ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์การมียีน *Avirulence* ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Genetic Diversity and *Avirulence* Gene Analysis of *Pyricularia oryzae* in Northeast Thailand

คนึงนิจ ศรีวิลัย[1),*] อังคณา กันทาจันทร์[1)] สุกัญญา แก้วพงษ์[1)] พรรณนิดา หอมสมบัติ[1)] วันพร เข็มมุกด์[2)]

Kanuengnij Srivilai[1),*] Angkana Kantachan[1)] Sukanya Kaewpong[1)] Phannida Homsombat[1)] Wanporn Khemmuk[2)]

Abstract

Rice blast disease caused by the fungus *Pyricularia oryzae* is an important disease affecting rainfed and irrigated rice cultivation. The severity of this disease depends on the genetic diversity of fungal *Avirulence* (*AVR*) genes. This study aimed to investigate fungal isolates' genetic diversity and determine the presence of *AVR* genes in *P. oryzae* isolates collected from the northeastern region of Thailand during the 2020 and 2023 rice seasons. Morphological characterization and genetic diversity analysis of fungal isolates were performed using the repetitive-based polymerase chain reaction (rep-PCR) technique. The presence of seven *AVR* genes was also determined using PCR. The results showed that fungal isolates from the same and different locations exhibited differences in morphological characteristics and could be classified into 24 groups based on genetic diversity. The average percentage of *AVR* genes in fungi collected in 2020 and 2023 were as follows: *AVR-Pizt* (0% and 0%), *AVR-Pii* (17.9% and 31.7%), *AVR-Pia* (71.9% and 69.8%), *AVR-Pi9* (96.4% and 100%), *AVR-Pib* (91.1% and 73%), *AVR-Pik* (87.5 and 100%), and *AVR-Pita 1* (91.1 and 77.7%). The results of this study suggest that morphological characteristics, genetic diversity of fungal isolates, and the presence of *AVR* genes. This information could be useful for developing rice varieties resistant to blast disease and sustainable blast disease management in the Northeastern region of Thailand.

Keywords: rice, blast disease, *Pyricularia oryzae*, rep-PCR, fungi, *AVR-Pita1*, *AVR-Pii*, *Avirulence* gene, Northeastern

บทคัดย่อ

โรคไหม้ของข้าวมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cavara เป็นโรคข้าวที่สำคัญส่งผลกระทบต่อการปลูกข้าวนาน้ำฝนและนาชลประทาน ความรุนแรงของโรคนี้ขึ้นกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Avirulence* (*AVR*) ของเชื้อรา ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา และตรวจการมียีน *AVR* ในเชื้อรา *P. oryzae* ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในฤดูนาปี 2563 และ 2566 โดยดำเนินการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา ด้วยเทคนิค repetitive-based polymerase chain reaction (rep-PCR) และตรวจยีน *AVR* จำนวน 7 ยีน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราจากแหล่งปลูกข้าวเดียวกันหรือต่างกันมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐาน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถจัดกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ได้ 24 กลุ่ม และการมียีน *AVR* ของเชื้อราที่เก็บรวบรวมปี พ.ศ. 2563 และ 2566 ดังนี้ ไม่พบยีน *AVR-Pizt*

Received: June 3, 2024/ Revised: October 21, 2024/ Accepted: December 5, 2024

* corresponding author E-mail: kanuengnij.s@rice.mail.go.th

1) ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000 โทร. 0-4271-1471

Sakon Nakhon Rice Research Center, Mueang, Sakon Nakhon 47000 Tel. 0-4271-1471

2) กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-7892

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

แต่พบยีน *AVR-Pii* ร้อยละ 17.9 และ 31.7 *AVR-Pia* ร้อยละ 71.9 และ 69.8 *AVR-Pi9* ร้อยละ 96.4 และ 100 *AVR-Pib* ร้อยละ 91.1 และ 73 *AVR-Pik* ร้อยละ 87.5 และ 100 และ *AVR-Pita 1* ร้อยละ 91.1 และ 77.7 ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา และการมีอยู่ของยีน *AVR* ของเชื้อรา สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้และวางแผนการป้องกันโรคไหม้ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
คำสำคัญ: ข้าว โรคไหม้ *Pyricularia oryzae* เชื้อรา rep-PCR ยีน *AVR-Pita1* ยีน *AVR-Pii* ยีน *Avirulence* ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

คำนำ

โรคไหม้ของข้าวมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cavara (teleomorph: *Magnaporthe oryzae*) พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอเมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลายในระยะออกดอกทำให้ผลผลิตข้าวลดลงร้อยละ 100 (Dissanayaka *et al*., 2024) เกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข15 และ กข6 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้เป็นสาเหตุให้เผชิญกับการเข้าทำลายของโรค กรมส่งเสริมการเกษตร (2567) รายงานว่าช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2567 พบการระบาดของโรคไหม้ ในพื้นที่ 12 จังหวัด รวมพื้นที่ปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 7 จังหวัด คิดเป็นพื้นที่รวม 5,785.12 ไร่

เชื้อรา *P. oryzae* ที่มียีน *Avirulence (AVR)* ซึ่งมีความจำเพาะกับยีนต้านทานข้าว (resistance gene, R) ไม่สามารถก่อโรคในข้าวที่มียีนต้านทานได้ Selisana และคณะ (2017) รายงานว่ายีน *AVR* เป็นเป้าหมายหลักในการกลายพันธุ์ เชื้อราก่อโรคไหม้หลีกเลี่ยงการรับรู้ของโปรตีนต้านทานในข้าว (R protein) โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมบริเวณยีน *AVR* เช่น การแทรกของทรานสโปซอน (transposon insertion) การแทรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น (short sequence insertion) การหายไปหรือการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide deletion หรือ substitution) การเพิ่มจำนวนยีน (gene duplication) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อการสูญเสียการรับรู้ของโปรตีนต้านทานข้าวที่ตรงกันกับยีน *AVR* เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้ข้าวสูญเสียความต้านทานต่อยีน *AVR* ชนิดนั้น (Hu *et al*., 2022) Sirisathaworn และคณะ (2017) ศึกษาความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR* จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *PWL-2 Avr-Pii* และ *Avr-Piz-t* พบว่า เชื้อราก่อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ แต่ยังคงพบการกลายพันธุ์แบบไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน (non-synonymous mutations) เผยให้เห็นกลไกของการคัดเลือก (selective pressure) ที่ส่งผลต่อการปรับตัวของยีน *AVR* เพื่อเอาชนะกลไกการป้องกันตัวของข้าวต้านทาน

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) จำแนกสายพันธุ์เชื้อราก่อโรคไหม้โดยการปลูกเชื้อลงบนข้าวพันธุ์มาตรฐาน แต่พบว่า เชื้อทดสอบมีความแปรปรวนทำให้ยากต่อการสรุปผล ต่อมาพูนศักดิ์ และคณะ (2554) รายงานว่า เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งได้รับอิทธิพลจากการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual recombination) และการกลายพันธุ์ (mutation) แสดงให้เห็นความสามารถของเชื้อราในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง

Selisana และคณะ (2017) พบว่า ประชากรหลักของเชื้อราที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมและพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันตามความต้องการของเกษตรกรในท้องถิ่น ดังนั้น การตรวจสอบการมีอยู่และความแปรผันของยีน *AVR* จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการติดตามประชากรของเชื้อราประจำถิ่น

Longya และคณะ (2020) พบว่า ลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่แยกจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคเหนือจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างของลักษณะเส้นใย สีเส้นใย และขนาดและรูปร่างโคนิเดีย

