



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND
สร้างสรรค์ปัญญา เพื่อพัฒนาประเทศ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เปรียบเทียบระดับความรุนแรงและความแปรปรวนของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว
(*Pyricularia grisea*) จากระบบการปลูกพืชที่แตกต่างกันในจังหวัดเชียงใหม่

โดย ชวนพิศ บุญชิตศิริกุล และคณะ

เดือน กันยายน ปี 2544

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เปรียบเทียบระดับความรุนแรงและความแปรปรวนของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว (*Pyricularia grisea*) จากระบบการปลูกพืชที่แตกต่างกันในจังหวัดเชียงใหม่

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล
2. รศ.ดร.ประสาทพร สมิตะมาน

สังกัด

- ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้เงินมาสนับสนุนในการทำวิจัยหลังปริญญาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาทพร สมิตระมาน ที่ได้ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณวาสนา พุ่มสฤติย์ ที่ได้สอนเทคนิคในการสกัด DNA และการทำ rep-PCR ที่ได้เรียนมาจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute) ประเทศฟิลิปปินส์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาโรคพืช ที่ได้ช่วยเหลือในการจัดส่งชื่อของ และอุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัย และ น้องๆของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชทุกคน

สุดท้ายขอขอบคุณแม่ และพี่น้องทุกคน ที่เป็นกำลังใจเมื่อยามมีอุปสรรคและมีปัญหาใดๆเกิดขึ้น

ชวนพิศ บุญชิดสิริกุล

กันยายน 2546

รหัสโครงการ: PDF/21/2542

ชื่อโครงการ: เปรียบเทียบระดับความรุนแรงและความแปรปรวนของเชื้อ โรคใบไหม้ของข้าว (*Pyricularia grisea*) จากระบบการปลูกพืชที่แตกต่างกันในจังหวัดเชียงใหม่

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่

E-mail address: agicbnch@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เพื่อเปรียบเทียบระดับความรุนแรงและความแปรปรวนของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว (*Pyricularia grisea*) จากระบบการปลูกพืชที่แตกต่างในพื้นที่เชียงใหม่ เก็บเชื้อ จากแปลงปลูกข้าวที่แตกต่างกัน 3 แบบคือปลูกข้าวตลอดทั้งปีแต่มีการเปลี่ยนสายพันธุ์ข้าวปลูกสลับกัน(site1) ปลูกข้าวปีละครั้งสลับกับการปลูกหอมหัวใหญ่และข้าวโพด(site2) ปลูกข้าวปีละครั้งและปล่อยทิ้งไว้(site3) และเก็บเชื้อจากแผลที่แตกต่าง 7 ลักษณะ โดยการแยก spore เดี่ยวจากแผลเลี้ยงบนอาหาร เพื่อศึกษาคุณลักษณะ colony และลักษณะสัณฐานวิทยาของ conidium รวมทั้งทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ บนสายพันธุ์ข้าวไทย และ International set of host differential นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร Prune Agar Medium มาเลี้ยงในอาหารเหลว Fries เป็นเวลา10วันเพื่อใช้ในการสกัด DNA ก่อนนำไปศึกษาลายพิมพ์ DNA โดยวิธี rep-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคของ Lee and Taylor(1990) การปรากฏของโรคที่แตกต่างในแปลงปลูกของเกษตรกรจะสัมพันธ์กับลักษณะการปลูกพืชที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนของลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เก็บมาจากแปลงการปลูกที่แตกต่างกัน ทั้งขนาดและปริมาณการสร้างspore แต่จะแตกต่างระหว่าง isolate เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ พบว่า กข5 กข6 ชัยนาท สุพรรณบุรี 1 IRBLa-C (Pia) IRRI-F5(Pii) และ IRBLks-F5(Pik-s) อ่อนแอต่อเชื้อบาง isolates จาก site1 และ site 3 และจากการทำ Plot rep-PCR สามารถแบ่งเชื้อ 22 isolates จากsite 1ได้ 9 lineages และ 25 isolates จาก site 3 15 lineages จากระดับความเหมือนกันของ DNA band pattern มากกว่า 70% และเชื้อจากปีที่ 1 สัมพันธ์เชื้อปีที่ 2 ด้วย เชื้อจากลักษณะแผลที่แตกต่างกันมี isolate ที่แตกต่างกัน ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ระบบการปลูกพืชและความหลากหลายของพืชจะเกี่ยวข้องต่อความแปรปรวนและความรุนแรงของโรคในแปลงปลูก การจัดการระบบการปลูกพืชที่ดีจะช่วยลดปริมาณและการทำลายของเชื้อได้

Key word: *Pyricularia grisea*, rice leaf blast disease, Plot rep-PCR, Rice

Abstract

Project Code : PDF/21/2542

Project Title: Comparision of virulence and variation of rice blast fungus(*Pyricularia grisea*) from different cultural practice of rice farmer's field in Chiang Mai area.

Investigator : Chuanpit Boonchitsirikul, Department of Plant Pathology Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

E-mail address: agicbnch@chiangmai.ac.th

Project Period : 2 years

To compare virulence and variation of rice blast fungus (*Pyricularia grisea*) from different rice farmer cultural practice in Chiang Mai area. Fungus isolated were collected from three different cultural practice fo rice farmer's field follow: 1) growing rice all around the year(site1) 2) growing rice once a year and without sanitation of rice field(site2) 3) rotation growing rice with other plants(site3) and 7 different necrotic spot of infection leaf rice. Single spore isolation from each collection was cultured on mediium for the colony and conidium morphology studies. After 3 weeks of culture, the fungi were transferred to Fries medium for another 10 days before the mycelium were collected for the DNA extraction following the techniqe described by Lee and Taylor(1990). The rep-PCR method is used for *P. grisea* fingerprinting study as applied for the standard procedure of IRRI. The occurrence of rice blast disease in each rice farmer's field was differentiated but morphology studied of the colony and conidium was not different between them. There was variation of conidium size and number among the isolate within each group. Virulence testing, RD5 RD6 Chinart Supan-buri 1 IRBLa-C (Pia) IRRI-F5(Pii) and IRBLks-F5(Pik-s) were susceptible to some isolates collected from site 1 and site 3. At 70%level of similarity of DNA banding pattern could be classed 9 lineages from 22 isolates collected from site 1 and 15 lineages from 25 isolates collected from site 3. There was correlated between isolated collected from frist year and second year. Different necrotic on natural infection varies between isolate. The results suggest that the variation and virulence of blast fungus could be linked to cultural practic of farmer and genetic diversity of the host. Management of cultural farm practic could be help to reduce inoculum and virulance of rice blast infection.

Key word: *Pyricularia grisea*, rice leaf blast disease, Plot rep-PCR, Rice

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลการวิจัย	11
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	29
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 Rice varieties used in the experiment with different of rice blast resistant gene from IRRI	8
2 The score of lesion types of blast disease has been defined according to the size of lesion formed.Ranging from type0, no visible symtoms, to type 9, the largest.	10
3 The morphology of fungus isolate from Site 1 and Site 2.	14
4 The number of conidia producing of Pyricularia grisea on Prun Agar Medium(PA) obtained from three different cultural practice of rice farmer's field.	21
5 Average size of conidia of Pyricularia grisea collected from three different cultural practice of rice farmer's field.	22
6 Reaction of infected rice isolates of Pyricularia grisea from different cultural practice of farmer's field on International set of host differential and some rice cultivars	24

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	Site 1, the famer's field at Mae Wang that rotary growing rice with other Plants(onion and cron)	5
2	Site 2, the famer's field at Mae Wang that growing rice several time a year	6
3	Site, the farmer's field at Chiang Down that growing rice once a year without sanitation	7
4	Seven different tryptical lesion of rice blast disease, A: gray round spindle, B: moderate spindle C:great spindle D narrowly elongated spindle E:lesion coalesce F: small size spindle and G:small spot	7
5	The characteristic of different rice blast fungus isolates on various medium (PA, PDA and PRA)	18
6	The characteristic of various spores from different isolates and area	19
7	The characteristic of various spore from different isolate , site 3	20
8	Everage of size conidium of <i>Pyricularia grisea</i> collected from 3 different cultural practices	23
9	Plot rep-PCR fingerprint patterns from genomic DNA of rice-infecting <i>Pyricularia grisea</i> isolates from Site 1 and Site 3	25
10	Dendrogram from rep-PCR data of <i>Pyricularia grisea</i> isolates collected from farmer's field , A: Site 1 and B: Site 3	26
11	Dendrogram from rep-PCR data of correlation of <i>Pyricularia grisea</i> isolates collected from farmer's field , Site 1 and Site 3	27
12	Dendrogram from rep-PCR data of <i>Pyricularia grisea</i> isolates collected from Different lesion type of leaf rice blast disease	28

บทนำ

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย คือเป็นทั้งอาหารและพืชส่งออกที่สำคัญและมีการขยายการส่งออกอย่างต่อเนื่อง นำรายได้เข้าประเทศปีละ 30-50 พันล้านบาท เนื่องจากการแข่งขันในตลาดการค้าข้าวโลกมีสูงขึ้น จำเป็นที่ประเทศไทยต้องปรับตัว และเพิ่มคุณภาพของผลผลิตให้มากขึ้น แต่ผลผลิตของข้าวยังต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับบางประเทศ ทั้งนี้เนื่องจากยังต้องอาศัยปัจจัยทางธรรมชาติในการเพาะปลูก การระบาดของโรคและแมลงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของข้าวต่ำและมีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น

โรคใบไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. เป็นโรคหนึ่งพบได้ทั่วไปในแปลงปลูกข้าวและสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยทำให้เกิดความเสียหายไม่ต่ำกว่า 15% และในกรณีที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถทำให้เกิดความเสียหายไม่ต่ำกว่า 20%-30% และความเสียหายจะรุนแรงถ้าเข้าทำลายในระยะข้าวออกรวงเพราะจะทำให้เมล็ดลีบ และร่วงหล่นคุณภาพและปริมาณของเมล็ดลดลง การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับเกษตรกร ซึ่งประหยัดและปลอดภัยทำให้สามารถลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นการลดต้นทุนหลักของเกษตรกรอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามการคัดพันธุ์ต้านทานที่ผ่านมามักไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเชื้อมีความหลากหลาย จากการศึกษาระชากรของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว 64 isolates จากทวีปต่าง โดยใช้เทคนิค PADP (Random Amplified Polymorphic DNA) พบว่าประชากรของเชื้อมีความแตกต่างกันในแต่ละทวีป และพบว่าทวีปเอเชียมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากที่สุด (Souababere และคณะ 1998) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียความต้านทานภายในระยะ 2-3 ปีหลังจากได้นำพันธุ์ต้านทานนั้นสู่เกษตรกร

ในประเทศไทยพบว่าโรคใบไหม้ของข้าวสร้างความเสียหายให้เกษตรกรอยู่เสมอและได้มีการระบาดรุนแรงในเขตภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือในปีพ.ศ.2535 โดยทำให้เกิดความเสียหายเป็นพื้นที่ 1,250,525 ไร่ ซึ่งมากกว่า 70% ของพื้นที่ในเขตภาคเหนือที่มีการระบาดของโรคโดยมีการระบาดในข้าว กข.6 กข.8 กข.10 และเหนียวสันป่าตอง และยังมีการระบาดอีกครั้งในปี พ.ศ. 2538 ในเขตภาคเหนือเช่นจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง และลำพูน สำหรับประเทศไทยจากการทดลองของศูนย์วิจัยข้าวตามสถานต่างๆ ทั่วประเทศโดยทำการทดสอบปฏิกิริยาของโรคใบไหม้ของข้าวลงบนข้าวชุด IRBN (International Rice Blast Nursery) ได้แก่ Dular Kanto51 NPD USEN Zenith C22 IR45 และ Kataktara DA2 พบว่าปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต่อเชื้อในแต่ละแห่งมีความแตกต่างกันชัดเจนยิ่งขึ้น แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อโรคใบไหม้ของข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีความระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ (Somrith. 1991) ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อโดยวิธีการอนุโมเลกุลก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้เห็นความสัมพันธ์ของเชื้อแต่ละ isolates จากแหล่งที่แตกต่างกัน ในกรณีของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าวพบว่าได้มีการใช้หลายวิธีในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ เช่น การใช้ RAPD-DNA, primer J-06, MGR586-RFLP และ Pot2 primer ซึ่งในการ

ทดลองนี้ได้นำเอาวิธีการ Pot2 primer ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อราโรคใบไหม้มากกว่า Prob ชนิดอื่นๆ และมีความจำเพาะเจาะจงสูงโดยใช้ร่วมกับเทคนิค Repetitive element-based Polymorphism(rep-PCR) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการแยกกลุ่มของประชากรของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานจำนวน race กลุ่มของเชื้อ รวมทั้งระดับความรุนแรงของเชื้อในประเทศไทย

