โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประเมินความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อโรคใบขีดโปร่งแสง

ชื่อนิสิต นางสาวปาริชาติ มากเจริญ

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การประเมินความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อโรคใบขีดโปร่งแสง

นางสาวปาริชาติ มากเจริญ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Evaluation of bacterial leaf streak resistance in rice lines

Miss Parichat Makjareon

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2017

ชื่อเรื่อง	การประเมินความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อโรคใบขีดโปร่งแสง
ชื่อนิสิต	นางสาวปาริชาติ มากเจริญ
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงาน	ดร.พยอม โคเบลลี่
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.พยอม โคเบลลี่)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การประเมินความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อโรคใบขีดโปร่งแสง
ชื่อนิสิต นางสาวปาริชาติ มากเจริญ
สาขาวิชา พฤกษศาสตร์
ภาควิชา พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงาน ดร.พยอม โคเบลลี่
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นแหล่งอาหารหลักที่สำคัญของโลก โดยประเทศไทยมีการส่งออกข้าวเป็นอันดับต้นๆของโลก ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวต่อไร่ที่ต่ำกว่าประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชีย ซึ่งสาเหตุเกิดจากความอุดมสมบูรณ์ของดิน ศักยภาพของพันธุ์ข้าว และความเสียหายของผลผลิตข้าวที่เกิดโรคและแมลงศัตรูข้าว โรคข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญส่งผลต่อผลผลิตข้าวในประเทศไทยโรคหนึ่ง ก็คือ โรคใบขีดโปร่งแสง เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) วิธีการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพสูง คือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามการที่จะได้มาซึ่งพันธุ์ต้านทานจะต้องมีแหล่งพันธุ์กรรมยีนต้านทานเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแหล่งพันธุ์กรรมยีนต้านทานมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง จึงได้ทำการประเมินความต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสงในสายพันธุ์ข้าวจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ IRBB5 IRBB7 IRBB13 และ IRBB21 ซึ่งมียีน *xa5* *Xa7* *xa13* และ *Xa21* ตามลำดับ และใช้พันธุ์ กข71 เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานเปรียบเทียบในการทดลอง โดยใช้เชื้อ *Xoc* จำนวน 5 ไอโซเลท ที่แยกเชื้อมาจากตัวอย่างข้าวที่เป็นโรค มาทดสอบความต้านทานของพันธุ์ข้าว และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Xoc* บนอาหาร Nutrient agar และ Wakimoto’s พบว่าโคโลนีของเชื้อ *Xoc* มีลักษณะกลม สีเหลือง มันวาว นูน ผิวเรียบ เมื่อทำการพิสูจน์เชื้อสาเหตุโรคตามวิธี Koch’s postulation ลงบนใบข้าวของพันธุ์ กข71 พบว่ามีการแสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงชัดเจน และยืนยันเชื้อสาเหตุโรค *Xoc* โดยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 945 bp จากนั้นจึงปลูกเชื้อลงบนใบข้าวเพื่อทดสอบความต้านทานโรค และให้คะแนนการเกิดโรคในวันที่ 7 14 และ 21 วัน หลังการปลูกเชื้อ พบว่าข้าวสายพันธุ์ IRBB5 อยู่ในระดับที่มีความต้านทานต่อโรคสูง ซึ่ง IRBB5 น่าจะเป็นสายพันธุ์ข้าวที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบขีดแสงต่อไป

คำสำคัญ: โรคใบขีดโปร่งแสง, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, พันธุ์ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง, ข้าว

Title	Evaluation of bacterial leaf streak resistance in rice lines
Student name	Miss. Parichat Makjareon
Program	Botany
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr. Teerada Wangsomboondee
Co-advisor	Dr. Payom Cobeli
Academic year	2018

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is an important staple food in the world and Thailand is one of the top rice exporters in the world. However recently, rice production in Thailand has been reduced. One of many reasons of low rice productivity in Thailand is outbreaks of diseases and insects. An important bacterial disease of rice is bacterial leaf streak disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). One of the most effective method to control this disease is the use of disease resistance varieties. Therefore, assessment of bacterial leaf streak resistance in 4 rice lines, IRBB5 IRBB7 IRBB13 and IRBB21 containing *xa5, Xa7, xa13* and *Xa21* genes, respectively, was performed and the RD71 was used as a susceptible check. Five isolates of *Xoc* isolated from disease leaf samples were tested. *Xoc*'s colony characteristics were smooth, mucoid, convex and yellow on Nutrient agar and Wakimoto's media. Koch's postulation was conducted to prove the causing agent of the disease and inoculated rice leaves positively demonstrated leaf streak symptoms. *Xoc* was confirmed by PCR technique with specific primer presenting 945 bp PCR products. All isolates of *Xoc* were inoculated on rice leave for disease resistance test and disease scoring was examined on day 7, 14 and 21 after inoculation. The result showed that IRBB5 was the most resistant line to the disease followed by RD71, IRBB7 and IRBB21 respectively. IRBB13 was the least resistance to the disease. Therefore, IRBB5 should be a rice line that can be used in breeding program for leaf steak disease resistance.

Keywords: Bacterial leaf streak disease, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola,* leaf steak disease resistance varieties, rice

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พยอม โคเบลลี่ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์พันธุ์ข้าว และใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง พร้อมทั้งอนุญาติให้ใช้ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา ของกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ในการดำเนินการทดลอง และให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการเขียนผลงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้ง ให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวพรพรรณ ถีรัตถา ผู้ช่วยวิจัยกองวิจัยและพัฒนาข้าว และนางสาวปองทอง พิลึก ผู้ช่วยวิจัยกองวิจัยและพัฒนาข้าว ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย และพื้นที่โรงเรือนของกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังให้กันมาโดยตลอด

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสาร	4
3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	9
4 ผลการศึกษา	20
5 อภิปรายผลการศึกษา	26
6 สรุปผลการศึกษา	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32
ภาคผนวก ก	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการของโรคใบขีดโปร่งแสง (ก.) และลักษณะของแบคทีเรียในรูปหยดน้ำสีเหลือง (ข.)	5
2	ลักษณะอาการของโรคขอบใบแห้ง	6
3	ตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคใบขีดโปร่งแสง	12
4	ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียที่ขึ้นบริเวณขอบแผลชิ้นส่วนของใบข้าว	13
5	ลักษณะอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงที่เกิดจากไอโซเลท BLS2018-79(ก.), BLS2018-80 (ข.), BLS2018-81 (ค.), BLS2018-82 (ง.) และ BLS2018 (จ.)	22
6	ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Xoc3864F และ Xoc3864R	23

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Xoc* 17

2 ระดับคะแนนตามลักษณะของการเกิดโรค 18

3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่แยกจากแหล่งต่างๆบนอาหาร NA และ Wakimoto's 21

4 ปฏิกิริยาการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง จำนวน 5 ไอโซเลท จาก จ.สุพรรณบุรี บนข้าว จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ 25

บทที่ 1
บทนำ

ข้าว (Rice) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภูมิภาคเอเชียมีการผลิตข้าวมากกว่า 90% ของผลผลิตข้าวทั่วโลก สำหรับประเทศไทยนั้นมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 58 ล้านไร่และในปี 2561 มีเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตข้าวที่ลดลงจากปีที่ผ่านมา และยังมีการคาดการว่าจะลดลงอีกในปี 2562 เนื่องจากการผลิตข้าวในประเทศไทยมีปัญหาหลักที่ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลง ได้แก่ การลดพื้นที่เพาะปลูกข้าวเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อันเนื่องมาจาก น้ำท่วม ความแห้งแล้ง ปัญหาดินเปรี้ยว ดินเค็ม การจัดการการเพาะปลูกที่ไม่เหมาะสม การใช้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ รวมถึงการระบาดของแมลง เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และการระบาดของโรคที่เป็นปัญหาสำคัญของข้าว เช่น โรคใบไหม้ โรคขอบใบแห้ง (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2561ก : ออนไลน์) และในปัจจุบันพบโรคใบขีดโปร่งแสงที่มีการระบาดรุนแรงในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคกลาง (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2560 : ออนไลน์)

