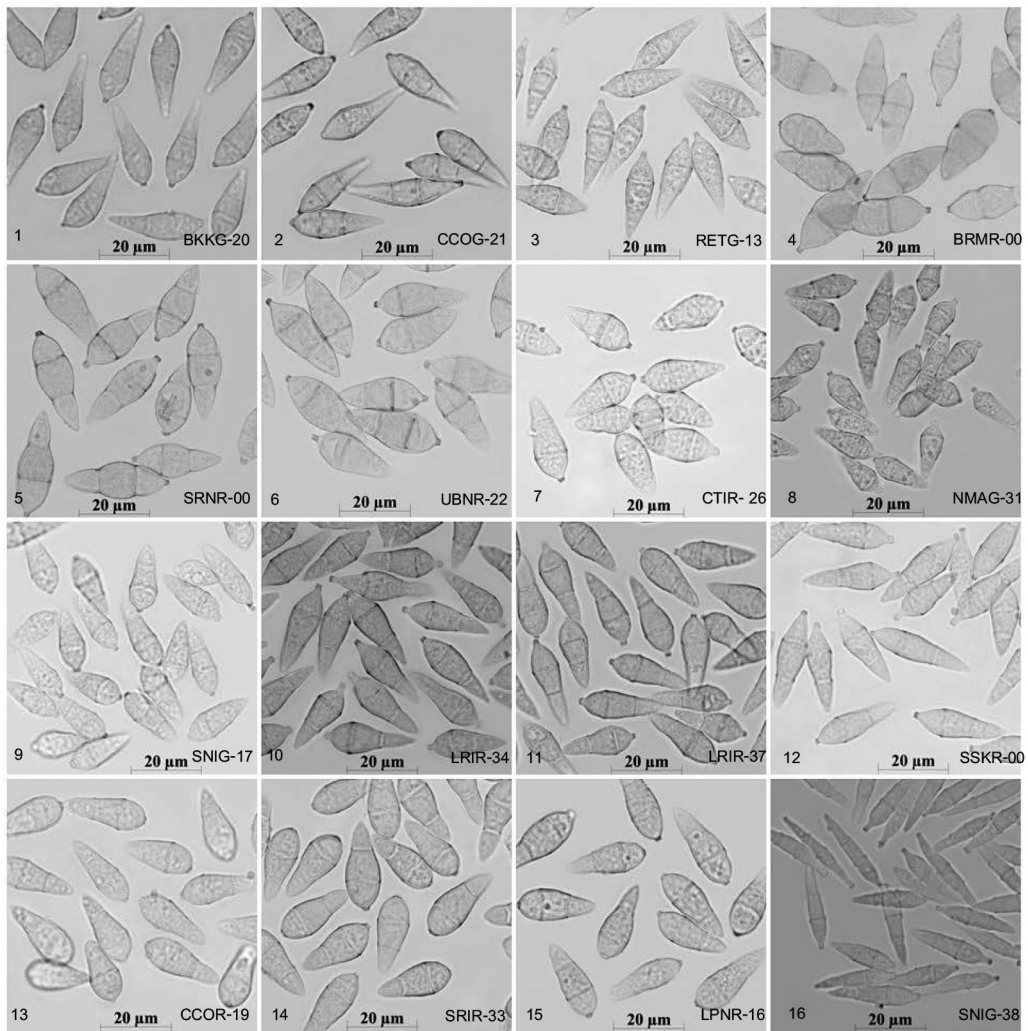


Figure 1 Conidial characteristics of *Pyricularia* spp. under the light microscope. Group I (1–3), Group II (4–6), Group III (7–9), Group IV (10–12), Group V (13–15), and Group VI (16)

