วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 32 : 3 (52 - 60)

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

Genetic Diversity Assessment of Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*) Collected in Thailand using SSR Marker

นวรัตน์ ใจหอม[1,2] สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง[3] และนงลักษณ์ เภรินทวงค์[1]

บทคัดย่อ

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) จำนวน 53 ไอโซเลท โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่จำเพาะต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย ที่ครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อราสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ พบเครื่องหมาย MGM มีค่า polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 1.00 แสดงถึงความมีศักยภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ในการใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้โดยวิธี SHAN จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 4 กลุ่ม พบว่าการจัดกลุ่มของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 48 ไอโซเลท ที่มีแหล่งที่มาจากทุกภาคของประเทศไทย คือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศ กลุ่มที่ 2 และกลุ่ม 3 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 1 และ 2 ไอโซเลท จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม 4 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท จากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่สำรวจและเก็บในช่วงปีที่ต่างกัน (2541 — 2556) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่นเดียวกับเชื้อบางไอโซเลทที่เก็บในปีเดียวกันและจังหวัดเดียวกันถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เชื้อราส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และมีเพียงไม่กี่ไอโซเลทที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 – 4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่รวบรวมไว้ในการทดลองนี้มีฐานพันธุกรรมค้ายกัน ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อและการปรับตัวให้เข้าทำลายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่างๆ ได้ ทำให้เป็นอุปสรรคในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้จึงมีประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ในการเลือกใช้กลุ่มสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมในการทดสอบความต้านทานโรค

คำสำคัญ : โรคไหม้ข้าว, *Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers,เครื่องหมายโมเลกุล SSR

Abstract

Fifty three isolates of rice blast pathogen *(Pyricularia gresea)* were genetic diversity analyzed using 14 Magnaporthe grisea microsatellite (MGM) markers distributed along 7 chromosomes. Polymorphic information content (PIC) value of MGM markers were between 0.30 to 1.00, indicated their good potential as marker for genetic diversity analysis. Cluster analysis using SHAN method with 80% level of confidence separated fungal population into 4 groups. The cluster according to the fungal genetic did not depend on blast epidemic area. Group 1 consisted of 48 isolates from all regions of Thailand including Northern, North-eastern, Central, Eastern and Southern. Group 2 and 3 comprised of 1 and 2 isolates from North-eastern region, respectively. While group 4 was composted of 2 isolates from Northern and

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[3] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ. ชลบุรี 20110

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

North-eastern regions. The isolates collected in different years (1998 — 2013) were grouped together as in case of isolates collected in the same year or same province. The fungal isolates were mainly in group 1 and only few isolates were in group 2-4, indicated their genetic similarity. This probably resulted from their asexual reproduction and adaptation to invade resistant rice cultivars, which caused major obstruct to rice breeders. The results reported here is useful for rice breeder to choose appropriate fungal isolates for breeding of rice blast resistant cultivar.

Keyword : rice blast disease, *Pyricularia grisea, Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers, SSR markers