โรคใบขีดโปร่งแสง (Bacterial leaf streak) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) อาการของโรคเป็นได้ตั้งแต่ระยะข้าวแตกกอจนถึงออกรวง อาการปรากฏที่ใบ เริ่มแรกเห็นเป็นขีดช้ำยาวไปตามเส้นใบ ต่อมาค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม เมื่อแผลขยายรวมกันก็จะเป็นแผลใหญ่ แสงสามารถทะลุผ่านได้ และพบแบคทีเรียในรูปหยดน้ำสีเหลืองคล้ายยางสนกลม ๆ ขนาดเล็กปรากฏอยู่บนแผล ความยาวของแผลขึ้นอยู่กับความต้านทานของพันธุ์ข้าวและความรุนแรงของเชื้อ ในพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรค แผลจะขยายจนใบไหม้ไปถึงกาบใบ ลักษณะของแผลจะคล้ายคลึงกับเกิดบนใบ ส่วนในพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคได้ จำนวนแผลจะน้อยและแผลจะไม่ขยายตามความยาวของใบ รอบ ๆ แผลจะมีสีน้ำตาลดำ พบมากในนาน้ำฝน และนาชลประทาน ในอดีตพบระบาดในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2560 : ออนไลน์) แต่ปัจจุบันมีรายงานการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในภาคกลางของประเทศไทยต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 ถึงปัจจุบัน (2560) โดยเฉพาะในเขตนาน้ำฝน มีรายงานการระบาดในปี พ.ศ. 2555 พบการระบาดรุนแรงถึง 40% ในช่วงเดือนกรกฎาคม ที่จังหวัดปราจีนบุรี นครนายก และฉะเชิงเทรา ในข้าวพันธุ์ กข31 กข41 และ กข47 (วรรณพรรณ จันลาภา และคณะ, 2557)

การป้องกันจำกัดโรคใบขีดโปร่งแสงสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีฉีดพ่น แต่เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายสูง และส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม (ดารา เจตนะจิตร, 2545) การเลือกใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ลดการใช้สารเคมีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม การศึกษาพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสงในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก เนื่องจากก่อนหน้านี้การระบาดของโรคยังไม่รุนแรงมากและไม่เป็นปัญหาหลักของข้าว ดังนั้น แหล่งของพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงจึงยังไม่มีแพร่หลาย ซึ่งแตกต่างกับข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) ที่มีสาเหตุมาจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) มีการศึกษายีนต้านทานต่อโรคเป็นจำนวนมาก (Khan, Naeem, and Iqbal, 2013) พยอม โคเบลลี่ และคณะ (2558) ได้ศึกษาสายพันธุ์ข้าว Near Isogenic Line (NILs) ที่มียีนต้านทานเดียว โดยมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่มีประสิทธิภาพสูง 4 ยีน ได้แก่ *xa5* *Xa7* *xa13* และ *Xa21* ซึ่งมาจากข้าวสายพันธุ์ IRBB5 IRRBB7 RBB13 และ IRBB21 ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*Xoo*) และโรคใบขีดโปร่งแสง (*Xoc*) มีความใกล้ชิดกัน (Suarez et al., 2010) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวมาศึกษาความต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาพันธุ์ข้าวที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง โดยทดสอบในข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และใช้ข้าวพันธุ์ กข71 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบขีดโปร่งแสง เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานเปรียบเทียบ (Susceptible check) ผลการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง เพื่อเป็นการรักษาเสถียรภาพการผลิตของข้าวที่ประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคดังกล่าว โดยเฉพาะข้าวในภาคกลางที่พบว่ามีการระบาดของโรคใบขีดโปร่งแสงเพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อประเมินหาสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง และสามารถนำพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

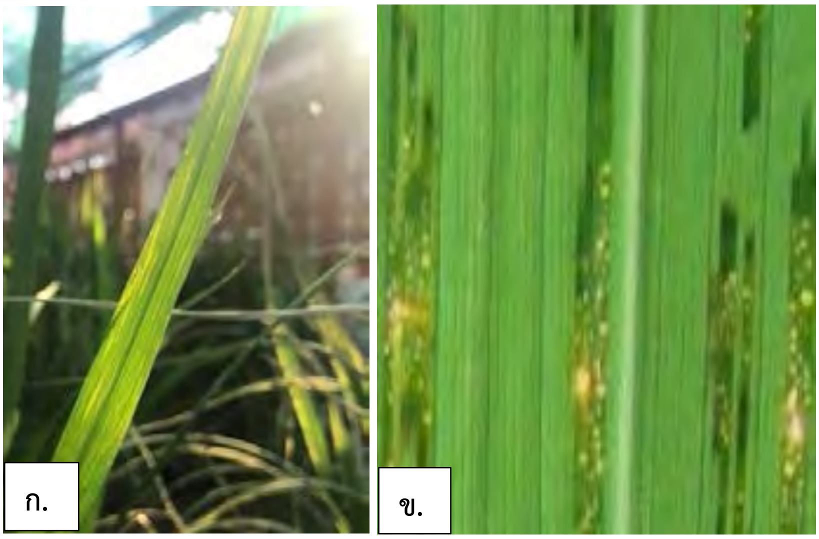
ข้าว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* L. เป็นพืชในวงศ์หญ้า (Poaceae) ถือเป็นแหล่งอาหารหลักที่สำคัญของโลก ซึ่งพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวพบว่ามีมากกว่า 958 ล้านไร่ กระจายอยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะแถบทวีปเอเชีย ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวเพื่อการบริโภคมายาวนาน 5,000 ปี ข้าวจึงกลายมาเป็นส่วนหนึ่งของประเพณี วัฒนธรรม และวิถีชีวิตในการดำรงชีวิตของคนไทยมาจนถึงปัจจุบัน นอกจากการบริโภคข้าวภายในประเทศปีละประมาณ 21 ล้านตัน การส่งออกก็ถือเป็นสินค้าส่งออกหลักของไทย โดยถูกจัดอันดับให้เป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ 1 ใน 5 ของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561ก : ออนไลน์)

อย่างไรก็ตามพบว่าผลผลิตเฉลี่ยข้าวต่อไร่ของประเทศไทยมีปริมาณที่ต่ำกว่าประเทศเพื่อนบ้านในเอเชีย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561ข : ออนไลน์) ซึ่งหนึ่งในหลายสาเหตุมาจาก การลดพื้นที่เพาะปลูกข้าวเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อันเนื่องมาจาก น้ำท่วม ความแห้งแล้ง ปัญหาดินเปรี้ยว ดินเค็ม การจัดการการเพาะปลูกที่ไม่เหมาะสม การใช้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ รวมถึงการระบาดของแมลง เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และการระบาดของโรคที่เป็นปัญหาสำคัญของข้าว เช่น โรคใบไหม้ โรคขอบใบแห้ง และโรคใบขีดโปร่งแสง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561ก : ออนไลน์)

โรคใบขีดโปร่งแสง (Bacterial leaf streak)

โรคใบขีดโปร่งแสง เป็นโรคที่สำคัญของข้าวโรคหนึ่งที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) อาการของโรคใบขีดโปร่งแสงเป็นได้ตั้งแต่ระยะข้าวแตกกอจนถึงออกรวง อาการปรากฏที่ใบ เริ่มแรกเห็นแผลเป็นขีดช้ำยาวไปตามเส้นใบ ต่อมาค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม เมื่อแผลหลายแผลขยายมาชนกันก็จะเป็นแผลใหญ่ แสงสามารถส่องผ่านได้ (ภาพที่ 1ก.) และพบแบคทีเรียในรูปหยดน้ำสีเหลืองคล้ายยางสนกลม ๆ ขนาดเล็กปรากฏอยู่บนแผล (ภาพที่ 1ข.) ความยาวของแผลขึ้นอยู่กับความต้านทานของพันธุ์ข้าวและความรุนแรงของเชื้อ ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค แผลจะขยายจนไปถึงกาบใบ ลักษณะของแผลจะคล้ายคลึงกับเกิดแผลที่ปรากฏบนใบ ส่วนในข้าวพันธุ์ต้านทานโรค จำนวนแผลจะน้อยและแผล

จะไม่ขยายตามความยาวของใบ รอบ ๆ แผลจะมีสีน้ำตาลดำ โดยแบคทีเรียจะสามารถแพร่ระบาดไปได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็วในสภาพที่มีฝนตก ลมพัดแรง (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2560 : ออนไลน์)



<u>ภาพที่ 1</u> ลักษณะอาการของโรคใบขีดโปร่งแสง (ก.) และ
ลักษณะของแบคทีเรียในรูปหยดน้ำสีเหลือง (ข.)