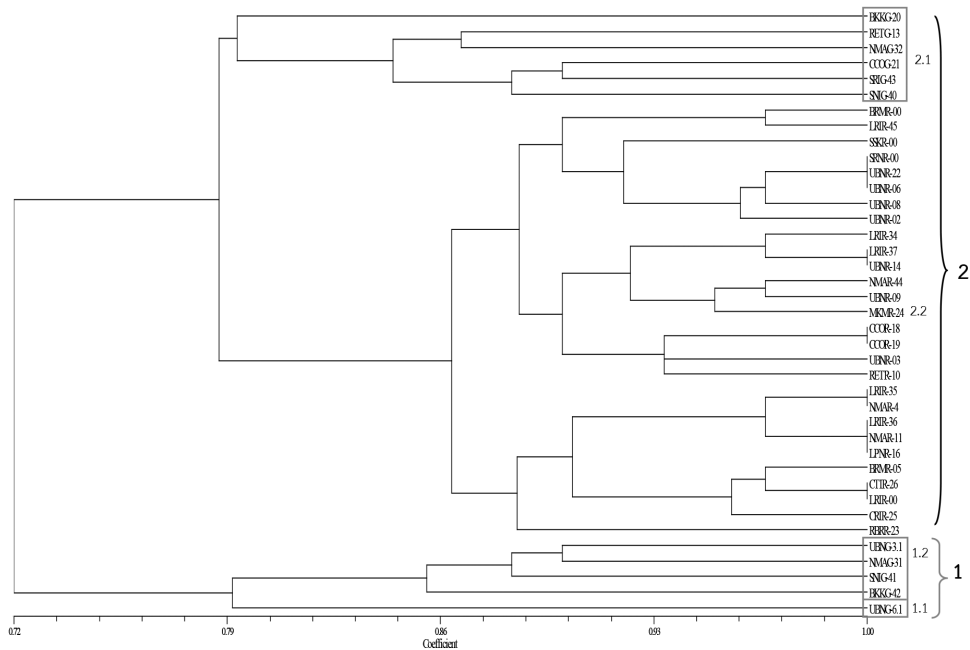


Figure 2 Dendrogram of 39 *Pyricularia* spp. isolated from rice and grasses

3. วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

Figure 2 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 42 ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวและหญ้า โดยใช้เทคนิค *Pot2* rep-PCR สามารถจัดความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่แยกได้จากหญ้า มีจำนวน 5 ไอโซเลท แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1.1 จากเชื้อที่แยกได้จากหญ้า มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ UBNG-6.1 กลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากหญ้า มีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ UBNG-3.1, NMAG-31, SNIG-41 และ BKKG-42 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ มีจำนวน 34 ไอโซเลท ที่แยกได้จากหญ้าและข้าว ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 2.1 ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากหญ้า มีจำนวน 6 ไอโซเลท คือ BKKG-20, RETG-13, NMAG-32, CCOG-21, SRIG-43 และ SNIG-40 กลุ่มที่ 2.2 ประกอบด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

มีจำนวน 28 ไอโซเลท ที่แยกได้จากข้าวทั้งหมด คือ BRMR-00, LRIR-45, SSKR-00, SRNR-00, UBNR-22, UBNR-06, UBNR-08, UBNR-02, LRIR-34, LRIR-37, UBNR-14, NMAR-44, UBNR-09, MKMR-24, CCOR-18, CCOR-19, UBNR-03, RETR-10, LRIR-35, NMAR-4, LRIR-36, NMAR-11, LPNR-16, BRMR-05, CTIR-26, LRIR-00, CRIR-25 และ RBRR-23 ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 42 ไอโซเลท โดยใช้พีชออคัยในการแยกกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ คือข้าว และหญ้า พบว่า ค่าเฉลี่ยของความยาว และความกว้างโคนินเดียมีความแตกต่างกัน โดยโคนินเดียของราสาเหตุโรคไหม้ที่แยกได้จากข้าว (ยาว $20.89 \pm 0.13 - 28.14$