Mekwatanakarn และคณะ (2000) นำวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยการสร้างลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ชนิดอาร์เอฟแอลพี (RFLP) โดยใช้ MGR586 เป็นตัวตรวจสอบและจัดกลุ่มเชื้อราที่มีแถบดีเอ็นเอคล้ายกัน นอกจากนี้ เทคนิค repetitive-based polymerase chain reaction (rep-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ Pot2 สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อและยังมีความสัมพันธ์กับการจำแนกเชื้อด้วย MGR586 (Olukayode *et al*., 2019; Peng *et al*., 2023) ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการ

ศึกษาพันธุกรรมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและเชื้อสายพันธุ์ของเชื้อรา และข้อมูลการมีชนิดยีน *AVR* ของเชื้อรา *P. oryzae* ที่พบระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อราบริสุทธิ์

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง สำรวจโรคไหม้ในแปลงข้าว ในฤดูนาปี 2563 และ 2566 ในจังหวัดสกลนคร นครพนม หนองบัวลำภู ขอนแก่น หนองคาย อุดรธานี และร้อยเอ็ด และเก็บตัวอย่างโรคไหม้ที่มีแผลรูปตา ตรงกลางแผลสีเทา (Fig. 1A) บันทึกพิกัดที่ตั้งแปลง พันธุ์ข้าว ระยะการเจริญเติบโตของข้าว ประเมินการเกิดโรค (disease incidence) และระดับความรุนแรงของโรค (scale of disease severity) ตามวิธีการของ IRRI (2014)

1.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ นำใบข้าวเป็นโรคไหม้ที่มีแผลรูปตาจากข้อ 1.1 มาตัดเป็นชิ้นความยาว 3-5 เซนติเมตร วางบนกระดาษกรองที่ชื้น บ่มไว้ 1 คืน ใช้ลูป (loop) จุ่มน้ำแตะบนแผล แล้วนำไปแตะบนอาหาร water agar (WA) (Fig. 1A-C) จากนั้นใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ลนไฟ ดึงปลายแหลมแยกสปอร์เดี่ยวนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร

นำชิ้นกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วมาวางรอบขอบนอกเส้นใย (Fig. 1F) เลี้ยงเชื้อราจนกว่าเส้นใยเจริญคลุมกระดาษกรอง จากนั้นย้ายชิ้นกระดาษกรองไปทำให้แห้งด้วยโถดูดความชื้น (Fig. 1G-H)

เก็บรักษาไว้ในตู้ดูดความชื้นสำหรับใช้ในทดสอบการต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้จากการเก็บรวบรวมฤดูนาปี 2563 จำนวน 64 ไอโซเลท และฤดูนาปี 2566 จำนวน 75 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 8 ชั่วโมง สลับกับมืด 16 ชั่วโมง บันทึกลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีเส้นใย และวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อราอายุ 10 วัน

กระตุ้นการสร้างสปอร์โดยใช้แผ่นสไลด์ขูดเส้นใยเบาๆ และเลี้ยงเชื้อราต่อภายใต้แสงแบล็กไลต์ ที่อุณหภูมิ

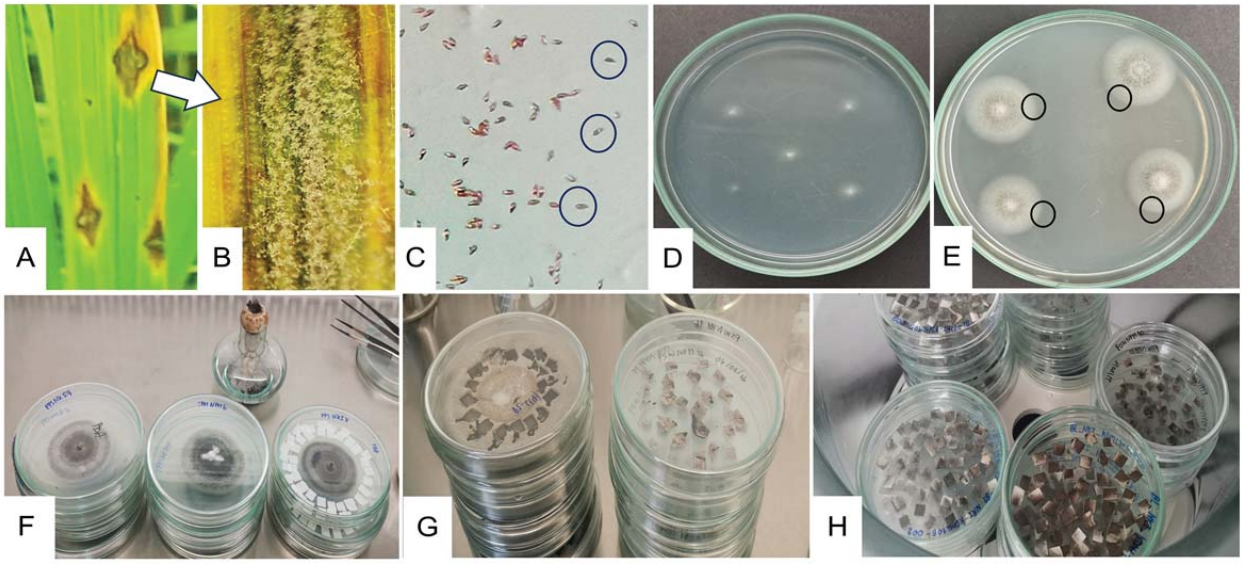

Fig. 1 Single spore isolation (A) a rice leaf showing a typical lesion caused by blast disease (B) a microscopic view of a rice blast lesion, revealing the conidiophores and conidia of *Pyricularia oryzae* (C) a microscopic image showing *P. oryzae* conidia on water agar (D-E) a single spore colony on PDA media (F) the fungus showed growth on PDA media after 5 days (G) covering the mycelia with filter paper (H) drying filter papers with fungus in a desiccator

25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า

บันทึกลักษณะทางสัณฐานของเส้นใย สีเส้นใย รูปร่างโคนิเดีย และวัดขนาดความกว้าง ความยาวของโคนิเดีย จำนวน 30 โคนิเดียต่อไอโซเลท

3. การระบุชนิดเชื้อราด้วยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล

เชื้อราที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐาน จากข้อ 2 เลือกมา 3-5 ไอโซเลท เพื่อเป็นตัวแทนจากแต่ละพื้นที่ ซึ่งเป็นเชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2563 จำนวน 45 ไอโซเลท และเชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2566 จำนวน 15 ไอโซเลท รวม 60 ไอโซเลท นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel, Germany) ดำเนินการตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal DNA (ITS rDNA) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White *et al.*, 1990) และยีน *translation elongation factor 1-alpha* (*TEF1*) ด้วยไพรเมอร์ EF1-983F และ EF1-2218R (Zhang *et al.*, 2011) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป 2X PACBIO Taq Mix Red (PCR biosystems, USA)

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในบัฟเฟอร์ 0.5x Tris-Borate-EDTA (TBE) ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Co. Ltd ประเทศเกาหลีใต้

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ *TEF1* กับฐานข้อมูล GenBank ใช้โปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

4. การวิเคราะห์การมียีน *AVR* ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

เชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2563 จำนวน 58 ไอโซเลท และเชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2566 จำนวน 61 ไอโซเลท นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน *AVR* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AVR-Pii, AVR-Pizt, AVR-Pia, AVR-Pib, AVR-Pi9, AVR-Pik* และ *AVR-Pita1* (Table 1)