Wubneh and Bayu (2016) ได้ทำการศึกษาเพื่อประเมินความเสียหายของโรคที่เกิดในข้าวซึ่งพบว่าโรคใบขีดโปร่งแสง สร้างความเสียหายในระยะในการเจริญเติบโตทางด้านต้น (vegetative growth) 0.8 เปอร์เซนต์ และความเสียหายในระยะออกรวง (heading growth stages) 1.1 เปอร์เซ็นต์ แม้จะมีความรุนแรงไม่มาก แต่ก็ก่อให้เกิดความเสียหายที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง จากรายงานของ Rice Knowledge Bank (2019 : Online) โรคใบขีดโปร่งแสงทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 8-17% ในฤดูฝน และ 1-3% ในฤดูร้อน และในปี พ.ศ. 2555 พบการระบาดรุนแรงถึง 40% ในช่วงเดือนกรกฎาคม ที่จังหวัดปราจีนบุรี นครนายก และฉะเชิงเทรา ในข้าวพันธุ์ กข31 กข41 และ กข47 (วรรณพรรณ จันลาภา และคณะ, 2557)

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight)

โรคขอบใบแห้ง มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) โรคนี้พบได้ในข้าวตั้งแต่ระยะกล้า ระยะแตกกอ จนถึงระยะออกรวง ในระยะต้นกล้าก่อนนำไปปักดำจะมีจุดเล็ก ๆ ลักษณะช้ำที่ขอบใบของใบล่าง ต่อมาประมาณ 7-10 วัน จุดช้ำนี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็ว และสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา ๆ ในกรณีที่ต้นข้าวมีความอ่อนแอต่อโรคและเชื้อโรคมีปริมาณมาก จะทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวจะเหี่ยวเฉาและแห้งตายทั้งต้นโดยรวดเร็ว เรียกอาการของโรคนี้ว่า ครีเสก (kresek)

อาการในระยะแตกกอถึงแตกกอสูงสุด ใบที่เป็นโรคขอบใบแห้งจะมีรอยขีดช้ำ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ที่แผลมีหยดน้ำสีครีมคล้ายยางสน กลม ๆ ขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด (ภาพที่ 2) ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดไปตามน้ำหรือฝน ซึ่งจะทำให้โรคสามารถระบาดต่อไปได้ แผลจะขยายไปตามความยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปในเนื้อใบตามความกว้างของใบ ขอบแผลมีลักษณะเป็นขอบลายหยัก เมื่อเวลาผ่านไปแผลนี้จะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เป็นโรค ขอบใบจะแห้งและม้วนตามความยาว (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2560 : ออนไลน์)

<u>**ภาพที่ 2**</u> ลักษณะอาการของโรคขอบใบแห้ง (เอื้อเฟื้อภาพโดย ดร. พยอม โคเบลลี่)

เนื่องจากโรคใบขีดโปร่งแสงและโรคขอบใบแห้งอาจเกิดร่วมกันในแปลงนาเดียวกัน ลักษณะอาการของโรคทั้ง 2 ชนิดในระยะสุดท้ายของการเกิดโรคจะคล้ายคลึงกันมาก เมื่อนำใบที่เกิดโรคมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เชื้อทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะโคโลนีที่คล้ายกันมาก ดังนั้น การแยกเชื้อ *Xoc* และ *Xoo* โดยใช้ลักษณะของโคโลนี จึงทำได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ จึงมีการศึกษาความ

แตกต่างของเชื้อทั้งสองพาโทวาร์โดยการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนก (Lang et al., 2010)

การศึกษาของ Lang และคณะ (2010) ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า custom computational pipeline เป็นการนำ Xanthomonas genome ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบหาความแตกต่างของลำดับเบสที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับ *X. oryzae* *Xoo* และ *Xoc* และออกแบบไพร์เมอร์จากส่วนที่จำเพาะนั้น ๆ ทำให้ได้ลำดับเบสที่มีความจำเพาะเจาะจง เพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ออกจากสายพันธุ์อื่น ๆ และเพื่อให้แยก *Xoc* และ *Xoo* ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ศึกษาโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* แต่ละพาโทวาร์ที่มาจากหลายภูมิภาค ทำให้ได้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียจำนวน 7 คู่ไพร์เมอร์ คือ Xo1321 Xo2207 และ Xo2967 มีความจำเพาะเจาะจงกับ *X. oryzae* คู่ไพร์เมอร์ Xoo80 และ Xoo4009 มีความจำเพาะเจาะจงกับ *Xoo* และคู่ไพร์เมอร์ Xoc3866 ออกแบบมาจากยีนที่สร้าง LPS O-antigen biosynthesis protein และ Xoc3864 ออกแบบมาจากยีน *wxocB*; putative glycosyltransferase ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ *Xoc*

การป้องกันและกำจัดโรคใบขีดโปร่งแสง

การป้องกันกำจัดขีดโปร่งแสง สามารถใช้วิธีทางเขตกรรม โดยไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากในดินที่อุดมสมบูรณ์ ไม่ควรปลูกข้าวแน่นเกินไป และอย่าให้ระดับน้ำในนาสูงเกินไป โรคนี้จะสร้างความเสียหายลดลงเมื่อข้าวมีอายุมากขึ้น การใช้สารเคมีการป้องกันและกำจัดโรคในสภาพนาข้าวส่วนใหญ่ยังไม่คุ้มต่อการลงทุน และทำให้เสียสมดุลของสภาพแวดล้อม (ดารา เจตนะจิตร และคณะ, 2550) อีกแนวทางหนึ่งคือการใช้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมและดีที่สุดในการป้องกันและกำจัดโรค จากการศึกษาของ Chi-hong และคณะ (2006) ระบุว่าข้าวพันธุ์ Dular (*Oryzae sativa* ssp. *Indica*) เป็นข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง และยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานมีหลายยีน (multi gene loci) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทย ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงได้ยังมีน้อย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เช่น การศึกษาของ พยอม โคเบลลี่ และคณะ (2558) เกี่ยวกับยีนต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบ

ใบแห้งในข้าว โดยศึกษาในสายพันธุ์ข้าว Near Isogenic Line (NILs) ที่มียีนต้านทานเดียว จากผลการศึกษา พบยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่มีประสิทธิภาพสูง 4 ยีน ได้แก่ *xa5* *Xa7* *xa13* และ *Xa21* ซึ่งมาจากข้าวสายพันธุ์ IRBB5 IRRBB7 IRBB13 และ IRBB21 ตามลำดับ

ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*Xoo*) และโรคใบขีดโปร่งแสง (*Xoc*) มีความใกล้ชิดในสายวิวัฒนาการกันมาก (Suarez et al., 2010) จึงมีความสนใจในความเป็นไปได้ที่จะนำยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง มาทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง เพื่อนำยีนที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงต่อไป

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

1. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 วัสดุ อุปกรณ์

1.1.1 อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อจากใบข้าว

- ใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว)
- จานเพาะเชื้อ
- มีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ปากคีบ
- กระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ตู้ Incubator รุ่น MIR153 (Sanyo)

1.1.2 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เครื่องชั่งสาร
- บิกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- สำลีม้วน
- กระดาษ
- ยางรัด
- เครื่องนึ่งความดันไอ

1.1.3 อุปกรณ์สำหรับเก็บเชื้อ

- เครื่องเขย่าสาร รุ่น G560E (Scientific Industries)
- หลอดไมโครทิวบ์
- เข็มปลายวงกลม (loop)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.1.4 อุปกรณ์สำหรับเพาะพันธุ์ข้าว