บทนำ

โรคไหม้ของข้าว (rice blast disease) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.) เป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการปลูกข้าว ก่อให้เกิดความเสียหายและมีการระบาดของโรคอย่างกว้างขวาง สำหรับประเทศไทยนั้นมีการระบาดของโรคมากโดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและความชื้นเหมาะสมต่อการเข้าทำลาย การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้นี้สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว ทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเฉพาะในระยะออกรวงมีผลให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) ในปี 2535 พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะออกรวงบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 1.2 ล้านไร่ (Disthaporn, 1994) ในปี 2544 มีพื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 78,778 ไร่ และในปี 2553 พบการระบาดในจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี และบุรีรัมย์ ในช่วงเดือนกันยายน-ธันวาคม มีพื้นที่ได้รับความเสียหายมากกว่า 793,200 ไร่ (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2010) เชื้อรานี้เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม มีความแปรปรวนของเชื้อมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ (Ou, 1985) Giatgong and Frederiksen, (1969) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้ โดยพบว่ามีสาเหตุของความแปรปรวนมาจากการกลายพันธุ์และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ส่งผลให้เชื้อรามีการปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว การศึกษาประชากรเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยของ Mekwatanakarn *et al*. (2000) พบว่าเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความแปรปรวนและหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่นๆ ของโลก เชื้อรามีความแตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกข้าว ฤดูปลูก และระยะการเจริญเติบโตของข้าว พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ได้รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2545-2548 ได้ทั้งหมด 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อได้ 623 สายพันธุ์ และมีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้สูงถึง 83 เปอร์เซ็นต์ จากการที่ประชากรเชื้อราโรคไหม้นี้มีความหลากหลายและมีความแปรปรวนเนื่องจากเชื้อราสามารถปรับตัวให้เข้าทำลายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่างๆ ได้ ทำให้เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับความรุนแรงและความหลากหลายของเชื้อโรคไหม้จึงจำเป็นต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำ เครื่องหมายโมเลกุล 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 โครโมโซมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ซึ่งเครื่องหมาย SSR นี้ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นชุด ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี (สุรีพร, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 53 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ทั้งที่มีการเก็บรวบรวมไว้แล้วและเก็บรวบรวมใหม่ โดยเลือกใช้เครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมาย ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมของเชื้อรา *P.grisea* ทั้ง 7 โครโมโซม ข้อมูลที่ได้จะอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้และเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ในการเลือกใช้กลุ่มสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมในการทดสอบความต้านทานโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1.ตัวอย่างเชื้อราและการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อรา

รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*P. grisea*) จากพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทยที่มีการระบาดของโรค ทั้งหมดจำนวน 53 ไอโซเลท (Table 1) ประกอบด้วยเชื้อราโรคไหม้ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อราที่เก็บรวบรวมเอง ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และเลี้ยงบนอาหาร Rice Flour Agar (RFA) เก็บเชื้อราในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรอง ตามวิธีการของ Sirithunya *et al*. (2008) ระบบการตั้งชื่อเชื้อราที่เก็บรวบรวมเองนั้น ตัวอักษรสามตัวแรกหมายถึงชื่อย่อภาษาอังกฤษของจังหวัดที่เก็บ ตัวเลขสองตัวต่อจากตัวอักษรคือ ปี พ.ศ. ที่เก็บ และตัวเลขสามตัวสุดท้ายคือ หมายเลขของไอโซเลทเชื้อรา เมื่อต้องการเส้นใย นำกระดาษกรองที่มีเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหาร RFA ประมาณ 3 วัน ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราย้ายลงในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) จำนวน 5 ชิ้น เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4-6 วัน เก็บเกี่ยวเส้นใยเชื้อราเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Matsumoto *et al*. (1999)

Table 1 Isolates of *Pyricularia grisea* and their locations.

Region	Province	Isolates
Northern	Chiang Rai	Chiangrai34.1
	Phitsanulok	Phitsanulok1.1, Phitsanulok40.4, THL84, THL191,
North-eastern	Ubon Ratchathani	UBN2010 7384, UBN2010 11351, UBN2009 11308, UBN2010 13515, UBN2010 61112, UBN2009 207129, UBN2009 207128, UBN2010 13512, UBN2009 128351, UBN2010 195167, UBN2010 61086, UBN2010 195171, UBN2010 94678, UBN2008 7344, UBN2010 94677
	Nong Khai	NKI2007 211170, NKI2010 47181
	Sakon Nakhon	SKN2008 60867, SKN2007 10389
	Khon Kaen	KKN2009 11321, KKN2010 61119, KKN2008 7357, KKN2009 61067
	Surin	SRN54002, SRN54005, SRN54006, SRN54007, SRN54009
	Chaiyaphum	CPM55001, CPM55002, CPM55003
Central	Bangkok	BKK55001, BKK55002, BKK55003
	Ratchaburi	THL794, RBR55001, RBR55002, RBR55003, RBR55004
Easthern	Chachoengsao	CCO55002, CCO56001, CCO56003, CCO56004,
	Nakhon Nayok	NYK55001, NYK56003
Southern	Phatthalung	PL1, PL2, PL3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 10 µl ที่ประกอบด้วย 10x buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5mM dNTPs 1 U Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA), ไพร์เมอร์สำหรับเครื่องหมาย MGM (Table 2) ความเข้มข้น 0.3 µM และ DNA template 10 ng ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบปฏิกิริยา 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และ 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 1 รอบปฏิกิริยา วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate (AgNO3) ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006)