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ บันทึกการปรากฏของแถบดีเอ็นเอให้เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เป็น 0

คำนวณร้อยละการมีอยู่ของยีน *AVR* และนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของยีนด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.20e (Rohlf, 2000)

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ด้วยวิธี repetitive-based polymerase chain reaction (rep-PCR)

เชื้อราที่แยกจากใบข้าวแสดงอาการโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวในจังหวัดสกลนคร นครพนม หนองคาย หนองบัวลำภู อุดรธานี ขอนแก่น และร้อยเอ็ด เป็นเชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2563 จำนวน 74 ไอโซเลท และเชื้อราที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2566 จำนวน 48 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 122 ไอโซเลท นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยา NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel, Germany) ดำเนินการตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

เตรียมน้ำยาปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ บัฟเฟอร์ 2x PCRBIO Taq Mix Red ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Pot2-1 และ Pot2-2 (George *et al.*, 1998) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอเข้มข้น 60-100 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร

กำหนดโปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

1) pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2.5 นาที

2) denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

3) annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

4) extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 วนซ้ำ 4 รอบ ต่อด้วย

5) denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

6) annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

7) extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

8) post-extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ขั้นตอนที่ 5-7 วนทำซ้ำ 26 รอบ

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE ที่ความต่าง

Table 1 List of PCR primer sequences, sizes, and references for *Avirulence (AVR)* genes

Gene/region	Forward sequence (5'->3')	Reverse sequence (5'->3')	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
AVR-Pii	TTATGCAGGCCCAAATCCG	GAAATTCCCGCAATAGTCC	57	534	Sirisathaworn *et al*., 2017
AVR-Pizt	CCGTCACTTTCATTCTCCAGC	TGGACCTAAGTCGCAAGCCTC	60	632	Sirisathaworn *et al*., 2017
AVR-Pii	CCTCGGCTTCTTGTATATTACT	TAAATCGTGCGCTTTCAGAT	56	373	Wang *et al.,* 2014
AVR-Pizt	GATCAAATGAACACCAGGAA	CGATGAAGAATGGAAGAATG	56	505	Wang *et al*., 2014
AVR-Pia	TTATTGCTACCACCTTCCTC	GTAGTAACTGAGTTGGCGTT	56	464	Wang *et al*., 2014
AVR-Pik	TCACTTTGGGAACTGTCGC	GGAAGTCGCCCGACAAAT	56	267	acc. No. AB498875
AVR-Pital	TCACACCGTTGCGATTTC	ACTTGTGAATCCCATCCC	56	713	Xing *et al*., 2013
AVR-Pib	CGTTCCTCAACCACTTT	ATTCCACGGTATATTTGC	56	220	Zhang *et al*., 2015
AVR-pi9	CAGTTCTCTCAGATCCCTCAC	TACCAGTGCGTCTTTTCGAC	56	338	Wu *et al*., 2015
Pot2	CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT	CCCTCATTCGTCACACGTTC	62	1,000-10,000	George *et al*., 1998

ศักย์ไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง บันทึกภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (NaBI, Korea)

การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอต้องทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้งต่อตัวอย่าง โดยบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลที่ตำแหน่งตรงกัน ให้ค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา ด้วยวิธี Unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.20e (Rohlf, 2000) นำมาหาสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ SAHN (similarity coefficient) และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม Win boot (Yap and Neison, 1996)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อราบริสุทธิ์

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

<u>ฤดูนาปี 2563</u> พบโรคไหม้ จำนวน 16 แปลง ในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดสกลนคร นครพนม หนองคาย หนองบัวลำภู ขอนแก่น และศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร โดยพบในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข6 กข15 และหางยี 71 เกิดโรคร้อยละ 20-90 ความรุนแรงของโรคระดับ 5-9 พบโรคไหม้มากที่สุดและมีความรุนแรงของโรคสูงสุด ที่อำเภอนาหว้า จังหวัดนครพนม และอำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู (Table 2)

<u>ฤดูนาปี 2566</u> พบโรคไหม้ จำนวน 10 แปลง ในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดสกลนคร นครพนม อุดรธานี และร้อยเอ็ด พบในพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 กข15 และหางยี 71 เกิดโรคร้อยละ 5-100 ความรุนแรงของโรคระดับ 3-9 พบโรคไหม้มากที่สุดและมีความรุนแรงของโรคสูงสุดที่อำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม (Table 2)

1.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2563 แยกได้เชื้อราบริสุทธิ์ จำนวน 64 ไอโซเลท ฤดูนาปี 2566 แยกได้เชื้อราบริสุทธิ์ จำนวน 75 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 139 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์บนกระดาษกรอง โดยวางชิ้นกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อโดยรอบโคโลนีเชื้อรา ปล่อยให้เส้นใยเจริญคลุมชิ้นกระดาษกรอง จากนั้นย้ายชิ้นกระดาษกรองไปลดความชื้นในโถดูดความชื้น เมื่อกระดาษกรองแห้ง นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรา *Pyricularia* spp. จำนวน 139 ไอโซเลท อายุ 10 วันบนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีตั้งแต่ 6.8-8.8 เซนติเมตร มีลักษณะแตกต่างกันทั้งรูปร่างและสีของเส้นใย แบ่งออกได้เป็น 9 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เส้นใยสีเทาปนขาวเจริญซ้อนกันหลายชั้น ฟูเล็กน้อย (Fig. 2, G1)

กลุ่มที่ 2 เส้นใยสีเทา มีกลุ่มเส้นใยสีขาวขนาดเล็กกระจายบนอาหาร (Fig. 2, G2)

กลุ่มที่ 3 เส้นใยสีเทาปนขาว เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร (Fig. 2, G3)

กลุ่มที่ 4 เส้นใยสีเทาฟู (Fig. 2, G4)

กลุ่มที่ 5 เส้นใยสีน้ำตาลเข้ม ฟูเล็กน้อย (Fig. 2, G5)

กลุ่มที่ 6 เส้นใยสีน้ำตาลปนเทา ฟูเล็กน้อย (Fig. 2, G6)

กลุ่มที่ 7 เส้นใยสีน้ำตาล ขอบสีเทา ฟูเล็กน้อย (Fig. 2, G7)

กลุ่มที่ 8 เส้นใยสีเทาปนน้ำตาล มีกลุ่มเส้นใยสีขาวขนาดใหญ่ (Fig. 2, G8)

กลุ่มที่ 9 เส้นใยสีเทาปนน้ำตาล เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร (Fig. 2, G9) เส้นใยสีน้ำตาลอ่อน มีหลายผนังกั้น (septum) สร้างโคนิเดียที่ปลายก้านชู (conidiophores) โคนิเดียมีรูปร่างรี (pyriform) ปลายแหลม สีน้ำตาลอ่อน แตกต่างจากผลการศึกษาของ Longya และคณะ (2020) ที่เลี้ยงเชื้อราโรคไหม้บนอาหาร rice flour agar (RFA) เชื้อรามีเส้นใยสีขาวหนาแน่น เป็นปุย เส้นใยสีครีม ราบไปกับหน้าอาหาร เส้นใยสีเทาฟู

เชื้อราที่เก็บรวบรวมปี 2563 มีขนาดโคนิเดีย กว้าง 7.28-10.26 ไมโครเมตร ยาว 21.06-30.05 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโคนิเดียเชื้อราที่รวบรวมในปี 2566 ที่กว้าง 7.49-9.16 ไมโครเมตร ยาว 25.97-31.49 ไมโครเมตร