เนื่องจากในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบว่า 70% ของพื้นที่จะมีการปลูกข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมือง ที่เป็นทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ และมีการปลูกทั้งข้าวนาปีและนาปรัง (Chamras,1991) จึงทำให้เชื้อมีแหล่งอาศัยตลอดทั้งปี จากการศึกษาของกรมวิชาการเกษตรหน่วยป้องกันกำจัดโรคพืช พบว่าในเขตภาคเหนือการเข้าทำลายของโรคใบไหม้จะถูกพบในช่วงหน้าร้อนและหน้าหนาว ในขณะที่ภาคกลางการระบาดของโรคจะพบในช่วงหน้าหนาวเท่านั้นคือระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมีนาคม เนื่องจากสภาพแวดล้อม และช่วงระยะเวลาการปลูกพืชจะมีผลต่อการเกิดโรคเช่นกัน และมักพบการระบาดของโรคเป็นครั้งคราวในเขตภาคเหนือ ในช่วงที่ฝนตกและอากาศเย็นจะเหมาะกับการเกิดโรคใบไหม้ของข้าว อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงของโรคก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าวที่นำมาใช้ในการเพาะปลูกพืชด้วยรวมทั้ง ความหลากหลายของเชื้อ และความรุนแรงของเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะดูลักษณะการเกิดโรคความรุนแรงของโรคและความหลากหลายของเชื้อ ที่เกิดจากระบบการปลูกข้าวที่แตกต่างกัน ซึ่งจะได้มาเป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัด การจัดการที่เหมาะสมเพื่อลดการเกิดโรคในแปลงของเกษตรกร รวมทั้งนำไปใช้ในการคัดพันธุ์ต้านทานโรคที่มีประสิทธิภาพและความต้านต่อโรคได้นานยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของเชื้อ และความรุนแรงของเชื้อของสายพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกในเขตจังหวัดเชียงใหม่
- 2) เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของเชื้อ และความรุนแรงของเชื้อบนสายพันธุ์ข้าว International differential varieties จาก IRRI
- 3) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อจากตัวอย่างเชื้อ ทั้งในระดับอนุโลกุล และลักษณะรูปร่าง สัณฐานวิทยา
- 4) เปรียบเทียบลักษณะของแผลที่แตกต่างกันเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ

วิธีการวิจัย

1 เก็บตัวอย่างโรคจากแปลงข้าวของเกษตรกร 3 รายซึ่งมีระบบการปลูกพืชที่แตกต่างกันที่อำเภอเชียงดาว และอำเภอแม่วาง โดยเก็บเชื้อทั้งปีที่ 1 และปีที่ 2

1.1 เกษตรกรรายแรกที่อำเภอแม่วาง จะมีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีแต่มีการเปลี่ยนสายพันธุ์ข้าวปลูกสลับกัน(ภาพที่ 3), site 1

1.2 เกษตรกรรายแรกที่อำเภอแม่วางจะปลูกข้าปีละครั้งสลับกับการปลูกหอมหัวใหญ่ และข้าวโพด(ภาพที่ 2), site 2

1.3 เกษตรกรรายที่สามมีการปลูกข้าวปีละครั้งเนื่องจากน้ำไม่พอจะปล่อยทิ้งไว้โดยไม่มีการปลูกอะไร(ภาพที่ 4), site 3

2. ได้แยกลักษณะผลจากตัวอย่างที่เป็นโรคที่มีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งขนาดและรูปร่าง สามารถแบ่งได้เป็น 7 ลักษณะดังแสดงในรูปที่ 1 คือผลเป็นรูปกระสวยขนาดปานกลาง สีเทา ผลรูปกระสวยขนาดใหญ่สีน้ำตาล ผลเป็นรูปกระสวยขนาดเล็ก สีน้ำตาล ผลมีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาล ผลรูปกระสวยขนาดปานกลาง สีน้ำตาล ผลมีขนาดใหญ่ลูกกลม สีน้ำตาล และผลมีลักษณะเหลี่ยมมีขอบผลไม่ชัดเจน

3. นำ single spore จากตัวอย่างผลที่เก็บมาแล้วเลี้ยงบนอาหาร PDA ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงต่อบนกระดาษกรองที่วางบนอาหาร PDA และจะเก็บเชื้อในรูปของกระดาษกรองโดยการการคัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ในซองฟลอยที่ฆ่าเชื้อก่อนนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำมาใช้ในงานทดลองต่อไป

3. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อโดยการเลี้ยงบนอาหาร Polish Agar medium (RPA), Potato Dextrose Agar medium(PDA) และ Prun Agar Medium(PA) เพื่อศึกษาลักษณะ colony ของเชื้อที่เจริญบนอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนนำไปจุดเส้นใยเพื่อชักนำให้เชื้อสร้าง spore โดยการวางไว้ใต้แสง UV เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเตรียมเป็น inoculum นับจำนวนของ spore วัดขนาดของ spore ที่มาจากแต่ละที่ และนำไปใช้เตรียมเป็น inoculum สำหรับทดสอบความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

4. วิธีการปลูกเชื้อ ได้ปลูกพันธุ์ข้าวทั้งที่เป็นพันธุ์ด้านทาน เป็นที่นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือในกระบะ และ สายพันธุ์ที่เป็น International Differential Set จาก IRRI จำนวน 34 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนที่จะทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดยา และใช้ความเข้มข้นของ spore 5×10^4 spores/ml หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 10 วันและทำการตรวจและให้คะแนนโดยวิธีของ IRRI

5. ศึกษาความหลากหลายของเชื้อแต่ละ Isolate โดยวิธี Plot rep-PCR primer จะมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง Pot2 primer จะมีขนาด 1857 bp

5. ศึกษาความหลากหลายของเชื้อแต่ละ Isolate โดยวิธี Plot rep-PCR primer จะมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง Pot2 primer จะมีขนาด 1857 bp (Plot2-1 5' CGGAAGCCCTAAAGCTGTT 3' Plot2-2 5' CCCTCATTCGTCACACGTTC 3') จะร่วมกับเทคนิค Repetitive element-based Polymorphism(rep-PCR) ที่เกิดจากการนำเอาวิธีการจาก PCR แบบธรรมดา รวมกับวิธีการ Restriction Fragment Length Polymorphism(PFLP)

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้ ได้ modified วิธีการของ Lee and Taylor (1990) โดยการนำเชื้อของแต่ละสายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลว Fries medium เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นนำเส้นใยไปน้ำแล้วนำไปบดกับ nitrogen เหลวในโถรงบดยา นำผลละเอียดของเส้นใย 0.1-0.3 g ใส่ลงใน microtube ผสมกับ Lysis buffer ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1%β - mercaptoethanol) 400 ml แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ใส่ส่วนผสมของ phenol, chloroform และ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน (25:24:1) ในปริมาณ volum ที่เท่ากันแล้วเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปั่นในเครื่อง centrifuge 1400xg ดูดเอา supernatant ด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วทำให้ DNA ตกตะกอนโดยการใส่ 0.03 vol ของ 3 M sodium acetate และ 0.5 vol ของ isopropanol แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วทำการปั่นอีกครั้งก่อนทำการล้างด้วย ethanol แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 50-100 µl ซึ่งจะใช้เป็น template สำหรับ PCR

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA โดยวิธี PCR(polymerase chain reaction) ใช้วิธีการ และ primer จากสถาบันวิจัยข้าวของประเทศ ฟิลิปปินส์ สำหรับการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา(reaction mixture) มีดังนี้ DNA template 1 µl, B9 buffer 2.5 µl , dNTP mixture 7.5 µl, Primer MG1 1.25 µl, Primer MG 2 1.25 µl, AMST 0.5 µl, Tag-polymerase 0.5 µl และ H₂O 10.5 µl ผลรวมของ volum เท่ากับ 25 µl นำส่วนผสมไปปั่นเป็นเวลา 30 วินาที นำไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle โดยกำหนด (program) อุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลานาน 25 นาทีในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดเวลาและอุณหภูมิดังนี้ 94°C 1 นาที 62°C 1 นาที 65°C 10 นาที จำนวน 4 รอบ 94°C 30 วินาที 62°C 1 นาที 65°C 10 นาที จำนวน 26 รอบ เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 65°C 15 นาที จากนั้นแช่หลอด (soak) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ดูดผลผลิตที่ได้ 10 ไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis ตามด้วยการย้อม ethidium bromide แล้วส่องดูแถบของ PCR products (โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA marker) ได้แสง UV แล้วทำการบันทึกภาพ



A



B

Fig.1 Site 1, the farmer's field at Mae Wang that rotary growing rice with other plants(A: onion and B: corn)



Fig. 2 Site 2, the famer's field at Mae Wang that growing rice several time a year.





Fig.3 Site, the farmer's field at Chiang Down that growing rice once a year without sanitation

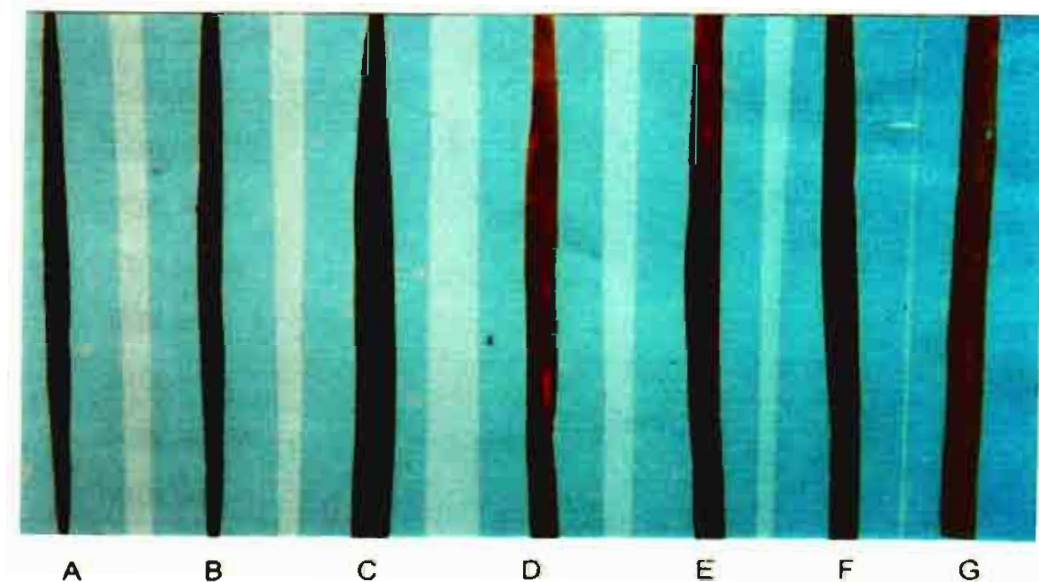


Fig.4 Seven different typical lesion of rice blast disease, A: gray round spindle, B: moderate spindle C: great spindle D: narrowly elongated spindle : E: lesion coalesce F: small size spindle and G: small spot



Table 1. Rice varieties used in the experiment with different of rice blast resistant gene from IRRI (International set on host differential) and Thai rice varieties

Varieties	Resistant gene
International set of host differential	
IRBLa-A	Pi-a
IRBLa-C	Pia
IRBLi-F5	Pii
IRBLks-F5	Pik-s
IRBLks-S	Pik-s
IRBLk-ka	Pik-s
IRBLkp-K60	Pik-p
IRBL kh-K3	Pik-h
IRBLz-Fu	Piz(?)
IRBL z5-CA	Piz-5
IRBLzt-T	Piz-t
IRBLta-CT2	Pita
IRBL –B	Pita
IRBLt-K59	Pib
IRBLsh-S	Pita
IRBL1-CL	Pish
IRBL3-CP4	Pi1
IRBL5-M	Pi3
IRBL7-M	Pi5(t)
IRBL9-W	Pi7(t)
IRBL12-M	Pi12(t)
IRBL19-A	Pi19(t)
IR24/FUJISAKA5//6*IR24	Pii
IRBL24/KUSABUE//6*IR24	Pik

Varieties	Resistant gene
IR24/PINO.4//6*IR24	Pita-2
IR24/C101LAC//6*IR24	Pi1
IR24/C101PKT//6*IR24	Pita-2
IR24/C104PKT//6*IR24	Pi3
IR24/C101A5//6*IR24	Piz-5
IR24/RIL249//6*IR24	Pi5(t)
IR24/RIL29//6*IR24	Pi7(7)