Table 2 Sequence of the MGM markers used in this study, number of alleles and polymorphic information content (PIC) value.

No.	Chr.	Name	Primer sequence (5' - 3')		No. of alleles	PIC
			Forward	Reverse		
1	1	MGM447	AGACTTGTTACTCGGGTCTTGA	CCAGATGTCACTCCCCTGTA	151	1.00
2	1	MGM35	GTTGAATTACCTTTCGGACTGG	AAGGACTTTGCTCAGACCGTAG	53	0.78
3	2	MGM192	GGAGGGCGTCACTGTACCTA	ATGAGGCATGTACCCCAAAA	50	0.91
4	2	MGM185	AATGCTTCGAGGTCCCAGT	GCTTATCGACGGCGTATTTG	50	0.30
5	3	MGM436	GACCTTTATCGGATGCGTGT	CACACAGTGGCCATCTAACG	199	0.72
6	3	MGM209	TCACCCTCAACTGCAGTCAT	GTTGCCGCTGTTGTTGAATA	53	0.33
7	4	MGM237	AACCTGAAGCTCCTCGACAG	ATGGGGGCTGTACTTGTGTC	78	0.65
8	4	MGM249	CGAGAAGAAGACGGTCAAGG	CATCTTTGGCCAGTTTGTCA	120	0.31
9	5	MGM453	CACCACTTTATGGCGCAGT	ACCTAGGTAGGTATACATGTTGTT	95	0.52
10	5	MGM110	ACCGGGTAGTGATGGACTCA	AATCGTATGCGGCTGAGTTT	53	0.61
11	6	MGM266	TGTGGTGGGTGATCTTGTTG	ATTCCCGGCGAGAGAGATT	130	0.71
12	6	MGM400	GGCATTACCCAAGAAGCAAA	CTCGTTGCAGATGGTGATGA	105	0.71
13	7	MGM282	TTGGCTGGCAAGACAGTTAAT	GGGCTTTGTCTATTCCAGCA	53	0.68
14	7	MGM414	ACGTACACGTCCCTGACACA	CTGATCCACATGAGCCACAC	53	0.63

3.การวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราและศักยภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SSR

แปลงรูปแบบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจนภายหลังการย้อมให้เป็นข้อมูลตัวเลขเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p จากนั้นวิเคราะห์ค่า Similarity เลือกตัวเลือกของการวิเคราะห์เป็น SimInt โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Canberra เลือกวิธีการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี SHAN เพื่อสร้างแผนภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโรคไหม้ และวิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) เพื่อประเมินคุณสมบัติของเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยใช้สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^{n} p_{ij}^2$$