3. การระบุชนิดเชื้อราด้วยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล

เชื้อรา *Pyricularia* spp. จำนวน 60 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ความยาว 300 คู่เบส กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 60

Table 2 Geographic distribution of *Pyricularia oryzae* isolated from 23 paddy fields, 7 provinces in the northeastern region

Locations (district, province)	Year	Latitude	Longitude	Rice variety	DI (%)	Scale of disease severity[1)]	Isolates code	No. of isolates
Mueang, Sakon Nakhon (MUASKN)	2020	17.231729	104.103972	RD6	80	7	BL2020MUASKN	11
Wanon Niwat, Sakon Nakhon (WASKN)	2020	17.638734	103.856511	RD6	20	7	BL2020WANSKN	3
				KDML105	40	9		2
Phanna Nikhom, Sakon Nakhon (PANSKN)	2020	17.378297	103.974175	RD6	40	9	BL2020PANSKN	3
Akat Amnuai, Sakon Nakhon (ARSKN)	2020	17.571843	103.961022	RD6	40	7	BL2020ARSKN	6
Phang Khon, Sakon Nakhon (PUNSKN)	2020	17.463312	103.826143	RD6	70	7	BL2020PUNSKN	2
Charoen Sin Sakon, Nakhon (CRNSKN)	2020	17.706584	103.545501	RD15	25	7	BL2020CRNSKN	2
Na Wa, Nakhon Phanom (NANPM)	2020	17.564201	104.049480	RD15	90	7	BL2020NANPM	6
Si Songkhram, Nakhon Phanom (SRINPM)	2020	17.643234	104.194106	RD6	80	9	BL2020SINPM	12
Mueang, Nong Bua Lam Phu (MUANBP)	2020	17.173689	102.441756	RD6	90	5	BL2020MUANBP	4
Na Wang, Nong Bua Lam Phu (NANBP)	2020	17.434585	101.994689	RD6	80	7	BL2020NANBP	9
Rattanawapi, Nong Khai (RATNKI)	2020	18.164046	103.169400	KDML105	20	7	BL2020NKIRRC	3
Chum Phae, Khon Kaen (CPAKKN)	2020	16.532449	102.118902	RD6	20	5	BL2020CPAKKN	1
Mueang, Sakon Nakhon (MUASKN)	2023	17.180611	104.119364	RD6	40	7	BL2023SKNRRC	5
				KDML105	40	9		3
Phon Sawan, Nakhon Phanom (PSWNPM)	2023	18.06230	103.2581	KDML105	5	3	BL2023PSWNPM	15
That Phanom, Nakhon Phanom (TPMNPM)	2023	16.95088	104.715801	RD6	100	9	BL2023TPMNPM	12
Suwannaphum, Roi Et (SWPRET)	2023	15.54730	103.8083	HY71	50	7	BL2023SWPRET	7
				RD6	70	7		4
Phon Phisai, Nong Khai (PPSNKI)	2023	18.152316	103.132509	RD15	40	7	BL2023PPSNKI	8
Nong Han, Udon Thani (NHUDN)	2023	17.30490	103.0512	RD15	80	7	BL2023NHUDN	21

[1)] 0 = No wound
1 = Small brown wound (pin head size), no spore at wound center
3 = Circular or oval wound 1-2 mm, grey point at wound center, brown or yellow wound boundary
5 = Brown eye-shaped wound 1-2 mm width, 3 mm length or larger, brown wound boundary
7 = Larger eye-shaped wound, yellow, brown or purple wound boundary
9 = Rapid spread eye-shaped wounds, non-unifom boundary, grey or blue wound boundary

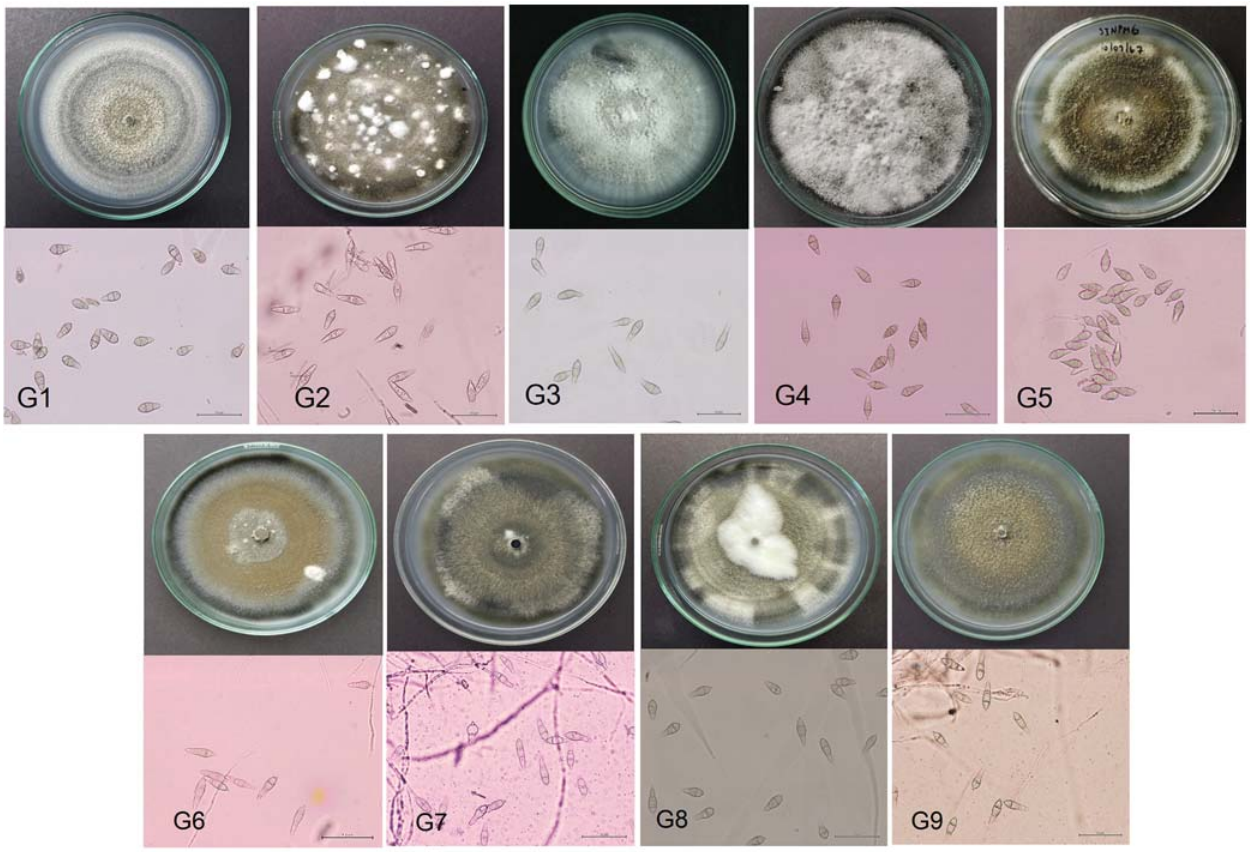

Fig. 2 Morphological and conidial characteristics representative of group 1 (G1), group 2 (G2) group 3 (G3), group 4 (G4), group 5 (G5), group 6 (G6) group 7 (G7), group 8 (G8) and group 9 (G9) of *Pyricularia oryzae*