สายพันธุ์ข้าวไทยที่ต้านทานโรคใบไหม้ (ทัศนีย์,2540)

สุพรรณบุรี 1	-
สุพรรณบุรี 2	-
สุพรรณบุรี 60	-
สุพรรณบุรี 90	-
ชัยนาท 1	-
กข 5	-
กข 7	-
หางยี่ 71	-
หันตรา 60	-

สายพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภค หรือปลูกเพื่อการค้า(ศูนย์สถิติการเกษตร,2536)

กข6	-
กข15	-
กข21	-
กข23	-
สุพรรณบุรี 60	-
ข้าวหอมมะลิ 105	-
ข้าวเหนียวสันป่าดอง	-

Table 2 The score of lesion types of blast disease has been defined according to the size of lesions formed. Ranging from type 0, no visible symptoms, to type 9, the largest

Score	Predominant lesion type
0	ไม่แสดงอาการ (ไม่มีแผลเกิดขึ้น)
1	แผลเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆ
3	แผลเล็กกลมจนถึงค่อนข้างรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 mm ขอบแผลสีน้ำตาลชัดเจน
5	แผลเป็นรูปตาแคบๆ หรือออกรี กว้างประมาณ 1-2 mm ยาวมากกว่า 3 Mm มีขอบแผลสีน้ำตาล
7	แผลเป็นรูปตาหรือรูปกระสวยมีขนาดกว้าง ขอบแผลสีเหลือง น้ำตาลหรือม่วง
9	แผลขนาดเล็กสีขาว เทา หรือออกฟ้าเทา แผลมาเชื่อมกันโดยมองไม่เห็นขอบแผลชัดเจน

หมายเหตุ: แผล 5,7 และ 9 เป็นแผลที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคที่มีลักษณะเฉพาะ
(Typical susceptible lesion)

ผลการวิจัย

สำหรับตัวอย่างเชื้อที่มาจากลักษณะการเพาะปลูกข้าวที่แตกต่าง และได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่แตกต่างกันคือ Polish Agar medium Potato Dextrose Agar medium และ Prun Agar Medium ลักษณะของสีของ colony และลักษณะของเส้นใย จะแตกต่างกัน isolate โดยจะมีลักษณะที่เหมือนกัน และแตกต่างกัน ทั้งภายในแปลงปลูกเดียวกัน และจากแปลงที่มีลักษณะการปลูกที่ต่างกัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างแปลงปลูก ขณะเดียวกัน ชนิดของอาหารก็ทำให้ลักษณะสีของเส้นใย และการเจริญของเชื้อแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 5 แต่จากการเลี้ยงบนอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าลักษณะของ colony ของเชื้อที่เก็บในระหว่างปีที่ 1 และปีที่ 2 คือ เก็บในเวลาใกล้เคียงกันลักษณะ colony และลักษณะของเส้นใยจะมีความใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 สำหรับการสร้าง spores โดยการชักนำให้เชื้อสร้าง spores ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถสร้าง spores บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แตกต่างกัน และแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้าง spores ของเชื้อ และพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้าง spores ได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบาง isolates เท่านั้นที่สามารถสร้าง spores ได้ดี และมีปริมาณมาก แต่บาง isolates ก็พบว่าไม่สร้าง spore เลย ปริมาณการสร้าง spore ของเชื้ออยู่ระหว่าง 0.0×10^6 - 42.2×10^6 spores/ml ถึงแม้ว่าจะเก็บเชื้อในแปลงเดียวกันและเวลาใกล้เคียงกันพบว่าเชื้อมีการสร้าง spores ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน แต่เชื้อที่สร้าง spores ได้ดี พบว่าจะมาจากแปลงปลูกที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับเชื้อที่มีการสร้าง spore ได้ดีจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะจากแหล่งที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปี สำหรับพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวสลับกับการปลูกข้าวกับพืชชนิดอื่นพบว่าปริมาณการสร้าง spores ของเชื้อจะต่ำ และความสามารถในการทำให้เกิดโรคน้อยกว่าเชื้อที่นำมาจากการปลูกข้าวทั้งสองแหล่ง คือ แปลงปลูกข้าวตลอดทั้งปี และแปลงปลูกที่มีการปลูกข้าวปีละครั้ง และไม่พบเชื้อเลยในปีที่ 2 สำหรับแปลงปลูกข้าวที่สลับกับการปลูกพืชชนิดอื่น เมื่อทำการศึกษาและวัดขนาดของ spores พบว่ามีขนาดของ spore ไม่แตกต่างกันมากระหว่างแปลงปลูกที่ต่างกัน โดยเชื้อจะมีขนาดของความยาวของ spore ระหว่าง $20.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ถึง $30.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ และขนาดของความกว้างของ spore ระหว่าง $7.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ถึง $12.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ดังแสดงในตารางที่ 5 แต่ค่าเฉลี่ยของ spores ที่มาจากแปลงปลูกข้าวที่สลับกับการปลูกกับพืชชนิดอื่น จะมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 พบว่าขนาดของ spore ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้เกิดโรค และไม่พบความสัมพันธ์ขนาดของ spore ที่แตกต่างกันระหว่างปีที่ 1 และปีที่ 2

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในพันธุ์ข้าวที่เป็น International set on host differential และพันธุ์ข้าวไทย (ไม่สามารถทดสอบทุกสายพันธุ์ได้เนื่องจากเมล็ดไม่งอก) ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวไทย กข.5 กข.6 ชัยนาทและสุพรรณบุรี 1 สำหรับข้าวสายพันธุ์สันป่าตองด้านทานในระดับปานกลาง สำหรับสายพันธุ์ข้าวที่เป็น International set on host

differential จะพบว่าเชื้อที่เก็บจากแปลงปลูกปีละครั้ง และจากแปลงปลูกข้าวตลอดทั้งปี จะมีเชื้อบาง isolates ที่สามารถเข้าทำลายบางสายพันธุ์ได้ IRBL a C, IRRI F5 , IRBLks F5 ซึ่งมี resistance gene คือ Pia, Pii และ Pik-s แต่เชื้อบาง isolates ไม่สามารถชักนำให้สร้าง spore ได้ หรือสร้างในปริมาณน้อย ไม่เพียงพอในการที่จะทำให้เกิดโรค จึงไม่ทราบปฏิกิริยาของเชื้อต่อพืชได้ ทำให้การทดสอบไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามจากการทดสอบก็พบว่าเชื้อแต่ละ isolate ความสามารถในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกัน และเชื้อที่เก็บมาจากแปลงปลูกที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีจะสามารถทำให้เกิดโรคได้ดีกว่าเชื้อที่เก็บมาจากแปลงปลูกอื่น และ กข5 และ กข6 จะอ่อนแอต่อเชื้อทุกลักษณะของแปลงปลูก และเป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในเขตภาคเหนือ และน่าจะเป็นพันธุ์ข้าวที่มี resistance gene Pii และ Pik-s เนื่องจากอ่อนแอต่อเชื้อ isolate เดียวกันพันธุ์ข้าวที่มี gene ดังกล่าว อย่างไรก็ตามนอกจากลักษณะแปลงปลูกที่แตกต่างกันแล้ว ยังพบว่าสภาพแวดล้อมของแปลงปลูกทั้งสามแปลงก็มีความแตกต่างกันด้วย โดยเฉพาะแปลงที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีจะมีปริมาณน้ำที่เพียงพอ และมีดินไม่ใหญ่ปลูกรอบแปลงปลูกจึงเหมาะต่อการเกิดโรค จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ และความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสายพันธุ์ข้าวต่างๆจะพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโดยเฉพาะลักษณะ colony ขนาดของ spore ของเชื้อจะไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคและลักษณะแปลงปลูกที่แตกต่างกัน แต่จำนวนการสร้าง spore ของเชื้อจะมีผลต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ และสัมพันธ์กับลักษณะแปลงปลูกที่แตกต่างกันโดยเฉพาะเชื้อที่มาจากแปลงปลูกที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปี

จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยมีลักษณะความเหมือนกันของ DNA banding patterns ตั้งแต่ 20% ถึง 100% เชื้อที่เก็บในปีเดียวกัน หรือในช่วงเดียวกัน จะมีความเหมือนของพันธุกรรมมากกว่าเก็บเวลาต่างกัน บาง isolate มีระดับความเหมือนกันถึง 100% อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อที่เก็บในปีที่ 1 (BK1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14 และ PH1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,13,14,15) เชื้อที่เก็บในปีที่ 2 (BK16,17, 22,23, 24,32,33,34 และ PH16,20,22,23,25,26,27,28,29,30,32) มีบาง isolates ที่มีความสัมพันธ์กัน อย่างเช่น ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 70% ขึ้น PH14 และ PH25 , PH15 และ PH20, BK15 และ BK 22,23 และเมื่อจัดกลุ่มของเชื้อที่เก็บจากแปลงที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีทั้งหมด 22 isolates พบว่าที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 70% ขึ้นไปสามารถแบ่งกลุ่มได้ 9 lineages และมีบาง isolate ที่มีความเหมือนกันทางพันธุกรรมถึง 100% คือ isolates BK 17 และ BK 24 ดังแสดงในภาพที่ 10(A) จากการจัดกลุ่มจากแปลงที่ปลูกข้าวปีละครั้งทั้งหมด 25 isolates พบว่าที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 70% ขึ้นไปสามารถแบ่งกลุ่มได้ 15 lineages และมีบาง isolate ที่มีความเหมือนกันทางพันธุกรรมถึง 100% คือ isolates PH22, 17 กับ PH27 24 และ PH19 กับ PH26 ดังแสดงในภาพที่ 10(B) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อที่มาจากแปลงปลูกข้าวตลอดทั้งปี เมื่อนำเชื้อจากทั้งสองแหล่งมาศึกษาความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมพบว่า พบว่าที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 70% ขึ้นไปสามารถแบ่งกลุ่มได้ 21 lineages และพบว่ากลุ่มของเชื้อที่

เหมือนกันจะมาจากแปลงปลูกข้าวเดียว มีเพียงบาง isolate ที่มาจากแหล่งปลูกที่ต่างกันแต่มีระดับความเหมือนของพันธุกรรม 90% คือ BK16 และ PH14 ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 11

จากการเก็บลักษณะแผลของโรคใบไหม้ของข้าวที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Pyricularia grisea* จากแปลงเดียวกัน ดังรูปที่ 1 ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งหมด 7 ลักษณะของแผลนั้นพบว่า ความสามารถในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกัน เมื่อได้ทำการศึกษาความแตกต่างของแผลทั้ง 7 ลักษณะโดยการทำ Plot rep-PCR พบว่าเชื้อที่มีลักษณะแผลที่แตกต่างกันมี isolate ที่แตกต่างกัน โดยเชื้อแต่ละ isolate ลักษณะความเหมือนของ DNA banding patterns ระหว่าง 62-82% และสามารถจัดกลุ่ม ลักษณะความเหมือนของ DNA banding patterns ที่ 60% ได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มเชื้อที่มาจากแปลงปลูกที่ปลูกข้าวตลอดทั้งปี กับแปลงที่ปลูกข้าวปีละครั้ง แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่มาจากแหล่งเดียวกันและที่ลักษณะของแผลแตกต่างกัน ก็ยังมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังแสดงในภาพที่ 12

Table3 The morphology of fungus isolate form Amphur Maewang and Amphur Phang on Prune agar medium

Fungus isolate No.	Morphology of fungus isolate
Amphur Mae wang(site 1)	
1	Colony สีดำเข้มเส้นใยฟูเล็กน้อย
2	Colony ดำเข้มตรงกลางสีเทาเส้นใยฟูเล็กน้อย
3	Colony สีเทาตรงกลาง ขาวปนเทา เส้นใยฟูตรงกลาง
4	Colony สีดำเข้มเส้นใยฟู
5	Colony สีเทาขาวเส้นใยฟูเล็กน้อย
6	Colony สีเทาดำ เส้นใยฟู
7	Colony สีเทาดำ เส้นใยฟูเล็กน้อย
8	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู เส้นใยฟูเล็กน้อย
9	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู
10	Colony สีเทาดำเข้มตรงกลางฟู
11	Colony สีดำเข้มไม่ฟูตรงกลาง
12	Colony สีน้ำตาลเส้นใยไม่ฟู
13	Colony สีขาวปนเทาเส้นใยฟู
14	Colony สีเทาดำตรงกลางฟูสีขาว
15	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู สีขาว
16	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู สีขาว
17	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู
18	Colony สีเทาเส้นใยไม่ฟู
19	Colony สีขาวปนเทาเส้นใยไม่ฟู
20	Colony สีเทาดำตรงกลางฟู