- เพลทพลาสติก
- กระดาษ
- กระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว

1.1.5 อุปกรณ์สำหรับเตรียมการปลูกเชื้อ

- บิกเกอร์
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม
- ถุงมือยาง

1.1.6 อุปกรณ์สำหรับการทำ PCR

- หลอดพลาสติก (Eppendorf)
- เครื่องเขย่าสาร รุ่น Innova 4080 (Eppendorf)
- เครื่องปั่นตกตะกอน รุ่น Universal 320R (Hettich)
- ไมโครปิเปต
- เครื่องวัดนาโนดรอป รุ่น NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น TProfessional Basic Thermocycler (Biometra Ltd.)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น PowerPac Basic (Bio-Rad)

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับแยกเชื้อจากใบข้าว

- สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เข้มข้น 0.6% (Clorox 10%)
- 70% Ethanol
- น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

1.2.2 สารเคมีสำหรับเก็บเชื้อ

- สารละลายกลีเซอรอล 20%

1.2.3 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA)

- Bacto agar
- Nutrient Agar สำเร็จรูป
- น้ำกลั่น

1.2.4 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหาร Wakimoto's

- มันฝรั่ง
- Cacium nitrate ($Ca(NO_3)_2 4H_2O$)
- Sodium dihydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4 12H_2O$)
- Peptone
- Sucrose
- Agar
- น้ำกลั่น

1.2.5 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหาร Luria-Bertani Broth (LB)

- Tryptone
- Yeast extract
- Sodium Chloride (NaCl)
- น้ำกลั่น

1.2.6 สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- Tris-EDTA buffer, pH 8
- 10% Sodium dodecyl sulfate
- 10% CTAB in 0.7 M NaCl
- 20 mg/ml Proteinase K
- 5 M NaCl
- Chloroform : isoamyl alcohol (24:1)
- Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)
- Isopropanol

- 70% Ethanol
- 100 mg/ml RNase
- Primer (Xoc3864F และ Xoc3864R)
- Master mix
- Agarose gel

1.3 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

- เมล็ดพันธุ์ข้าว IRBB5
- เมล็ดพันธุ์ข้าว IRBB7
- เมล็ดพันธุ์ข้าว IRBB13
- เมล็ดพันธุ์ข้าว IRBB21
- เมล็ดพันธุ์ข้าว กข71

ได้รับความอนุเคราะห์จากกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว

วิธีการดำเนินงาน

การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* จากใบข้าว

นำตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสง (ภาพที่ 3) มาแยกเชื้อ โดยใช้มีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดใบข้าวบริเวณที่คาบเกี่ยวระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5-6 ชิ้น

ภาพที่ 3 ตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคใบขีดโปร่งแสง

ใช้ปากคีมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว คีบชิ้นส่วนของใบข้าวล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เข้มข้น 0.6% เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วย 70% Ethanol เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนของใบข้าวที่ล้างแล้วมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้ง

เมื่อชิ้นส่วนใบข้าวแห้งแล้ว นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 3-4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการบ่ม ให้ตรวจหากลุ่มโคโลนีแบคทีเรียที่จะเจริญบริเวณขอบแผลชิ้นส่วนพืช ซึ่งลักษณะโคโลนีจะมีสีเหลือง นูน วาว ดังตัวอย่างใน ภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียที่ขึ้นบริเวณขอบแผลชิ้นส่วนของใบข้าว

จากนั้นแยกกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี cross streak plate บนอาหาร NA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะเป็นสีเหลือง

วาว รูปร่างกลม นูนและมีผิวเรียบ ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการ cross streak plate ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

การเก็บเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

นำโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร NA ที่ได้จากการแยกเชื้อ มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี cross streak plate บนอาหาร NA แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเข็มปลายวงกลม (loop) ที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว ขูดนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เบา ๆ นำมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 20% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Xoc* โดยการนำเชื้อจำนวน 5 ไซโอเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 ที่ได้จากการแยกใบข้าว มาเพาะบนอาหาร ด้วยวิธี cross streak plate แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร NA มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA และ อาหาร Wakimoto’s ด้วยวิธี cross streak plate นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การพิสูจน์โรคตามวิธี Koch’s postulation (Robert, Mark and Alan, 2008)

การเพาะพันธุ์ข้าว (พยอม โคเบลลี่ และคณะ, 2558)

เพาะเมล็ดข้าวลงในเพลทพลาสติก ด้วยวิธีวางเมล็ดในจาน เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้าอายุ 4 วัน ย้ายไปปลูกในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้วที่บรรจุดิน 1 กิโลกรัม กระถางละ 5 กอ กอละ 1 ต้นจากนั้นใส่ปุ๋ยยูเรีย (46%) อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ หลังปลูกข้าว 1 อาทิตย์ ควบคุมระดับน้ำในกระถางสูงประมาณ 10 เซนติเมตร ตลอดการทดลอง

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* สำหรับปลูกเชื้อ

เตรียมสารละลายแบคทีเรียจากเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท บนอาหาร NA และ Wakimoto's โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มาทำการ cross streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Wakimoto's จำนวน 5 เพลท/ไอโซเลท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/แบคทีเรีย จำนวน 1 เพลท ลงบนกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Wakimoto's แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมขูดเชื้อแบคทีเรียเบาๆโดยไม่ให้โดนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทสารละลายแบคทีเรียลงในบิกเกอร์ เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงไปให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร

การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ลงบนข้าว

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียมาปลูกเชื้อลงในใบข้าวพันธุ์ กข71 ในระยะข้าวแตกกอสูงสุด ใช้ถุงมือยางจุ่มลงในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ จากนั้นลูบใบข้าวจากโคนใบจนถึงปลายใบ 5 ครั้ง โดยแบ่งเป็นลูบขึ้น 3 ครั้ง และลูบลง 2 ครั้งสลับกัน เพื่อให้ใบข้าวเกิดบาดแผลและทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าไปตามบาดแผลได้

การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* จากใบข้าวอีกครั้ง (Re-isolation) ทำเช่นเดียวกับวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (Ausubel et al., 2002)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Xoc* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคใบขีดโปร่งแสงแล้ว จากอาหาร NA มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani Broth (LB) ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 2 ml แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าผสมสาร ใช้ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวใสออกให้หมด เติม TE buffler pH 8 ปริมาณ 567 µl 10%

SDS ปริมาณ 30 µl และ 20 mg/ml Proteinase K ปริมาณ 3 µl พลิกหลอดไปมาเบา ๆ 5-10 ครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม 5 M NaCl ปริมาณ 100 µl และ 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl ปริมาณ 80 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาณ 700 µl ผสมแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ดูดของเหลวใสด้านบน ใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ (ดีเอ็นเอจะอยู่ด้านบน) เติม Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 700 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่เติม isopropanol (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 0.6 เท่าของส่วนใสที่ดูดมา พลิกหลอดไปมาให้ผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ค่อยๆเทของเหลวใสออกระวังไม่ให้ตะกอนติดไปด้วย เติม 70% Ethanol ปริมาณ 500 µl พลิกหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งระวังไม่ให้ตะกอนติดไปด้วย ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม TE Buffer ปริมาณ 100 µl พลิกหลอดไปมาให้ผสมกัน เติม RNase (100 mg/ml) ปริมาณ 1 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัด Nanodrop เพื่อวัดค่าปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Lang et al., 2010)

ผสมปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification โดยใช้ปริมาตรของ PCR ในแต่ละตัวอย่าง 25 µl ประกอบด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1.5 µl ไพรเมอร์ (F) 10 µM 0.5 µl ไพรเมอร์ (R) 10 µM 0.5 µl Master mix 12.5 µl และ DNA template 2 ng/ µl 10 µl โดยไพรเมอร์ ที่ใช้เพื่อยืนยันเชื้อ *Xoc* ได้แก่ Xoc3864F และ Xoc3864R (ตารางที่ 1) จากนั้นใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมการทำงานและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ตามด้วยการทำงาน 35 รอบโดยแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที 64 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 30 วินาที และในขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที จากนั้นจึงนำผลผลิต

ดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหาขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 2%

ตารางที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Xoc*

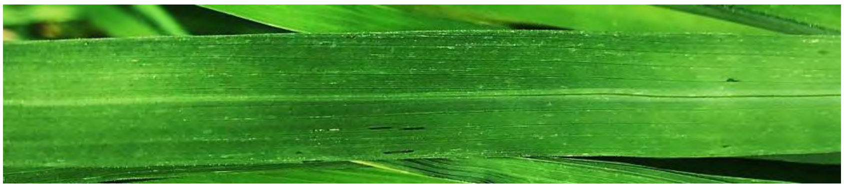
Name	Sequence	Product size (bp)
*Xoc*3864F	GTGCGTGAAAATGTCGGTTA	945
*Xoc*3864R	GGGATGGATGAATACGGATG	

การทดสอบหาข้าวพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสง

ทำการเพาะเมล็ดข้าว จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ข้าวที่ต้านต่อโรคขอบใบแห้ง คือ IRBB5 IRBB7 IRBB13 และ IRBB21 และพันธุ์ข้าวที่เป็นพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอเปรียบเทียบสำหรับโรคใบขีดโปร่งแสง (Susceptible check) คือ กข71

ในการปลูกเชื้อลงบนต้นข้าว เลือกใบข้าวที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค จำนวน 15 ใบต่อ 1 กระถางในการทดสอบ และทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ คือ 1 ไอโซเลท จำนวน 3 กระถางต่อพันธุ์ข้าว และให้คะแนนการเกิดโรคทุก 7 วัน เป็นเวลา 21 วัน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนการเกิดโรคบนใบที่แสดงอาการของโรค จำนวน 15 ใบ ซึ่งดัดแปลงจาก Standard Evaluation System (SES) for rice (IRRI, 2014) ดังตารางที่ 2

<u>ตารางที่ 2</u> ระดับคะแนนตามลักษณะของการเกิดโรค

<table>
<tr><th>ระดับคะแนน</th><th>ลักษณะของการเกิดโรค</th></tr>
<tr><td>0</td><td>ไม่เกิดแผล
 </td></tr>
<tr><td>1</td><td>พบแผลขีดช้ำน้ำสีเหลืองหรือสีน้ำตาลขนาดเล็กถึงใหญ่จำนวนน้อย เกิดแผลประมาณ 1% ของพื้นที่ใบข้าว
</td></tr>
<tr><td>3</td><td>พบแผลขีดช้ำน้ำสีเหลืองหรือสีน้ำตาลขนาดเล็กถึงใหญ่จำนวนมาก เกิดแผลมากกว่า 1-3% ของพื้นที่ใบข้าว
 </td></tr>
</table>

ตารางที่ 2 ระดับคะแนนตามลักษณะของการเกิดโรค (ต่อเนื่อง)

ระดับคะแนน	ลักษณะของการเกิดโรค
5	พบขีดแผลมีสีเหลืองหรือน้ำตาล เมื่อแผลขยายรวมกันเป็นแผลใหญ่ เมื่อนำไปส่องดูกับแสงแดดจะเห็นขีดใสตรงแผลอย่างชัดเจน และมีกลุ่มเซลล์แบคทีเรียเกิดแผล 4-<25% ของพื้นที่ใบข้าว
7	พบขีดแผลมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล เมื่อแผลขยายรวมกันเป็นแผลใหญ่ เมื่อนำไปส่องดูกับแสงแดดจะเห็นขีดใสตรงแผลอย่างชัดเจน และมีกลุ่มเซลล์แบคทีเรีย >25-50% ของพื้นที่ใบข้าว
9	พบขีดแผลมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลเมื่อแผลขยายรวมกันเป็นแผลใหญ่เมื่อนำไปส่องดูกับแสงแดดจะเห็นขีดใสตรงแผลอย่างชัดเจนและมีกลุ่มเซลล์แบคทีเรียเกิดแผลมากกว่า 50% ของพื้นที่ใบข้าว

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* จากใบข้าว

จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xoc* จากใบข้าวที่เป็นโรคบนอาหาร NA ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83

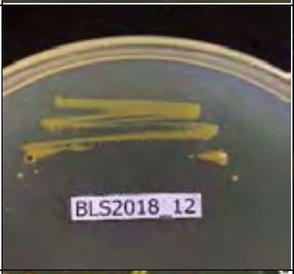
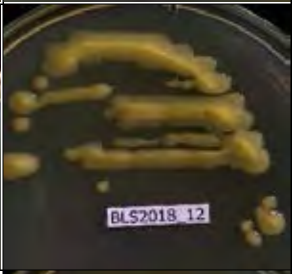
การตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xoc*

จากการเลี้ยงเชื้อ *Xoc* ทั้ง 5 ไอโซเลท บนอาหาร NA เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีที่มีสีเหลือง มัน วาว รูปร่างกลม นูน ผิวเรียบ ในขณะที่เชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's เป็นเวลา 2 วัน มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองและเยิ้ม และมีการเจริญที่รวดเร็วกว่าบนอาหาร NA แสดงดังตารางที่ 3

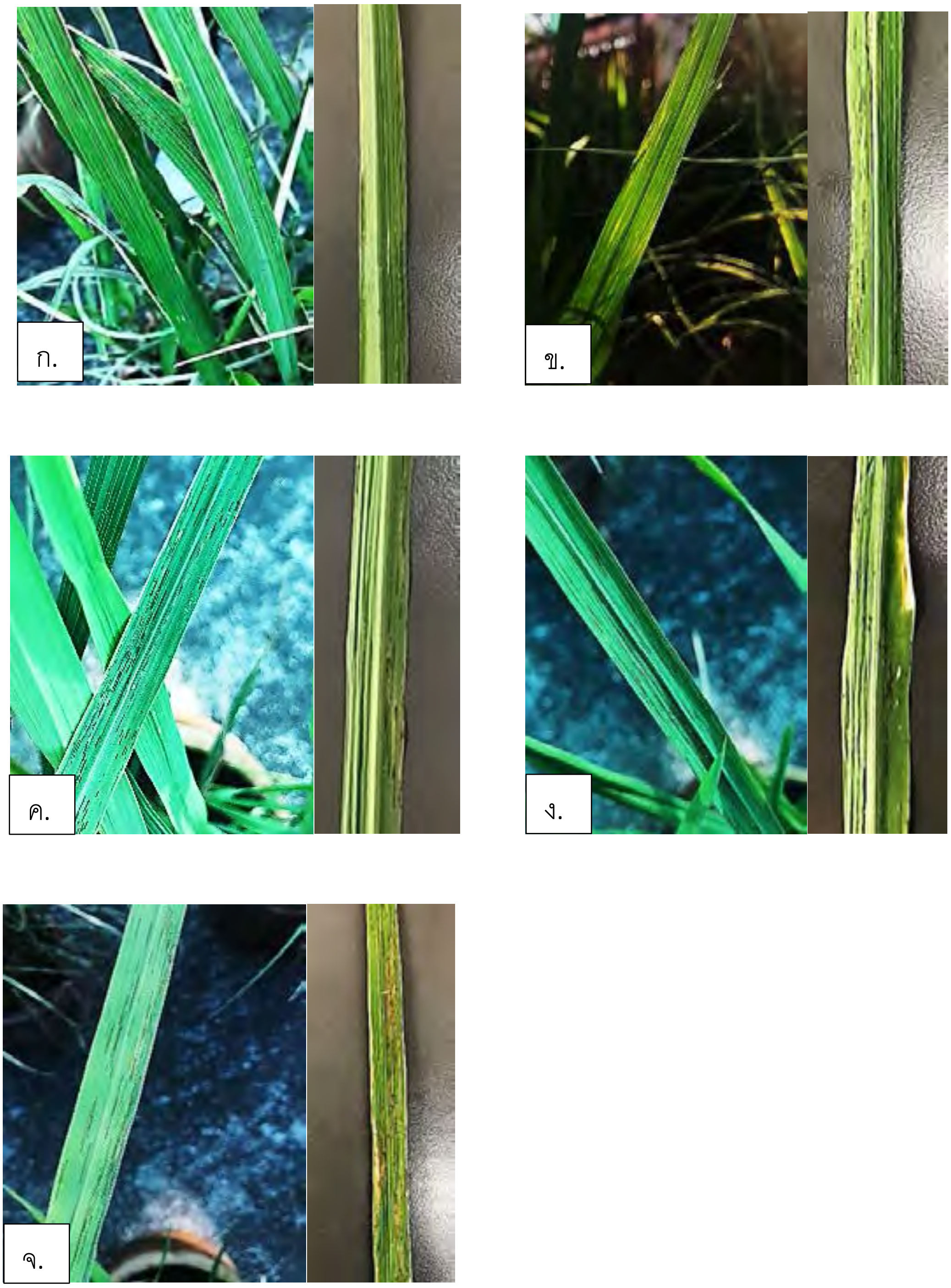
การพิสูจน์การเกิดโรคใบขีดโปร่งแสงบนใบข้าวตามวิธี Koch's postulation