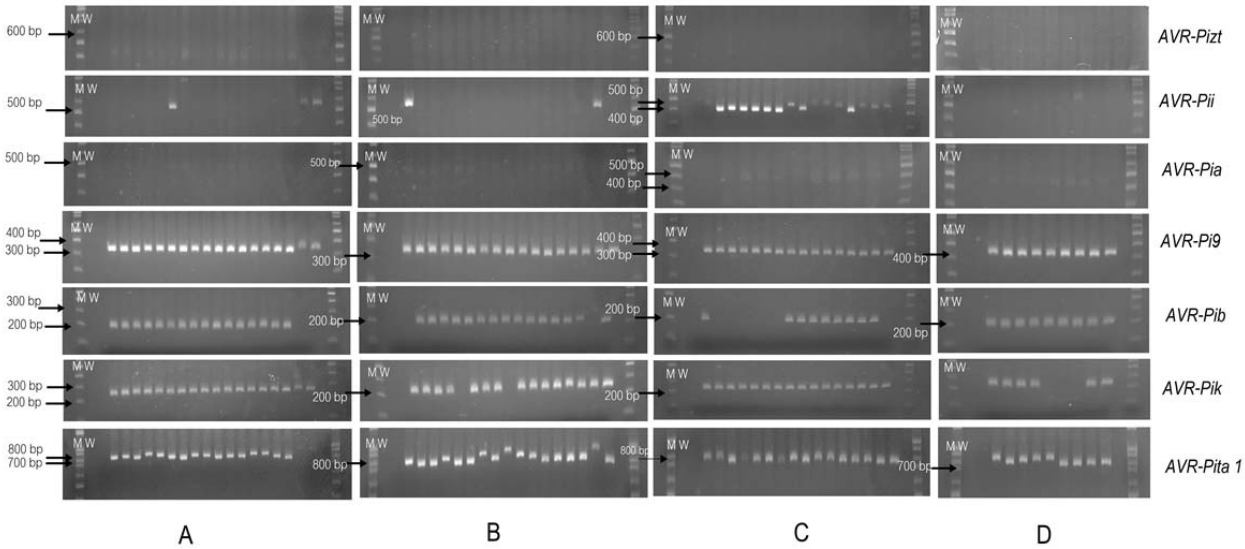

Fig. 3 Agarose gel shows representative results of *AVR* gene products amplified from DNA of *P. oryzae* isolates from 16 paddy fields in 2020 (A) Isolates from Mueang (MUASKN), Phang Khon (PUNSKN), Wanon Niwat (WANSKN), and Rattanawapi (RATNKI) (B) Mueang (MUANBP), Na Wang (NANBP), Mueang (MUASKN) (C) Panna Nikhom (PANSKN), Charoen Sin (CRNSKN), Si Songkhram (SINPM), (D) Akat Amnual (ARSKN), Na Wa (NANPM) M = 1 kb DNA marker (Bio-Helix), W = water, negative control

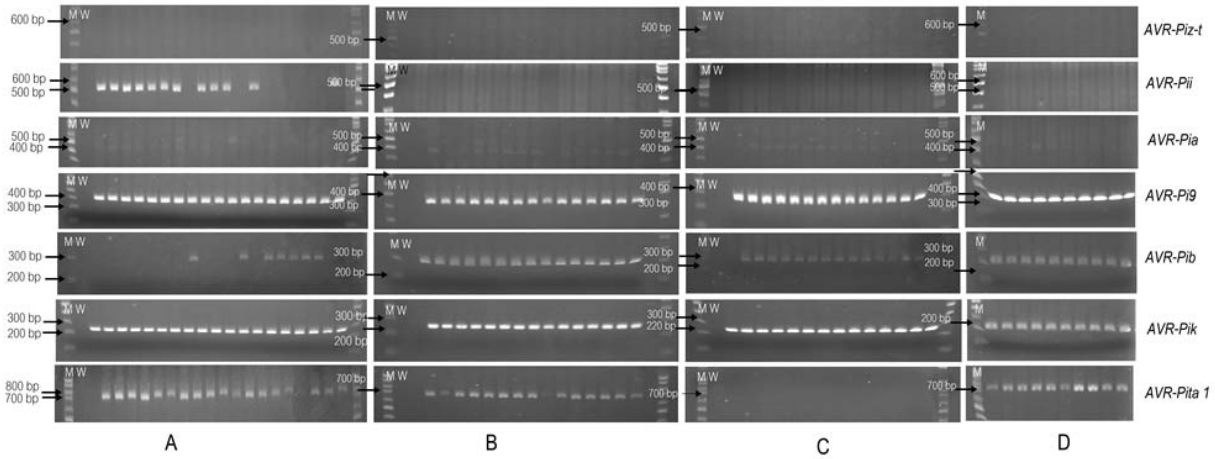

Fig. 4 Agarose gel shows representative results of *AVR* gene products amplified from DNA of *P. oryzae* isolates from 10 paddy fields in 2023 (A) Nong Han (BL2023NHUDN), Suwannaphum (SWPRET) (B) That Phanom (TPMNPM) (C) Phon Sawan (PSWNPM) (D) Phon Phisai (PPSNKI) M= 1 kb DNA marker (Bio-Helix), W = water negative control

