

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะของเชื้อราโรคใบไหม้

โรคใบไหม้ของข้าว (rice blast disease) Saccardo ได้ตั้งชื่อเชื้อราสาเหตุว่า *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. หรือ *P. oryzae* Cav. และ perfect stage ของเชื้อคือ *Magnaporthe grisea* Hebert (Barr.) (Ou, 1985) นอกจากนี้อนงค์และคณะ (2542) รายงานเพิ่มเติมว่า เชื้อราจำแนกได้เป็น 2 ชนิดคือ *P. oryzae* Cav. เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าวและหญ้าบางชนิด ส่วน *P. grisea* (Cooke) Sacc. เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในหญ้าหลายชนิดและพืชอื่นๆ เชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันที่อาการและขนาดสปอร์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *P. oryzae* Cav. และ *P. grisea* (Cooke) Sacc. สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวและหญ้าบางชนิด (อนงค์และคณะ 2542)

ข้อแตกต่าง	<i>P. oryzae</i>	<i>P. grisea</i>
1. อาการ	ใบจุดสีเขียวหม่น ขยายเป็นแผลรูปกระสวย ขอบแผลสีเขียวอมเทาและขอบนอกสีเหลือง	ใบจุดสีน้ำตาลอมม่วงหรือน้ำตาล ขยายเป็นแผลวงกลม ขอบสีน้ำตาลอมม่วง
2. สปอร์	17-23 (21.2) × 8-11 (7.6) μ	17-28 (20.9) × 6-9 (7.6) μ
3. พืชอาศัย	ข้าวและหญ้าบางชนิด	หญ้าบางชนิดและพืชอื่นๆ

2. ลักษณะอาการของโรคใบไหม้ในข้าว (สมคิด, 2532)

ระยะกล้า ใบมีแผลสีน้ำตาลลักษณะคล้ายรูปดาหรือรูปกระสวย มีสีเทาตรงกลาง ขนาดแตกต่างไปตามความคืบหน้าของสายพันธุ์ข้าว ซึ่งอยู่ระหว่าง 2-5 × 10-15 มม. โดยมีแผลเป็นจุดขนาดเล็กในพันธุ์ต้านทานและมีแผลขนาดใหญ่หรือรูปดาในพันธุ์อ่อนแอ และแผลสามารถขยายลุกลามจนทั่วบริเวณใบ ในกรณีที่โรครุนแรงต้นกล้าจะแห้ง และพุ่มตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้

ระยะแตกกอ พบอาการของโรคได้ทั้งใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดของแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะต้นกล้า แผลอาจถูกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ กาบใบจะมีลักษณะแผลชำสีน้ำตาลดำและทำให้ใบหลุดจากกาบใบ

ระยะคอรวง ถ้าเชื้อราเข้าทำลายในระยะเริ่มออกรวงจะทำลายทุกส่วนของรวงข้าว ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาล เรียกการเข้าทำลายในระยะนี้ว่า "ไหม้คอรวง" (neck blast neck rot และ rotten neck) การเข้าทำลายในระยะนี้จะทำให้เมล็ดลีบ แต่ต้นเชื้อเข้าทำลายในระยะใกล้เก็บเกี่ยว คอรวงจะปรากฏรอยแผลชำสีน้ำตาล ทำให้เปราะหักพับง่ายและเมล็ดข้าวร่วงหล่นเสียหาย