จากการปลูกเชื้อ *Xoc* จำนวน 5 ไอโซเลท ลงบนข้าวพันธุ์ กข71 ซึ่งเป็นพันธุ์เปรียบเทียบอ่อนแอ พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 ที่เก็บจากใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงจาก จ. สุพรรณบุรี และแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ในปี พ.ศ. 2561 สามารถก่อให้เกิดโรคใบขีดโปร่งแสง โดยแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 5) และจากการเก็บใบข้าวที่แสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงทั้ง 5 ไอโซเลท มาทำการแยกเชื้ออีกครั้งหนึ่ง (re-isolation) และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะที่ไม่แตกต่างจากเดิม คือโคโลนีมีสีเหลือง นูน มัน วาว และผิวเรียบ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 4 วัน และโคโลนีมีลักษณะเหลืองเยิ้ม บนอาหาร Wakimoto's เป็นเวลา 2 วัน

<u>ตารางที่ 3</u> ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ บนอาหาร NA และ Wakimoto's

อันดับ	ชื่อไอโซเลท*	โค้ด*	แหล่งที่มา	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (4 วัน)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Wakimoto's (2 วัน)
1	BLSPTT1_SP BUT7.1-2018	BLS2018 -79	อ.อู่ทอง จังหวัด สุพรรณบุรี		
2	BLSPTT1_SP BUT7.2-2018	BLS2018 -80	อ.อู่ทอง จังหวัด สุพรรณบุรี		
3	BLSRD41_SP BWV11.1- 2018	BLS2018 -81	ต.วังหว้า อ.ศรีประจันต์ จังหวัด สุพรรณบุรี		
4	BLSRD41_SP BWV11.2- 2018	BLS2018 -82	ต.วังหว้า อ.ศรีประจันต์ จังหวัด สุพรรณบุรี		
5	BLSRD41_SP B WV11.3-2018	BLS2018 -83	ต.วังหว้า อ.ศรีประจันต์ จังหวัด สุพรรณบุรี		

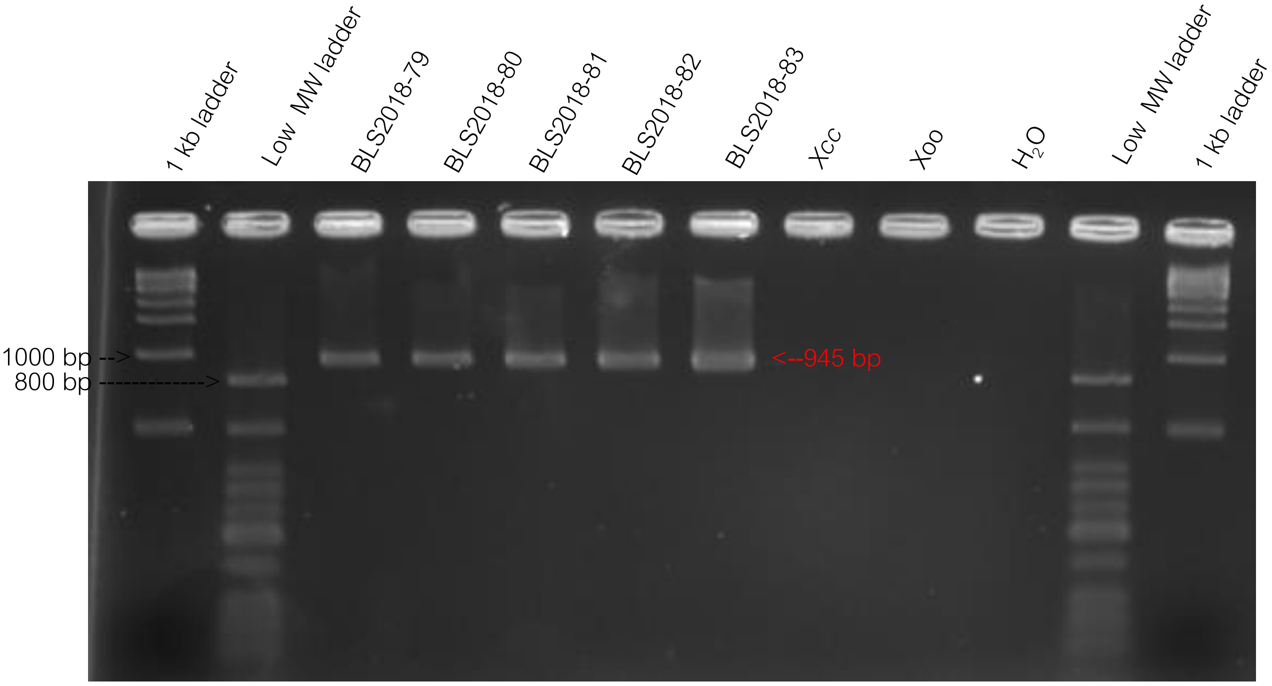
*ชื่อไอโซเลท และโค้ด กำหนดโดยกรมการข้าว



<u>ภาพที่ 5</u> ลักษณะอาการของโรคใบขีดโปร่งแสงที่เกิดจากไอโซเลท BLS2018-79 (ก.), BLS2018-80 (ข.), BLS2018-81 (ค.), BLS2018-82 (ง.) และ BLS2018-83 (จ.)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ด้วยเทคนิค PCR

การยืนยันเชื้อ *Xoc* โดยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *Xoc* (Lang et al., 2010) โดยใช้ *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) เป็น negative control ซึ่งเชื้อ *Xoc* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 945 bp ขณะที่ *Xcc* และ *Xoo* ไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR (ภาพที่ 6)



<u>**ภาพที่** 6</u> ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Xoc3864F และ Xoc3864R

การทดสอบหาข้าวพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสง

จากการนำพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ IRBB5 IRBB7 IRBB13 และ IRBB21 มาทดสอบความต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง เทียบกับพันธุ์ กข71 (Susceptible check) โดยการปลูกเชื้อ จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 ลงในพันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบดังกล่าว พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถทำให้เกิดโรคใบขีดโปร่งแสงในข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ แต่มีระดับความรุนแรงที่ต่างกัน โดยที่เมื่อระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อมากขึ้น ความรุนแรงของโรคก็จะมากขึ้นด้วย หลังการปลูกเชื้อ 21 วัน ข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคขอบใบแห้ง IRBB5

แสดงความต้านทานระดับปานกลาง (MR) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-79 แสดงความต้านทาน (R) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-80 BLS2018-81 และ BLS2018-82 และแสดงความต้านทานสูง (HR) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-83 ข้าวสายพันธุ์ IRBB7 แสดงความต้านทานระดับปานกลาง (MR) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-83 และแสดงความต้านทาน (R) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-81 และ BLS2018-82 ข้าวสายพันธุ์ IRBB13 แสดงความต้านทานระดับปานกลาง (MR) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-82 ข้าวสายพันธุ์ IRBB21 แสดงความต้านทานระดับปานกลาง (MR) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-81 และ BLS2018-82 ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข71 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ แสดงความอ่อนแอปานกลาง (MS) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-79 และ BLS2018-80 แต่แสดงความต้านทานระดับต้านทาน (R) ต่อเชื้อไอโซเลท BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 (ตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่าเชื้อไอโซเลท BLS2018-79 และ BLS2018-80 มีความรุนแรงในการเกิดโรคสูงกว่า (6.47 และ 6.16 ตามลำดับ) ไอโซเลท BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 (4.60 3.31 และ 4.51 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง จำนวน 5 ไอโซเลท จาก จ.สุพรรณบุรี บนข้าว จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์