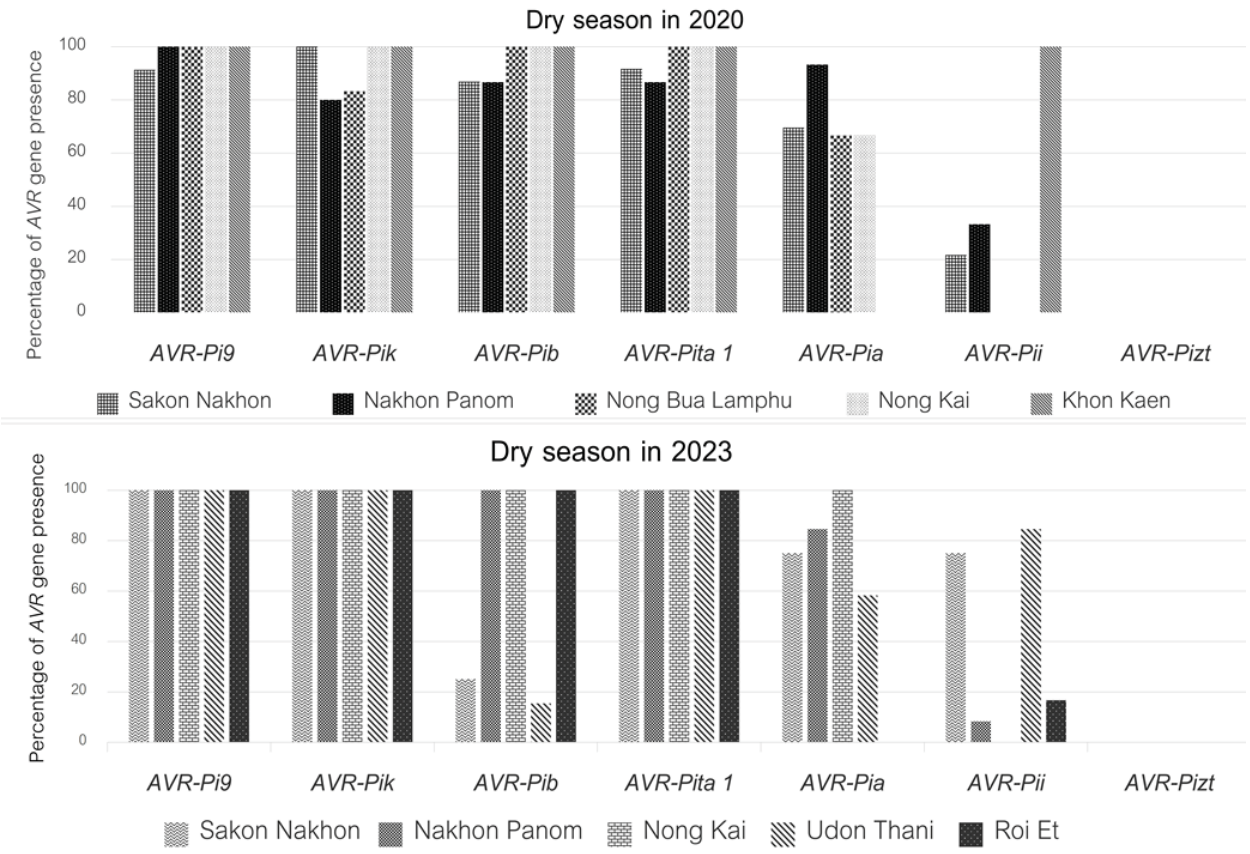

Fig. 5 The detection rates of *AVR* genes differed between 58 *P. oryzae* isolates collected in dry season 2020 and 61 isolates collected in dry season 2023

ไอโซเลท ระบุว่าเป็นเชื้อรา *P. oryzae* มีความเหมือนกับไอโซเลท M1477 (accession. no. MF422332) ร้อยละ 98.26-100 ยกเว้นไอโซเลท BL2023TPNNPM7 จากอำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม มีความเหมือนน้อยที่สุด ร้อยละ 92.07

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TEF1* ความยาว 949 คู่เบส ระบุว่าเป็นเชื้อรา *P. oryzae* มีความเหมือนกับไอโซเลท 70-15 (accession. no. XM_003716200) ร้อยละ 97.75–100 ยกเว้น ไอโซเลท BL2020NANPM5 จากอำเภอนาหว้า จังหวัดนครพนม มีความเหมือนน้อยที่สุด ร้อยละ 94.92

4. การวิเคราะห์การมียีน *Avirulence (AVR)* ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

เชื้อรา *P. oryzae* ที่เก็บรวบรวมในฤดูนาปี 2563 จำนวน 58 ไอโซเลท ร้อยละเฉลี่ยของการมียีน *AVR* แต่ละชนิด เป็นดังนี้ *AVR-Pizt* ร้อยละ 0 *AVR-Pii* ร้อยละ 17.9 *AVR-Pia* ร้อยละ71.9 *AVR-Pi9* ร้อยละ 96.4 *AVR-Pib* ร้อยละ 91.1 *AVR-Pik* ร้อยละ 87.5 และ *AVR-Pita* 1 ร้อยละ 91.1 (Fig. 3, 5)

เชื้อราที่รวบรวมในฤดูนาปี 2566 จำนวน 61 ไอโซเลท ร้อยละเฉลี่ยของการมียีน แต่ละชนิด *AVR* เป็นดังนี้ *AVR-Pizt* ร้อยละ 0 *AVR-Pii* ร้อยละ 31.7 *AVR-Pia* ร้อยละ 69.8 *AVR-Pi9* ร้อยละ 100 *AVR-Pib* ร้อยละ 73 *AVR-Pik* ร้อยละ 100 และ *AVR-Pita* 1 ร้อยละ 77.7 (Fig. 4, 5)

เชื้อราที่แยกได้จากทั้งสองฤดูไม่มียีน *AVR-Pizt* จึงไม่ถูกกดดันให้กลายพันธุ์ เชื้อรามียีน *AVR-Pii* ในเปอร์เซ็นต์ต่ำทั้งสองฤดู ในขณะที่เชื้อรามียีน *AVR-Pia, AVR-Pi9, AVR-Pib, AVR-Pik* และ *AVR-Pita1* ไม่สม่ำเสมอทั้งสองฤดู แสดงให้เห็นถึงความกดดันให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนเพื่อหลีกเลี่ยงความต้านทานของข้าว

เชื้อราในอำเภอหนองหาน จังหวัดอุดรธานี มียีน *AVR-Pii* ร้อยละ 84.6 แต่พบยีนนี้ประปรายในเชื้อราที่พบหลายพื้นที่ บางพื้นที่เชื้อราไม่มียีนนี้ เชื้อราที่สำรวจทุกแห่งไม่มียีน *AVR-Pizt* ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Sirisathaworn และคณะ (2017) ที่ว่าเชื้อราในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่นมียีนนี้

ความผันแปรของยีน *AVR-Pii* ใช้ไพรเมอร์ที่อ้างอิงตาม Wang และคณะ (2014) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน *AVR-Pii* ได้ในบางไอโซเลทในขณะที่ไม่พบยีนนี้เมื่อใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Sirisathaworn และคณะ (2017) อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน *AVR-Pii* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sirisathaworn และคณะ (2017) ที่พบการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบส (substitution) ในบริเวณที่เข้ารหัสของยีน *Avr-Pii* และ *Avr-Pizt* ส่งผลให้ร้อยละการตรวจพบยีนทั้งสองน้อย ทำให้เกิดความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้งสอง ผลการตรวจยีน *AVR-Pita 1* พบยีนเกือบทุกพื้นที่ยกเว้นในอำเภอโพนสวรรค์ จังหวัดนครพนม ไม่พบความแปรปรวนเชื้อราจากอำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม และอำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย (Fig. 3) มีความเป็นไปได้ว่าเกิดความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีนนี้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Zhou และคณะ (2007) ที่พบว่า ยีน *AVR-Pita*1 มีวิวัฒนาการจากกลไกการได้หรือสูญเสียยีนบริเวณ 5' leader region แต่มีการแทรกของ transposon Pot3 ในบริเวณด้าน 3' ของเชื้อราสายพันธุ์ที่รุนแรง จากผลการศึกษาของ Damchuay และคณะ (2020) พบว่า ยีน *AVR-Pital 1* ในประเทศไทยมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ในขณะที่ยีน *AVR-Pia, AVR-Pi9, AVR-Pib, AVR-Pik* และ *AVR-Pita1* พบสม่ำเสมอและมีความถี่สูงในหลายพื้นที่ แสดงให้เห็นว่า ข้าวที่มียีนต้านทานที่สัมพันธ์กันมีความสามารถต้านทานเชื้อราโรคไหม้ในพื้นที่

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ด้วยวิธี repetitive-based polymerase chain reaction (rep-PCR)

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา จำนวน 122 ไอโซเลท พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 3-13 แถบ มีขนาดระหว่าง 1,000-10,000 คู่เบส (Fig. 6) นำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมาจัดกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ (lineage) ได้ 24 กลุ่ม (Fig. 7) ดังนี้ กลุ่มที่ประกอบด้วยเชื้อมากกว่า 5 ไอโซเลท จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ที่พบประจำ มีจำนวน 9 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 16 ร้อยละ 18.85 กลุ่มที่ 19 ร้อยละ 13.11 กลุ่มที่ 20 ร้อยละ 9.84 กลุ่มที่ 1 ร้อยละ 9.02 กลุ่มที่ 9 ร้อยละ 8.20 กลุ่มที่ 10 ร้อยละ 8.20 กลุ่มที่ 12 ร้อยละ 5.74 กลุ่มที่ 5 ร้อยละ 4.10 และกลุ่มที่ 15 ร้อยละ 4.10 ซึ่งในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยเชื้อราที่มา