$\pm 0.08 \mu\text{m}$ กว้าง $7.39 \pm 0.04 - 10.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$) มีขนาดใหญ่กว่าราสาเหตุโรคไหม้ที่แยกได้จากหญ้า ($18.12 \pm 0.10 - 24.93 \pm 0.14 \mu\text{m}$ กว้าง $5.27 \pm 0.05 - 9.77 \pm 0.05 \mu\text{m}$) และการใช้ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับพืช เช่น อาการใบไหม้ ไหม้คอรวง และกาบใบไหม้ พบว่า โคนินเดี่ยวที่แยกได้โรคไหม้คอรวง (ยาว $20.89 \pm 0.20 - 28.14 \pm 0.08 \mu\text{m}$ กว้าง $7.60 \pm 0.07 - 10.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$) มีขนาดใหญ่กว่าที่แยกได้จากโรคใบไหม้ (ยาว $18.12 \pm 0.70 - 26.51 \pm 0.13 \mu\text{m}$ กว้าง $5.27 \pm 0.05 - 9.77 \pm 0.05 \mu\text{m}$) จากการทดลองพบว่า ขนาดของโคนินเดี่ยวที่แยกได้จากข้าว และมีอาการไหม้คอรวงจะมีขนาดใกล้เคียงกับ Ou (1973) ที่รายงานว่เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่มีการสร้างโคนินเดี่ยวมีขนาดตั้งแต่ $8.1-10.3 \times 19.2-27.3 \mu\text{m}$ ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน อาจเป็น pyriform หรือ obclavate ปลายยอดของโคนินเดี่ยวมีลักษณะแหลม บางครั้งตรงผนังกันอาจจะเว้าเล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะใส ไม่มีสี (hyaline) แต่ไม่สอดคล้องกับ Chandrasrikul and Srijumpa (1999) ที่รายงานว่ เชื้อ *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว และหญ้าบางชนิด มีขนาดโคนินเดี่ยว $17-23 (21.2) \times 8-11 (7.6) \mu\text{m}$ ส่วนเชื้อ *P. grisea* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในหญ้าหลายชนิด มีขนาดโคนินเดี่ยว $17-28 (20.9) \times 6-9 (7.6) \mu\text{m}$ นอกจากนี้ การใช้ลักษณะลักษณะทางรูปร่างโคนินเดี่ยวในการจัดจำแนก พบลักษณะโคนินเดี่ยว 6 กลุ่ม แต่หลักเกณฑ์ดังกล่าวยังไม่สามารถจำแนกเชื้อราระดับสปีชีส์ได้ จึงจำเป็นต้องใช้การจำแนกทางอณูชีววิทยาเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค *Pot2* rep-PCR พบว่า เชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของโคนินเดี่ยว แต่ไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อที่แยกได้จากพืชอาศัยคือข้าว และหญ้าได้อย่างชัดเจน (George *et al.*, 1998) และจากการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ *Pot2* rep-PCR สามารถจัดความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เชื้อที่ทำความเสียหายให้กับหญ้า

(*P. grisea*) และกลุ่มที่ 2 เชื้อที่แยกได้จากหญ้า และข้าว (*P. oryzae*) ซึ่งสอดคล้องกับ Chandrasrikul and Srijumpa (1999) ที่จำแนกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ออกเป็น 2 ชนิด คือ *P. oryzae* Cav. และ *P. grisea* (Cooke) Sacc. เชื้อราทั้งสองมีลักษณะอาการและขนาดโคนินเดี่ยวแตกต่างกัน โดยเชื้อ *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าวและหญ้าบางชนิด ส่วนเชื้อ *P. grisea* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในหญ้าหลายชนิด และพืชอื่น ๆ Phumsathit (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อที่แยกได้จากพืชอาศัยข้าว และหญ้า พบว่า ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากข้าวและเชื้อที่แยกได้จากหญ้าจะมีการผสมกันอยู่เสมอ แสดงว่าลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อรา *P. oryzae* และ *P. grisea* มีบางส่วนของลำดับเบสที่คล้ายคลึงกัน

จากการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ *Pot2* ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของอาการของโรคที่เกิดกับพืช และลักษณะทางรูปร่างของโคนินเดี่ยวได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Chen *et al.* (2006) Faivre-Rampant *et al.* (2008) และ Choi *et al.* (2013) ที่รายงานว่ เชื้อ *P. oryzae* และเชื้อ *P. grisea* เชื้อทั้งสองนี้ไม่มีความแตกต่างกัน ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกลักษณะของ conidium, perithecium และ ascospore ได้ แต่เมื่อนำ Dendrogram มาใช้แยกความแตกต่างของเชื้อ *P. grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้ใน *Digitaria* spp. พบว่ เชื้อจะมีลักษณะแตกต่างกัน

เชื้อราที่แยกจากแหล่งที่มาจากจังหวัดเดียวกัน อำเภอเดียวกัน ปีเดียวกัน แต่ถูกจัดแยกกลุ่มกัน เช่น เชื้อราที่เก็บรวบรวมจาก จังหวัดอุบลราชธานี ในปี 2557 (UBNR-06, UBNR-02, UBNR-03 และ UBNR-14) พบว่ เชื้อราสาเหตุโรคไหม้กลุ่มนี้อาจมีพันธุกรรมที่ต่างกัน ในจังหวัดเดียวกันอาจพบเชื้อสาเหตุเข้าทำลายข้าวได้มากกว่า 1 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยของ Uckarach *et al.* (2011) ที่รายงานว่ เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันมีความ



หลากหลายของระดับความรุนแรงในการก่อโรคที่ต่างกันไม่สามารถจัดกลุ่มรวมกันได้ เชื้อราบางไอโซเลทที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น เชื้อราที่มีแหล่งที่มาจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CCOR-18 และ CCOR-19) แสดงให้เห็นว่า เชื้อราสาเหตุโรครไหมนี้มีพันธุกรรมที่คล้ายกัน เชื้อราที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันแต่ปีที่เก็บต่างกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เชื้อราที่เก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี (UBNR-22 และ UBNR-06) ซึ่งเก็บตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2555 และ 2557 แสดงให้เห็นว่า เชื้อราที่มีการระบาดซ้ำเป็นประจำทุกปีในพื้นที่เดียวกัน เนื่องจากเชื้อรานี้มีการอยู่ข้ามฤดู และมีพืชอาศัยหลายชนิด อีกทั้งเชื้อราสามารถดำรงชีพอยู่ในซากพืชได้ และโคนินเดียจะมีชีวิตอยู่ในเมล็ดข้าวได้นานที่สุดถึง 2 ปี (Ou, 1985) ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการปลูกข้าวพันธุ์เดียวกันซ้ำในในพื้นที่เดิม (Disthaporn, 1994) และนอกจากนี้ เชื้อรายังมีการแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่นโดยอาศัยลม ฝน และการขนส่งสินค้าเกษตรต่าง ๆ (Ou, 1985) พบตัวอย่างที่มาจากต่างจังหวัด และภูมิภาค แต่มีพันธุกรรมที่เหมือนกันคือเชื้อราที่แยกได้จากไหม้คอรวง ในจังหวัดลพบุรี นครราชสีมา และลำพูน (LRIR-36, NMAR-11 และ LPNR-16) นอกจากนี้ไม่พบตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากวัชพืชชนิดเดียวกัน (RETG-13 และ UBNG-3.1) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เหมือนกันถึง 100% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (1995) การนำไพรเมอร์ *Pot2* มาใช้ในเทคนิค rep-PCR เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกเชื้อโรครไหม้ที่เข้าทำลายข้าว และหญ้าเนื่องจากการนำเทคนิคจาก PCR ทำให้ง่ายต่อการจำแนก อีกทั้งยังใช้ปริมาณ DNA ของเชื้อราในขบวนการ PCR

ในขณะที่เดียวกันการทดลองนี้พบว่า เทคนิค *Pot2* rep-PCR ไม่สามารถตรวจพบขนาดชิ้นส่วน DNA ของเชื้อที่แยกได้จากหญ้าได้ 3 ไอโซเลทคือ SNIG-17, SNIG-27 และ SNIG-38 แต่เมื่อนำเชื้อ