Fungus isolate No.	Morphology of fungus isolate
Amphur Mae wang (site2)	
1	Colony สีขาวปนเทา ดำตรงกลางฟู
2	Colony สีเทา ดำตรงกลางขาวฟู
3	Colony สีเทา ตรงกลางขาวฟู
4	Colony สีเทา ดำตรงกลาง เส้นใยไม่ฟู
5	Colony สีเทา ดำตรงกลางฟู สีขาว
6	Colony สีเทา ดำเส้นใยตรงกลางฟู สีขาว
7	Colony สีขาวปนเทา เส้นใยไม่ฟู
8	Colony สีเทา ดำตรงกลางสีขาวฟู
9	Colony สีเทา ดำตรงกลางเส้นใยฟู
10	Colony สีเทา ดำตรงกลางสีขาวฟู
11	Colony สีเทา ปนขาวตรงกลางสีขาวฟู
12	Colony สีเทา ดำเส้นใยไม่ฟู
13	Colony สีเทา ดำมีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
14	Colony สีเทา เข้มเส้นใยฟูเล็กน้อย
15	Colony สีเทา ปนขาวเส้นใยค่อนข้างฟู
16	Colony สีเทา เข้มดำตรงกลางสีขาวฟู
17	Colony สีเทา เข้มเส้นใยฟูเล็กน้อย
18	Colony สีเทา เข้มเส้นใยฟูเล็กน้อย
19	Colony สีเทา เข้มตรงกลางสีเทาปนขาว
20	Colony สีเทา เข้มตรงกลางสีขาวเป็นหย่อมๆ
21	Colony สีเทา ปนดำเส้นใยไม่ฟู
22	Colony สีเทา ปนดำเส้นใยไม่ฟู
23	Colony สีเทา ปนดำตรงกลางสีขาวฟูเล็กน้อย
24	Colony สีเทา ดำเส้นใยไม่ฟู
25	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟู
26	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟู

Fungus isolate No.	Morphology of fungus isolate
27	Colony สีเทาดำ เส้นใยไม่ฟู
28	Colony สีเทาดำ เส้นใยฟูเล็กน้อย
29	Colony สีเทาดำ เส้นใยฟูเล็กน้อย
30	Colony สีเทาดำ เส้นใยฟูเล็กน้อย
Amphur Chiang Doaw	
1	Colony สีเทา เส้นใยไม่ฟู
2	Colony สีเทาปนขาว เส้นใยค่อนข้างฟู
3	Colony สีดำเข้ม เส้นใยไม่ฟู
4	Colony สีเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย
5	Colony สีดำเข้ม เส้นใยไม่ฟู
6	Colony สีเทาดำ ตรงกลางสีขาวฟู
7	Colony สีเทาดำ ตรงกลางสีเทาฟูมาก
8	Colony สีเทาปนดำ เส้นใยไม่ฟู
9	Colony สีเทาขาว เส้นใยฟู
10	Colony สีเทา และมีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
11	Colony สีเทา มีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
12	Colony สีขาวเทา เส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
13	Colony สีขาวเทา เส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
14	Colony สีเทาดำ เส้นใยไม่ฟู
15	Colony สีเทาดำ เส้นใยไม่ฟู
16	Colony สีเทาดำ เส้นใยไม่ฟู
17	Colony สีเทาน้ำตาล เส้นใยไม่ฟู
18	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย
19	Colony สีเทาดำ มีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
20	Colony สีเทา ตรงกลางสีขาวฟู
21	Colony สีเทาดำ เส้นใยไม่ฟู

Fungus isolate No.	Morphology of fungus Isolate
22	Colony สีดำน้ำตาล เส้นใยฟูเล็กน้อย
23	Colony สีเทาดำ มีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
24	Colony สีเทาดำ มีเส้นใยสีขาวเป็นหย่อมๆ
25	Colony ดำน้ำตาล เส้นใยไม่ฟู
26	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย
27	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย
28	Colony สีขาวเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย
29	Colony สีเทาเข้ม เส้นใยฟูเล็กน้อย
30	Colony สีเทาเข้ม เส้นใยฟูเล็กน้อย

หมายเหตุ Isolates 1-15 were collected from first year of rice growing

Isolates 16-30 were collected from second year of rice growing

(Rice farmer field at Amphur Mae wang (site 2) and Amphur Chiang Doaw)

Excepted isolates 1-20 of rice farmer field at Amphur Mae wang (site 1) were only collected from first year.

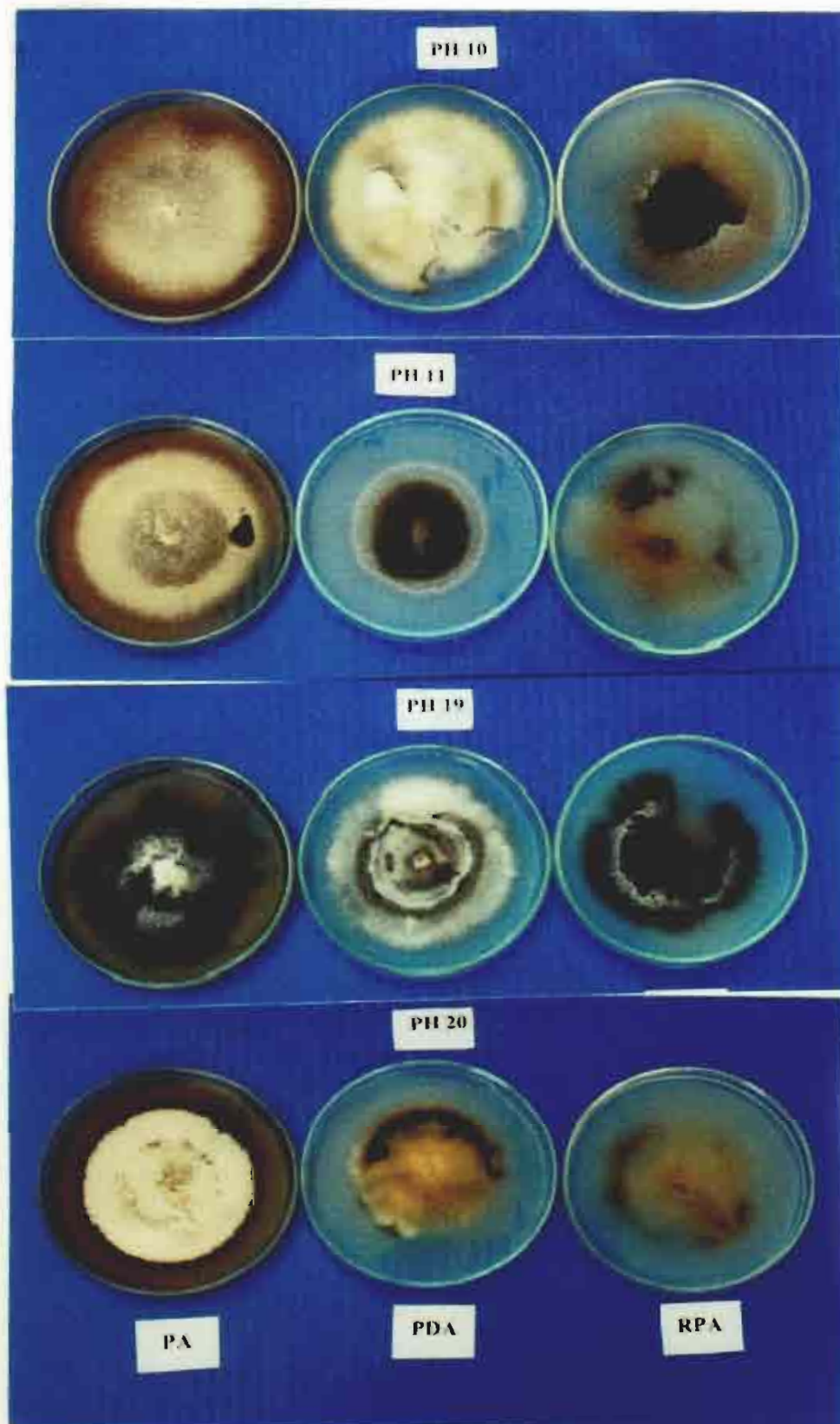


Fig. 5 The characteristic of different rice blast fungus isolates on various medium (PA, PDA and RPA).

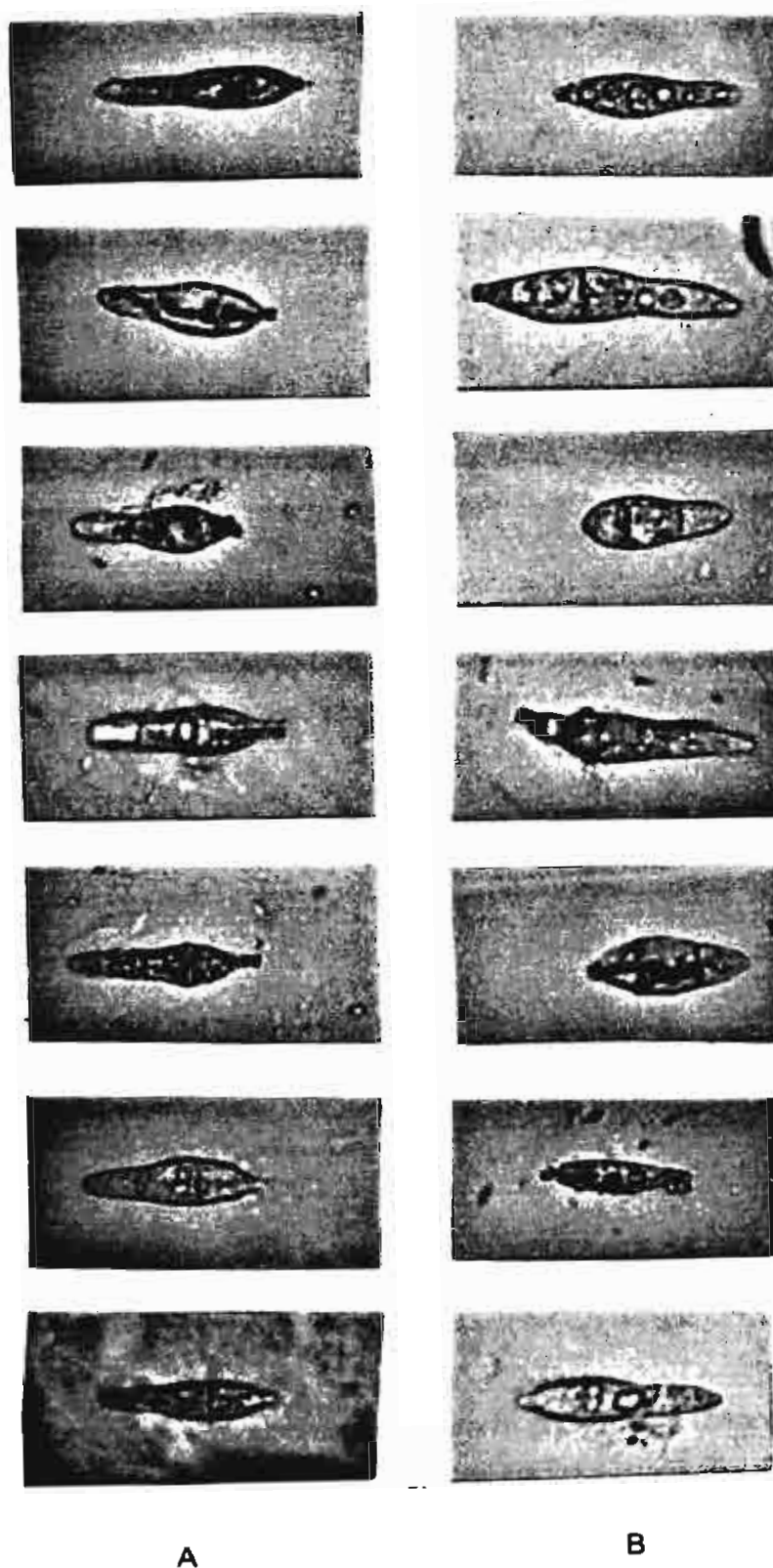


Fig.6 The characteristic of various spores of *Pyricularia gnsea* from different isolates and area .
A:site 1and B: site 2.