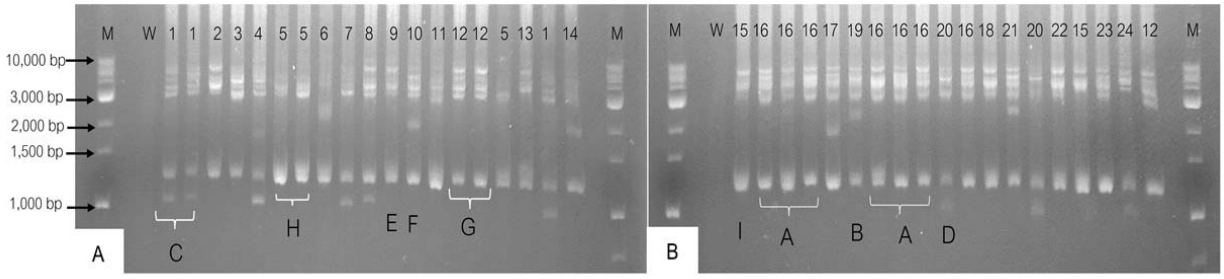

Fig. 6 Pot2 rep-PCR analysis showing representative DNA fingerprinting profiles of *P. oryzae* from the Sakon Nakhon, Nakhon Phanom, Nong Bua Lam Phu, Nong Khai, Khon Kaen, Roi Et, and Udon Thani. The numbers represent the lineage designation, in which A to I were the major lineages, respectively. M = 1 kb DNA marker (Bio-Helix), W = water

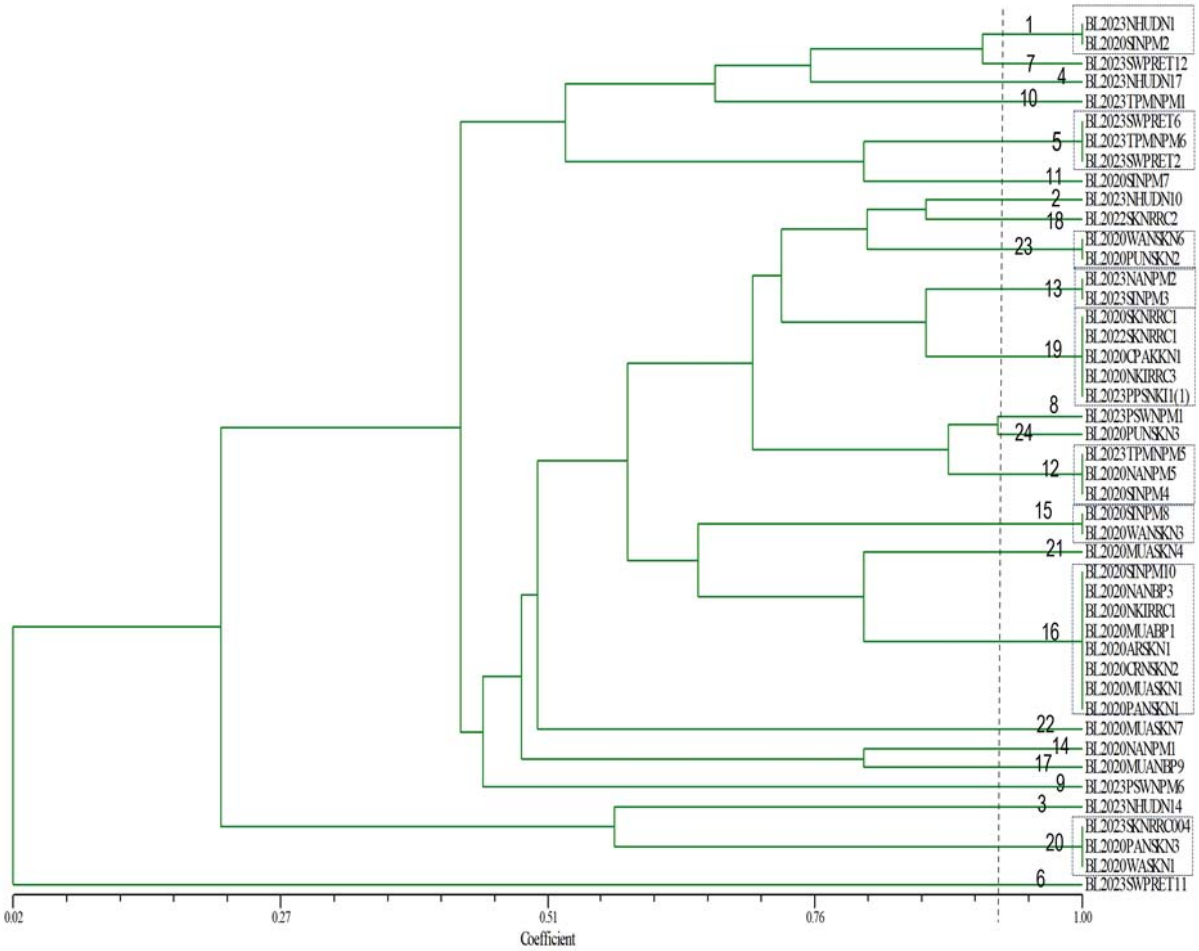

Fig. 7 The dendrogram illustrates the genetic relationships among 45 isolates of *P. oryzae*, representing different collection sites

จากหลายแหล่งปลูก และกลุ่มที่ประกอบด้วยเชื้อน้อยกว่า 5 ไอโซเลท จัดเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่พบยาก มีจำนวน 15 กลุ่ม เชื้อสายพันธุ์ของเชื้อรา *P. oryzae* ที่พบระบาดในอำเภอโพนสวรรค์ จังหวัดนครพนม ไม่มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐาน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ แบ่งได้ 2 กลุ่ม ซึ่งทุกไอโซเลทมียีน *AVR-Pi9, AVR-Pia, AVR-Pib* และ *AVR-Pik* ร้อยละ100

เชื้อสายพันธุ์จากอำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐาน แต่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม แบ่งได้ 1 กลุ่ม ทุกไอโซเลทมียีน *AVR-Pi9, AVR-Pia, AVR-Pib, AVR-Pik* และ *AVR-Pita 1* และไม่พบความผันแปรของยีน *AVR-Pita 1*

เชื้อสายพันธุ์ที่รวบรวมจากหลายอำเภอในจังหวัดสกลนครและนครพนม มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐาน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นกับจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา แหล่งปลูก และฤดูปลูก

ความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่พบระบาดในแต่ละแหล่งปลูกเรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ จังหวัดสกลนคร นครพนม อุดรธานี หนองบัวลำภู ร้อยเอ็ด หนองคาย และขอนแก่น มีจำนวน 14 14 4 3 3 3 และ 1 เชื้อสายพันธุ์ ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mekwatanakarn และคณะ (2000) และพูนศักดิ์ และคณะ (2554) พบว่าเชื้อรามีความแปรปรวนไปตามฤดูกาล แหล่งปลูกข้าว และพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย สอดคล้องกับผลการศึกษาของเพ็ญนภา และคณะ (2557) พบว่า บริเวณที่พบการระบาดของโรคในจังหวัดเดียวกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท

สรุปผลการทดลอง

เชื้อรา *P. oryzae* ที่ระบาดในอำเภอโพนสวรรค์ จังหวัดนครพนม ไม่มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐาน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เชื้อราจากอำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานและไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เชื้อราที่รวบรวมจากหลายอำเภอในจังหวัดสกลนครและนครพนม มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐาน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นกับจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา แหล่งปลูก และฤดูปลูก