อันดับ	ไอโซเลทเชื้อ *Xoc*	ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรค* และระดับความต้านทาน 7 วัน					ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรค* และระดับความต้านทาน 14 วัน					ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรค* และระดับความต้านทาน 21 วัน				
		IRBB5 (*xa5*)	IRBB7 (*Xa7*)	IRBB13 (*xa13*)	IRBB21 (*Xa21*)	กข71 (S-check)	IRBB5 (*xa5*)	IRBB7 (*Xa7*)	IRBB13 (*xa13*)	IRBB21 (*Xa21*)	กข71 (S-check)	IRBB5 (*xa5*)	IRBB7 (*Xa7*)	IRBB13 (*xa13*)	IRBB21 (*Xa21*)	กข71 (S-check)
1	BLS2018-79	1.44 (R)	4.82 (MS)	3.53 (MR)	4.69 (MS)	4.20 (MS)	2.76 (R)	7.00 (S)	4.73 (MS)	5.98 (MS)	4.82 (MS)	3.09 (MR)	7.98 (S)	5.71 (MS)	6.47 (MS)	6.02 (MS)
2	BLS2018-80	1.00 (R)	4.29 (MS)	3.67 (MR)	3.49 (MR)	2.47 (R)	2.17 (R)	5.49 (MS)	5.31 (MS)	5.27 (MS)	3.84 (MR)	2.51 (R)	6.16 (MS)	5.93 (MS)	5.49 (MS)	4.33 (MS)
3	BLS2018-81	0.67 (HR)	1.33 (R)	1.36 (R)	1.00w (R)	1.00 (R)	1.67 (R)	2.26 (R)	3.28 (MR)	2.33 (R)	2.15 (R)	1.71 (R)	2.81 (R)	4.60 (MS)	3.35 (MR)	2.80 (R)
4	BLS2018-82	0.00 (HR)	0.67 (HR)	1.00 (R)	2.11 (R)	1.00 (R)	0.56 (HR)	1.57 (R)	2.41 (R)	2.53 (R)	2.30 (R)	1.76 (R)	2.31 (R)	3.31 (MR)	3.08 (MR)	2.73 (R)
5	BLS2018-83	0.33 (HR)	1.00 (R)	1.50 (R)	1.19 (R)	1.22 (R)	0.67 (HR)	2.23 (R)	3.18 (MR)	3.02 (MR)	1.78 (HR)	0.67 (HR)	3.42 (MR)	4.51 (MS)	4.29 (MS)	2.64 (R)

*ระดับความรุนแรงของการเกิดโรค (IRRI, 2014)

0 = ต้านทานสูง (Highly resistant; HR), 1 = ต้านทาน (Resistant; R), 3 = ต้านทานปานกลาง (Medium resistant; MR), 5 = อ่อนแอปานกลาง (Medium susceptible; MS), 7 = อ่อนแอ (Susceptible; S) และ 9 = อ่อนแอสูง (Highly susceptible; HS)

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Xoc* จากใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบขีดโปร่งแสง ที่เก็บรวบรวมมาจากแปลงนาของเกษตรกร จ.สุพรรณบุรี ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NA จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-79 BLS2018-80 BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 ซึ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xoc* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะ สีเหลือง มัน วาว รูปร่างกลม นูน และมีผิวเรียบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และมีลักษณะเหลือง เยิ้ม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wakimoto's ซึ่งมีลักษณะที่ตรงตามลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xoc* ตามที่ EPPO (2007) กล่าวไว้ จึงสามารถนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบการเกิดโรคใบขีดโปร่งแสง ในขั้นตอนการพิสูจน์โรคตามวิธี Koch's postulation ได้

ทั้งนี้ วัตถุประสงค์ของการตรวจสอบลักษณะโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ Wakimoto's นั้นแตกต่างกัน โดยเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA สามารถเกิดโคโลนีเดี่ยวได้ง่าย และเห็นได้ชัดเจน จึงเหมาะสำหรับการนำมาศึกษาลักษณะของเชื้อ ส่วนเชื้อที่เจริญบนอาหาร Wakimoto's มีการเจริญที่รวดเร็ว ทำให้เหมาะต่อการนำมาทำสารละลายเชื้อเพื่อใช้ปลูกเชื้อลงบนต้นข้าว เนื่องจากอาหาร Wakimoto's จะประกอบไปด้วยน้ำตาลปริมาณมาก ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถและเพิ่มความรุนแรงของการเกิดโรค (Atlas, 2547)

การตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีที่ไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัดว่าเชื้อที่แยกได้ เป็นเชื้อ *Xoc* จริง เนื่องจากลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* แต่ละพาโทวาร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมากนัก คือมีสีเหลือง กลม และผิวเรียบบนอาหาร NA และมีลักษณะสีเหลือง และเยิ้ม บนอาหาร Wakimoto's แต่ถ้าเพื่อเป็นการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อในเบื้องต้น ก็สามารถนำมาใช้ได้ เพื่อใช้ในการตรวจสอบยืนยันเชื้อในขั้นตอนต่อ ๆ ไป

จากการพิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรคโดยวิธี Koch's postulation ของเชื้อ *Xoc* ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่แยกจากใบพืชที่เป็นโรคใบขีดโปร่งแสง เป็นเชื้อ *Xoc* เนื่องจากทำให้ต้นข้าวทดสอบแสดงอาการของโรคใบขีดโปร่งแสง และเมื่อทำการแยกเชื้อจากใบที่เป็นโรคอีกครั้ง (re-isolation) ได้ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ตรงกับลักษณะของเชื้อ *Xoc* นอกจากนี้ เชื้อ *Xoc* ทั้ง

5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 945 bp ตามที่ Lang และคณะ (2010) ได้รายงานไว้ว่าเป็นขนาดของดีเอ็นเอของเชื้อ *Xoc* ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่า ได้เชื้อที่ถูกต้องมาทำการทดสอบและสามารถนำไพร์เมอร์คู่นี้มาใช้ตรวจสอบเชื้อ *Xoc* ในอนาคตได้

การทดสอบหาข้าวพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสง เมื่อปลูกเชื้อลงบนข้าวเป็นเวลา 21 วัน พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อจำนวนไอโซเลทมากที่สุด คือ IRBB5 ซึ่งอยู่ในระดับที่มีความต้านทานต่อโรคสูง รองลงมาคือ กข71 IRBB7 และ IRBB21 ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อการเกิดโรคมากที่สุด คือ IRBB13 นอกจากนี้พันธุ์ กข71 ที่เป็นพันธุ์เปรียบเทียบอ่อนแอ แต่ไม่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท เนื่องจากก่อนหน้านี้ ได้พบการระบาดของโรคใบขีดโปร่งแสงมากบนข้าวพันธุ์ กข71 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา จึงคาดว่าข้าวพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบขีดโปร่งแสง แต่เมื่อนำมาทำการทดสอบพบว่าไม่แสดงความอ่อนแอที่มากนัก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อที่นำมาทดสอบ ได้มาจากใบข้าวที่เป็นโรคจากจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งมีความแตกต่างกับเชื้อที่พบในจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำให้เมื่อปลูกเชื้อบนข้าวพันธุ์ กข 71 แสดงความรุนแรงในการเกิดโรคที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าในการทดสอบหาข้าวพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดโปร่งแสงครั้งต่อไป จำเป็นต้องใช้ข้าวพันธุ์/สายพันธุ์อื่นๆ มาใช้เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบมาตรฐาน เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข41 เป็นต้น