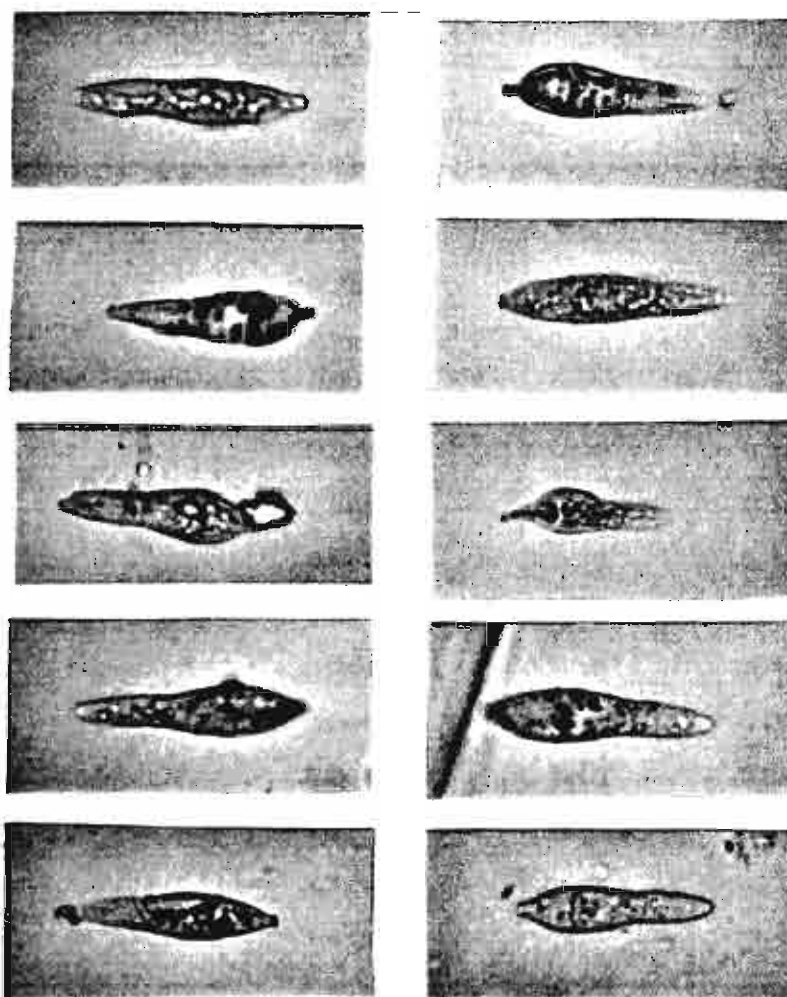


Fig.7 The characteristic of various spore of *Pyricularia grisea* from different isolate , site 3

Table 4. The number of conidia producing of *Pyricularia grisea* on Prun Agar Medium (PA) obtained from three different cultural practice of rice farmer's field

Isolate no.	Number of spores (spores/ml)		
	Site 1	Site 2	Site 3
1	0.0×10^4	1.1×10^4	4.7×10^4
2	8.1×10^4	1.0×10^4	1.7×10^4
3	0.0×10^4	6.2×10^4	0.0×10^4
4	4.2×10^4	0.0×10^4	0.7×10^4
5	0.0×10^4	0.5×10^4	0.1×10^4
6	2.0×10^4	0.0×10^4	0.1×10^4
7	0.0×10^4	0.7×10^4	0.1×10^4
8	0.0×10^4	0.7×10^4	0.1×10^4
9	0.0×10^4	0.7×10^4	0.0×10^4
10	0.0×10^4	0.3×10^4	0.0×10^4
11	0.8×10^4	0.1×10^4	2.0×10^4
12	1.4×10^4	0.1×10^4	1.1×10^4
13	4.7×10^4	0.0×10^4	42.2×10^4
14	$1.9.0 \times 10^4$	0.5×10^4	35.2×10^4
15	0.0×10^4	0.2×10^4	0.0×10^4
16	0.0×10^4	0.0×10^4	0.5×10^4
17	0.0×10^4	0.0×10^4	0.2×10^4
18	2.0×10^4	0.4×10^4	1.0×10^4
19	0.8×10^4	0.0×10^4	0.0×10^4
20	4.1×10^4	0.2×10^4	0.2×10^4

Table5. Average size of conidia of *Pyricularia grisea* collected from three different cultural practice of rice farmer's field.

Isolate no	Average range of conidia (µm)		
	Site1	Site2	Site3
1	23.9±1.9x9.4±0.5	23.9±1.9x9.4±0.5	23.9±1.9x9.4±0.5
2	30.7±1.7x10.7±0.7	23.7±1.7x10.6±0.4	22.0±0.4x9.2±1.4
3	25.7±1.2x9.5±0.4	26.9±2.0x8.2±0.0	20.5±0.9x10.4±1.1
4	26.8±1.6x8.8±0.5	30.9±1.9x8.6±0.5	23.0±0.4x11.4±0.4
5	23.1±0.8x9.4±0.5	-	23.9±1.9x9.4±0.5
6	25.5±0.9x9.5±0.5	28.0±1.9x10.3±0.0	24.1±0.9x9.5±0.2
7	23.9±1.9x9.4±0.5	25.9±1.5x9.7±0.4	20.0±0.7x9.7±0.8
8	22.6±1.2x11.8±1.6	-	25.5±0.4x9.9±0.7
9	20.3±1.1x9.9±0.3	23.5±0.7x10.0±0.3	21.4±0.0x9.6±0.6
10	23.9±1.5x9.8±0.4	28.0±1.3x9.4±0.4	24.5±1.9x8.2±1.6
11	-	-	22.2±0.4x12.4±0.5
12	23.9±1.6x10.3±0.0	25.5±1.2x8.6±0.5	23.4±0.9x10.2±0.0
13	23.2±0.8x11.1±1.4	23.5±0.5x9.0±0.6	20.0±1.1x11.2±0.3
14	-	-	18.8±0.8x10.4±1.1
15	21.6±1.6x11.0±0.5	27.3±1.3x9.5±0.5	20.0±0.9x9.2±0.4
16	21.8±0.8x10.4±0.5	26.3±1.0x9.7±0.4	21.0±1.2x8.4±0.3
17	-	21.0±1.1x8.9±0.7	26.0±1.7x10.7±1.4
18	24.4±0.7x9.9±0.5	27.9±1.2x10.9±0.0	23.0±0.0x9.7±0.5
19	-	27.1±1.6x9.9±0.3	24.0±0.8x9.8±0.4
20	-	-	25.0±1.4x8.0±0.8
21	25.2±0.8x8.4±0.4	-	21.0±0.9x8.4±1.8
22	22.4±0.9x10.4±0.4	-	20.0±0.8x11.2±0.4
23	21.0±0.5x11.0±0.6	-	25.0±1.2x9.4±0.6
24	26.2±0.6x11.2±0.5	-	23.0±0.5x10.8±0.7
25	22.6±1.1x9.8±0.8	-	20.0±0.4x11.5±0.4
26	23.0±0.7x9.6±0.6	-	22.0±1.3x10.4±0.5
27	23.2±1.2x10.4±0.5	-	21.0±1.0x7.9±1.9
28	26.8±0.5x8.4±0.2	-	25.0±0.5x9.6±0.4
29	25.2±0.8x9.5±0.4	-	24.0±0.4x9.8±1.3
30	24.4±0.3x11.2±1.3	-	24.0±0.7x9.4±0.2

- : none spore production

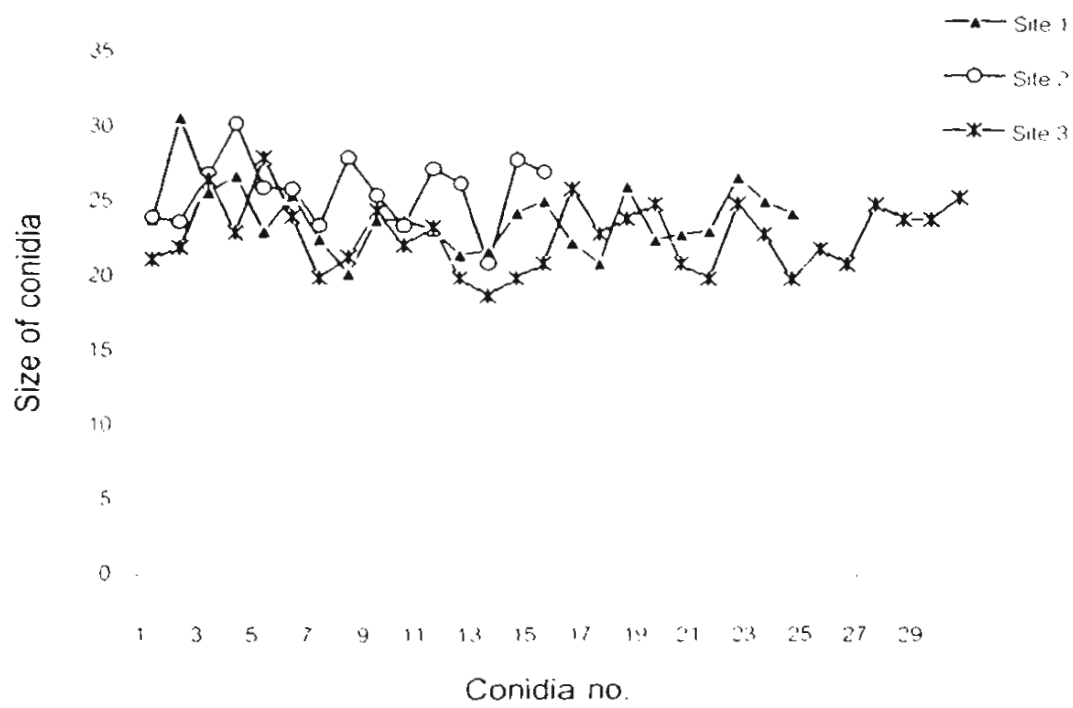


Fig 8. Everage of size conidium of *Pyricularia grisea* collected from 3 different cultural practices

Table 6. Reaction of infected rice isolates of *Pyricularia grisea* from different cultural practice of farmer's field on International set of host differential and some rice cultivars

Rice cultivar	R-gene	Site 1	Site 2	Site 3
IRBLa-C	Pia	MS	R	S
IRBLi-F5	Pii	S	MR	S
IRBLks-F5	Pik-s	S	R	MS
IRBLks-S	Pik-s	R	R	R
IRBLk-ka	Pik-s	R	R	R
IRBLkp-K60	Pik-p	R	R	R
IRBL kh-K3	Pik-h	R	R	R
IRBLz-Fu	Piz(?)	R	R	R
IRBL z5-CA	Piz-5	R	R	R
IRBLta-CT2	Pita	R	R	R
IRBL3-CP4	Pi1	R	R	R
IRBL24/KUSABUE//6*IR24	Pik	R	R	R
IR24/PINO.4//6*IR24	Pita-2	R	R	R
IR24/C101LAC//6*IR24	Pi1	R	R	R
IR24/C101PKT//6*IR24	Pita-2	R	R	R
IR24/C104PKT//6*IR24	Pi3	MR	R	R
IR24/C101A5//6*IR24	Piz-5	R	R	MR
IR24/RIL249//6*IR24	Pi5(t)	R	R	MR
IR24/RIL29//6*IR24	Pi7(7)	R	R	R
IR24/WHI-15-75-1-127//6*IR24	Pi9(t)	R	R	MS
กข5	-	S	S	MS
กข6	-	S	S	S
กข105	-	R	R	MR
สันป่าตอง	-	MS	R	MS
สุพรรณบุรี	-	R	R	S
ชัยนาท 1	-	R	R	S
หางยี่ 11	-	R	R	R