3. การระบาดของโรคใบไหม้

On (1980) รายงานว่าในอดีตประเทศในเขตร้อนพบการระบาดของโรคในข้าวอยู่ระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ปัจจุบันพบว่ามีการทำนามากกว่า 1 ครั้งต่อปี ทำให้พบโรคนี้ระบาดตลอดทั้งปี และพบระบาดรุนแรงในแปลงนาหว่านที่มีการปลูกข้าวหนาแน่น การระบายอากาศไม่ดี การใส่ปุ๋ยปริมาณมาก และสภาพอากาศมีความชื้นสูงและเย็นในเวลากลางคืนซึ่งเหมาะสมต่อการพัฒนาการของเชื้อรา อย่างไรก็ตามประเทศในเขตอบอุ่นสามารถพบการระบาดของโรคได้ตลอดปีเช่นเดียวกัน เพราะเชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูได้บนตอซังและเมล็ดพันธุ์ การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อราสาเหตุพบว่า เชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ แพร่กระจายไปตามดิน น้ำ ลม และเศษฟางข้าว การเข้าทำลายของเชื้อราพบว่าเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้ภายใน 4-5 ชั่วโมงหลังการเข้าทำลาย เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม และสปอร์ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ออกได้ภายใน 30-40 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา 1 สปอร์อาจสร้างสปอร์ใหม่ได้ตั้งแต่ 20 สปอร์ขึ้นไป ฉะนั้น 1 คืบ แผล 1 จุดอาจสร้างสปอร์ได้ถึง 4,000-6,000 สปอร์ และสามารถสร้างได้นาน 2 สัปดาห์ ถ้ามีแผลบนใบมาก จำนวนสปอร์ที่สร้างจึงมีมาก อย่างไรก็ตามสปอร์ที่สร้างขึ้นมาสามารถแพร่กระจายตามลมได้ถึง 1-2 เมตร ในการเข้าทำลายพืชครั้งใหม่ของสปอร์เหล่านี้ใช้เวลา 7-8 ชั่วโมง และเชื้อราชุดใหม่จะสร้างได้ภายใน 6-7 วัน

เนื่องจากเป็นโรคที่มีการระบาดตลอดทั้งปีจึงทำให้มีการระบาดของโรคเกิดได้ทั่วไปในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกข้าว อย่างเช่นปี พ.ศ. 2505 เกิดโรคใบไหม้ระยะกล้าในประเทศญี่ปุ่นเป็นพื้นที่ถึง 5.4 ล้านไร่ (865,000 เฮกตาร์) และโรคไหม้คอรวง 4.5 ล้านไร่ (721,000 เฮกตาร์) ในประเทศอินเดียระหว่างปี พ.ศ. 2503-2504 ผลิตเสียหายเนื่องจากโรคนี้ถึง 266,000 ตัน ในประเทศเกาหลีเมื่อปี พ.ศ. 2521 โรคไหม้คอรวงทำให้ผลผลิตลดลงถึง 30-40% และในประเทศฟิลิปปินส์พื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50% Katsube และ Koshimizu ได้ประเมินความเสียหายที่

เกิดจากโรคไหม้โดยรวมว่าทุกๆ 10% ของโรคไหม้โดยรวมที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 6% และเมล็ดมีท้องไขเพิ่มขึ้น 5% ซึ่งทำให้คุณภาพของเมล็ดลดลง 1-2 ระดับ และรายได้สุทธิลดลง ประมาณ 7-9% (ทัศนีย์, 2541) ในปี 1995 บริเวณ Uzunlik pr และ Edime ซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวของประเทศตุรกี พบว่าโรคไหม้ทำให้ผลผลิตเสียหายถึง 20 และ 100 % ตามลำดับ เชื้อราเข้าทำลาย ข้อต่อลำต้นและคอรวงเป็นส่วนใหญ่ (Surek and Beser, 1997) จากการรายงานของ Long *et al.* (1998) ได้รายงานการระบาดของเชื้อราที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เมือง Arkansa ในปี 1996-1997 ว่าการใช้เมล็ดที่ติดเชื้อมาปลูกจะทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้สูงถึง 40% ในตอนกลางของฤดูปลูก และสูงถึง 90% เมื่อสิ้นฤดูปลูก สรุปได้ว่าเมล็ดที่ติดเชื้อเป็นแหล่งของสปอร์เชื้อราที่สามารถเข้าทำลายต้นกล้าข้าวได้ในระยะเวลาต่อมา นอกจากนี้ Manandhar *et al.* (1998) ได้ศึกษาในประเทศเนปาลพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่เข้าทำลายเมล็ดเดิมมากกว่าเมล็ดสืบทำให้เมล็ดสูญเสียความงอกแต่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่ำกว่า 4 % การนำเมล็ดข้าวไปเพาะที่อุณหภูมิ 25-30 °C พบพัฒนาการของโรคสูงกว่าการเพาะที่ 15-20 °C อย่างไรก็ตามวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การเป่าลมหรือการอบแห้งสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราได้

4. ความหลากหลายของเชื้อราโรคไหม้

จากรายงานโรคไหม้ของข้าวพบบันทึกครั้งแรกในประเทศจีนเมื่อปี ค.ศ. 1637 หลังจากนั้นได้พบรายงานในประเทศต่างๆ ดังนี้ ญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1704 อิตาลีในปี ค.ศ. 1828 สหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1876 และในอินเดียในปี ค.ศ. 1913 และจากรายงานมีการแพร่กระจายไปทั่วโลกถึงประมาณ 85 ประเทศ โดยเชื้อโรคสามารถปรับตัวให้เข้าทำลายได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ กัน (ทัศนีย์, 2541)

เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยตระกูลหญ้าได้มากกว่า 50 ชนิดรวมทั้งพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวฟ่าง (Nicholas, 1995) การศึกษาของ Mackill และคณะ (1986) พบพืชอาศัยชนิดใหม่ของ *P. oryzae* คือ *Rottboellia exaltata* (หญ้าโป่งคายน) *Echinochloa colona* (หญ้าข้าวนก) *Leersia hexandra* (หญ้าไทร) *Brachiaria distachya* และ *B. mutica* (หญ้าขน) *Leptochloa chinensis* (หญ้าดอกขาว) *Panicum repens* (หญ้าชันกาด) *Pennisetum purpureum* (หญ้าขจรจบ) *Digitaria ciliaris* (หญ้าตีนนก) และ *Eleusine indica* และ *E. corocana* (หญ้าตีนกา) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hunst และคณะ (1986) เกี่ยวกับพืชอาศัยชนิดใหม่ของ *Pyricularia* sp. คือ หญ้าตีนกา (finger millet: *Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) หญ้าตีนกา (goosegrass: *E. indica* (L.) Gaertn.) หญ้าหวาย (weeping lovegrass: *Eragrostis curvula* (Schrad.) Ness) และหญ้าตีนนก (crabgrass: *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) ในทำนองเดียวกัน

Rodriguez *et al.*, (1999) ได้รายงานว่าการพิชิตยีนชนิดใหม่ของเชื้อรา *P. grisea* ที่รัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศเม็กซิโก ซึ่งพบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่มากกว่า 8-10 ล้านเอเคอร์ คือ *Cenchrus ciliaris* L. (Buffelgrass) ซึ่งเป็นเชื้อเดียวกับที่พบระบาดใน *Pennisetum* spp. สปอร์มีขนาด $8.5-10.1 \times 20.6-26.3 \mu$ รูปร่างรียาว ใส อาการบนใบมีลักษณะเป็นแผลสีคล้ำ จากนั้นจึงพัฒนาเป็นสีดำ รูปร่างกลมรี เป็นแผลเนื้อตายขอบสีแดงและมีวงสีเหลืองล้อมรอบ ถ้าอาการรุนแรงอาจทำให้ใบแห้งตายได้

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคใบไหม้

การศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรเชื้อรามีความสำคัญ เพราะทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างพิชิตยีนของเชื้อราและเกิดโรค ข้อมูลที่เกี่ยวกับการกระจายตัวทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราในพื้นที่ขนาดเล็กทำให้เข้าใจความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับใหญ่ การศึกษาทางอณูโมเลกุล การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ลักษณะของ mating type auxotrophic mutant melanin deficiency drug resistant และ isozyme polymorphism ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา จากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับ gene cloning fungal transformation และ genomic-mitochondria DNA-RFLP analysis ได้ (Xia *et al.*, 1993)

Leung and Williams (1986) รายงานว่าวิธีการศึกษความหลากหลายของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะของ enzyme polymorphism พบว่าลักษณะ polymorphism ของเอนไซม์ 12 ชนิดที่ใช้ศึกษาเชื้อราจำนวน 335 ตัวอย่างที่ได้จากพื้นที่ปลูกข้าว 12 แห่งทั่วโลก สามารถจัดกลุ่ม Electrophoretic types (Ets) ได้ 6 แบบ อย่างไรก็ตาม Leung and Williams (1985) ได้การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อโรคใบไหม้ที่ได้จากข้าวและวัชพืช เช่น หนวดดินกา (finger millet: *Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) และหญ้าน้ำว (weeping lovegrass : *Eragrostis curvula* (Schrud.)) โดยใช้ Electrophoretic enzyme เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ภายในกลุ่มด้วยเอนไซม์ 6 ชนิด คือ Phosphoglucumutase (PGM) Phosphoglucose isomerase (PGI) Glycerate-2-dehydrogenase (G2DH) Malate dehydrogenase-3 (MDH-3) Lactate dehydrogenase-1 (LDH-1) และ Lactate dehydrogenase-3 (LDH-3) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมด้วยยีนเพียงตัวเดียว พบว่า LDH-3 และ MDH-3 มีความแตกต่างของตำแหน่งค่อนข้างสูง การควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของการมีสองเพศในสปอร์เดียวกัน ทำให้ทราบความเป็นเพศผู้ของเชื้อรา อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเดี่ยว การจัดกลุ่มด้วยเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิด mating type และ