ทั้ง 3 ไอโซเลทนี้มาแยกความหลากหลายในบริเวณ ITS ของ rDNA โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ ITS สามารถเพิ่มปริมาณดี DNA ได้ทุกไอโซเลท โดยมีขนาดของชิ้น DNA ประมาณ 600 คู่เบสซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bussaban *et al.* (2005) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางโมเลกุล และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Pyricularia* และ allied genera บริเวณ ITS ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ได้ขนาดชิ้น DNA มีจำนวน 402-623 คู่เบส

ในการทดลองนี้พบว่า การใช้ *Pot2* rep-PCR เฉพาะเจาะจงกับหญ้า แต่ในทางกลับกันพบว่า *Pot2* rep-PCR ยังไม่สามารถใช้ในการแยก และจัดกลุ่มเชื้อราโรครไหม้ที่ทำลายหญ้าได้ทั้งหมด ดังนั้นควรจะมีการนำเทคนิค Microsatellite, SNPs หรือใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นที่มีความเฉพาะเจาะจงมากกว่านำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุล Simple sequence repeat (SSR) หรือ microsatellite ของ *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Brondani *et al.* (2000), Kaye *et al.* (2003) และ Zheng *et al.* (2008) ตำแหน่งของเครื่องหมายครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อราสาเหตุโรครไหม้ จากงานวิจัยของ Jaihom and Parinthawong (2014) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายร่วมกับจัดกลุ่มความแปรปรวนและความหลากหลายทางคุณสมบัติการก่อโรค พบว่า เครื่องหมาย SSR มีศักยภาพดีและเหมาะสมในการใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรครไหม้ ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย และเป็นข้อมูลสำคัญที่จะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรครไหม้ ในการเลือกใช้เชื้อราสาเหตุโรครไหม้สำหรับทดสอบความต้านทานโรครของข้าว Yadav *et al.* (2017) ได้ใช้เทคนิค SNPs เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและค้นหาถิ่นกำเนิดของโรคร และนำไปคัดพันธุ์ต้านทานโรครไปใหม่

พบว่า การใช้เทคนิคนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

สรุป

การใช้พีชอาคัยเป็นตัวแบ่งประเภทพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของของโคนินเดียมีความแตกต่างกัน โดยโคนินเดียที่แยกได้จากข้าวจะมีขนาดใหญ่กว่าที่แยกได้จากพีชอาคัยอื่น ๆ และเมื่อใช้ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับพีชพบว่าค่าเฉลี่ยของความยาวและความกว้างโคนินเดียมีความแตกต่างกัน โดยโคนินเดียที่แยกได้จากอาการที่เกิดกับคอรวง จะมีขนาดใหญ่กว่าอาการที่เกิดขึ้นบนใบ เมื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 42 ไอโซเลท ที่แยกได้จากข้าว และหญ้า โดยใช้เทคนิค *Pot2* rep-PCR สามารถจัดความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พบเชื้อที่ทำให้ความเสียหายให้กับหญ้า และ

เชื้อที่แยกได้จากพีชตระกูลและข้าวพบเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ พบว่า การใช้เทคนิค *Pot2* rep-PCR เป็นเครื่องหมาย DNA ที่มีศักยภาพดีในระดับหนึ่ง และเหมาะสมในการใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย และการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.02

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนในการวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Brondani, C., R.P.V. Brondani, L.R. Garrido and M.E. Ferreira. 2000. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. Genet. Mol. Biol. 23(4): 753–762.
- Bussaban, B., S. Lumyong, P. Lumyong, T. Seelanan, D.C. Park, E.H. McKenzie and K.D. Hyde. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. Mycologia 97: 1002–1011.
- Chandrasrikul, A. and N. Srijumpa. 1999. Blast disease of Globba, Heliconia, rice and weeds. Pueankaset 10(10): 34–40. (in Thai)
- Chen, D.H., R.S. Zeigler, H. Leung and R.J. Nelson. 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85: 1011–1020.
- Chen, Q.H., Y.C. Wang and X.B. Zheng. 2006. Genetic analysis and molecular mapping of the avirulence gene PRE1, a gene for host–species specificity in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. Genome 49: 873–881.
- Choi, J., S.Y. Park, B.R. Kim, J.H. Roh, I.S. Oh, S.S. Han and Y.H. Lee. 2013. Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. PLoS ONE 8(2): e57196.