ทั้งนี้จากการทดลองทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยทำการปลูกเชื้อลงบนใบข้าวจำนวน 15 ใบ และให้คะแนนการเกิดโรคโดยเลือกใบที่แสดงอาการของโรคจำนวน 15 ใบ เนื่องจากผู้ทดลองไม่ได้ทำสัญลักษณ์ไว้ที่ใบที่ทำการปลูกเชื้อ จึงไม่สามารถทราบได้ว่าใบที่เกิดโรค เป็นใบที่เกิดจากการลูบเมื่อทำการปลูกเชื้อ หรือเป็นใบที่เกิดโรคจากการเสียดสีกันระหว่างใบที่ปลูกเชื้อและไม่ได้ปลูกเชื้อ ดังนั้นใบที่แสดงอาการของโรคที่นำมาให้คะแนนการเกิดโรค จึงเป็นใบที่เลือกจากความรุนแรงการเกิดโรคที่มากกว่า เพราะฉะนั้น ในการศึกษาในครั้งถัดไป หากต้องการความต่อเนื่องในการเข้าทำลายใบข้าวพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อสาเหตุ และความแม่นยำในการทดลองมากขึ้น ควรที่จะมีการทำสัญลักษณ์ของใบที่ทำการปลูกเชื้อ

ความสามารถของเชื้อ *Xoc* ทั้ง 5 ไอโซเลท ในการทำให้เกิดโรคกับพันธุ์ข้าวทดสอบสามารถแยกเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความรุนแรงมาก ได้แก่ BLS1018-79 และ

BLS2018-80 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ แยกได้จากข้าวที่เป็นโรคในเขตอำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี และอีก 3 ไอโซเลท ได้แก่ BLS2018-81 BLS2018-82 และ BLS2018-83 มีความรุนแรงน้อยกว่า ซึ่งแยกมาจากข้าวที่เป็นโรคในเขตอำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี จึงสรุปได้ว่าเชื้อ Xoc ที่พบในจังหวัดสุพรรณบุรี อาจมีความหลากหลายในส่วนของยีน และมีผลให้ความสามารถในการทำให้เกิดโรคใบขีดโปร่งแสงแตกต่างกัน

จากการศึกษาของพยอม โคเบลลี่ และคณะ (2558) ซึ่งเป็นการศึกษาหาสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง พบว่ายีน *xa5* และ *Xa7* เป็นยีนต้านทานที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งเมื่อนำมาใช้กับการทดสอบหาสายข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง พบว่าสายพันธุ์ข้าว IRBB5 ซึ่งมียีน *xa5* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสง จึงสรุปได้ว่ายีน *xa5* เป็นยีนที่มีประสิทธิภาพทั้งในการต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงและโรคขอบใบ แห้ง จึงสามารถนำยีนต้านทานนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงและขอบใบแห้ง ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา

การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อ *Xoc* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง โดยการเริ่มจากคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง เป็นทางเลือกหนึ่งในการหาพันธุ์ต้านทานโรค เพราะทั้งสองโรคนี้มักเกิดร่วมกัน เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสกุลและชนิดเดียวกัน คือ *Xanthomonas oryzae* ซึ่งความใกล้ชิดในสายวิวัฒนาการกันมาก อีกทั้งวิธีการป้องกันกำจัดโรคด้วยสารเคมี พบว่าการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีสารทองแดงเป็นองค์ประกอบเป็นวิธีการควบคุมโรคขอบใบแห้งและโรคใบขีดโปร่งแสงที่มีประสิทธิภาพเหมือนกัน และจากการศึกษาพบว่ายีนต้านทาน *xa5* ที่เป็นยีนต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อ *Xoc* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสงเช่นเดียวกัน ซึ่งเราสามารถนำยีนต้านทาน xa5 มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคทั้งสองต่อไป อย่างไรก็ตามการที่สายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* บางสายพันธุ์ กลับมีความต้านทานต่อเชื้อ *Xoc* ที่ไม่เท่ากัน จึงเป็นไปได้ว่า กลไกการต้านทานโรค *Xoc* และ *Xoo* ในข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวมีความแตกต่างกันออกไป

การศึกษาขั้นต่อไป ควรเลือกพันธุ์ข้าวที่มีอยู่ในประเทศไทยจากหลายพื้นที่มาใช้ในการทดสอบความสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Xoc* ให้มากขึ้น รวมทั้งควรมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *Xoc* เพื่อให้สามารถจัดการควบคุมหรือลดความเสียหายต่อการปลูกข้าวอย่างยั่งยืนในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ดารา เจตนะจิตร. 2545. คู่มือโรคข้าว. 1. กรุงเทพมหานคร: กองโรคพืชและจุลชีววิทยากรมวิชาการเกษตร.

ดารา เจตนะจิตร และคนอื่นๆ. 2550. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว.

พยอม โคเบลลี่ และคนอื่นๆ. 2558. การใช้ประโยชน์เครื่องหมายโมเลกุลชนิด STS สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวในไทยให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งแบบคงทนถาวร. วารสารวิชาการข้าว 6 : 56-69.

วรรณพรรณ จันลาภา ทัสดาว เกตุเนตร อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และสมหมาย ศรีวิสุทธิ. 2557. ผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการระบาดของโรคข้าวในภาคตะวันออก. หน้า 73-83. ใน : การประชุมวิชาการข้าว กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคกลางตะวันออก และตะวันตก ประจำปี 2556. 26-28 มีนาคม 2557. ณ โรงแรมเอกไพลินรีเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. กรมการข้าว.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561ก. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตรปี 2561 และแนวโน้มปี 2562. [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/view/1/ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร/TH-TH [4 เมษายน 2562]

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561ข. ปริมาณการผลิตข้าวของโลกและสต๊อกข้าวคงเหลือ. [ออนไลน์]แหล่งที่มา : http://www.thairiceexporters.or.th/world%20rice%20prod_cons_ends.Htm [6 มิถุนายน 2562]

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2560. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.ricethailand.go.th/rkb/disease%20and%20insect/index.php-file=content .php&id=121.htm [18 กรกฎาคม 2561]

Atlas, R.M. 2547. Media. Handbook of Microbiological Media. 3rd ed. P.1899. London: CRC Press.

Ausubel, F.M, et al. 2002. Short Protocols in Molecular Biology. 5th ed. New York: John Wiley & Sons Publications.

Cai-hong, C. et al. 2006. Major QTL conferring resistance to rice bacterial leaf streak. Agicultural Sciences in China. 5: 216-220.

EPPO. 2007. *Xanthomonas oryzae*. Diagnostics 37: 543-553.

IRRI. 2014. Standard Evaluation System for rice. International rice research institute, 5th ed. P.57.

Lang, J.M. et al. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. Plant Disease 94: 311- 319.

Khan, M.A., Naeem M., and Iqbal M. 2014. Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. The European Journal of Plant Pathology 139: 27–37.

Rice Knowledge Bank. 2019. Bacterial leaf streak. [Online] Available from http://www.knowledgebank.irri.org/training/fact-sheets/pestmanagement/ diseases/item/bacterial-leafstreak. [2019,May 15]

Robert, M., Mark, T., and Alan, S. 2008. Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. Boca Raton, FL: CRC Press.

Suarez, M., Gonzalez, C., Piegu, B., Tohme, J., and Verdier, V. 2010. Genomic comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization. FEMS Microbiology Letters 308: 16-23.

Wubneh, W.Y. and Bayu, F.A. 2016. Assessment of diseases on rice (*Oryza sativa* L.) in major growing fields of Pawe district, Northwestern Ethiopia. World Scientfic News 42: 13-23.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

สูตรอาหาร Nutreint Agar (NA) ประกอบด้วย

Bacto agar	3.0 g
NA สำเร็จรูป	23 g
น้ำกลั่น	1 L

สูตรอาหาร Wakimoto's ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	300 g
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	0.5 g
$Na_2HPO_4 12H_2O$	2 g
Peptone	5 g
Sucrose	20 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1 L

สูตรอาหาร Luria-Bertani Broth (LB) ประกอบด้วย

Tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
NaCl	5 g
น้ำกลั่น	500 ml