ลักษณะการมีสองเพศในสปอร์เดียวกัน จึงให้เห็นว่า PGM และ G2DH มีความสัมพันธ์กันเพียง 43% เท่านั้น

Devulapalle และ Suryanarayanan (1995) รายงานว่าในปี 1971 Hebert พบ perfect stage ของ *P. grisea* เป็นครั้งแรก การศึกษา perfect stage ของเชื้อรา ในประเทศอินเดียใช้เชื้อราที่ได้จาก ข้าว จำนวน 11 สายพันธุ์ *Eleusine coracana* จำนวน 17 สายพันธุ์ *Setaria italica* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Pennisetum typhoideum* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Zingiber officinale* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Curcuma longa* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Panicum repens* จำนวน 8 สายพันธุ์ *Brachiaria mutica* จำนวน 4 สายพันธุ์ และ *Leersia hexandra* จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยทำการแยกสปอร์เชื้อราในพืชแต่ละชนิดมากกว่า 5 สปอร์ ทำให้ได้เชื้อราทั้งหมดจำนวน 172 สายพันธุ์ แต่ไม่พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ใดสามารถสร้างสปอร์ได้ เพียงแค่ได้โครงสร้างที่เหมือนกับ perithecia เท่านั้น แสดงว่าการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศในประเทศอินเดียพบมาก แต่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรคและความรุนแรงของโรค เมื่อเลี้ยงเชื้อราที่เข้าทำลายหญ้าตีนกาสายพันธุ์ที่เป็นกะเทยบนอาหาร Oatmeal agar หรือ Potato-sucrose agar สามารถกระตุ้นให้สร้าง perithecia ได้ การเติม zinc และ methionine รวมทั้งจันพืช ใน Modified Sachs's medium ทำให้ปริมาณ fruiting body เพิ่มขึ้น การศึกษาค้นคว้าพบลักษณะ mating type ของข้าว หญ้าตีนกาและหญ้าข้าวนก และพบว่าการสร้าง ascospore ของเชื้อรา *M. grisea* ควบคุมโดยยีนตำแหน่งเดียว แต่ประสิทธิภาพในการสร้าง perithecia (เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย) ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง การสืบพันธุ์และความสามารถในการทำให้เกิดโรคในพืชอาศัยต่างๆ เป็นการกระจายตัวแบบอิสระ และพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวพิษ การศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา สอดคล้องกับความเป็นหมันของเพศเมีย สายพันธุ์ที่ไม่เป็นหมันเป็นตัวแทนของเพศผู้เพียงอย่างเดียว จึงทำให้สัดส่วนของ mating type เกิดการเอนเอียง การมีส่วนเพศผู้น้อยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเพศภายในกลุ่มของเชื้อรา ถึงแวคคูลัม และทำให้เกิดการกลายพันธุ์

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ mating type ของเชื้อราโรคไหม้โดย Mekwatanakam และคณะ (1999) พบว่าเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นบริเวณที่เพาะปลูกข้าวมานานและถือเป็นแหล่งผลิตข้าว เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี MGR586 fingerprint พบกลุ่มเชื้อราถึง 50 lineages แสดงว่าเชื้อรามีความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและ mating type ของเชื้อราจำนวน 431 ตัวอย่างในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศกับสายพันธุ์ตรวจสอบที่เป็นกะเทยพบเชื้อรา 67% เป็นหมัน แต่สายพันธุ์ที่สืบพันธุ์ได้มีปริมาณ ascospore ที่แตกต่างกัน การเป็นกะเทย และ/หรือ การเป็นสายพันธุ์เพศเมียพบในทุกพื้นที่ แต่สร้าง perithecia ได้ต่ำกว่า 10 perithecia ต่อตารางเซนติเมตร แต่มีบางตัว