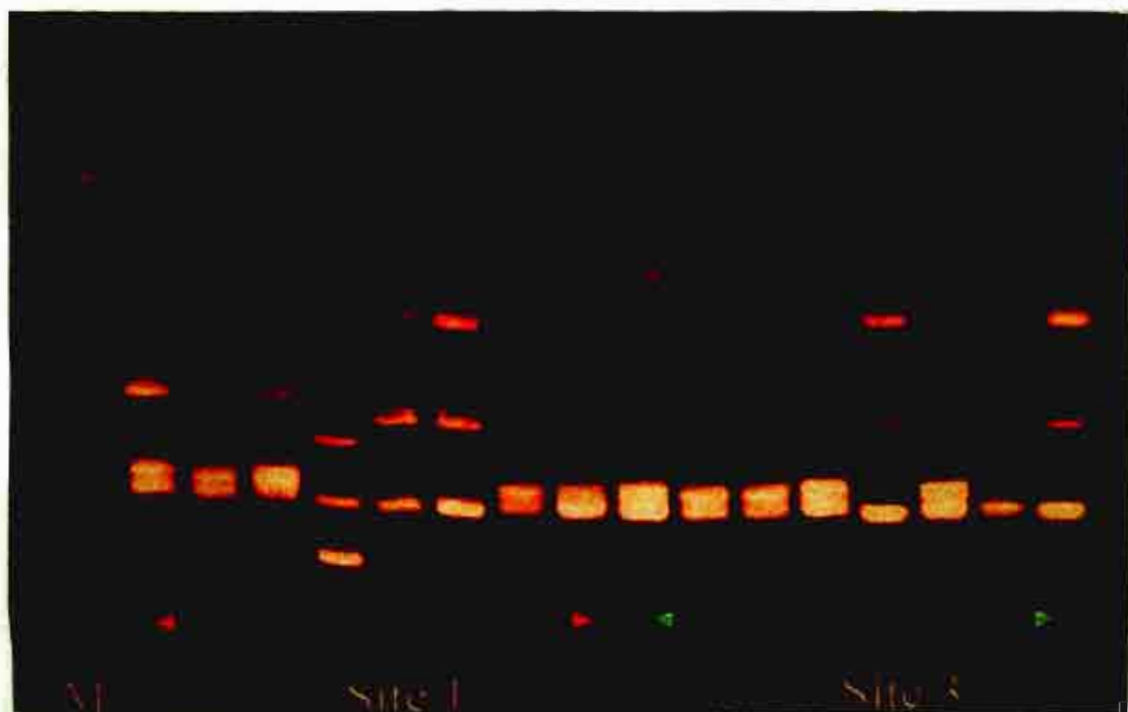
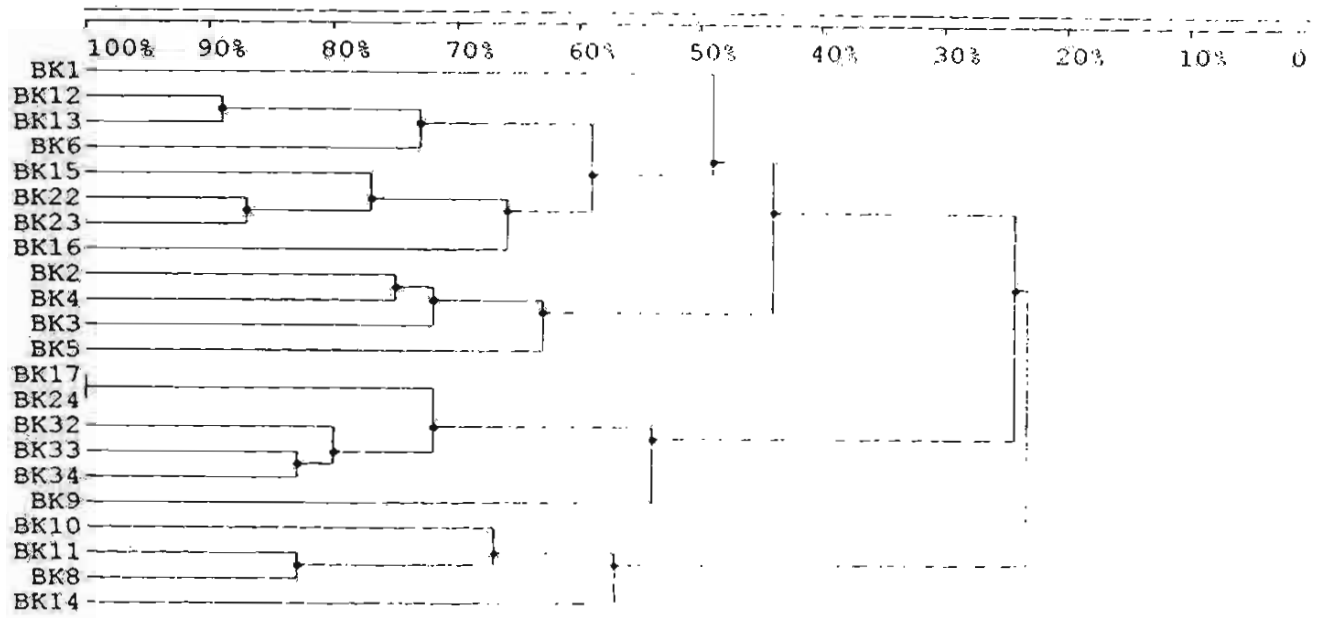
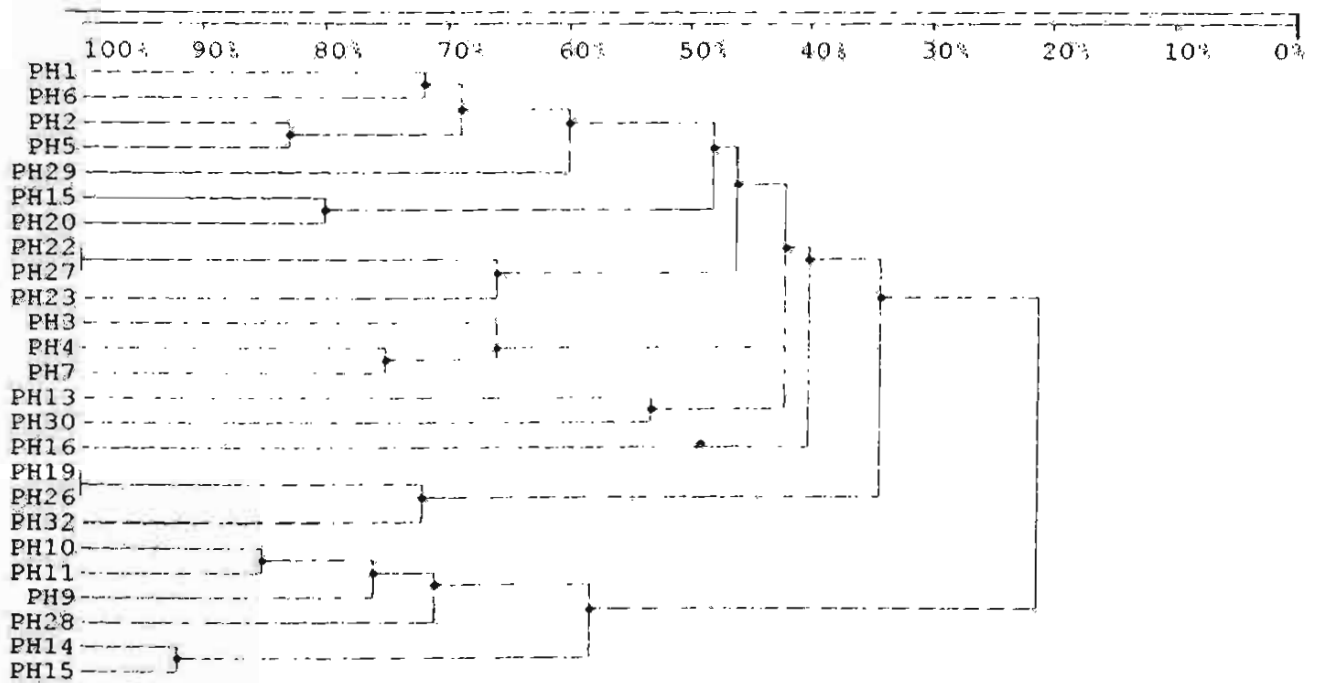


Fig 9. Plot rep-PCR fingerprint patterns from genomic DNA of rice-infecting *Pyricularia grisea* isolates from Site 1 and Site 3.



A



B

Fig 10. Dendrogram from rep-PCR data of *Pyricularia grisea* isolates collected from farmer's Field, Site 1 (A) and Site 3 (B).

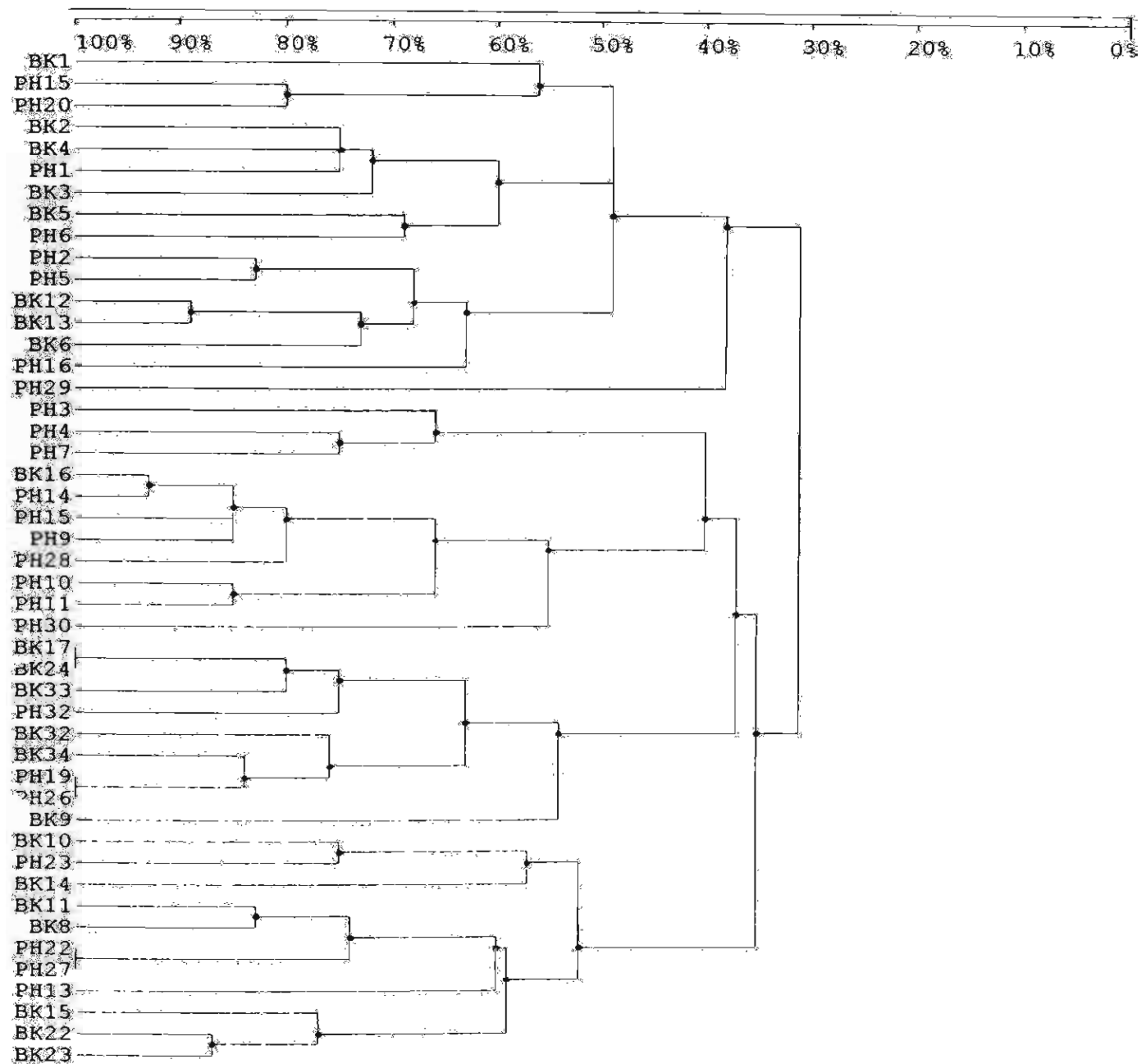


Fig 11. Dendrogram from rep-PCR data of correlation of *Pyricularia grisea* isolates collected from farmer's field, Site 1 and Site 3