- 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, in association with IRRI, Manila, Philippines.
- Faivre-Rampant, O., J. Thomas, M. Allègre, J.B. Morel, D. Tharreau, J.L. Nottéghem, M.H. Lebrun, U. Schaffrath and P. Piffanelli. 2008. Characterization of the model system rice *Magnaporthe* for the study of nonhost resistance in cereals. *New Phytol.* 180: 899–910.
- George, M.L.C., R.J. Nelson, R.S. Zeigler and H. Leung. 1998. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88: 223–229.
- Giatgong, P. and R.A. Frederiksen. 1969. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 59: 1152–1157.
- Jaihom, N. and N. Parinthawong. 2014. Genetic diversity assessment of rice blast fungus (*Pyricularia grisea*) collected in Thailand using SSR marker. pp. 71–78. In Proc. the 52nd Kasetsart University Annual Conference, Thailand. (in Thai)
- Kaye, C., J. Milazzo, S. Rozenfeld, M.H. Lebrun and D. Tharreau. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genet. Biol.* 40: 207–214.
- Luo, J. and N. Zhang. 2013. *Magnaporthiopsis*, a new genus in *Magnaporthaceae* (Ascomycota). *Mycologia*. 105(4): 1019–1029.
- Mekwatanakarn, P., W. Kositratana, M. Levy and R.S. Zeigler. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near – isogenic for major resistance genes. *Plant Dis.* 84: 60–70.
- Mithrasena, Y.J.P.K., W.S.S. Wijesundera, R.L.C. Wijesundera, D.C. Wimalasiri and R.P.N. Priyanthi. 2012. Pathogenic and genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* populations from Sri Lanka. *Rice Sci.* 19(3): 241–246.
- Motallebi, P., M. Javan-Nikkhah and S.M. Okhovvat. 2013. Characterization of *Magnaporthe grisea* populations associated with rice and weeds in Iran. *Australas. Plant Pathol.* 42: 693–700.
- Murata, N., T. Aoki, M. Kusaba, Y. Tosa and I. Chuma. 2014. Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in *Magnaporthaceae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 66–72.
- Noriguni, S. 2006. A rice (*Oryza sativa* L.) breeding for field resistance to blast disease (*Pyricularia oryzae*) in mountainous region agricultural research institute, Aichi agricultural research center of Japan. *Plant Prod. Sci.* 9(1): 3–9.

- Ou, S.H. 1973. Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England. 368 p.
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2nd Edition, CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 380 p.
- Phumsathit, W. 2001. Biodiversity and Pathogenicity of Rice Blast Pathogen In Chiang Mai Valley. M.S. Thesis, Chiang Mai University. Chiang Mai, Thailand. (in Thai)
- Skamnioti, P. and S.J. Gurr. 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. Trends Biotechnol. 27: 141–150.
- Uckarach, S., P. Sripichitt and T. Sreewongcha. 2011. Cluster analysis of blast disease resistance of improved rice varieties using newly blast pathogen isolates. pp. 581–588. *In Proc. the 49th Kasetsart University Annual Conference, Thailand.* (in Thai)
- Yadav, M.K., S. Aravindan, U. Ngangkham, H.N. Shubudhi, M.K. Bag, T. Adak, S. Munda, S. Samantaray and M. Jena. 2017. Use of molecular markers in identification and characterization of resistance to rice blast in India. PLoS ONE 12(4): e0176236.
- Yulin, J., L. Guangjie, C. Stefano, L. Seonghee and D. Yuntao. 2009. Current progress on genetic interactions of rice with rice blast and sheath blight fungi. Agric. Sci. China. 3(3): 231–239.