อย่างที่สร้าง perithecia ได้ถึง 20 perithecia ต่อตารางเซนติเมตร ในประเทศจีน Li และคณะ (1997) ได้ศึกษาการระบาดของโรคในจังหวัดยูนนานพบว่า cross-fertile ของเชื้อรา *M. grisea* เข้าคู่กับเชื้อราที่ได้จากข้าวนาข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวป่า (*O. rufipogon*) จากข้าวนาไร่สามารถเข้าคู่กันเองได้มากกว่าข้าวนาข้าว เชื้อราจากข้าวป่าหนึ่งสายพันธุ์เข้าคู่กับเชื้อราจากข้าวนาข้าวและสามารถสร้าง ascospore ได้ นอกจากนี้เชื้อราจากข้าวไร่ยังเข้าคู่กับเชื้อราจากหญ้าตีนกา (*Eleusine indica* และ *E. coracana* Gaertn.) และหญ้าตีนนก (*Digitaria sanguinalis*) แต่ไม่สร้างสปอร์ อาจกล่าวได้ว่าเชื้อราจากข้าวป่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อราจากข้าวที่ปลูกทั่วไปมากกว่าเชื้อราจากวัชพืช ซึ่งใกล้เคียงกับ Vijji และ Gnanamanickam (1998) ศึกษาการเข้าคู่ของเชื้อราในเขตตอนใต้ของประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อราที่ได้จากข้าวและวัชพืช เช่น หญ้าตีนกาและหญ้าขนเข้าคู่กันและสร้าง perithecia ได้ แสดงว่าเชื้อราจากพืชอาศัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน

Borromeo และคณะ (1993) รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุลของเชื้อราทำให้พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อราที่ได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน การวิเคราะห์ DNA hybridization พบว่าจีโนมของเชื้อที่เข้าทำลายข้าวมีบางส่วนของ DNA ที่อาจมี/ไม่มีในเชื้อราที่เข้าทำลายวัชพืช แสดงว่า *P. grisea* ที่ได้จากพืชอาศัยต่างชนิดและต่างสถานที่อาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนั้นจึงมีพัฒนา DNA probe เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับ DNA ของเชื้อราโรคไหม้มากขึ้น และจากรายงานของ Levy และคณะ (1993) กล่าวไว้ว่า probe ที่ได้พัฒนาขึ้นมามีลำดับเบสบางส่วนของ DNA เชื้อรา เช่น MGR586 (ก่อนหน้านี้เรียกว่า pCB586) เมื่อนำ probe นี้ติดกับโครงสร้างของ EcoRI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP พบการเข้าคู่กับ DNA ของ *P. grisea* ที่เข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าบางส่วน เมื่อพิจารณา genetic mapping พบว่า MGR586-RFLP กระเจียบบนโครโมโซมของเชื้อรา ในแต่ละตำแหน่งของยีน การที่พบ MGR586-RFLP หลายๆ แบบทำให้ทราบว่าเชื้อรามีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ Devulapalle และ Suryanarayanan (1995) ที่ศึกษาจีโนมของเชื้อรา *M. grisea* พบ *Magnaporthe grisea* repeat (MGR) ที่ซ้ำกันหลายตำแหน่ง จึงนำมาใช้เป็น genetic marker เพื่อคุณลักษณะที่เฉพาะเจาะจงบางอย่างในการโคลนยีน รวมทั้งการระบาดของโรคและวิวัฒนาการของเชื้อรา อย่างไรก็ตาม Farman และคณะ (1996) รายงานไว้ว่าลำดับของ MGR ที่ใช้ศึกษาประชากรของเชื้อราโรคไหม้กันอย่างกว้างขวางคือ MGR586 ที่ได้จาก plasmid probe pCB586 ซึ่งจัดแบ่งกลุ่มเชื้อราได้หลาย lineage การศึกษาการกระจายตัวของ MGR586 ในจีโนมของเชื้อรา *M. grisea* พบว่ามีลำดับเบสอยู่ในเส้น DNA และเมื่อศึกษา plasmid อีก 4 ชนิดพบว่ามีลำดับเบสเช่นเดียวกับ MGR586 โดยส่วนที่เหมือนกันมีลำดับเบสยาว 740 bp อยู่บริเวณปลายของ pCB586 plasmid ขนาด 2.6 kb ดังนั้น fingerprint ที่ได้จึงเป็นเพียงบางส่วนของเส้น DNA เชื้อรา เมื่อศึกษาหาลำดับ