โดย *Pij* คือ ความถี่ของแอลลีล *j* ของ marker *i*

ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 53 ไอโซเลท โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 14 เครื่องหมาย คือ MGM447, MGM35, MGM192, MGM185, MGM204, MGM209, MGM237, MGM249, MGM453, MGM110, MGM266, MGM400, MGM282 และ MGM414 ที่ครอบคลุมโครโมโซมเชื้อรา ทั้ง 7 โครโมโซม สามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ พบเครื่องหมาย MGM มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 1 แสดงถึงความมีศักยภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ในการใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (Table 2) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 80 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 48 ไอโซเลท แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1.1 ประกอบด้วยเชื้อที่มีแหล่งที่มาจากภาคเหนือ คือ THL84, THL191 และ Chiangrai34.1 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ UBN2010 11351, UBN2009 128351, UBN2009 11308, UBN2010 7384, UBN2010 94677, UBN2009 207129, UBN2009 207128, UBN2010 61112, UBN2010 13515, UBN2010 13512, UBN2010 195167 และ SKN2008 60867 ภาคกลาง คือ RBR55002 และ RBR55004 ภาคตะวันออก คือ NYK56003, CCO55002, CCO56003 และ CCO56004 กลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วยเชื้อที่มีแหล่งที่มาจากภาคเหนือ คือ Phitsanulok1.1 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ CPM55001, CPM55002, CPM55003, KKN2009 11321, KKN2010 61119, KKN2008 7357, KKN2009 61067, SKN2007 10389, NKI2007 211170, NKI2010 47181, SRN54002, SRN54005, SRN54006, SRN54007 และ SRN54009 ภาคกลาง คือ RBR55001, RBR55003, BKK55001, BKK55002, BKK55003 และ THL794 ภาคตะวันออก คือ NYK55001 และ CCO56001 ภาคใต้ คือ PL1, PL2 และ PL3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 1 ไอโซเลท เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีแหล่งที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ UBN2010 61086 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีแหล่งที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ UBN2010 195171 และ UBN2010 94678 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีแหล่งที่มาจากบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ คือ UBN2008 7344 และ Phitsanulok40.4 ตามลำดับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเมื่อวิเคราะห์ในด้านของอายุหรือปีที่เก็บรวบรวมเชื้อนั้น เชื้อไอโซเลทที่เก็บในปีเดียวกันและสถานที่เดียวกันมีแนวโน้มสูงที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน เช่น เชื้อโรคไหม้ที่มีแหล่งที่มาจากจังหวัดอุบลราชธานี คือ UBN2009 128351 ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับ UBN2009 11308 เชื้อไอโซเลท UBN2010 13515 ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับ UBN2010 13512 เชื้อที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทราคือ CCO56003 ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับ CCO56004 เชื้อที่เก็บจากจังหวัดสุรินทร์คือ SRN54002 ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับ SRN54005 และเชื้อที่เก็บจากกรุงเทพมหานครคือ BKK55001 ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับ BKK55002 เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

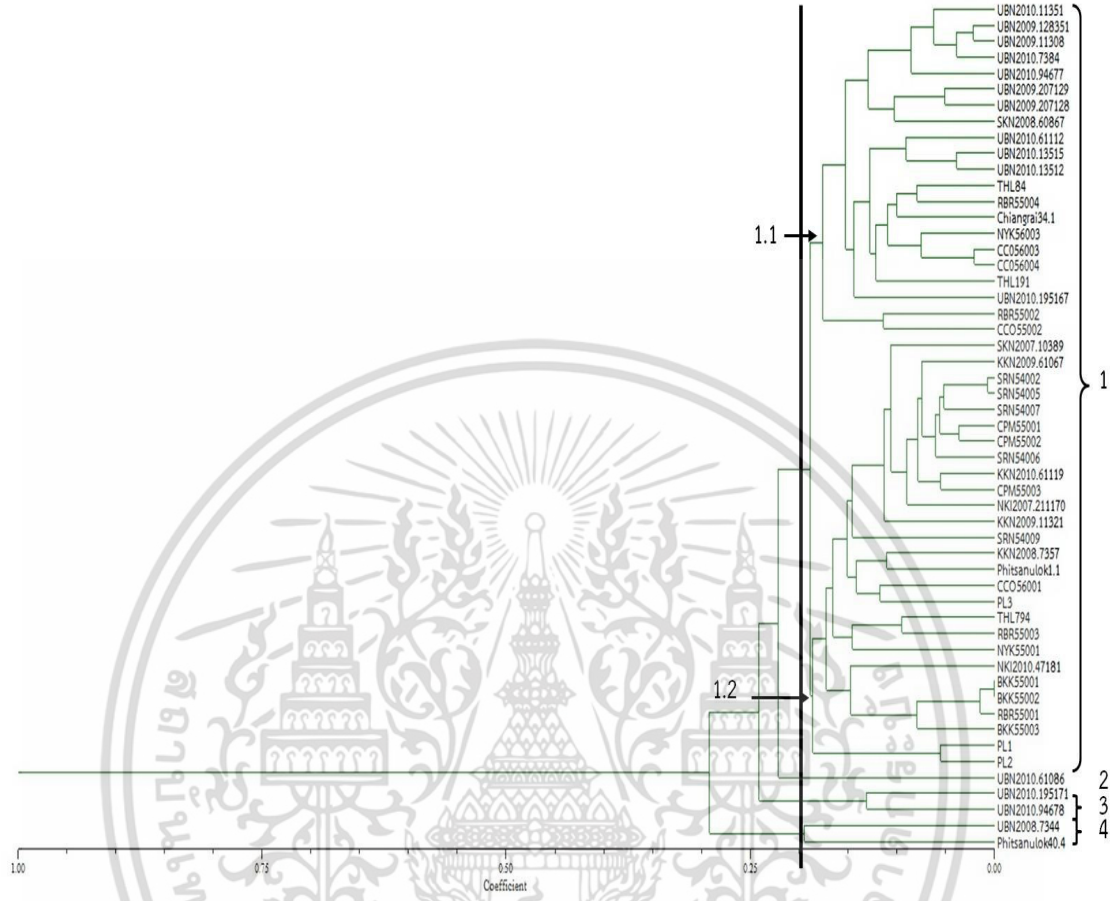

Figure 1 Dendrogram represented genetic diversity of 53 rice blast fungus (*Pyriculariaoryzae*) isolates generated by SAHN analysis method from 14 MGM markers. Vertical line indicated 80 percent level of confidence.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 53 ไอโซเลท โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 14 เครื่องหมาย พบเครื่องหมาย MGM มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 1.0 แสดงว่าเครื่องหมายที่นำมาใช้นั้นมีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อโรคไหม้ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพนั้นจะต้องมีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 (Botstein *et al*., 1980) และจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ เชื้อราส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือ กลุ่มที่ 1 และมีเพียงไม่กี่ไอโซเลทที่ถูกแยกออกมาในกลุ่มที่ 2 – 4 อาจเป็นเพราะว่าเชื้อรามีฐานพันธุกรรมคล้ายกันเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อและแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีรายงานว่าประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้นี้สามารถกระจายหรือเคลื่อนย้ายข้ามพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (พูนศักดิ์, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราที่มีแหล่งที่มาจากจังหวัดเดียวกัน ปีที่เก็บเดียวกัน แต่ถูกจัดแยกกลุ่มกัน เช่น เชื้อราที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดอุบลราชธานี ในปี ค.ศ. 2010 (พ.ศ. 2553) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันในปีเดียวกันอาจมีพันธุกรรมที่ต่างกัน ในจังหวัดเดียวกันอาจพบเชื้อสาเหตุเข้าทำลายข้าวได้มากกว่า 1 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยของ เสาวลักษณ์ และคณะ (2554) ที่รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันมีความหลากหลายของระดับความรุนแรงในการก่อโรคที่ต่างกันไม่สามารถจัดกลุ่มร่วมกันได้ เชื้อราบางไอโซเลทที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น เชื้อราที่มีแหล่งที่มาจากจังหวัดสุรินทร์ กรุงเทพฯ และพัทลุง เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้นี้มีพันธุกรรมที่คล้ายกัน เชื้อราที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันแต่ปีที่เก็บต่างกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เชื้อราที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ในปี พ.ศ. 2555-2556 จังหวัดหนองคายในปี ค.ศ. 2007-2010 (พ.ศ. 2550-2553) และจังหวัดขอนแก่นในปี ค.ศ. 2008-2009 (พ.ศ. 2551-2552) แสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีการระบาดซ้ำเป็นประจำทุกปีในจังหวัดเดียวกัน เนื่องจากเชื้อรานี้มีการอยู่ข้ามฤดูและมีพืชอาศัยหลายชนิด สามารถดำรงชีพอยู่ในซากพืชได้ และ conidia จะมีชีวิตอยู่ในเมล็ดข้าวได้นานที่สุดถึง 2 ปี (Ou, 1985) การปลูกข้าวพันธุ์เดียวซ้ำกันในพื้นที่เดิม (Disthaporn, 1994) และนอกจากนี้ เชื้อรายังมีการแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่นโดยอาศัยลม ฝน และการขนส่งสินค้าเกษตรต่างๆ (Ou, 1985 และ McCartney *et al*., 2006) สำหรับเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดเดียวกัน ปีที่เก็บต่างกันถูกจัดแยกกลุ่มกัน คือ เชื้อราที่เก็บจากจังหวัดนครนายก ในปี พ.ศ. 2555-2556 จังหวัดอุบลราชธานีในปี ค.ศ. 2008-2010 (พ.ศ. 2551-2553) จังหวัดสกลนครในปี ค.ศ. 2007-2008 (พ.ศ. 2550-2551) แสดงว่าเชื้อราโรคไหม้นี้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหรือปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของพื้นที่นั้นๆ ในแต่ละปี ซึ่งพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น มีปัจจัยการเกิดโรคที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อราที่สมบูรณ์มากกว่าพื้นที่ปลูกข้าวในภาคอื่นๆ ของประเทศ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูก เช่น ขาวดอกมะลิ 105 กข6 หรือ กข15 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ จึงทำให้พบการระบาดของเชื้อมาก (Disthaporn, 1994)

พูนศักดิ์และคณะ (2554) ได้ศึกษาความหลากหลายประชากรโรคไหม้ข้าวในระหว่างปี พ.ศ. 2548–2552 พบประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายสูง ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดสอบทาง pathotype ของนวรัตน์ และ นงลักษณ์ (2557) คือ เชื้อโรคไหม้ที่มีแหล่งที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะเชื้อที่มาจากอุบลราชธานีมีลักษณะการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ทดสอบที่หลากหลายและมีความรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงมาก ซึ่งถูกจัดกระจายในทุกกลุ่ม pathotype เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบทาง pathotype ร่วมกับผลการทดสอบทาง genotype พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ จากแผนภาพเดนโดรแกรมของการจัดกลุ่มความหลากหลายทาง pathotype (นวรัตน์ และ นงลักษณ์, 2557) และ genotype นั้น พบเชื้อไอโซเลท PL1 และ PL2 มีแหล่งที่มาจากจังหวัดพัทลุง ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันเหมือนกันในทั้งสองแผนภาพ แสดงว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทนี้อาจมีพันธุกรรมและความสามารถในการก่อโรคที่เหมือนกัน เชื้อที่มีความสามารถในการก่อโรคที่ระดับรุนแรงจนถึงระดับที่ไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเกือบทั้งหมด อาจเป็นเพราะว่าเชื้อราโรคไหม้แต่ละไอโซเลทซึ่งมีแหล่งที่มาจากภาคต่างๆ ของประเทศไทยนั้นมีพันธุกรรมคล้ายกันหรืออยู่ใน race เดียวกัน โดย Sirithunya *et al*. (2008) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. grisea* จำนวน 174 ไอโซเลท จากข้าวบาร์เลย์ ข้าว ข้าววัชพืช และข้าวป่า ที่ปลูกในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าเชื้อ *P. grisea* ที่เก็บรวบรวมจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย เป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ นั่นคือ เชื้อที่รวบรวมจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ในภาคอื่น ในด้านของอายุของเชื้อหรือปีที่เก็บเชื้อนั้นไม่มีผลต่อการประเมินความหลากหลายทั้งทาง pathotype และ genotype จากผลการจัดกลุ่มของเชื้อแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่เก็บต่างปีกันมีการจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากเชื้อรามีการระบาดซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นประจำทุกปีจึงสามารถทำให้พบเชื้อราที่มีฐานพันธุกรรมเดิมนั้นขยายพันธุ์และระบาดอยู่ในพื้นที่ได้

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR นั้นช่วยให้ผลการทดลองมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุล SSR พัฒนามาจากกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นชุดของเชื้อราโรคไหม้และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างได้ดี (สุรีพร, 2546) งานทดลองนี้ได้คัดเลือกเครื่องหมาย SSR จำนวน 14 เครื่องหมายที่กระจายอยู่บนทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อรา ข้อมูลที่ได้สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มจำนวนเครื่องหมาย SSR จะทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำยิ่งขึ้น เมื่อนำผลการวิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR มาวิเคราะห์ร่วมกับผลการจัดกลุ่มความแปรปรวนและความหลากหลายทางคุณสมบัติการก่อโรคจากงานวิจัยของนวรัตน์ และนงลักษณ์ (2557) จึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ในการเลือกใช้เชื้อราสาเหตุโรคสำหรับทดสอบความต้านทานโรคของข้าว

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 53 ไอโซเลท โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย พบว่าเป็นเครื่องหมายที่มีศักยภาพดีและเหมาะสมในการใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย และการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 4 กลุ่ม พบเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ เมื่อวิเคราะห์ในด้านของอายุหรือปีที่เก็บรวบรวมเชื้อพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมต่างปีกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและยังพบว่าเชื้อบางไอโซเลทที่เก็บในปีเดียวกันและสถานที่เดียวกันยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนในการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิต ศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการทดสอบจากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

นวรัตน์ ใจหอม และ นงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2557. การประเมินความหลากหลายและการจัดกลุ่มความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย *ใน* เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาพืช. กรุงเทพฯ : 71-78.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. โรคไหม้ข้าว : ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. เอกสารวิชาการ. กลุ่มวิจัย ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สานักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พยอม โคเบลลี่, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี, กุลชนา เกศสุวรรณ, ชน สิรินกลิ่นมณี และ สงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว 1(1): 52-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, วราพงษ์ ชมาฤกษ์, จิรพงศ์ ใจรินทร์, อุไรวรรณ คชสถิต, อนุชาติ คชสถิตย์, บุญรัตน์ จงดี, สมใจ สาลีโท, วีระศักดิ์ หอมสมบัติ, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พันนิภา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้ *ใน* การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 2. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ : 249-266.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2010. โรคไหม้และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. Thai Journal of Genetics 3(2): 106-119.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ ม.อบ. 5(2): 37-39.

เสาวลักษณ์ อัคราช, ประภา ศรีพิจิตต์ และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่ *ใน* เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาพืช. กรุงเทพฯ : 581-588.

Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin, and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 10(2): 77–81.

Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 32(3): 314–331.

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*. Genetics and Molecular Biology. 23(4): 753-762.

Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand. *In*: R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds) Rice Blast Disease. CAB Int., Wallingford, U.K. pp. 333-442.

Giatgong, P. and R.A. Frederiksen. 1969. Pathogenic variability of monoconidial subcultures *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 59(8): 1152-1157.

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 Genetics and Biology 40: 207–214.

Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi. 1999. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.85 sequences of the ribosomal DNA. Mycoscience 40(4): 321-331.

McCartney, H.A., B.D.L. Fitt and J.S. West. 2006. Dispersal of foliar plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns. *In* B.M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye (eds) The epidemiology of plant diseases. Springer, Netherlands. pp. 159-186.

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.

Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surry, England.

Sirithunya P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawang and P. Smitamana. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by Random Amplification of Polymorphic DNA. Journal of Phytopathology 156: 196-204.

Zheng, Y., G. Zhang, F. Lin, Z. Wang, G. Jin, L. Yang, Y. Wang, X. Chen, Z. Xu, X. Zhao, H. Wang, J. Lu, G. Lu and W. Wu. 2008. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Fungal Genetics and Biology 45: 1340–1347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้