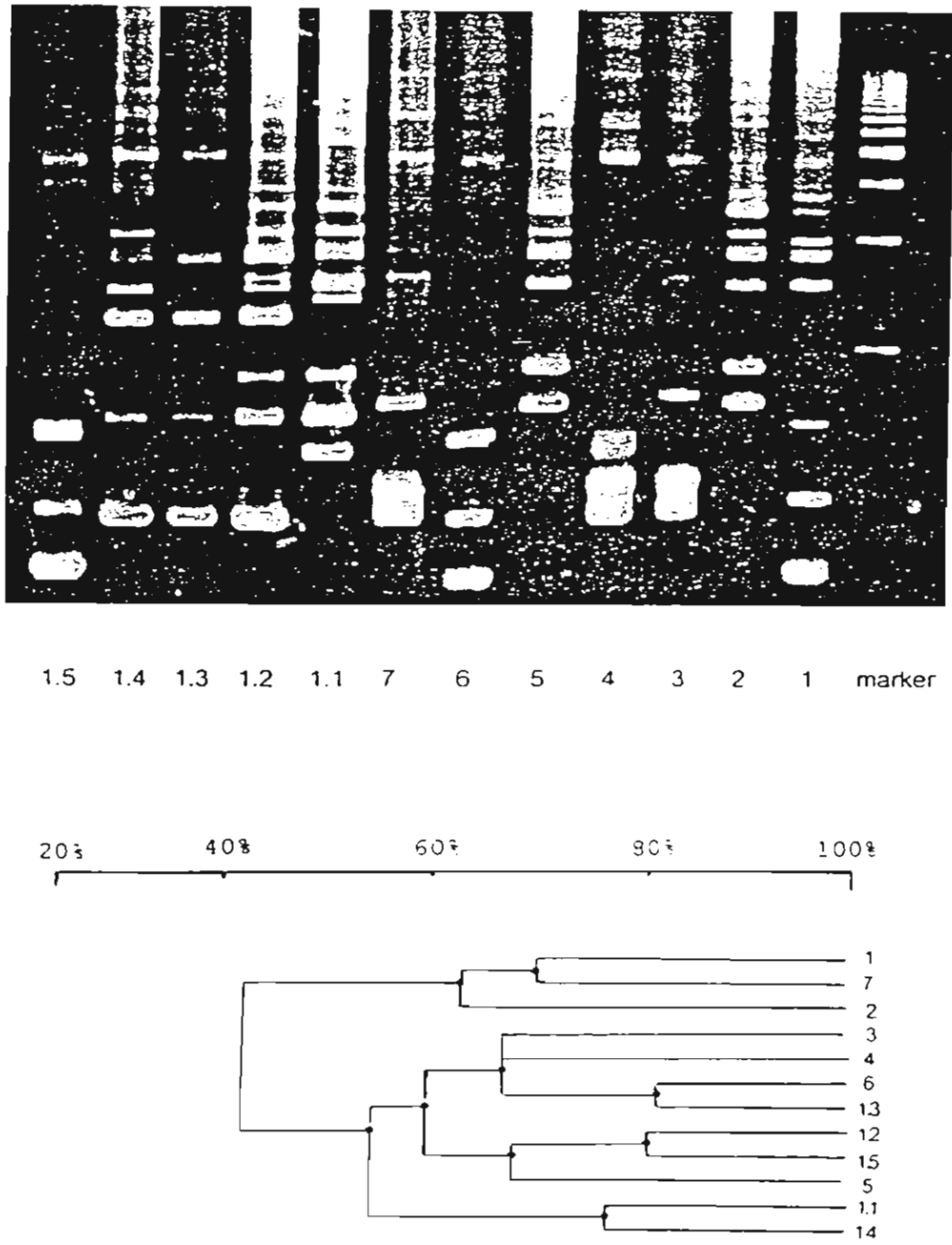


Fig 12. Dendrogram from rep-PCR data of *Pyricularia grisea* isolates collected from different lesion type of leaf rice blast disease, Site1: 1.1-1.5 and Site3: 1-7

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาโรคใบไหม้ในแปลงของเกษตรกรที่มีระบบการปลูกข้าวที่แตกต่างกัน คือ ปลูกข้าวปีละครั้งสลับกับการปลูกหอมหัวใหญ่และข้าวโพด ปลูกข้าวตลอดทั้งปีแต่มีการเปลี่ยนสายพันธุ์ข้าวระหว่างปลูก และปลูกข้าวปีละครั้งเนื่องจากน้ำไม่พอจะปล่อยทิ้งไว้โดยไม่ได้ทำความสะอาดแปลงปลูก พบว่าลักษณะการเกิดโรคทั้งสามแปลงมีความแตกต่างกัน โดยแปลงที่ปลูกข้าวตลอดทั้งปีมีการเข้าทำลายของโรคที่รุนแรงมากกว่าทั้งสองแปลง ในขณะที่แปลงปลูกข้าวที่มีการสลับการปลูกข้าวกับพืชชนิดอื่นไม่พบการเกิดโรคในปีที่ 2 ส่วนแปลงที่มีการปลูกข้าวปีละครั้งจะพบโรคทุกครั้งที่มีการปลูกข้าว และเมื่อได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มาจากแหล่งปลูกข้าวที่แตกต่างกัน 3 แบบ โดยการดูลักษณะของ colony สีของเส้นใย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และความสามารถในการสร้าง spores ของเชื้อบนอาหาร PA เนื่องจากพบว่าเชื้อสามารถสร้าง spore ได้ดีบนอาหาร PA รวมทั้งวัดขนาดของ spore จำนวนการสร้าง spore ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Pyricularia grisea* มาแล้วโดยนักวิจัยหลายท่านก็ตาม เนื่องจาก Ou(1986) Asuyama(1965) ได้รายงานว่าขนาดของ spore จะแตกต่างกันระหว่าง isolate สภาพแวดล้อม และลักษณะการปลูกพืชที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นลักษณะการปลูกข้าวที่แตกต่างกันที่ศึกษาจึงน่าจะมีผลต่อลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อ รวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วย แต่จากการศึกษาไม่พบว่าความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของเชื้อที่เก็บจากแปลงปลูกพืชที่แตกต่างกัน แต่จะพบว่าเชื้อที่เก็บจากแปลงปลูกเดียวกัน จะมีลักษณะของสี และ colony ของเชื้อที่คล้ายกัน อย่างเชื้อที่เก็บจากแปลงที่ปลูกข้าวปีละครั้งจะมีลักษณะของสีและ colony ของเชื้อออกฟูขาวและเทาเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่แปลงปลูกข้าวที่ปลูกข้าวตลอดทั้งปี ลักษณะส่วนใหญ่ของเชื้อสีเทาออกดำ แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าจะมีลักษณะของสี และ colony ของเชื้อแตกต่างกันออกไปในบางส่วนของเชื้อที่เกิดจากการพัดปลิวของ spore จากที่อื่น ส่วนที่มีความคล้ายกันน่าจะเกิดจากการปลดปล่อยของ spores ที่เกิดจากโรคใบไหม้ที่อยู่ภายในแปลงปลูกหรือบริเวณใกล้เคียง สำหรับขนาดของ spore จะมีความแตกต่างระหว่าง isolate โดยขนาดความยาวจะอยู่ระหว่างระหว่าง 20.0 -30.0 μm และขนาดของความกว้างของ spore จะอยู่ระหว่าง 7.9 -12.4 μm สำหรับแปลงปลูกข้าวที่มีการสลับการปลูกกับพืชชนิดอื่น จะมีขนาดของ spore เฉลี่ยใหญ่กว่าเล็กน้อย แต่ก็ช่วงของขนาดของ spore ที่พบโดยทั่วไปของเชื้อที่เข้าทำลายข้าว (Ou,1986) และพบว่าขนาดของ spore ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้เกิดโรค สำหรับการสร้าง spores ของเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจนระหว่าง isolate บาง isolate สามารถสร้าง spore ได้ดีขณะที่บาง isolate พบว่าไม่สร้าง spore เลย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมือนกัน ซึ่งพบได้ทุกลักษณะของแปลงปลูก แสดงให้เห็นว่าเชื้อน่าจะมีความแตกต่างระหว่าง isolate อาหารและสภาพแวดล้อมน่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้าง spore ทั้งในธรรมชาติ และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่สร้าง spore ได้ดีจะสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานของเชื้อจึงไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะของแปลงปลูกที่ต่างกัน แต่จะแตกต่างกันระหว่าง isolate แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อในประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวโดยทั่วไป และทุกภาคของประทศ รวมทั้งสามารถปลูกข้าวได้ตลอดทั้งปีในบริเวณเขตชลประทาน จึงทำให้มีการพัดปลิวของ spores จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้ง่าย จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ พบว่าเชื้อที่มาจากแต่ละแหล่งจะมีความสามารถในการเข้าทำลายแตกต่างกัน โดยที่เชื้อจากแปลงปลูกข้าวตลอดทั้งปี และแปลงปลูกข้าวปีละครั้งจะมีเชื้อบาง isolates ที่มีความรุนแรง สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ โดยเฉพาะในพันธุ์ข้าวที่มี Pia Pii Pik-s gene ด้านทานอยู่ และพบว่า กข5 กข6 และสันป่าดองก็อาจมี gene ดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ เพราะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ Isolate เดียวกัน เนื่องจาก กข5 กข6 และสันป่าดอง เป็นพันธุ์ที่ปลูกโดยทั่วไปในภาคเหนือดังนั้นเมื่อไรที่สภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่นอากาศเย็นชื้น หรือมีการให้ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง การเกิดโรคก็จะรุนแรงได้ อย่างไรก็ตามพบว่าระบบการปลูกพืชที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณของเชื้อในแปลงปลูก ด้วย พบว่าในแปลงที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปี ทุกครั้งที่มีการปลูกข้าวจะพบการเข้าทำลายของโรคและยังพบว่า ระดับความรุนแรงของโรคในปีที่สองจะเป็นมากกว่าปีที่หนึ่ง ขณะเดียวกันแปลงที่ปลูกข้าวปีละครั้งโดยไม่มีการกำจัดเศษฟางของข้าวที่เป็นโรคในแปลงปลูก ก็กลายเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อและสามารถเข้าทำลายข้าวที่ปลูกได้ในฤดูการปลูกข้าวของปีถัดไป สำหรับแปลงปลูกข้าวที่ปลูกสลับกับการปลูกพืชชนิดอื่นปริมาณโรคน้อยและไม่พบการเกิดโรคเลยในปีที่สอง และจากการทำ DNA finger print ของปีที่ 1 และปีที่ 2 มีความใกล้ชิดกันทางด้าน genetic เช่น BK17(เก็บในปีที่ 1) และ BK24(เก็บในปีที่2) มีความใกล้ชิดกันทางด้าน genetic 100 เปอร์เซ็นต์ หรือ PH15 (เก็บในปีที่ 1) และ PH20(เก็บในปีที่2)มีความใกล้ชิดกันทางด้าน geneticมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่อยู่ในแปลงปลูกปีที่ 1 แล้วสามารถอยู่รอดได้โดยการอาศัยอยู่ในเศษซากพืช ฟางข้าวหรือในวัชพืช ดังได้มีรายงานเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าได้มากกว่า 50 ชนิดรวมทั้งพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี (Nicolas,1995) ดังนั้นการเก็บเศษซากพืชที่อยู่ในแปลงปลูก หรือการปลูกพืชหมุนจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการลดปริมาณของเชื้อในแปลง และเป็นการจัดการโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราโรคใบไหม้เชื้อที่เก็บจากแปลงปลูก มีความแปรปรวนค่อนข้างสูงจากการศึกษาจะพบว่า เชื้อที่เก็บจากแปลงที่มีการปลูกข้าวตลอดทั้งปีทั้งหมด 22 isolates ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 70%ขึ้นไปสามารถแบ่งกลุ่มได้ 9 lineages สำหรับเชื้อที่เก็บจากแปลงที่ปลูกข้าวปีละครั้งทั้งหมด 25 isolates ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 70%ขึ้นไปสามารถแบ่งกลุ่มได้ 15 lineages เนื่องจากในประเทศไทยได้พบว่าเชื้อรามีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจากการศึกษาลักษณะ mating type โดย Mekwatanakarn และคณะ(1999) จากเชื้อราที่เก็บจากเขตภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปลูกข้าวมานาน เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี MGR586 fingerprint พบกลุ่มเชื้อราถึง 50 lineages และยังพบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศโดยมีลักษณะของ mating type ของเชื้อราถึงจำนวน 143 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของความหลากหลาย

ของเชื้อ นอกจากนี้การปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องจะทำให้เชื้อมีแหล่งอาศัยตลอดเวลาทำให้เกิดการสะสมของเชื้อ ทำให้เกิดความหลากหลายของเชื้อมากยิ่งขึ้น ประกอบกับประเทศในเขตเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของโลก ซึ่ง spores ของเชื้อราสามารถที่จะถูกพัดพาโดยลมจากแหล่งหนึ่งไปสู่แหล่งหนึ่งได้ตลอดเวลา ดังรายงานโดย Soubabere และ คณะ(1998) ความหลากหลายของเชื้อโรคใบไหม้จะมีมากที่สุดในทวีปเอเชีย นอกจากนี้การเคลื่อนย้ายของเมล็ดที่ติดโรคจะมีบทบาทที่สำคัญในการกระจายของเชื้อไปยังที่ต่าง ๆ ด้วย จากลักษณะแผลที่แตกต่างกันในแปลงปลูก ก็เป็นดัชนีที่บอกได้ถึงความหลากหลายของและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นได้ ถึงแม้ว่าลักษณะของแผลที่แตกต่างกันสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัยแต่ส่วนหนึ่งก็เกิดจากความหลากหลายของเชื้อที่เข้าทำลาย เพราะลักษณะของแผลที่แตกต่างกันเกิดจากเชื้อที่เข้าทำลายต่างกัน หรือเหมือนกันที่แผลนั้นอาจยังไม่มีการพัฒนา ซึ่งสอดคล้องกับที่พบว่ามี ความหลากหลายของเชื้อ ภายในแปลงปลูก อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่ทำทดลองซ้ำจึงยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

ลักษณะการปลูกพืชจึงมีบทบาทที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเพิ่มปริมาณของเชื้อและความหลากหลายของเชื้อ นอกจากการใช้พันธุ์ต้านทานแล้วการจัดการ เป็นวิธีการหนึ่งจะช่วยลดปริมาณของเชื้อและความรุนแรงของโรค อย่างแปลงปลูกที่สลับกับการปลูกพืชชนิดอื่นไม่พบโรคในปีที่2 เพื่อให้การควบคุมโรคนั้นมีประสิทธิภาพ ควรให้การจัดการการปลูกพืชเป็นส่วนหนึ่งในการจัดการโรคพืช

เอกสารอ้างอิง

- ทัศนีย์ สงวนสัจ 2540 . บทบาทของพันธุกรรมด้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย เอกสารวิชาการ ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์ ISBN: 974-7642-53-2 pp. 45-50.
- บริบูรณ์ สมฤทธิ์ และ สงกรานต์ จิตรากร 2537. การศึกษาและวิเคราะห์ปัญหาหลักด้านเทคโนโลยี ของข้าวในประเทศไทย. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. 148 หน้า
- ศูนย์สถิติการเกษตร 2537. รายงานการสำรวจข้าวนาปี ปีเพาะปลูก กลุ่มวิเคราะห์ข้อมูลการผลิตพืช สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ 292 หน้า
- Chamras, P. 1991. Knowledge of Rice. Rice Research Institute, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand, 267 pp. (in Thai)
- Disthaporn, S. 1987. Studies on sampling methods for rice disease in Thailand. Ph.D. Thesis, University of Giessen, Germany.
- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand, pp.333-342 in Zeigler, R.S., Leuang, S.A., and Teng, P.S.(eds). Rice Blast Disease. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Kiyosawa, S. 1972. Genetics of blast resistance. In: Rice Breeding. International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, The Philippines, pp.203-225.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1990 Isolation DNA from fungus mycelia and single spores, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J., and White, T.J., Academic Press, San Diego. Pp. 282-287
- Mekwatanakam, P., W. Kositratana, T. Phromraksa, and R.S. Zeigler. 1999. Sexually fertile Magnaporthe grisea rice pathogenesis in Thailand. Plant Disease. 83:939-943.
- Nicolas, J.T. 1995. Having a blast :exploring the pathogenecity of Magnaporthe grisea. Trend in Microbiology 3:9-16
- Ou, S.H. 1985. Rice disease. Commonwealth mycological institute, Surrey, UK. pp. 109-201.
- Rosero, M.J. 1979. Breeding for blast resistance at CIAT. In. Proceedings of the Rice Blast Workshop. International Rice Research Institute, PO BOX 933, Manila, The Philippines, pp. 63-67.

- Somrith, B.1991. Modern Thai rice varieties: development with allele genes Paper presented in " Thai-IRRI Three Decades of Cooperation" January11, 1991. Rama Gadens Hotel, Bangkok, Thailand. (memo 13 pp.)
- Soubabere , O., Tharreau, D., Dioh, W., Lebrum, M.H., and Notteghem, J.L. 1998. Development and use of SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) to analyse populations of *Magnaporthe grisea*. 2nd International rice blast conference-August 4-7-Montpellier, France.pp.32.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชานานาชาติ ยังไม่ได้ตีพิมพ์
2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์
 - นำผลงานไปบรรยายการควบคุมโรคใบไหม้แก่เกษตรกรในโครงการ 135 มหาวิทยาลัยกับชุมชน
3. เสนอผลงานเป็นโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 ระหว่างวันที่ 18-20 ตุลาคม 2543 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร บกคัดย่อหน้า 539

ความหลากหลายของเชื้อ *Pyricularia grisea* ที่มาจากลักษณะแผลที่แตกต่างกันของโรคใบไหม้ของข้าว
DIVERSITY OF *Pyricularia grisea* POPULATION FROM DIFFERENT LESION TYPES OF RICE BLAST DISEASE

ชวนพิศ บุญชิตศิริกุล^a และ ประสพพร สมิตะมาน^b

Chuanpit Boonchitsirikul^a and Prasartporn smitamana^b

^aDepartment of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;

^bPlant Biotechnology Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;

e-mail address: agicbnc@chiangmai.ac.th

บทคัดย่อ: โรคใบไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. เป็นโรคที่พบระบาดอย่างแพร่หลายรวมทั้งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของข้าวในประเทศไทย โดยทำให้เกิดความเสียหายได้มากกว่า 15% และในกรณีที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถทำให้เกิดความเสียหายได้ไม่ต่ำกว่า 20%-30% เชื้อสาเหตุของโรคสามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต เนื่องจากเชื้อ *Pyricularia grisea* มีความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์จึงทำให้ยากต่อการคัดพันธุ์ต้านทานโรค วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อและความสัมพันธ์ของเชื้อจากลักษณะของแผลที่แตกต่างกัน จากการสำรวจการเข้าทำลายของเชื้อในระยะต้นกล้าของสายพันธุ์ กข 10 ในแปลงเกษตรกรที่ อำเภอเชียงดาวและอำเภอแม่วงก์จำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าแผลมีลักษณะที่แตกต่างกัน 7 ลักษณะ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะ DNA banding pattern พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่แยกจากแผลเหล่านั้นมีความแตกต่างกัน และพบว่าเชื้อที่มาจากแหล่งเดียวกันมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีความหลากหลายในธรรมชาติ ถึงแม้ว่าจะไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างลักษณะแผลและสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุของโรค

Abstract: Rice blast, caused by *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., is widely spread in all rice growing areas and is one of the destructive factors for rice production in Thailand. This disease might cause rice yield loss of more than 15% or occasionally up to 20-30% under favorable conditions. It could infect rice plants in every growth stages. *P. grisea* has varied in genetic diversity that caused difficult to screen for disease resistance. The purpose of this research is to study the relationship between the *P. grisea* population diversity and lesion types. Variation of lesion types within the infected leaves of RD10 variety were found in samples collected from two individual farmer's fields at Mae Wang and Chiang Dow sites. The differences of lesion types were classified into 7 lesion types from 12 isolates. The colony morphology and DNA banding patterns revealed the difference in all isolates. Furthermore, DNA banding patterns of the isolates collected from the same area were mostly similar. There was short distance between genetically difference among isolates used in this study. The result suggested that the pathogens were high diverse in nature and there was no clear relationship between lesion types and the isolates.

Experiment procedure: Fungus isolates were collected from various necrotic spots of rice leaf blast disease from individual of farmer's field at Chiang Dow and Mae Wang site. Symptoms of infected leaves were classified into 7 lesion types, great spindle, moderate spindle, small size spindle, small spot, narrowly elongated spindle, lesion coalesce and gray round shape spindle. Single spore isolation from each collection was cultured on PDA and Prune agar for the colony and conidia morphology studies. After 3 weeks of culture, the fungi were transferred to Fries medium for another 10 days before the mycelia were collected for the DNA extraction following the technique described by Lee and Taylor (1990). The PCR-RAPD method is used for *P. grisea* fingerprinting study as applied for the standard procedure of IRRI. Amplified products were separated by electrophoresis on 1.2 % agarose gel in TBE buffer, stained with ethidium bromide and visualized with UV illumination.

Results, Discussion and Conclusion: Natural infected lesions on the rice leaves were different in size, shape, color and zonate pattern of lesion. These different necrotic spots were not only depended upon environmental conditions, leaf age, age of spots, and degree of susceptible in each cultivar but also lineages of *P. grisea*. Twelve isolates of *P. grisea*, 7 from Chiang Dow and 5 from Mae Wang, were used in this study. Culture morphology varied greatly from isolates and medium used. The mycelium varied from very scanty to a thick cotton mass as well as colour of mycelium varied from whitish or cream to dark gray. Spores number varied from 0 to 6.8×10^4 spores/ml. The average size of conidia varied from $18.7-30.7 \times 8.7-12.5 \mu m$. The DNA banding pattern showed difference in all isolates even with same lesion type from different site. However, the similarity of the pathogens collected from the same area was higher comparing to the pathogens from the different locations. Moreover, they showed the short distance between genetic differed among isolates. Result from this study showed that different lesion types could caused by many factors which affecting symptom development including the biological diversity of the pathogens in those locations.

Reference:

- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand, pp. 333-342 in Zeigler, R.S., Leung, S.A., and Teng, P.S. (eds). Rice Blast disease. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Lee, S.B., and Taylor, J.W., 1990. Isolation of DNA from fungus mycelia and single spores, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H. Sninsky, J.J., and White, T.J., Eds., Academic Press, San Diego, pp. 282-287.

Key word: Blast disease, Diversity, *Pyricularia grisea*

TITLE: Comparision of virulence and variation of rice blast fungus from different cultural practic of rice farmer field in Chiang Mai area

AUTHOR(S): Chuanpit Boonchitsirikul and Pasartporn Smitraman

ADDRESS: Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

Objective: To compare virulence and variation of rice blast fungus (*Pyricularia grisea*) from different rice farmer cultural practic in Chiang Mai area

Methods: Fungus isolated were collected from three different cultural practice of rice farmer field as follow : 1) growing rice all around the year 2) growing rice once a year and without sanitation of rice field 3) rotation growing rice with other plants. Single spore isolation from each collection was cultured on PDA , Prune and Polish agar for the colony and conidium morphology studies. After 3 weeks of culture, the fungi were transferred to Fries medium for another 10 days before the mycelia were collected for the DNA extraction following the technique described by Lee and Taylor (1990). The rep-PCR method is used for *P. grisea* fingerprinting study as applied for the standard procedure of IRRI (1)

Results: The occurrence of rice blast disease in each rice farmer field was differentiated. Results suggest that the variation and virulence of blast fungus could be linked to cultural practic of farmer and genetic diversity of the host. Serious rice infection of both leaf and neck blast disease was prevalence in the field that growing rice every season and without sanitation before pianting. The less occurrence of infection was found in the field where had rotation with other plants. Culture morphology of blast fungus varied greatly between isolates and medium used. The DNA banding pattern showed that the overall similarity ranging from as low as 30% to 85% There were high similarity in contemporary collection of blast fungus at the same time and the similarity of blast fungus had correlated with the blast fungus infection of rice next year growing.

Conclusion: These results indicated that rice cultural practic played an important roll of occurrence of rice blast disease in rice farmer field. The DNA banding pattern of fungus had high similarity in contemporary collection of blast fungus at the same time.

Selected References:

1. George MLC, Nelson RJ, Zeigler RS and Leung H 1998 Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, 88, 223-229.

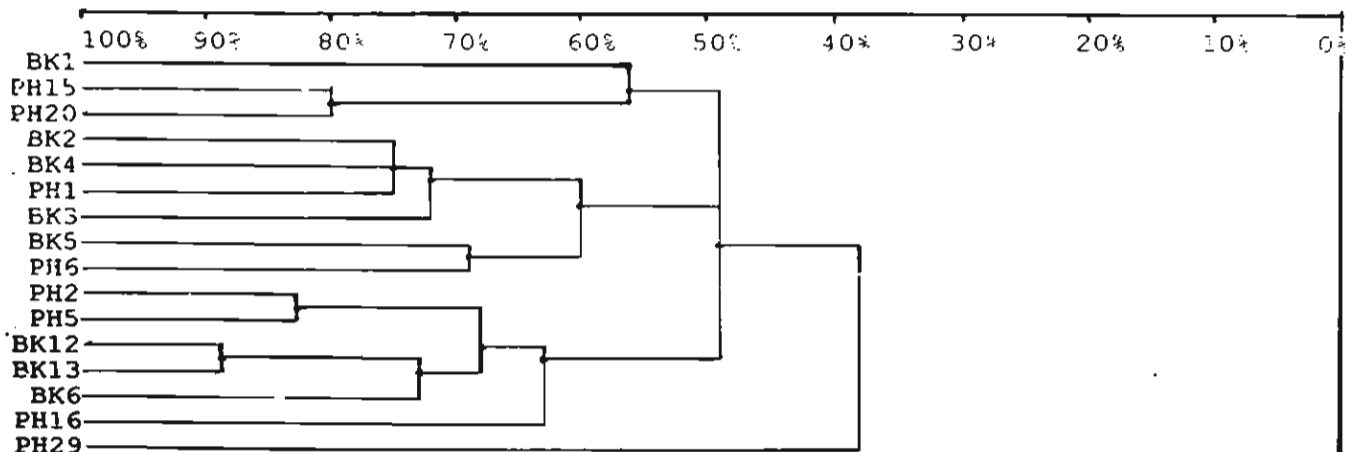


Fig.1 Dendrogram of *Pyricularia grisea* that collected from Amphur Chiang Doaw (PH) and Ban-kad (BK).

Keyword: *Pyricularia grisea*, rice blast, variation, rice, Thailand