เบสของ plasmid เหล่านี้มีลำดับเบสเหมือนกับ inverted repeated transposon แสดงว่า plasmid เหล่านี้มีลำดับเบสบางส่วนเหมือนกับ MGR586 บนเส้น DNA เชื้อราหลายตำแหน่ง การศึกษาของ Shull และ Hamer (1996) ได้รายงานที่สามารถจำแนกกลุ่มเชื้อราโรคไหม้ของข้าวด้วยวิธี restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) กับ MGR586 ทำให้แยกได้เป็น MGR586-P1 และ MGR586-P2 ที่เป็น sister-spore pair ของ complete tetra ที่มีจุดเริ่มต้นใกล้เคียงกับ long-terminal-repeat (LTR) ของ retrotransposon เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ P1 และ P2 (progenitor polymorphism) พบว่าอยู่บนชิ้น MGR586-PL (PL) ตำแหน่งเดียวกัน โดยที่ส่วนของ PL จะอยู่ไกลจาก telomeric region และสร้าง P1, P2 และ P3 ได้ การทดลองพบว่าตำแหน่งที่ทำให้เกิด DNA fingerprint อาจมีความหลากหลายมาก ดังนั้นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะ DNA fingerprint ของเชื้อรา *M. grisea* จึงมีมากมาย การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นโดย Don และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษา DNA fingerprinting ของเชื้อราโรคไหม้ด้วย MAGGY และ MGR586 พบว่าเชื้อราจำนวน 278 ตัวอย่างที่เก็บระหว่างปี 1993-1997 แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ JL1 และ JL2 (Japanese Lineage) เชื้อกลุ่ม JL1 เป็นกลุ่มที่มีมากถึง 97% โดยเชื้อรา 2 ใน 5 ส่วนเหมือนกับเชื้อที่ทำการศึกษาในปี 1960 อาจกล่าวได้ว่า โครงสร้างประชากรเชื้อราในประเทศญี่ปุ่นมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เชื้อราทั้ง 2 กลุ่มมีระดับความรุนแรงใกล้เคียงกันและ pathotype กับกลุ่ม lineage ไม่มีความสัมพันธ์กัน ทั้งการศึกษาด้วย MAGGY และ MGR586 ให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน สรุปได้ว่า MAGGY สามารถใช้เป็น Probe เพื่อศึกษาประชากรของเชื้อราโรคไหม้ได้อีกวิธีการหนึ่ง อย่างไรก็ตามรายงานของ Viji และคณะ (2000) ที่ศึกษา DNA polymorphism ระหว่างเชื้อรา *M. grisea* จากข้าวและหญ้าตีนกา โดยวิเคราะห์จีโนมของเชื้อราด้วย MGR586 พบว่า DNA เชื้อราจากหญ้าตีนกามีแถบปฏิกิริยาเพียง 1 แถบ และแยกชิ้นส่วนที่มีขนาดแตกต่างกันได้เป็น 2 ส่วน แต่แถบปฏิกิริยาที่เกิดจาก DNA ของเชื้อราจากข้าวมีแถบปฏิกิริยาหลายแถบ แสดงว่าประชากรเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวและ หญ้าตีนกามีความแตกต่างกัน

Kachroo และคณะ (1994) รายงานเกี่ยวกับการจำแนกเชื้อราโดย Pot2 ที่มีขนาด 1857 bp และมี terminal inverted repeated (TIRs) ขนาด 43 bp กับ direct repeated ขนาด 16 bp ลักษณะเช่นนี้คล้ายกับ transposable elements Tc1 และ mariner ของ *caenorhabditis elegans* กับ *drosophila* ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่ามีส่วนของ DNA เชื้อราที่เข้าทำลายข้าวและวัชพืชเหมือนกับ Pot2 ประมาณ 100 ชุด คอจีโนมเชื้อราแบบ haploid หนึ่งชุด นอกจากนี้การรายงานของ George และคณะ (1998) กล่าวว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้ทางอ้อมโมเลกุลทำได้วิธี เช่น การใช้ RAPD-DNA กับ primer J-06 และ MGR586-RFLP ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในหลายประเทศ แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากวิธีการดังกล่าวใช้เวลานานและสิ้นเปลืองแรงงาน ทำให้ไม่

สะดวกในการนำมาวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้ MGR586 มีส่วนของลำดับเบสที่เหมือนเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าวเพียง 45-50 ชุดต่อจีโนม และมีส่วนที่เหมือนเชื้อราโรคใบไหม้ของวัชพืชเพียง 1 ใน 3 ส่วนเท่านั้น จึงมีการนำเอา *Pot2* primer ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อราโรคใบไหม้มากกว่า probe ชนิดอื่นๆ และมีความเฉพาะเจาะจงสูง *Pot2* primer ชนิดนี้แยกได้จาก *M. grisea* ที่มีองค์ประกอบของ MGR586 และ Fot 1 ที่ได้จาก *Fusarium oxysporum* และ primer เหล่านี้สามารถเข้าสู่กับลำดับเบสของเชื้อราโรคใบไหม้ได้แต่มีลำดับของเบสที่แตกต่างกัน *Pot2* primer มีขนาด 1857 bp (*Pot2*-1 5' CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT 3' และ *Pot2*-2 5' CCCTCATTCGTCACACGTTC 3') มีลำดับเบสที่ประกอบด้วยส่วนของ *M. grisea* ที่เข้าทำลายข้าวและวัชพืชในสัดส่วนใกล้เคียงกัน การนำเอา *Pot2* primer มาใช้ร่วมกับเทคนิค repetitive element-based polymorphism chain reaction (rep-PCR) ซึ่ง *Pot2* rep-PCR เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมาก เพราะเป็นการรวมเทคนิคจาก PCR แบบธรรมดาเข้ากับวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) ที่เคยใช้ในการศึกษา fingerprint ของ แบคทีเรียในดิน แบคทีเรียโรคพืช และเชื้อรา จากการศึกษา DNA fingerprint ทำให้ทราบกลุ่มประชากรของเชื้อ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ เพิ่มมากขึ้น ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่มีประสิทธิภาพกว่าคือ การใช้เทคนิค rep-PCR ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อมากกว่า

6. ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราโรคใบไหม้

Vivian และคณะ (1997) รายงานว่าโรคใบไหม้ของข้าวเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของข้าว การใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอในพื้นที่ปลูกข้าวทั่วโลก ทำให้เชื้อรามีความหลากหลาย ด้านความสามารถในการทำให้เกิดโรคค่อนข้างสูง นอกจากนี้ Mekwatanakarn (2000) รายงานว่าข้าวโดยทั่วไปมีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เนื่องจากข้าวมีถิ่นกำเนิดต่างกัน และตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมๆ ได้แตกต่างกันด้วย จึงทำให้ความต้านทานต่อเชื้อโรคราใบไหม้โดยทั่วไปอยู่ในระดับปานกลางเท่านั้น จากรายงานของ Singburadom และคณะ (1995) รายงานว่าการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคสปอร์เชื้อรา มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่เชื้อราสูญเสียความสามารถในการเกิดโรค จึงใช้สารพิษที่เชื้อโรคสร้างเป็นตัวคัดเลือกแทน ซึ่งสอดคล้องกับ Ram และคณะ (1997) ที่รายงานว่าการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในสภาพไร้วัยสปอร์เชื้อรา มีข้อจำกัดคือ ต้องขึ้นกับสภาพของฤดูกาล ดังนั้นจึงศึกษาวิธีการที่สะดวกขึ้น ดังนั้นการศึกษากการใช้สารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น โดยพบว่าสารพิษมีประสิทธิภาพเหมือนการปลูกเชื้อด้วยสปอร์เชื้อรา