ยีน *AVR-Pii, AVR-Pia, AVR-Pib, AVR-Pik* และ *AVR-Pita 1* พบไม่สม่ำเสมอในประชากรเชื้อราที่เก็บจากพื้นที่เดียวกัน บางยีนพบเฉพาะกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ และพบเฉพาะพื้นที่ การวินิจฉัยโรคไหม้โดยอาศัยยีน *AVR* ช่วยเสริมเครื่องมือตรวจสอบเชื้อโรคไหม้ข้าวที่มีอยู่เดิม เพื่อการใช้ยีนต้านทาน (R) อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการศึกษาในครั้งนี้บอกได้ว่า ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi-9, Pi-k, Pi-b, Pi-ta 1* และ *Pi-a* อาจมีความต้านทานเชื้อราในพื้นที่จากอำเภอเมือง และนาวัง จังหวัดหนองบัวลำภู อำเภอศรีสงคราม นาหว้า และธาตุพนม จังหวัดนครพนม และอำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi-9, Pi-k, Pi-a* และ *Pi-b* มีความต้านทานเชื้อในพื้นที่จากอำเภอโพนสวรรค์ จังหวัดนครพนม อำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย ที่ระบาดในฤดูนาปี 2566 ในขณะที่ข้าวที่มียีน *Pita-1, Pi-9* และ *Pi-k* มีความต้านทานเชื้อราในอำเภอหนองหาน จังหวัดอุดรธานี อำเภอเมือง และรัตนวาปี จังหวัดหนองคาย อำเภอวานรนิวาส พังโคน พรรณนานิคม และเจริญศิลป์ จังหวัดสกลนคร คาดการณ์ได้ว่า ยีนต้านทาน *Pita-1* และ *Pii* อาจมีความต้านทานต่อเชื้อราในพื้นที่ดังกล่าวเพียงระยะสั้น เนื่องจากมีความผันแปรทางพันธุกรรมบริเวณตำแหน่งยีนดังกล่าว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ภายใต้แผนบูรณาการ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่และศาสตร์ทางโอมิกส์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและรักษาเสถียรภาพการผลิตข้าว โครงการความหลากหลายของไบโอไทป์และการค้นหาตำแหน่งยีนควบคุมไบโอไทป์เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณ มา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2567. รายงานสถานการณ์ศัตรูข้าว. วันที่ 18 กันยายน 2567. หน้า 1-8. สืบค้นจาก: https://ppsf.doae.go.th/สถานการณ์การระบาดศัตรูข้าว-207/. (25 พฤศจิกายน 2567)

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พยอม โคเบลลี่, อัจฉราพร ณ

ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี, กุลชนา เกศสุวรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว 1(1): 52-64.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, วราพงษ์ ชมาฤกษ์, จิรพงศ์ ใจรินทร์, อุไรวรรณ คชสถิตย์, บุญรัตน์ จงดี, สมใจ สาลีโท, วีระศักดิ์ หอมสมบัติ, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพันนิภา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. วารสารวิชาการข้าว 5(1): 16-28.

เพ็ญนภา ตันเซียน, ธานี ศรีวงศ์ชัย และนงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2557. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. หน้า 400- 406. *ใน*: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาพืช. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. กรุงเทพฯ.

Damchuay, K., A. Longya, T. Sriwongchai, P. Songkumarn, N. Parinthawong, K. Darwell, S. Talumphai, P. Tasanasuwan and C. Jantasuriyarat. 2020. High nucleotide sequence variation of avirulent gene, AVR-Pita1, in Thai rice blast fungus population. Journal of Genetics 99: 1-11.

Dissanayaka, D.M.H.R., M.D. Pabasara, G.K.S.N. Gajanayake, W.A.M. Daundasekera and H.A.C.K. Ariyarathna. 2024. A case report on Blast disease in Rice and Finger millet in Sri Lanka. Ceylon Journal of Science 53(2).

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.

Hu, Z.J., Y.Y. Huang, X.Y. Lin, H. Feng, S.X. Zhou, Y. Xie, Y.X.X. Liu, C. Liu, R.M. Zhao, W.S. Zhao and C.H. Feng. 2022. Loss and natural variations of Blast Fungal Avirulence genes breakdown rice resistance genes in the Sichuan Basin of China. Frontiers in Plant Science 13: 788876.

IRRI. 2014. Standard Evaluation System for Rice (SES). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. 57 p.

Longya, A., S. Talumphai and C. Jantasuriyarat. 2020. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers. Journal of Fungi 6(1): 38.

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 Disease 84: 60-70.

Olukayode, T., B. Quime, Y.C. Shen, M.J. Yanoria, S. Zhang, J. Yang, X. Zhu, W.C. Shen, A. von Tiedemann and B. Zhou. 2019. Dynamic insertion of Pot3 in *AvrPib* prevailing in a field rice blast population in the Philippines led to the high virulence frequency against the resistance gene Pib in rice. Phytopathology 109(5): 870-877.

Peng, Z., Y. Fu, F. Wang, Q. Liu, Y. Li, Z. Zhang, L. Yin, X.L. Chen, J. Xu, H. Deng and J. Xing. 2023. Genetic variation of *Magnaporthe oryzae* population in Hunan province. Journal of Fungi 9(7): 776.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numericail Taxonomy and Multivariate Analysis system, version 2.20e. User Guide. Exeter Software, Se tauket, New York, USA.

Selisana, S.M., M.J. Yanoria, B. Quime, C. Chaipanya, G. Lu, R. Opulencia, G.L. Wang, T. Mitchell, J. Correll, N.J. Talbot and H. Leung. 2017. Avirulence (*AVR*) gene-based diagnosis complements existing pathogen surveillance tools for effective deployment of resistance (*R*) genes against rice blast disease. Phytopathology 107(6): 711-720.

Sirisathaworn, T., T. Srirat, A. Longya and C. Jantasuriyarat. 2017. Evaluation of mating type distribution and genetic diversity of three *Magnaporthe oryzae* avirulence genes, *PWL-2, AVR-Pii* and *Avr-Piz-t,* in Thailand rice blast isolates. Agricuiture and Natural Resources 51(1): 7-14.

Wang, S.W., W.J. Zheng, J.M. Zhao, S.H. Wei, Y. Wang, B.H. Zhao and Z.H. Liu. 2014. Identification and

analysis of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes in Liaoning province. Journal of Integrative Agriculture 47: 462-472.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.315-322. *In:* PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York.

Wu, J., Y. Kou, J. Bao, Y. Li, M. Tang, X. Zhu, A. Ponaya, G. Xiao, J. Li, C. Li and M.Y. Song. 2015. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. New Phytologist. 206(4): 1463-1475.

Xing, J.J., Y. Jia, J.C. Correll, F.N. Lee, R. Cartwright, M. L. Cao and L.P. Yuan. 2013. Analysis of genetic and molecular identity among field isolates of the rice blast fungus with an international differential system, rep-PCR, and DNA sequence. Plant Disease 97: 491-495.

Yap, I. and R.J. Neison. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms. IRRI Discussion Paper Series 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Zhang, S.L., L. Wang, W.H. Wu, L.Y. He, X.F. Yang and Q.F. Pan. 2015. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib.* Scientific reports 5(1): 11642.

Zhang, N., S. Zhao and Q. Shen. 2011. A six-gene phylogeny reveals the evolution of mode of infection in the rice blast fungus and allied species. Mycologia 103: 1267-1276.

Zhou, E., Y. Jia, P. Singh, J.C. Correll and F.N. Lee. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *Avr-Pita* alters virulence. Fungal Genetics and Biology 44(10): 1024-1034.