Carlson (1973) เป็นบุคคลแรกที่รายงานเกี่ยวกับการใช้สารเคมีซึ่งคล้ายกับสารพิษที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (wildfire disease) ในการคัดเลือกยาสูบให้ต้านทานต่อโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำให้เซลล์ที่ต้านทานต่อสารพิษเจริญพัฒนาเป็นต้นได้ Nicholas (1995) รายงานว่าเชื้อโรคใบไหม้สร้างสารพิษได้หลายชนิดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น pyricularine pyricularic acid coumarin pyrichalasin H pyricularol pyricularol tyrosol picolinic acid และ tenuazonic acid รวมทั้ง endoxylanase ซึ่งสามารถทำลายเซลล์ต้นข้าวในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ อาจกล่าวได้ว่าสารพิษเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราโรคใบไหม้ และจากการศึกษาพบว่าสารพิษ pyricularine ก่อให้เกิดอาการจุดสีน้ำตาล (necrotic) คล้ายคลึงกับลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค และยับยั้งการเจริญของต้นกล้า การศึกษาต่อมาพบ tenuazonic acid ในใบข้าวที่เป็นโรค ซึ่งสอดคล้องกับ Tsuneo และคณะ (1996) ที่รายงานว่าเชื้อราโรคใบไหม้สร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น tenuazonic acid pyricularol และอนุพันธ์ของสาร สารพิษที่สร้างขึ้นทุกชนิดเป็น non-host selective toxins มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดแผลตายของเนื้อเยื่อ บทบาทของสารพิษที่สร้างเมื่อเชื้อราเข้าทำลายเกี่ยวข้องกับการเจริญของเส้นใยเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช โครงสร้างทางเคมีและปฏิกิริยาของสารพิษ นอกจากนี้ Vivian และคณะ (1997) กล่าวว่าเมื่อเชื้อราเริ่มงอกจะสร้างสารพิษอีกชนิดหนึ่งคือ dihydropyricularol แต่ไม่พบ tenuazonic acid และ pyricularol อาจเป็นเพราะ dihydropyricularol อาจเป็นสารตั้งต้นของ pyricularol การศึกษาของ Singburadom และคณะ (1998) พบว่า tenuazonic acid ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าวและทำให้เกิดอาการของโรคไหม้ได้ และที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm สารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของยอดและรากและทำให้เกิดจุดสีน้ำตาล รวมทั้งเกิดอาการของโรคไหม้เมื่อใช้หยดบนใบข้าว (detached leaves technique) การศึกษาหาค่า crude extract toxins ของเชื้อราพบว่าสารนี้เข้าทาง hydathode และรูเปิดธรรมชาติและทำให้เกิดโรคไหม้ได้ อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคมียังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคืออายุต้นข้าว และความเข้มข้นของ crude extract toxins ระดับที่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของโรคไหม้ คือ ต้นข้าวอายุ 20-30 วัน และความเข้มข้นของ Crude extract toxins ที่เหมาะสมคือ 25% (w/v) ในทำนองเดียวกัน Kozaka และคณะ (1985) ศึกษาสารพิษบริสุทธิ์ที่สกัดจาก culture filtrate ของเชื้อราทำให้เกิดโรคไหม้คอรวง และเมื่อทดสอบกับต้นข้าว พบว่าสารพิษไปขัดขวางทางเดินของน้ำโดยเฉพาะตรงข้อของต้นข้าว และยับยั้งการเจริญของพืชโดยรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ระดับไรโบโซม ความเข้มข้นของสารพิษที่เพิ่มขึ้นขนาดของแผลจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ Chaudhary และคณะ (1995) ศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ crude extract ของเชื้อราโรคใบไหม้ พบว่า crude extract ก่อให้เกิดอาการของโรคบนใบข้าวคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา ระดับความรุนแรง

ของแผลเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของ crude extract เพิ่มขึ้น และพบว่าพันธุ์ข้าวมีการตอบสนองต่อ crude extract แตกต่างกัน การศึกษาของฉรงค์ และคณะ (2538) ที่ทำการแยกสารพิษบริสุทธิ์ tenuazonic acid จาก crude extract ของเชื้อราโรคใบไหม้ พบว่าสารพิษทำให้เกิดอาการของโรคบนใบข้าวเหมือนกับอาการที่เกิดจากเชื้อรา การตอบสนองต่อสารพิษมีความแตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นต่างกันพบว่าพันธุ์ข้าวมีการตอบสนองต่อสารพิษต่างกันด้วย จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารพิษ tenuazonic acid เป็น pathotoxin ก่อให้เกิดอาการโรคไหม้ในข้าว การศึกษาของ Chaudhary และคณะ (1997) ได้รายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการใช้ crude extract ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ควรทำบาดแผลเป็นสิ่งจำเป็นต่อการก่อให้เกิดอาการของโรคก่อนใส่สารพิษลงบนใบข้าว แต่สารพิษสามารถก่อให้เกิดอาการของโรคได้ทั้งที่ทำแผลก่อนและไม่ทำแผล วิธีการหยดสารพิษโดยใช้ micropipette เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการทดสอบสารพิษบนใบพืช ในขณะที่วิธีการฉีดพ่นเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบสารพิษบนต้นพืชทั้งต้น การใส่สารพิษโดยใช้ micropipette ก่อให้เกิดอาการของโรคคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อรา ในขณะที่อาการที่เกิดจากวิธีการฉีดพ่นเกิดเป็นจุดเซลล์ตายสีน้ำตาล จากการทดลองสรุปได้ว่าสามารถใช้สารพิษในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคได้