ความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและการตอบสนองแบบสูงเกินของพันธุ์ข้าวต่อกลุ่มยีนอไวรูเลนส์

นางสาวสุธิดา เรืองบุญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DIVERSITY OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, THE BACTERIAL BLIGHT PATHOGEN OF RICE, AND HYPERSENSITIVE RESPONSE OF RICE LINES TO AVIRULENCE GENES

Miss Sutida Roungboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งของข้าวและการตอบสนองแบบสูงเกินของพันธุ์ข้าวต่อกลุ่มยีนอไวรูเลนส์
โดย	นางสาวสุธิดา เรืองบุญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.พยอม โคเบลลี่

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญหลง)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.พยอม โคเบลลี่)

…… กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์)

สุธิดา เรืองบุญ : ความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและการตอบสนองแบบสูงเกินของพันธุ์ข้าวต่อกลุ่มยีนอไวรูเลนส์ (DIVERSITY OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, THE BACTERIAL BLIGHT PATHOGEN OF RICE, AND HYPERSENSITIVE RESPONSE OF RICE LINES TO AVIRULENCE GENES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.พยอม โคเบลลี่, 77 หน้า.

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) มีสาเหตุมาจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) เป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญของการปลูกข้าวในประเทศไทย การระบาดที่รุนแรงของโรคขอบใบแห้งทำความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวเป็นอย่างมาก การปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *Xoo* เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันและควบคุมโรค ความต้านทานโรคในข้าวขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ของยีนต้านทาน (ยีน *R*) ในข้าว ที่เข้าคู่กันได้กับยีนอไวรูเลนส์ (ยีน *avr*) ในแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการตายอย่างรวดเร็วของเซลล์ในบริเวณที่มีการติดเชื้อเรียกว่า การตอบสนองแบบสูงเกิน (Hypersensitive response; HR) *Xoo* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการพัฒนาตัวเองให้เข้าทำลายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานชนิดเดียวได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นการทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* โดยเฉพาะชนิดของยีน *avr* จึงมีความสำคัญในการควบคุมโรค ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเกิด HR ในข้าว 2 พันธุ์ และ 11 สายพันธุ์ที่เป็น Near Isogenic Lines ที่มียีน *R* แตกต่างกัน ทำการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าสามารถจัดกลุ่ม *Xoo* ได้ 9 กลุ่ม โดยมีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มที่มีประชากรในกลุ่มถึง 70 ไอโซเลท ที่มาจากปีและจังหวัดที่ต่างกัน ซึ่งน่าจะมียีน *avr* 1-2 ยีน หรือ มียีน *avr* ที่มีความผิดปรกติ กลุ่มย่อยที่เหลือส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเดี่ยวซึ่งน่าจะมีจำนวนของยีน *avr* 3-4 ยีน จากการศึกษาด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการสร้างไพรเมอร์ 2 คู่ ที่มีความจำเพาะกับบริเวณซ้ำของยีน *avr* ใน *Xoo* พบว่าสามารถจัดกลุ่ม *Xoo* ได้ 20 กลุ่ม *Xoo* ที่มาจากจังหวัดและปีเดียวกันจะมีความเหมือนกันมากกว่าที่มาจากคนละจังหวัด ซึ่งการศึกษาด้วยวิธี PCR พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* มากกว่าการศึกษาการเกิด HR แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสอดคล้องกันของการจัดกลุ่มโดยใช้ส่วนของฟีโนไทป์และจีโนไทป์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลจากการศึกษาทั้ง 2 วิธีมาใช้ร่วมกันในการจัดกลุ่ม สามารถจัด *Xoo* ได้ 14 กลุ่ม โดยสามารถจัดให้ภายในแต่ละกลุ่มมีไอโซเลทที่มาจากจังหวัดและปีเดียวกันได้มากกว่าการใช้ข้อมูลชนิดเดียว ถึงแม้ว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจน เนื่องจาก *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งต่อไป

สาขาวิชา..เทคโนโลยีชีวภาพ…ลายมือชื่อนิสิต..... .....

ปีการศึกษา…..2553..……ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4972616423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*/ Diversity/ Avirulence gene/ Hypersensitive response

SUTIDA ROUNGBOON : DIVERSITY OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, THE BACTERIAL BLIGHT PATHOGEN OF RICE, AND HYPERSENSITIVE RESPONSE OF RICE LINES TO AVIRULENCE GENES. THESIS ADVISOR : TEERADA WANGSOMBOONDEE, Ph.D., THESIS CO- ADVISOR : PAYORM COBELLI, Ph.D, 77 pp.

Bacterial blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is one of the most importance problems of rice cultivation in Thailand. Severe epidemic of the disease results in severe damage on rice production. The best method to control this disease is the use of disease resistance rice cultivars. Disease resistance in rice depends on an interaction between a resistance gene (*R* gene) in rice and a corresponding avirulence gene (*avr* gene) in bacteria resulting in rapid death of cells called hypersensitive response (HR). Some *Xoo* isolates have the ability to rapidly overcome *R* genes in rice. Therefore, knowing genetic diversity especially the existing of *avr* genes in *Xoo* should be essential for disease control. In this study, HR was tested in 2 rice cultivars and 11 Near Isogenic Lines containing different *R* genes infiltrated with 80 isolates of *Xoo* from 12 provinces in Northeastern Thailand. *Xoo* isolates were clustered into 9 groups by HR results. One big group from this study contained 70 isolates collected from different provinces and years which might have a few *avr* genes or non-functional *avr* genes. Three to four *avr* genes in each isolates were expected from other small groups. Molecular genetic diversity of these *Xoo* isolates was also determined using two primer pairs designed from a specific repeat region of *avr* genes. The results showed that these two primer pairs could cluster *Xoo* isolates into 20 groups. The grouping from this method indicated that *Xoo* isolated from diseased rice in the same province and year was more similar in each other than *Xoo* isolated from different provinces. In conclusion, PCR-base technique using primers specific for *avr* genes could show more genetic diversity of *Xoo* isolates than HR test. These results of phenotype and genotype of the bacteria showed no correlation. However, when data from both methods were combined, *Xoo* isolates could be clustered into 14 groups. These grouping could present *Xoo* isolates from the same provinces and years in each group better than using a single data. Although, data from this study did not show clear relationship due to high genetic diversity of *Xoo*, they can be useful as basic data for developing rice resistance to bacterial blight in the future.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature .....

Academic Year : 2010 Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.พยอม โคเบลลี่ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .ปรีดา บุญ -หลง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร และ ดร.วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบเงินทุนสำหรับการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ตลอดจน วัสดุ อุปกรณ์ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอบคุณทุกความช่วยเหลือ เอื้อเฟื้อ จากทุกท่าน ในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาเรียน และการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา -มารดา และสมาชิกในครอบครัว สำหรับความรักและกำลังใจรวมถึงให้การสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมาอย่างหาที่สุดมิได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ หน้า

1. บทนำ 1
2. การตรวจเอกสาร… 5
   2.1 ข้าวและความสำคัญ 5
   2.2 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) 7
   2.3 ความหลากหลายของประชากร *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*…….…… 9
   2.4 ยีนต้านทาน (Resistance gene; ยีน *R*) ในข้าวต่อโรคขอบใบแห้ง…….. 11
   2.5 ยีนอไวรูเลนส์ (Avirulence gene; ยีน *avr*) ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 12
   2.6 การตอบสนองแบบสูงเกิน (Hypersensitive reponse ; HR)……..... 13
3. วิธีดำเนินงานวิจัย…..... 16
   3.1 ศึกษาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน..... 16
      3.1.1 พันธุ์ข้าว……..... 16
      3.1.2 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบการเกิด HR…….. 18
      3.1.3. ศึกษาการเกิด HR จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ของ *Xoo* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน…….. 18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.2 การวัดค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากใบข้าวที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุม..... 24
3.3 ศึกษาหาลำดับเบสบนยีน *avrXa* ที่มีความแตกต่างกันและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณซ้ำบนยีน *avrXa*..... 25
3.4 การสกัดดีเอ็นเอ..... 25
3.5 ศึกษาความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี PCR.. 26
3.6 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ..... 27
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 28
3.8 ศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายที่ได้จากการเกิด HR การทำ PCR..... 28
4. ผลการวิจัย..... 29
4.1 ผลการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avrXa* ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* ที่แตกต่างกัน..... 29
4.2 ค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากใบข้าวที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุม..... 37
4.3 ผลที่ได้จากการหาลำดับเบสของยีน *avrXa* และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa*..... 38
4.4 ความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการทำ PCR และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ..... 40
4.5 ผลการจัดกลุ่มความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ (Cluster analysis) ที่ได้จากการทำ PCR..... 44
4.6 ความสัมพันธ์ของกลุ่มเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) และการทำ PCR 47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

5. อภิปรายผลการวิจัย…..……,,,…….. 50
5.1 การตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* ที่แตกต่างกัน……. 50
5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* …….52
5.3 การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อโดยลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics analysis) และการเกิดการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR)……..……..... 55
6. สรุปผลการวิจัย……..…….. 58
รายการอ้างอิง……..……,,….. 60
ภาคผนวก……,,…… 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……..……77

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สถิติการส่งออกข้าวจากผลรวมปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือนในปี พ. ศ. 2548-2551..... 5

2.2 แสดงตัวอย่างของชนิดของโปรตีน AvrXa ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และโปรตีน R ในข้าว ที่เข้าคู่กันได้..... 15

3.1 ข้าวที่เป็น Near Isogenic Lines (NILs) และพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่ใช้ในการทดลอง ทั้งหมด 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์..... 17

3.2 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ..... 21

3.3 ไพรเมอร์ 2 คู่ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับส่วนยีน *avrXa* เพื่อใช้ในการทำ PCR 26

4.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*..... 31

4.2 จำนวนซ้ำของบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกันในยีน *avrXa* 4 ยีน ที่นำมาออกแบบไพรเมอร์..... 39

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 การกระจายตัวของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในหลายทวีปทั่วโลก..... 6

2.2 ลักษณะของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 7

2.3 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในท่อลำเลียงน้ำ(Xylem) ของต้นข้าว..... 8

2.4 ลักษณะของข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้ง และแบคทีเรียที่ออกมาบริเวณผิวใบ เมื่อมีความชื้นในอากาศสูง (ooze)..... 9

3.1 ต้นข้าวที่ทำการปลูกเพื่อรอการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 16

3.2 รอยช้ำน้ำที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อในใบข้าวด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 19

3.3 ผลจากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุมในลักษณะต่างๆ..... 20

4.1 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ด้วยวิธี UPGMA..... 36

4.2 กราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าการรั่วไหลของไอออนในการตอบสนองแต่ละรูปแบบ 38

4.3 แสดงตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ 2 คู่ บนยีน *avrXa5* 40

4.4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ avrXooIn..... 42

4.5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ avrXooOut 42

4.6 เปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณซ้ำของยีน *avrXa5* ในฐานข้อมูลกับลำดับเบสตัวอย่างของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการทำPCR โดยใช้โปรแกรม ClustalW 43

4.7 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA..... 46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.8 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลการเกิด HR และข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA..... 49

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย นอกจากการบริโภคเป็นอาหารหลักแล้ว ข้าวยังเป็นวัตถุดิบทางอุตสาหกรรมที่นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด จากการที่ข้าวมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีประโยชน์หลายด้าน ทำให้อัตราการบริโภคข้าวและการส่งออกข้าวเพิ่มมากขึ้นทุกปี ในปี พ .ศ. 2546 ประเทศไทยส่งออกข้าวจำนวน 7,345,971 ตัน คิดเป็นมูลค่า 76,699.1 ล้านบาท และมีปริมาณการส่งออกต่อปีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในปี พ .ศ. 2552 ประเทศไทยส่งออกข้าวได้ถึง 8,619,871 ตัน คิดเป็นมูลค่า 172,207.7 ล้านบาท ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความต้องการบริโภคข้าวที่มีเพิ่มมากขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

การปลูกข้าวประสบปัญหามากจากโรคและแมลงศัตรูพืชและจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งปัญหาเหล่านี้ล้วนแต่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของข้าว โรคข้าวที่เป็นปัญหาและมีความสำคัญอย่างมาก โดยสร้างความเสียหายในวงกว้าง ได้แก่ โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) โดยอาการของโรคเริ่มแสดงออกได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง ใบข้าวที่เริ่มติดเชื้อมีรอยช้ำน้ำที่ขอบใบ และจุดช้ำนี้จะขยายออกตามแนวยาวของใบและมีสีเหลือง ขอบใบที่เป็นโรคจะหยิกงอ แห้งเหี่ยวเร็วและตายในที่สุด (Ou, 1985) เชื้อที่เข้าทำลายในระยะกล้าภายหลังการปักดำทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเฉาและตายอย่างรวดเร็ว เรียกอาการเช่นนี้ว่า ครีเสค (Kresek) *Xoo* แพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วทางน้ำ ดังนั้นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการกระจายของเชื้อได้แก่ มีพายุฝน ฝนตกติดต่อกันหลายวัน น้ำท่วม ระดับน้ำในนาสูงเกินพอดี และการระบายน้ำในนาไม่ดี เป็นต้น (พยอม ศรีจำปา และคณะ , 2541) การป้องกันโรคขอบใบแห้งจึงมีความสำคัญหากสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพจะช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวได้

การป้องกันการเกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง ได้แก่ การปลูกข้าวสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ซึ่งนอกจากเป็นการลดปริมาณสารเคมีในการควบคุมโรคแล้ว ยังเป็นวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติได้ การปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคต้องอาศัยข้อมูลทางด้านจีโนไทป์ เช่น ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย และข้อมูลทางฟีโนไทป์ เช่น ความสามารถก่อโรคในข้าว ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* ในพื้นที่ที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Xoo* กับข้าวด้วย จึงมี

งานวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกกลุ่ม *Xoo* จากความหลากหลายทางพันธุกรรม (race) ของ *Xoo* ที่พบในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก โดยใช้เทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุลเป็นเครื่องมือในการศึกษา เช่น การใช้เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Yashitola และคณะ, 1997; Ochiai และคณะ, 2000; Ochiai และคณะ, 2005) เทคนิค Random amplification polymorphic DNA (RAPD) (Gupta และคณะ, 2001; Hu และคณะ, 2007) และเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Kosawang และคณะ, 2006) ศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* โดยผลการศึกษาจากที่ต่างๆ มีความสอดคล้องกัน ที่ทำให้สรุปได้ว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับความสามารถในการก่อโรคในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ (ระดับพาโทไทป์) กลับพบว่า ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์กันได้ว่ามีหรือไม่

กลไกการต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าว เกิดจากการทำงา นของยีนต้านทานชนิดต่างๆ ที่ร่วมแสดงออกในเชิงปริมาณ โดยยีนต้านทานที่อยู่ในข้าวจำนวนหนึ่งมีกลไกควบคุมการต้านทานโรคในรูปแบบการตอบสนองแบบสูงเกิน (Hypersensitive Response; HR) (Zhu และคณะ, 1998) ณ ตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ได้รับแบคทีเรียสาเหตุโรคที่มียีนสอดคล้องกั บยีนต้านทานของข้าว โดยปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นผลจากการทำงานระหว่างยีนต้านทาน (resistance gene; ยีน *R*) ในพืชและยีนอไวรูเลนซ์ (avirulence gene; ยีน *avr*) ในแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เข้าคู่กันได้ (Collmer, 1998; White และคณะ, 2000; Staskawicz และคณะ, 2001) ผลของการตอบสนองแบบสูงเกินทำให้เนื้อเยื่อพืชบริเวณที่ได้รับแบคทีเรียสาเหตุโรคเกิดการตายเฉพาะจุด ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถแพร่กระจายไปในส่วนอื่นๆของพืชและตายในที่สุด

ยีนอไวรูเลนซ์ ใน *Xoo* จัดอยู่ในกลุ่ม *avrBs3/pthA*-family ซึ่งยีนกลุ่มนี้พบมากใน *Xanthomonas* spp. มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด HR ที่มีการตอบสนองจำเพาะกับยีน *R* ในพืชหลายชนิด (Leach และ White, 1996) การแสดงออกของยีน *avrXa* มีผลทำให้ *Xoo* แต่ละไอโซเลทก่อโรคในข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* ชนิดต่างๆ แตกต่างกันออกไป จากปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวทำให้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียฯได้ในระดับที่เรียกว่า race ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสามารถก่อโรค และการตอบสนองแบบสูงเกินในพันธุ์ข้าวต่างๆ ล้วนเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคขอบใบแห้งที่เกิดจาก *Xoo* ตลอดจนการบริหารจัดการโรคในประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันการศึกษาคุณสมบัติต่างๆที่เป็นปัจจัยก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว *Xoo* ยังมีอยู่จำกัดเนื่องด้วย โดยทั่วไปการศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* ใช้การประเมินระดับความรุนแรงโรคที่เกิดขึ้นในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ต้องปลูกทดสอบในสภาพธรรมชาติ ทำให้ต้องใช้

เวลานานและอาศัยแรงงานมากในการประเมินโรค ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยใช้ส่วนของยีน *avr* ที่มีอยู่ใน *Xoo* แต่ละไอโซเลท ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น และข้อมูลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด HR และพันธุกรรมที่อยู่บนยีน *avr* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนา วิธีการตรวจสอบหาพาโทไทป์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นอีกด้วย การพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคขอบใบแห้ง และการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันและความคุมโรคที่ดีขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากร *Xoo* โดยอาศัยความแตกต่างของพันธุกรรมบนยีน *avr* ด้วยวิธี PCR และปฏิกิริยาการเกิด HR ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆต่อยีน *avr* ของเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษา *Xoo* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่รวบรวมพื้นที่ปลูกข้าวใน 12 จังหวัด ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และใช้เทคนิค PCR ศึกษาความแตกต่างในส่วนของยีน *avr* ในแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *avr* และทดสอบปฏิกิริยาการเกิด HR ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่มี ยีนต้านทานต่างชนิดกันเมื่อได้รับการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* ไอโซเลทต่างๆ เปรียบเทียบและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค PCR และปฏิกิริยาการเกิด HR ในข้าว เพื่อจัดกลุ่มความหลากหลายของแบคทีเรียสาเหตุโรค

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องใช้สถานที่ใ นการปฏิบัติงานที่มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมกับการเกิดโรค แต่พื้นที่ในการทำวิจัยมีบริเวณจำกัด สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และยังมีโรค แมลง ศัตรูต่อต้นข้าวระบาด ซึ่งมีผลต่อการทดสอบปฏิกิริยาการเกิด HR ในข้าว

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*, Diversity, Avirulence gene, Hypersensitive response

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบใน *Xoo* และความรุนแรงที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวสามารถนำไปใช้จำแนกหาพาโทไทป์ให้สะดวกรวดเร็วขึ้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยา HR ในข้าวที่มียีนต้านทานต่างๆที่ได้รับ *Xoo* ที่มียีน *avr* ที่แตกต่างกันสามารถนำไปใช้ในปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคขอบใบแห้ง

แผนการดำเนินงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีน *avrXa* ใน *Xoo* ที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าว
2. ศึกษาการเกิด HR จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ใน *Xoo* แต่ละไอโซเลท กับข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน
3. ศึกษาหาลำดับเบสของยีน *avrXa* ที่มีความแตกต่างกัน และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa*
4. ศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* ด้วยเทคนิค PCR
5. เปรียบเทียบความหลากหลายของ *Xoo* จากการจัดกลุ่มโดยใช้การเกิด HR และการทำ PCR

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ข้าวและความสำคัญ

ข้าวเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกับหญ้าจัดอยู่ในจีนัส *Oryza* ซึ่งข้าวมีการกระจายพันธุ์อยู่ในหลายทวีปทั่วโลก ทั้งทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา อเมริกาเหนือ และอเมริกากลาง พืชในจีนัสนี้มีมากถึง 25 สปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่ได้รับความนิยมในการปลูกและบริโภคมีเพียง 2 สปีชีส์ ได้แก่ *O. glaberrima* Stend. ที่นิยมปลูกในทวีปแอฟริกาตะวันตก และ *O. sativa* L. ที่มีการปลูกมากในบริเวณเขตเส้นศูนย์สูตร ซึ่งสามารถปลูกได้ทั้งในพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งไปจนถึงพื้นที่ที่มีน้ำ ท่วมถึง ข้าวเป็นอาหารหลักที่บริโภคโดยประชากรประมาณ 90% ในประเทศแถบเอเชียและยังมีการบริโภคในทุกทวีปทั่วโลก โดยในทวีปเอเชียมีการบริโภคข้าว 416,459,000 ตัน ทวีปอเมริกาใต้ 17,188,000 ตัน ทวีปแอฟริกา 15,741,000 ตัน ทวีปยุโรป 2,550,000 ตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา 2,704,000 ตัน ประเทศออสเตรเลีย 215,000 ตัน และอื่นๆ 636,000 ตัน จากปริมาณข้าวที่มีการบริโภคทั้งหมด 457,451,000 ตัน (International Rice Research Institute (IRRI), 2007)

ในประเทศไทยข้าว (*O. sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นสินค้าส่งออกในอันดับต้น ๆ ของ ประเทศ และยังเป็นอาหารหลักในการดำรงชีวิตของประชากรกว่า 63 ล้านคนในประเทศ นอกจากนี้ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ตั้งแต่ปี พ .ศ. 2548-2551 ประเทศไทยส่งออกข้าวในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นทุกๆปี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความต้องการในการบริโภคข้าวที่มีเพิ่มมากขึ้นด้วย (ตารางที่ 2.1) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

ตารางที่ 2.1 สถิติการส่งออกข้าว จากผลรวมปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือนในปี พ.ศ. 2548-2551

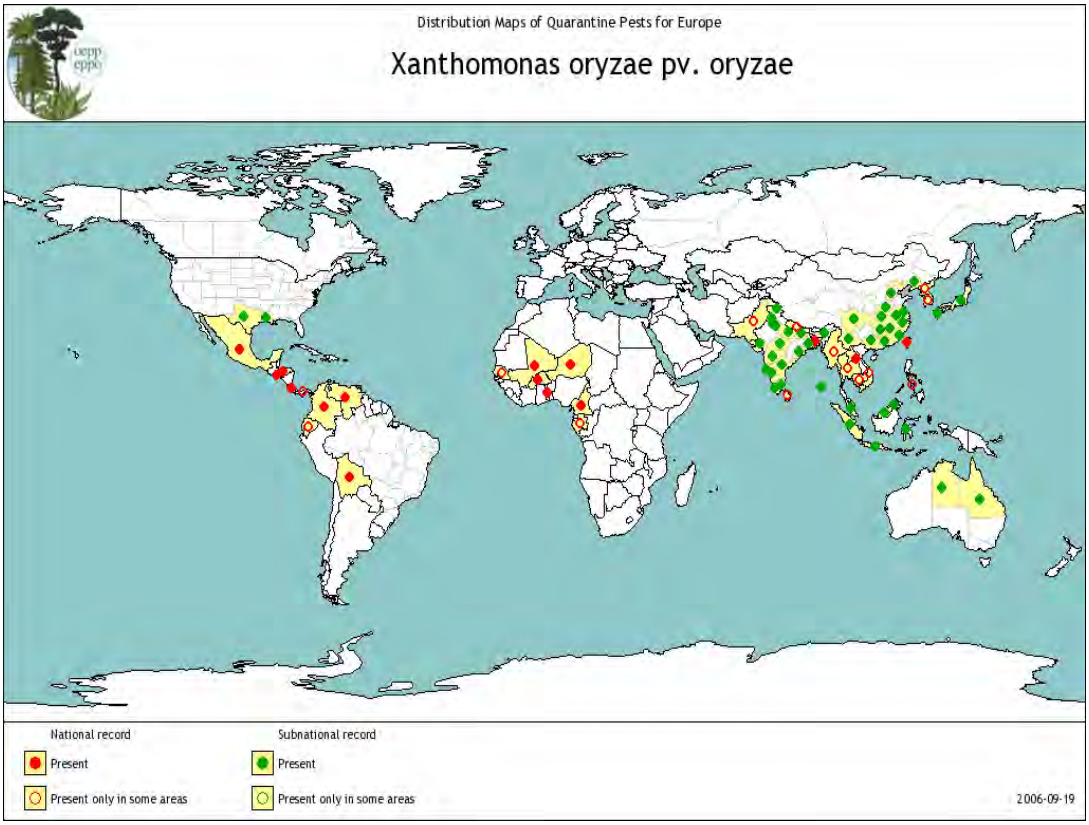
ปี	2548		2549		2550		2551	
พ.ศ.	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
รวม	7,495,904	92,993.70	7,494,140	98,179.00	9,192,518	119,215.40	10,216,128	203,219.10

ปริมาณ : ตัน

มูลค่า : ล้านบาท

การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตที่มากขึ้นเพื่อให้เพียงพอจะรองรับความต้องการของผู้บริโภคที่มากขึ้นมีความจำเป็นอย่างมาก การ ปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ข้าวสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวนั้น เป็นวิธี

ที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตและยังทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น จึงมีการศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ เ ช่น ข้าวทนเค็ม (Miah และคณะ , 1996) ข้าวทนแล้ง (Jongdee และคณะ , 2006) และข้าวที่ทนต่อโรค (Xiong และ Yang, 2003) เป็นต้น นอกจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวแล้ว การเกิดโรคยังเป็นอีกสาเหตุสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการเจริญเติบโตขอ งข้าว จึงมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีความสามารถใน การต้านทานต่อโรคต่างๆที่มากขึ้น ซึ่งโรคข้าวนั้นมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียซึ่งมักจะทำความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวจำนวนมาก โรคข้าวที่เป็นปัญหาและมีความสำคัญ อย่างมาก โดยสร้างความเสียหายในวงกว้าง ได้แก่ โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) เพราะมีการระบาดค่อนข้างรุนแรงและมีการกระจายของโรคในทุกภูมิภาคของโลกที่มีการปลูกข้าว (ภาพที่ 2.1) พบการระบาดของเชื้อ สาเหตุโรคขอบใบแห้ง ในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่ น จีน เนปาล บังคลาเทศ และศรีลังกา ทวีปแอฟริกา เช่น ประเทศแคเมอรูน และโตโก ทวีปอเมริกาเหนือ กลาง และใต้ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา แม็กซิโก ปานามา และโคลัมเบีย เป็นต้น รวมถึงประเทศแถบโอเชียเนีย (Oceania) อย่างประเทศออสเตรเลียอีกด้วย (CABI and EPPO, 1997)

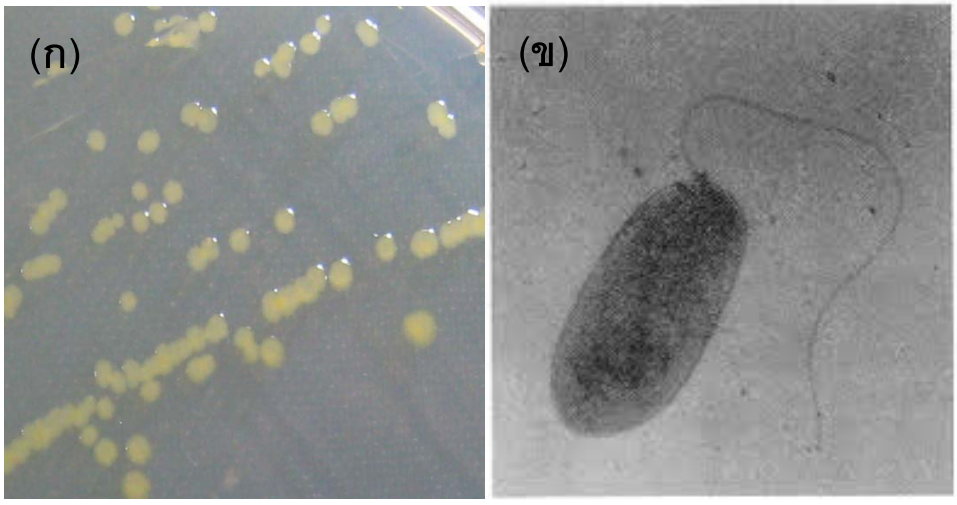


ภาพที่ 2.1 การกระจายตัวของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในหลายทวีปทั่วโลก
แหล่งที่มา : http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/ Xanthomonas_ oryzae/XANTOR_map.htm

2.2 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight)

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight) มีสาเหตุมาจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Adhikari และคณะ, 1995; Yashitola และคณะ, 1997; Ochiai และคณะ, 2000; พยอม ศรีจำปา และคณะ , 2541) เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในการปลูกข้าวเป็นอย่างมาก พบการระบาดของโรคที่รุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทุกภูมิภาคทั่วโลก จึงเป็นโรคที่มีความสำคัญ เนื่องจากโรคขอบใบแห้งทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวทั่วโลก ประมาณร้อยละ 30-50 ต่อปี (Adhikari และคณะ, 1995; Niño-Liu และคณะ, 2006; พยอม โคเบลลี่, 2550) โดยมักพบการระบาดของโรคขอบใบแห้งในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มีระดับน้ำในนาสูงการระบายน้ำไม่ดี มีพายุ ฝนตก น้ำท่วม และการทำนาโดยใช้พันธุ์ข้าวพันธุ์เดียวกันเป็นบริเวณกว้าง การใส่ปุ๋ย ไนโตรเจนอัตราสูง และระยะปักดำชิดกัน ก็สามารถทำให้เกิดการระบาดของโรคขอบใบแห้งที่รุนแรงและรวดเร็วได้ (พยอม ศรีจำปา และคณะ, 2541)

Xoo เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปทรงเป็นแท่ง (rod-shape) เซลล์มีความกว้างประมาณ 0.4-0.7 ไมครอน และยาวประมาณ 0.7-2.0 ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลคเจลลัม (flagellum) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โคโลนีจะมีลักษณะกลม นูน ขอบและผิวเรียบมัน เป็นเมือก และมีสีเหลือง (ภาพที่ 2.2) *Xoo* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30 °ซ (Ou, 1985; Niño-Liu และคณะ, 2006)

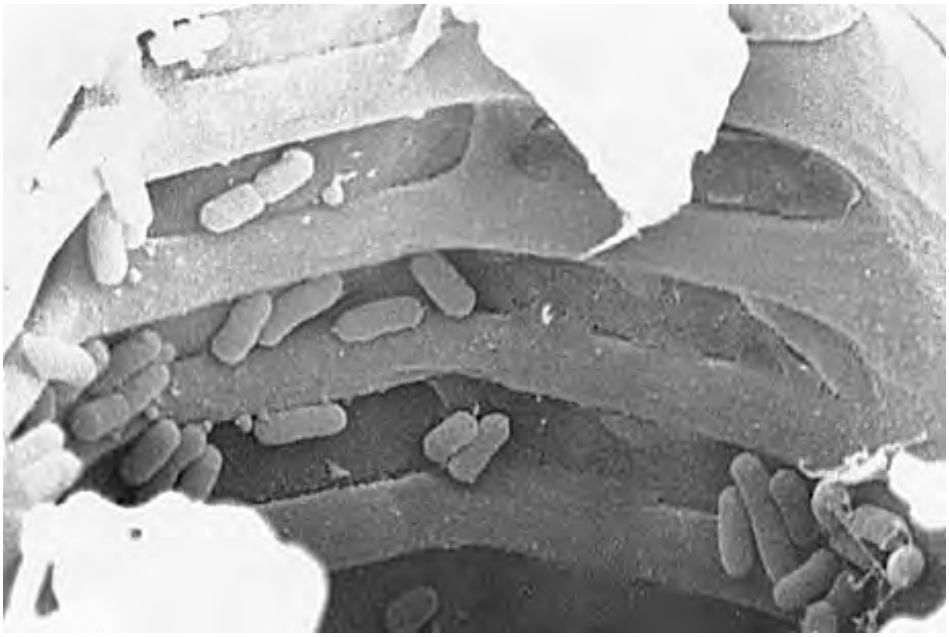


ภาพที่ 2.2 ลักษณะของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

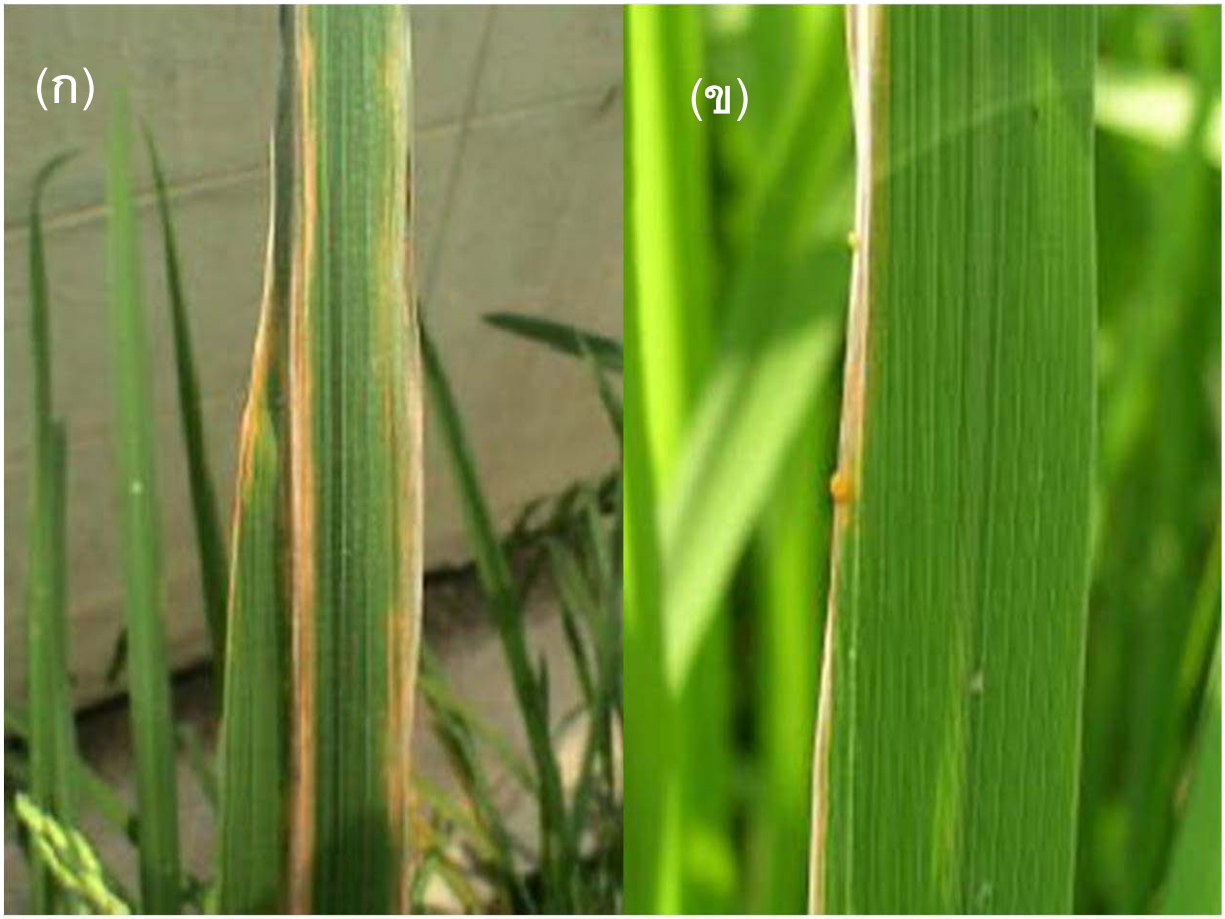
(ก) โคโลนีของ *Xoo* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง Nutrient Agar (NA)

(ข) ลักษณะของ *Xoo* ภาพจากล้องจุลทรรศน์แบบอีเล็กตรอน จาก Guevara และ Maselli (1999)

Xoo เข้าทำลายข้าวผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติ ไฮโดราโทด (hydratode) และทางบาดแผล แบคทีเรียเจริญเติบโต และแพร่กระจายไปตามท่อลำเลียง (ภาพที่ 2.3) ซึ่งแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง ลักษณะใบข้าวที่ติดเชื้อจะมีรอยช้ำที่ขอบใบ และจุดช้ำนี้จะขยายออกเป็นสีเหลืองตามแนวยาวของใบ ใบที่เป็นโรคจะมีขอบใบหยิกงอแห้งเร็ว สีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา ใบจะม้วนตามความยาวของใบ (ภาพที่ 2.4 ก) และจะตายในที่สุด ถ้าอากาศมีความชื้นสูงและแบคทีเรียเจริญเต็มท่อลำเลียงน้ำ แบคทีเรียจะออกมาที่ผิวใบในรูปของหยดเชื้อหรืออูซ (ooze) (ภาพที่ 2.4 ข) ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะกล้าเพิ่งปักดำจะทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเฉาและตายอย่างรวดเร็วจะเรียกอาการเช่นนี้ว่า ครีเสค (Kresek) *Xoo* มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วได้ทางน้ำ โดยเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการกระจายของเชื้อ เช่น ฝนตกพรำ มีพายุฝน น้ำท่วม ระดับน้ำในนาสูง การระบายน้ำในนาไม่ดี หรือติดไปกับเมล็ด (Bogdanove, 2002; พยอม ศรีจำปา และคณะ , 2541) จากการระบาดที่รุนแรงจึงมีการป้องกันโดยการใช้สารเคมีเข้ามาช่วยควบคุมโรค แต่ยังเป็นวิ ธีการที่ไม่คุ้มต่อการลงทุนและส่งผลให้สภาพแวดล้อมเสียหายจากการตกค้างของสารเคมี



ภาพที่ 2.3 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในท่อลำเลียงน้ำ (Xylem) ของต้นข้าวที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จาก Niño-Liu และคณะ (2006)



ภาพที่ 2.4 (ก) ลักษณะของข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้ง
(ข) แบคทีเรียที่ออกมาบริเวณผิวใบเมื่อมีความชื้นในอากาศสูง (ooze)
(กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549)

2.3 **ความหลากหลายของประชากร** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ในการศึกษาความหลากหลายของประชากร *Xoo* ที่ผ่านมานิยมศึกษาฟีโนไทป์ของเชื้อ โดยการจำแนก สายพันธุ์เชื้อ (pathotype/race) จากปฏิกิริยาการเข้าทำลายของแบคทีเรียในข้าว Near Isogenic Lines (NILs) ที่มียีน *R* ที่แตกต่างกัน ในระยะแตกกอ (Ochiai และคณะ, 2000; Hoang และคณะ, 2008) การแยกสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธีนี้ต้องใช้เวลาและแรงงานมาก ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ โดยจะอาศัยความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA) หรือยีนในการทำการศึกษา

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด โดยการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

และตรวจสอบความแตกต่างของจำนวนและขนาดของลำดับเบสที่ถูกตัด โดยใช้ยีนหรือบางส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งมีความแม่นยำในการตรวจสอบพอสมคว ร แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ระยะเวลานานและต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาอยู่ก่อน โดยการนำเทคนิค RFLP มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* นิยมใช้ส่วนของ IS element (Insertion element) และส่วนของยีน *avr* เป็นตัวตรวจจับ (probe) Yashitola และคณะ (1997) ได้นำเทคนิค RFLP มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* 67 ไอโซเลท ที่เก็บตัวอย่างจาก 18 พื้นที่ในประเทศอินเดีย โดยสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 9 haplotypes และ 11 haplotypes จากการใช้ยีน *avrXa10* และ *IS1112* เป็นตัวตรวจจับ ตามลำดับ ซึ่ง haplotypes เป็นการจัดกลุ่มตามรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันใน *Xoo* แต่ละไอโซเลท haplotypes ที่จัดกลุ่มจากการใช้ตัวตรวจจับทั้งสองนั้นค่อนข้างสอดคล้องกัน Ochiai และคณะ (2000) ทำการศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* 60 สายพันธุ์จาก 29 พื้นที่ในประเทศศรีลังกา โดยใช้ส่วนของ 16s และ 23s rDNA ที่ได้จากการทำ PCR (Polymerase chain reaction) และส่วนของ IS element คือ *IS1112* มาทำเป็นตัวตรวจจับสำหรับ RFLP สามารถแบ่งเชื้อได้ 2 ribogroups และ 5 clusters จากการใช้ rDNA และ *IS1112* เป็นตัวตรวจจับตามลำดับ นอกจากนี้มีการนำยีน *avr* ได้แก่ *avrXa27* และส่วนของ IS element คือ IS*Xo1* IS*Xo2* IS*Xo3* IS*Xo7* IS*Xo8* และ IS*1114* มาใช้เป็นตัวตรวจจับในการทำ RFLP โดย Hu และคณะ (2007) แยกเชื้อ 32 สายพันธุ์จาก 9 ประเทศ ซึ่งผลปรากฏว่า *Xoo* มีความหลากหลายสูง การจัดกลุ่มและลักษณะทางพันธุกรรมของ *Xoo* ในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค Random amplification polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นลำดับเบสสั้นๆ ประมาณ 10 เบส ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing ต่ำ เพื่อให้ไพรเมอร์สามา รถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้โดยง่าย จึงเป็นการจับแบบไม่มีความจำเพาะ (Williams และคณะ, 1990; Bardakci, 2000) จึงมีการนำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษางานด้านชีววิทยา เช่น การทำแผนที่ทางพันธุกรรม ช่วยในการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย การศึกษาความหลากหลายของประชากร และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากร เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RFLP แล้ววิธีนี้จะมีความสะดวกและรวดเร็วกว่า และยังไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของยีนที่ต้องการจะศึกษาอีกด้วย RAPD จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการใช้ในงานวิจัย Gupta และคณะ (2001) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศอินเดียจำนวน 16 ไอโซเลท และ 2 ไอโซเลท จากประเทศฟิลิปปินส์ โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ และ 2 ไพรเมอร์สำหรับ IS*1112* สามารถแบ่งเชื้อได้ 5 กลุ่ม โดยเชื้อจากประเทศฟิลิปปินส์ถูกจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อจากประเทศอินเดีย Hu และคณะ (2007) ใช้ RAPD ไพรเมอร์ 38 ไพรเมอร์ จำแนกเชื้อ 32 สายพันธุ์จาก 9 ประเทศ ออกเป็น 6 clusters แต่ละ cluster ประกอบด้วยเชื้อจากหลายประเทศ มี 2 clusters ที่เป็นกลุ่มเดี่ยว และพบว่าโดยส่วนใหญ่

เชื้อจากประเทศเดียวกันถูกแยกอยู่คนละกลุ่ม แสดงถึงความหลากหลายของ *Xoo* ที่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของประเทศด้วย

เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเป็นการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptors ที่เข้าคู่กับปลายของดีเอ็นเอ แล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptors ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งเป็นวิธีที่ไวต่อการตรวจ polymorphism ของดีเอ็นเอสูง แต่ข้อเสียคือในทางปฏิบัติเป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลานาน (Mueller และ Wolfenbarger, 1999) ในปี พ.ศ. 2549 Kosawang และคณะ ทำการศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* จำนวน 30 ไอโซเลท ที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2545-2547 จากหลายจังหวัดในภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 19 ไพรเมอร์ สามารถแบ่งเชื้อได้ 6 กลุ่มโดยกลุ่มที่ได้แบ่งตามสถานที่ที่เก็บเป็นหลัก

2.4 **ยีนต้านทาน** (Resistance gene; **ยีน** *R*) **ในข้าวต่อโรคขอบใบแห้ง**

โดยทั่วไปพืชหลายชนิดมีความสามารถในการป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชในหลายรูปแบบ ความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์จะทำได้โดยการสร้างการป้องกันตัว (plant defense) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *R* ในพืชที่มีความจำเพาะกับยีน *avr* ในเชื้อ (Collmer 1998; White และคณะ 2000; Staskawicz และคณะ 2001) ซึ่งโปรตีนที่สังเคราะห์จากยีน *avr* จะมีผลกระตุ้นทำให้พืชสร้างสารที่มีผลให้เกิดความต้านทานต่อการเกิดโรค ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวนั้นมีการค้นพบอย่างน้อย 30 ยีน (Chu และคณะ, 2006) ซึ่งยีน *R* บางยีนมีความจำเพาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อเพียง 1 ถึง 2 สายพันธุ์เชื้อ เช่น ยีน *Xa1* และมีบางยีนที่จะมีการแสดงออกเมื่อข้าวเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น เช่น ยีน *Xa21* ยีน *R* ที่แสดงความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งส่วนใหญ่จะเป็นยีนเด่น (dominant) แต่มีบางยีนเป็นยีนด้อย (recessive) เช่น ยีน *xa5* และยีน *xa13* (Niño-Liu และคณะ, 2006) ในการศึกษาโครงสร้างของยีน *Xa1* และ *Xa21* พบว่า ยีนทั้ง 2 ชนิดสร้างโปรตีน transmembrane ที่อยู่ในกลุ่ม Nucleotide-binding site and C-terminal leucine-rich repeat (NBS-LRR) มีโครงสร้างเป็น receptor kinase-like โดยมีบริเวณที่เป็น LRR อยู่ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนที่ยื่นเข้าไปภายในเซลล์เป็นส่วน serine/threonine kinase ซึ่งความจำเพาะของการจับกับโปรตีน AvrXa นั้น จะขึ้นอยู่กับบริเวณ LRR (Song และ Goodman, 2001) Andaya และ Ronald (2003) ศึกษาการกลายพันธุ์ (Mutation) ของ receptor ยีน *Xa21* ในข้าว พบว่า *Xa21* มีความสำคัญในการส่งสัญญาณ (signaling pathways) ให้ข้าวที่มียีนนี้เกิดการตอบสนองต่อเชื้อที่มีโปรตีน AvrXa21 อย่างสมบูรณ์ และเมื่อยีน *Xa21* มีการกลายพันธุ์ไป จะทำให้การตอบสนองน้อยลงด้วย

การปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีประสิทธิภาพ โดยจะต้องเลือกพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อ *Xoo* ที่มีการระบาดในขณะนั้น เพราะการมีอยู่ของยีน *avr* มีผลทำให้ *Xoo* แต่ละไอโซเลท เกิดความต้านทานโรคในข้าวที่มียีน *R* ชนิดต่างๆ แตกต่างกันไปด้วย จากปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีความอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง สายพันธุ์ *Oryza indica* IR24 ให้ได้ข้าวที่มีพื้นฐานของสายพันธุ์เหมือนกันแต่มีความแตกต่างกันที่ยีนต้านทาน (Near Isogenic Lines (NILs)) เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้า วและใช้ในการทดสอบสายพันธุ์เชื้อ (pathotype) (Niño-Liu และคณะ, 2006) แต่การปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานพันธุ์เดียวเป็นเวลานาน อาจทำให้ยีน *avr* ในเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงและอาจทำให้ข้าวนั้นๆไม่สามารถต้านทานเชื้อได้อีกต่อไป การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเสมอจึงมีความจำเป็นเพื่ อให้ข้าวสามารถต้านทานเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้

2.5 **ยีนอไวรูเลนส์** (Avirulence gene; **ยีน** *avr*) **ใน** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ยีน *avr* เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของแบคทีเรียใน 2 ลักษณะคือ การมีส่วนในการรุกรานเซลล์เจ้าบ้านจนทำให้เกิดโรค แต่ถ้าในพืชมียีน *R* ที่มีความจำเพาะกับยีน *avr* ในแบคทีเรียก็จะกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ โดยต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของยีน *avr* กับ hypersensitive response and pathogenicity gene (ยีน *hrp*) (White และคณะ, 1991) ทั้งนี้ความสามารถของยีน *avr* ก็มีความแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของยีนนั้นๆด้วย เช่น ยีน *avrXa* ของ *Xoo* ทำหน้าที่ได้สองแบบ (dual function) คือการเป็น elicitor กระตุ้นให้เกิดการต้านทานในข้าวในกรณีที่ข้าวมียีน *R* ให้โปรตีน R ที่สามารถเข้าคู่กันได้กับโปรตีนจากยีน *avrXa* ชนิดนั้นๆ และในทางกลับกันยังสามารถช่วยให้ *Xoo* ก่อโรคในข้าวที่ไม่มียีน *R* ชนิดที่เข้าคู่กันได้ (Hopkins และคณะ, 1992; Collmer, 1998; Staskawicz และคณะ, 2001; Bai และคณะ, 2000) Bai และคณะ (2000) ศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยการเปรียบเทียบการเกิดโรคในข้าวพันธุ์อ่อนแอ IR24 พบว่า *Xoo* สายพันธุ์ที่มียีน *avrXa7* จะกระตุ้นให้เกิดโรคได้มากกว่าสายพันธุ์ที่มียีน *avrXa10* และเมื่อศึกษาเชื้อที่มียีน *avrXa7 และ avrXa10* กับข้าวที่มียีน *R* ชนิด *Xa7 และ Xa10* ตามลำดับ พบว่ามีความต้านทานเกิดขึ้นในข้าวและเชื้อที่มียีนเข้าคู่กันได้ (*Xa7* กับ *avrXa7* และ *Xa10* กับ *avrXa10*) โดยความต้านทานนั้นเกิดขึ้นได้แม้ยีน *avrXa* นั้นจะอยู่บนพลาสมิดของเชื้อ

จากการศึกษายีน *avr* ใน *Xoo* นั้นพบว่า ยีน *avrXa* จัดอยู่ในกลุ่ม *avrBs3/pthA*-family ซึ่งเป็นยีน *avr* ที่พบมากในแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* (Leach และ White, 1996) ลักษณะของยีน *avr* ในกลุ่มนี้คือ มีบริเวณที่เป็นลำดับเบสซ้ำๆ กันของชุดเบส 102 bp ที่สร้างกรดอะมิโน 34 ตัว ซึ่งลำดับเบสแต่ละชุดที่ซ้ำกันของยีน *avrXa* จะมีความแตกต่างกันได้ที่กรดอะมิ

โนตำแหน่งที่ 12 และ13 (White และคณะ, 2000; Shen และ Ronald, 2002; Yang และ White, 2004) จำนวนซ้ำของแต่ละยีน *avrXa* จะแตกต่างกันไปในช่วง 5.5 – 28.5 ซ้ำ (Yang และ White, 2004; Hu และคณะ, 2007) ซึ่งแต่ละยีน *avrXa* จะมีจำนวนซ้ำของเบสที่จำเพาะ ปัจจุบันมีการค้นพบยีน *avrXa* ใน *Xoo* แล้ว 27 ยีน มีการตีพิมพ์ลำดับเบสที่สมบูรณ์แล้ว 4 ยีน ได้แก่ *avrxa*5 *avrXa*7 *avrXa*10 และ *avrXa*27 (Hopkins และคณะ, 1992; Liang และคณะ, 2004; Ponciano และคณะ, 2004; Gu และคณะ, 2005) ผลผลิตโปรตีนที่เกิดจากยีนนี้มีความสำคัญต่อระดับความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อแต่ละไอโซเลทในต้นข้าว (Vera Cruz และคณะ, 2000; Yang และ White, 2004) ซึ่งโปรตีนที่สร้างจากยีน *avrXa* กับโปรตีนที่สร้างจากยีน *R* ที่เข้าคู่กันได้ จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในการป้องกันตัวของพืช ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้เกิดการตอบสนองแบบสูงเกิน (Hypersensitive Response; HR) (Alfano และ Collmer, 1996; Leach และ White, 1996; Yang และคณะ, 1997) มีผลให้เกิดการตายของเซลล์รอบๆบริเวณที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งเป็นการจำกัดการแพร่กระจายและยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อในข้าวได้ การมีอยู่ของยีน *avr* มีผลทำให้ *Xoo* แต่ละไอโซเลท เข้าทำลายข้าวที่มียีน *R* ชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันไปด้วย และความแตกต่างของยีน *avr* แต่ละชนิดนี้ทำให้เกิดความแปรผันและวิวัฒนาการของเชื้อในแต่ละไอโซเลท เพื่อปรับตัวให้สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีน *R* ได้ (Leach และ White, 1996)

2.6 การตอบสนองแบบสูงเกิน (Hypersensitive reponse ; HR)

พืชสามารถถูกบุกรุกจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ทำให้เกิดโรคหรือภาวะที่ทำให้พืชอ่อนแอลงจนไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ทำให้พืชต้องพัฒนากลไกต่างๆ เพื่อที่จะต่อสู้กับการบุกรุกของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ กลไกเหล่านี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ แบบที่ไม่ต่อสู้ (ตั้งรับ) กับแบบที่ต่อสู้ กลไกการป้องกันตัวแบบตั้งรับของพืชประกอบด้วยกลไกทางกายภาพและทางเคมีซึ่งจะป้องกันไม่ให้ติดเชื้อได้ เช่น แบคทีเรียไม่ให้สามารถเข้าสู่ภายในได้ หรือทำให้รูปร่างลักษณะของพืชไม่เหมาะสมหรือเป็นพิษต่อศัตรูพืช ผิวภายนอกของพืชอาจเคลือบด้วยเยื่อบางๆ และเป็นมัน หรือมีขนเล็กๆ เรียกว่า trichomes ซึ่งทั้ง 2 ลักษณะนั้นสามารถช่วยป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชเข้าทำลายได้ง่าย trichomes ของพืชบางชนิดเหนียว และมีลักษณะเป็นต่อมเล็กๆที่ทำให้แมลงที่เกาะไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ (Peter และ Shanower, 1998; Codoso และคณะ, 2009)

พืชมีกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) ต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย หรือ รา การเกิด HR เป็นกลไกที่พืชใช้เพื่อป้องกันการกระจายตัวของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์รอบๆบริเวณที่มีการติดเชื้อ การที่พืชบางชนิดสามารถต้านทานโรคบางโรคได้สามารถอธิบายด้วยทฤษฎี gene-for-gene (gene-for-gene hypothesis) (Flor, 1955; Elingboe, 1976; Leach และ White, 1996; Gabriel, 1999) คือ

การเข้าคู่กันได้ระหว่างยีน *avr* ของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen) กับยีน *R* ของพืช เช่น การเข้าคู่กันได้ของโปรตีนที่เกิดจาก ยีน *avrXa* ใน *Xoo* และ ยีน *Xa* ในข้าว (ตารางที่ 2.2)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคและพันธุ์พืชอาศัย ซึ่งจัดเป็นปฏิสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่างยีน *avr* ของเชื้อสาเหตุโรค และยีน *R* ของพืชซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม (Park, 2005) โดยแบ่งปฏิสัมพันธ์ออกเป็น incompatible interaction และ compatible interaction กล่าวคือ incompatible interaction เป็นปฏิสัมพันธ์ที่เกิดการรับรู้จดจำระหว่างโปรตีน Avr และ โปรตีน R ลักษณะฟีโนไทป์ของปฏิสัมพันธ์นี้คือการเกิด HR ในทางตรงกันข้าม compatible interaction คือปฏิสัมพันธ์ที่ยีนทั้ง 2 ยีนดังกล่าว ไม่สามารถรับรู้และจดจำซึ่งกันและกัน เชื้อสาเหตุโรคจึงสามารถก่อให้เกิดโรคได้ กลไกการเกิด HR (Matthews, 2007) เริ่มจากเมื่อมีเชื้อเข้าทำลายพืชและมีการจดจำ effector หรือ โปรตีน Avr จากจุลินทรีย์นั้นได้ จะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ทำให้ยีน *R* แสดงออก และชักนำให้เกิดการรับและปลดปล่อยไอออนของเซลล์ โดยปลดปล่อยไฮดรอกไซด์และโพแทสเซี่ยมไอออนออกจากเซลล์ และสะสมไฮโดรเจนและแคลเซี่ยมไอออนเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นภายในเซลล์มากมายทำให้เกิด Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ superoxide anions hydrogen peroxide hydroxyl radicals และ nitrous oxide ซึ่งทำให้เกิดการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ จนเซลล์ตายและแตกออก มีการสูญเสียของเหลวภายในเซลล์ ROS ที่เกิดขึ้นจะชักนำให้เกิดการสะสมของสารพวกลิกนิน (lignin) และแคลโลส (callose) ทำให้ผนังเซลล์หนาขึ้น เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อไปยังเซลล์อื่นๆ (Pontier และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังมีการสร้างสารในกลุ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antimicrobial substances) เช่น ไฟโตอเลกซิน และจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดรอยแผลเป็นจุดสีดำหรือน้ำตาลเข้มบริเวณที่มีการติดเชื้อ

นอกจากการเกิด HR ในบริเวณที่มีการติดเชื้อซึ่งเรียกว่า Local Acquired Resistance (LAR) การเกิดการตายของเซลล์บริเวณที่มีการติดเชื้อยังกระตุ้นให้เกิด Systemic Acquired Resistance (SAR) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องทำให้สามารถจดจำศัตรูพืชที่เข้าทำลายและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเซลล์ที่อยู่ไกลออกไปได้ เกิดจากการส่งโมเลกุลสัญญาณ (signal molecule) จากเซลล์ที่ถูกทำลายและเซลล์รอบข้าง ไปยังเซลล์อื่นๆ เพื่อกระตุ้นกลไกในการต้านทานโรค (Ryals และคณะ, 1994)

ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างของชนิดของโปรตีน AvrXa ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ โปรตีน R ในข้าวที่เข้าคู่กันได้

AvrXa ใน *X. oryzae* pv. *oryzae*	โปรตีน R ในข้าวที่เข้าคู่กันได้	AvrXa ใน *X. oryzae* pv. *oryzae*	โปรตีน R ในข้าวที่เข้าคู่กันได้
AvrXa3	Xa3	AvrXa10	Xa10
AvrXa4	Xa4	AvrXa11	Xa11
Avrxa5	xa5	Avrxa13	xa13
AvrXa7	Xa7	AvrXa14	Xa14
AvrXa8	Xa8	AvrXa21	Xa21

การศึกษาความหลากหลายของประชากร *Xoo* โดยใช้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *avr* ในแบคเรียแต่ละไอโซเลทกับสายพันธุ์ข้าวที่มียีน *R* ที่เป็น NILs โดยดูปฏิกิริยาการตอบสนองแบบ HR เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาและแรงงานในการทดสอบ (Hopkins และคณะ, 1992) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคทาง PCR มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของ *Xoo* ในส่วนของยีน *avr* จะสามารถช่วยให้การศึกษาความหลากหลายของเชื้อได้รวดเร็วขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาหาความหลากหลายของ *Xoo* ที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยนำเทคนิคทาง PCR มาช่วยในการศึกษาถึงความแตกต่างในส่วนของยีน *avr* ของเชื้อ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ที่สร้างจากยีน *avr* เพื่อหาความสัมพันธ์ของวิธีดังกล่าวเปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบยีน *avr* โดยดูจากการเกิด HR ในข้าว และจากการจัดกลุ่มความหลากหลายของเชื้อทั้ง 2 วิธี น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในการหาความสัมพันธ์ของการมีอยู่ของยีน *avr* กับ ความสามารถในการทำ ให้เกิดโรคของ *Xoo* ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาพันธุ์ต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวต่อไป

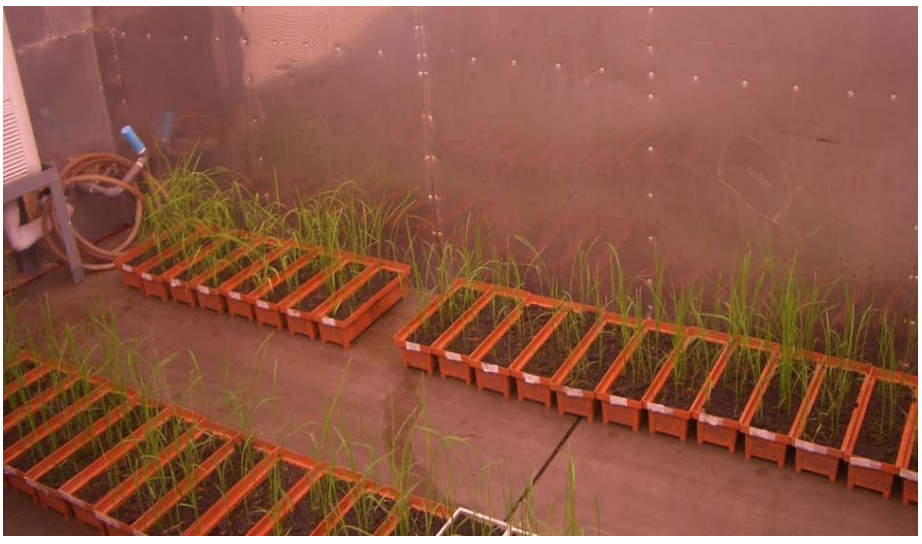
บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลท กับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน

3.1.1 พันธุ์ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ทั้งหมด 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์ ซึ่งเป็น Near Isogenic Lines (NILs) 11 สายพันธุ์ ที่มียีน *R* แตกต่างกัน มีพันธุ์ KDML105 และ IR24 เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานตรวจสอบ (susceptible check) และน้ำสะกุย 19 (NSG19) เป็นพันธุ์ต้านทานโรคมาตรฐานตรวจสอบ (resistant check) (ตารางที่ 3.1) เมล็ดพันธุ์ทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พยอม โคเบลลี่ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี การปลูกทำโดยเพาะเมล็ดที่จานเพาะเมล็ดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายต้นกล้าแต่ละพันธุ์หรือสายพันธุ์ลงปลูกในกระถางขนาด 4x12 นิ้ว ที่มีดินปริมาณ 1 กิโลกรัม และใส่ปุ๋ยมูลไก่อบแห้งรองกระถาง กระถางละ 6 กรัม ทำการย้ายปลูกกระถางละ 6 ต้น (ภาพที่ 3.1) โดยให้ข้าวที่ปลูกได้รับน้ำท่วมขังสม่ำเสมอมีระดับน้ำสูงจากผิวดินประมาณ 1-2 เซนติเมตร หลังจากปลูกข้าวทดสอบเป็นระยะเวลาประมาณ 12 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 อัตรา 0.8 กรัม (ละลายในน้ำ 400 มล.) ต่อกระถาง



ภาพที่ 3.1 ต้นข้าวที่ทำการปลูกเพื่อรอการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ตารางที่ 3.1 ข้าวที่เป็น Near Isogenic Lines (NILs) และพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่ใช้ในการทดลอง ทั้งหมด 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์

อันดับที่	พันธุ์หรือสายพันธุ์	ลักษณะเฉพาะของพันธุ์หรือสายพันธุ์
1	น้ำสะกุย 19(NSG19)	พันธุ์ต้านทานมาตรฐานตรวจสอบ (resistant check)
2	KDML105	พันธุ์อ่อนแอมาตรฐานตรวจสอบ (susceptible check)
3	IR24	พันธุ์อ่อนแอมาตรฐานตรวจสอบ (susceptible check)
4	IRRIBB3	มียีน *R* ชนิด *Xa3*
5	IRRIBB4	มียีน *R* ชนิด *Xa4*
6	IRRIBB5	มียีน *R* ชนิด *xa5*
7	IRRIBB7	มียีน *R* ชนิด *Xa7*
8	IRRIBB8	มียีน *R* ชนิด *Xa8*
9	IRRIBB10	มียีน *R* ชนิด *Xa10*
10	IRRIBB11	มียีน *R* ชนิด *Xa11*
11	IRRIBB13	มียีน *R* ชนิด *xa13*
12	IRRIBB14	มียีน *R* ชนิด *Xa14*
13	IRRIBB21	มียีน *R* ชนิด *Xa21*

3.1.2 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบการเกิด HR

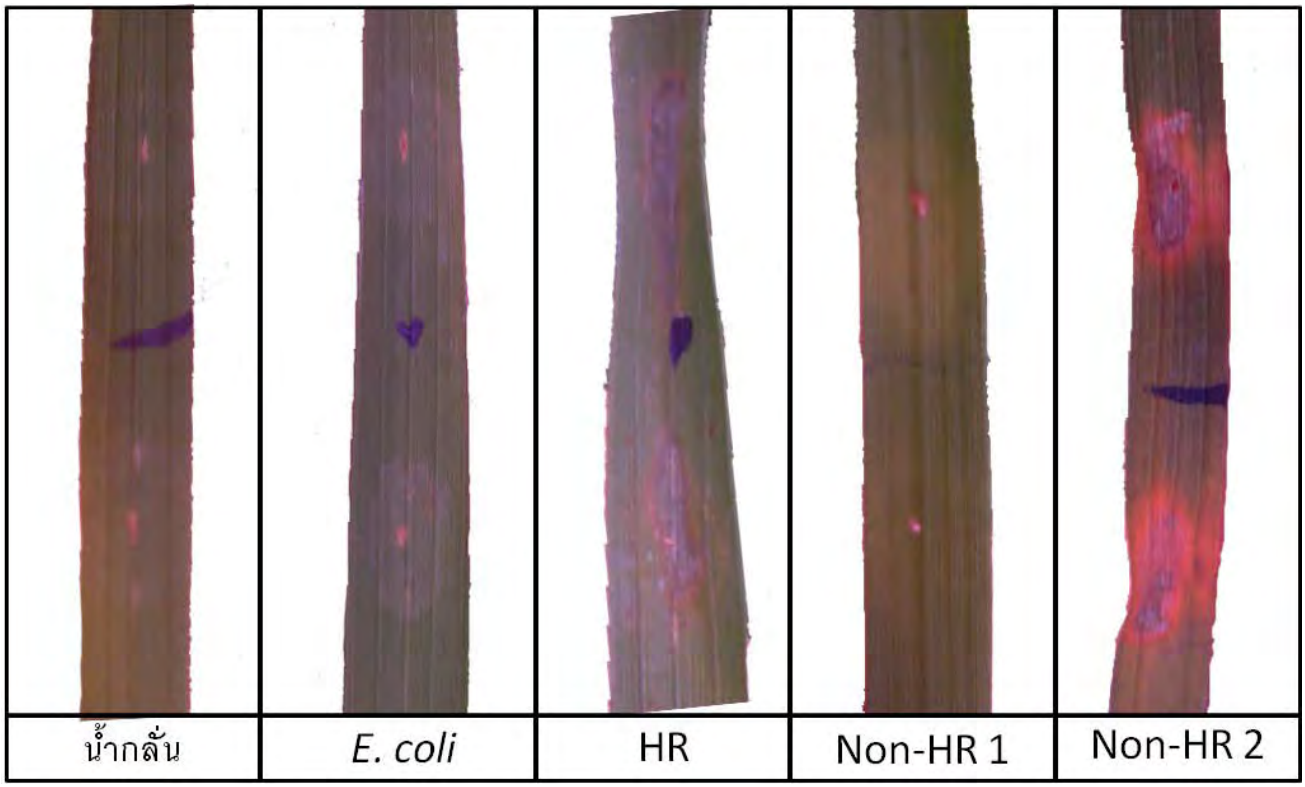
Xoo จำนวนทั้งหมด 80 ไอโซเลท ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ดร .พยอม โคเบลลี่ จากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ซึ่งแยกมาจากข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้งในแปลงเกษตรกร และในศูนย์วิจัยข้าวต่างๆ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวน 12 จังหวัด (ตารางที่ 3.2) โดยเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคที่รวบรวมได้ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ปี พ .ศ. 2547 จำนวน 27 ไอโซเลท ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ปี พ .ศ. 2548 จำนวน 26 ไอโซเลท และ ในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2549 จำนวน 27 ไอโซเลท การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ ทำโดยเก็บในกลีเซอรอล (analytical grade) ความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ –80°ซ เพื่อคงสภาพและคุณสมบัติของแบคทีเรียให้สม่ำเสมอตลอดการทดลอง การเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษา ทำโดย นำ *Xoo* ไอโซเลทที่เก็บรักษาไว้มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง Nutrient Agar (NA) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณประชากรในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA เตรียมสารละลายแบคทีเรียและปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อให้อยู่ประมาณที่ 2 x 10^9 cfu/ml ด้วยการใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/visible/NIR spectrophotometer, UK) ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยมีค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ประมาณ 1 (Zhu และคณะ 2000)

3.1.3. ศึกษาการเกิด HR จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ใน *Xoo* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน

การทดสอบ HR ดัดแปลงจาก Reimer และ Leach (1991) โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 3 มล. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เจาะตรงส่วนกลางบริเวณที่ขอบใบทั้ง 2 ขนานกันทางด้านหลังใบของต้นข้าวที่มีอายุ 12 วัน จากนั้นใช้หลอดฉีดยาที่ปราศจากเข็มและนึ่งฆ่าเชื้อแล้วขนาด 3 มล. ดูดสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 ฉีดลงไป ณ ตำแหน่งที่ทำแผลก่อนหน้านี้ จนได้รอยช้ำน้ำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มม. (ภาพที่ 3.2) ใช้ *Xoo* ไอโซเลท Vir09 ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงในระดับ 9 และทำให้ข้าวเกิดโรคได้ 100 % ในปี พ .ศ. 2552 (ได้ความอนุเคราะห์จาก ดร . พยอม โคเบลลี่ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี) ใช้แบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวควบคุมในการอ่านผลของ HR ทดสอบโดยใช้ใบข้าวที่มีใบคลี่เต็มที่แล้วใบที่ 2 ของต้นข้าวแต่ละต้น ใบละ 2 จุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ *Xoo* 1 ไอโซเลท ในข้าว 1 พันธุ์หรือสายพันธุ์ เก็บพืชทดสอบในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 28-30°ซ ความชื้นในอากาศ 95-100% บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใบข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ณ ตำแหน่งที่ได้รับ

การปลูกเชื้อ (Zhu และคณะ, 1998) เมื่อพบการตายของเนื้อเยื่อบนใบข้าว ณ ตำแหน่งที่ได้รับ *Xoo* ไอโซเลทต่างๆ ภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ เปรียบเทียบกับตัวควบคุม หมายถึงการเกิด HR (แสดงผลเป็นบวก) ส่วนสายพันธุ์ข้าวที่แสดงผลลบ หมายถึงไม่พบการเกิด HR และถูกเก็บต่ออีก 4-8 เพื่อบันทึกผลการเกิดโรคขอบใบแห้ง ซึ่งได้แก่ ข้าวที่แสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผล และข้าวที่แสดงอาการเหลืองและมีการลุกลามของการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน (ภาพที่ 3.3)

ภาพที่ 3.2 รอยช้ำน้ำที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อในใบข้าวด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*



ภาพที่ 3.3 ผลจากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุมในลักษณะต่างๆ ได้แก่

HR = Hypersensitive Response หมายถึง เกิด HR ซึ่งเกิดการตายของเซลล์บริเวณที่มีการปลูกเชื้ออย่างรวดเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง

Non-HR 1 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ แต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน

Non-HR 2 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน

น้ำกลั่น และ *E. coli* ที่เป็นชุดควบคุมซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ

ตารางที่ 3.2 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	ชื่อย่อ	จังหวัด	% การระบาดในพื้นที่	ระดับความรุนแรง*
1	2547	Kresek	KHK1-UBN-01	UBN04(1)	อุบลราชธานี	5-10	9
2	2547	Kresek	KHK2-UBN-02	UBN04(2)	อุบลราชธานี	5-10	9
3	2547	Kresek	KHK3-UBN-03	UBN04(3)	อุบลราชธานี	5-10	9
4	2547	Kresek	KHK4-UBN-04	UBN04(4)	อุบลราชธานี	5-10	9
5	2547	Kresek	KHK5-UBN-05	UBN04(5)	อุบลราชธานี	5-10	9
6	2547	Kresek	KHK6-UBN-06	UBN04(6)	อุบลราชธานี	5-10	9
7	2547	Kresek	KHK7-UBN-07	UBN04(7)	อุบลราชธานี	5-10	9
8	2547	Kresek	KHK8-UBN-08	UBN04(8)	อุบลราชธานี	5-10	9
9	2547	Leaf Blight	DC1-UBN-09	UBN04(9)	อุบลราชธานี	1-5	5
10	2547	Leaf Blight	RoiEt2-10	Roiet04	ร้อยเอ็ด	5-10	7
11	2547	Leaf Blight	SRN4-12	SRN04	สุรินทร์	5-10	7
12	2547	Leaf Blight	NKI1-13	NKI04(1)	หนองคาย	10-20	7
13	2547	Leaf Blight	NKI2-14	NKI04(2)	หนองคาย	10-20	7
14	2547	Leaf Blight	NKI3-15	NKI04(3)	หนองคาย	10-20	9
15	2547	Leaf Blight	UND2-16	UDN04(1)	อุดรธานี	20-50	9
16	2547	Leaf Blight	UND6-17	UDN04(2)	อุดรธานี	20-50	9
17	2547	Leaf Blight	UND9-18	UDN04(3)	อุดรธานี	20-50	9
18	2547	Leaf Blight	KKN1-20	KKN04	ขอนแก่น	1-5	5
19	2547	Leaf Blight	SKN4_4-21	SKN04(1)	สกลนคร	20-50	9
20	2547	Leaf Blight	SKN4_6-22	SKN04(2)	สกลนคร	20-50	9
21	2547	Leaf Blight	ANC2-24	ANC04	อำนาจเจริญ	1-5	5
22	2547	Leaf Blight	NKP2-25	NKP04	นครพนม	1-5	5
23	2547	Leaf Blight	MDH3-28	MDH04(1)	มุกดาหาร	10-20	7

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดบาดแผล 1-3% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดบาดแผล 7-12% ของ พื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดบาดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดบาดแผล 76-87% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิด บาดแผล 95-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ (Chaudhary, 1996)

ตารางที่ 3.2 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	ชื่อย่อ	จังหวัด	% การระบาดในพื้นที่	ระดับความรุนแรง*
24	2547	Leaf Blight	MDH4-29	MDH04(2)	มุกดาหาร	10-20	7
25	2547	Leaf Blight	MDH5-30	MDH04(3)	มุกดาหาร	10-20	7
26	2547	Leaf Blight	MDH6-31	MDH04(4)	มุกดาหาร	10-20	7
27	2547	Leaf Blight	MDH7-32	MDH04(5)	มุกดาหาร	10-20	7
28	2548	Kresek	KH1.1_05UBN-01	UBN05(1)	อุบลราชธานี	10-20	9
29	2548	Kresek	KH1.9_05UBN-02	UBN05(2)	อุบลราชธานี	10-20	9
30	2548	Kresek	KH2.7_05UBN-03	UBN05(3)	อุบลราชธานี	10-20	9
31	2548	Leaf Blight	PB7.3_05UBN-06	UBN05(4)	อุบลราชธานี	10-20	7
32	2548	Leaf Blight	KH1.1_05UBN-10	UBN05(5)	อุบลราชธานี	10-20	7
33	2548	Leaf Blight	KH3.2_05UBN-11	UBN05(6)	อุบลราชธานี	10-20	7
34	2548	Leaf Blight	SRT1.2_05UBN-16	UBN05(7)	อุบลราชธานี	10-20	7
35	2548-	Leaf Blight	SRT7.5_05UBN	UBN05(8)	อุบลราชธานี	10-20	7
37	2548	Leaf Blight	SRN2.5_05	SRN05(1)	สุรินทร์	1-5	5
38	2548	Leaf Blight	SRN1.1_05	SRN05(2)	สุรินทร์	1-5	5
39	2548	Leaf Blight	SRN4.1_05	SRN05(3)	สุรินทร์	1-5	5
40	2548	Leaf Blight	UDN2.3_05	UDN05(1)	อุดรธานี	10-20	9
41	2548	Leaf Blight	UDN6.2_05	UDN05(2)	อุดรธานี	10-20	9
42	2548	Leaf Blight	UDN10.5_05	UDN05(3)	อุดรธานี	10-20	9
43	2548	Leaf Blight	UDN17.5_05	UDN05(4)	อุดรธานี	10-20	9
44	2548	Leaf Blight	UDN18.5_05	UDN05(5)	อุดรธานี	10-20	9
45	2548	Leaf Blight	NKI2.3_05	NKI05	หนองคาย	20-50	9
46	2548	Leaf Blight	SKN3.4_05	SKN05(1)	สกลนคร	20-50	9

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดบาดแผล 1-3% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดบาดแผล 7-12% ของ พื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดบาดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดบาดแผล 76-87% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิด บาดแผล 95-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ (Chaudhary, 1996)

ตารางที่ 3.2 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	ชื่อย่อ	จังหวัด	% การระบาดในพื้นที่	ระดับความรุนแรง*
47	2548	Leaf Blight	KRS1.4_05	KRS05(1)	กาฬสินธุ์	1-5	5
48	2548	Leaf Blight	KRSKD5_05	KRS05(2)	กาฬสินธุ์	1-5	5
49	2548	Leaf Blight	KRS1.1_05-63	KRS05(3)	กาฬสินธุ์	1-5	5
50	2548	Leaf Blight	KRS1.2_05-65	KRS05(4)	กาฬสินธุ์	1-5	5
51	2548	Leaf Blight	SKN1.2_05-611	SKN05(2)	สกลนคร	20-50	9
52	2548	Leaf Blight	SKN6.2_05-636	SKN05(3)	สกลนคร	20-50	9
53	2548	Leaf Blight	SKN1.5_05-669	SKN05(4)	สกลนคร	20-50	9
54	2549	Leaf blight	SRN1.1_06-871	SRN06(1)	สุรินทร์	10-20	7
55	2549	Leaf blight	SRN(17)1.1_06-868	SRN06(2)	สุรินทร์	10-20	7
56	2549	Leaf blight	SRNRD15_1.1_06-820	SRN06(3)	สุรินทร์	10-20	7
57	2549	Leaf blight	SRNRD06_1.1_06-877	SRN06(4)	สุรินทร์	10-20	7
58	2549	Leaf blight	SRN(7)1.1_0.6-865	SRN06(5)	สุรินทร์	10-20	7
59	2549	Leaf blight	SRN4_1.1_06-874	SRN06(6)	สุรินทร์	10-20	7
60	2549	Leaf blight	SRNKD1.1_06-763	SRN06(7)	สุรินทร์	10-20	7
61	2549	Leaf blight	SRN_SKN14_06-883	SRN06(8)	สุรินทร์	10-20	7
62	2549	Leaf blight	SKNKD1.1_06-569	SKN06(1)	สกลนคร	10-20	7
63	2549	Leaf blight	SKNRD10_1.1_06-649	SKN06(2)	สกลนคร	10-20	7
64	2549	Leaf blight	SKN1.5_06-678	SKN06(3)	สกลนคร	10-20	7
65	2549	Leaf blight	SKNRD6_3.3_06-586	SKN06(4)	สกลนคร	10-20	7
66	2549	Leaf blight	KRS1.1_06-249	KRS06	กาฬสินธุ์	1-5	5
67	2549	Leaf blight	NKI1.1_06-484	NKI06	หนองคาย	1-5	5
68	2549	Leaf blight	UDNRD6_1.1_0.6-399	UDN06(1)	อุดรธานี	10-20	7
69	2549	Leaf blight	UDNKD1.4_06-302	UDN06(2)	อุดรธานี	10-20	7

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดบาดแผล 1-3% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดบาดแผล 7-12% ของ พื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดบาดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดบาดแผล 76-87% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิด บาดแผล 95-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ (Chaudhary, 1996)

ตารางที่ 3.2 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	ชื่อย่อ	จังหวัด	% การระบาดในพื้นที่	ระดับความรุนแรง*
70	2549	Leaf blight	URRC1.1_06UBN-895	UBN06(1)	อุบลราชธานี	1-5	5
71	2549	Leaf blight	YSTKD1.2_06-170	YST06	ยโสธร	1-5	5
72	2549	Leaf blight	SRTRD15_1.1_06UBN-709	UBN06(2)	อุบลราชธานี	10-20	7
73	2549	Leaf blight	KHRD15_1.1_06UBN-11	UBN06(3)	อุบลราชธานี	10-20	7
74	2549	Leaf blight	KH1.2_06UBN-11	UBN06(4)	อุบลราชธานี	10-20	7
75	2549	Leaf blight	PB1.3_06UBN-99	UBN06(5)	อุบลราชธานี	10-20	7
76	2549	Leaf blight	HDRD6_2.1_06UBN-67	UBN06(6)	อุบลราชธานี	10-20	7
77	2549	Leaf blight	SRTRD15_3.2_06UBN-67	UBN06(7)	อุบลราชธานี	10-20	7
78	2549	Leaf blight	SRT8.2_06UBN-752	UBN06(8)	อุบลราชธานี	10-20	7
79	2549	Leaf blight	PBRD15_15.3_06UBN-138	UBN06(9)	อุบลราชธานี	10-20	7
80	2549	Leaf blight	KHKD4.1_06UBN-40	UBN06(10)	อุบลราชธานี	10-20	7

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดบาดแผล 1-3% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดบาดแผล 7-12% ของ พื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดบาดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดบาดแผล 76-87% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิด บาดแผล 95-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ (Chaudhary, 1996)

3.2 การวัดค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากใบข้าวที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุม

ทำการปลูกเชื้อในข้าว 11 พันธุ์หรือสายพันธุ์ ด้วย *Xoo* 25 ไอโซเลท (ตารางที่ ก .1 ภาคผนวก) ตามวิธีในข้อ 3.1.3 หลังจากปลูกเชื้อด้วย *Xoo* ในวันที่ 1 2 และ 4 วัดค่าการรั่วไหลของไอออน โดยตัดใบข้าวบริเวณที่มีการปลูกเชื้อให้บริเวณที่มีการปลูกเชื้ออยู่กลางชิ้นที่ตัด มีความยาวประมาณ 1 ซม. แบ่งใบข้าวที่ปลูกเชื้อเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ใบข้าวที่ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลง (ชุดควบคุม) ใบข้าวที่แสดงลักษณะ HR ใบข้าวที่ไม่แสดงการเกิด HR แต่แสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน (Non-HR 1) และใบข้าวที่ไม่แสดงการเกิด HR แต่แสดงอาการเหลืองแ ละแผลมีขนาดใหญ่ขึ้น หลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน (Non-HR 2) ใส่ใบข้าวลงในหลอดทดลองขนาด 15 มล. ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 4 มล. หลอดละ 5 ชิ้น ที่ได้จากการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* แต่ละไอโซเลท ในข้าวพันธุ์เดียวกัน นำหลอดทดลองมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 320 rpm เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการรั่วไหลของไอออน ด้วยเครื่อง Expanded Range

Conductivity Meter รุ่น 09-328 (Fisher Scientific, USA) ในหน่วยไมโครโอห์ม (μΩ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 17 สำหรับ ANOVA เพื่อตรวจค่าความแปรปรวน และ DMRT ในการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการรั่วไหลของไอออนในแต่ละคู่ทดสอบ

3.3 ศึกษาหาลำดับเบสบนยีน *avrXa* ที่มีความแตกต่างกันและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณซ้ำบนยีน *avrXa*

ค้นหาข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสบนยีน *avrXa* ที่ประกอบด้วยยีน 4 ชุด ได้แก่ยีน *avrxa5 avrXa7 avrXa10* และ *avrXa27* จากฐานข้อมูลของ National center for biotechnology information (NCBI) การเปรียบเทียบเน้นส่วนที่มีการซ้ำกัน (repeat) ของลำดับเบสบนยีน *avrXa* แต่ละชุดเพื่อออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับบริเวณที่ต้องการบนยีน *avrXa* เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสที่ซ้ำกันในแต่ละยีนด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalW ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนต้นและส่วนปลายของบริเวณซ้ำบนยีน *avrXa* ทั้ง 4 ชุด เพื่อจำแนกความแตกต่างของ *Xoo* จากจำนวนซ้ำของแต่ละยีน *avrXa* นำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบแล้วส่งไปสังเคราะห์ที่ BioDesign (BioDesign Co., Ltd., Thailand)

3.4 การสกัดดีเอ็นเอ

นำโคโลนีเดี่ยวของ *Xoo* แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°ซ ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อจากวิธีการของ Ausubel และคณะ (2002) ดูดสารละลายแบคทีเรียที่เจริญเต็มที่ (log phase) มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวออก เติม TE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 567 µl 10% SDS ปริมาตร 30 µl และ 20 mg/ml Proteinase K ปริมาตร 3 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 µl และ CTAB solution (10% CTAB ใน 0.7 M Nacl) ปริมาตร 80 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 700 µl เขย่าให้ผสมกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 µl เขย่าให้ผสมกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนนำไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanal ที่แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10°ซ 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดมา ผส มให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อย ๆ เทของเหลวใสออกระวังไม่ให้ตะกอนติดไป ด้วยเติม 70% ethanol ปริมาตร 500 µl ผสมสารให้เข้ากันเบา ๆ 2-3 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งระวังไม่ให้ตะกอนติดไปด้วย ทิ้งให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้องเติม TE Buffer ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันเติม RNase (100 mg/ml) ปริมาตร 1 µl เขย่าให้ผสมกัน นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 60 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจ สอบ ปริมาณด้วยเทคนิคของ electrophoresis โดยใช้ 1% (w/v) agarose gel เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ -20°ซ

3.5 ศึกษาความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี PCR

ศึกษาและทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมจาก *Xoo* ไอโซเลทต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR และทดสอบประสิทธิภาพในด้านความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกให้เป็นตัวแทนจากแต่ละจังหวัด ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่บนยีน *avrXa* ชุดต่างๆ ใน *Xoo* จำนวน 80 ไอโซเลท โดยมีไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจาก *avrXa* 4 ยีน จำนวน 2 ชุด (ตารางที่ 3.3) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ทำในหลอดขนาด 0.2 ml (PCR microtube) ใช้เครื่อง PTC-100 Peltier Thermal (USA) ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 1x Taq DNA polymerase buffer (Vivantis, Poland) 1.5 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs 5 µmol primer 1 U Tag DNA polymerase (Vivantis, Poland) และดีเอ็นเอปริมาณ 50 ng โดยอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนประกอบด้วย 94°ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94°ซ 1 นาที 60°ซ (57°ซ สำหรับไพรเมอร์ avrXooOut) 1 นาที 72°ซ 2 นาที จำนวน 40 รอบปฏิกิริยา และ 72 °ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคของ electrophoresis โดยใช้ 1% (w/v) agarose gel ใน 0.5 x TBE Buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที ในการตรวจสอบใช้ผลผลิต PCR ปริมาตร 10 µl ผสมกับ loading Dye ปริมาตร 1 µl ทำการย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง gel documentation analysis set (BIO RAD, USA) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับ VC 1kb DNA ladder (Vivantis, Poland)

ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์ 2 คู่ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับส่วนยีน *avrXa* เพื่อใช้ในการทำ PCR

คู่ที่	ชื่อ	Forward primer (5'---3')	Reverse primer (5'---3')
1	avrXooIn	GTGCCCCCCTGAACCTGACC	CTCTCCAGCGCCTGCTTGCC
2	avrXooOut	AAGACATCGTTGGCGTCGGCAA	TTCACTGCAGCCAGGGCAGGAC

3.6 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

เตรียม *E. coli* competent cell โดย streak *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง Luria-Bertani agar (LB) บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 25 มล. แล้วใช้เครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดสารละลายแบคทีเรียดังกล่าว ปริมาตร 250 µl ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 25 มล. แล้วใช้เครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 580 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV/visible/NIR spectrophotometer, UK) นำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 7 นาที จึงเทสารละลายชั้นบน (supernatant) ทิ้ง แล้วใส่ 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 5 มล. ผสมสารให้ละลายเข้ากันดี นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายชั้นบนทิ้ง แล้วใส่ 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 5 มล. ผสมสารให้ละลายเข้ากันดี แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายชั้นบนทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อด้วย 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 1 มล. เก็บรักษาไว้ในหลอดที่มี 7% DMSO ที่อุณหภูมิ - 80°ซ

ทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในแต่ละกลุ่มของ *Xoo* ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ว่าเป็นส่วนที่ซ้ำกันบนยีน *avrXa* โดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ทำการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Leusden, Netherlands) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาละลายใน TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5) ปริมาตร 20 µl ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T easy cloning kit (Promega, MD, USA) แล้วถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้น โดยวิธี Freeze thaw transformation โดยใช้ *E. coli* competent cell ปริมาตร 50 µl ผสมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T ปริมาตร 10 µl แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 42°ซ ทันทีเป็นเวลา 90 วินาที แช่ในน้ำแข็ง 3 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่า ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นสารละลายชั้นบนออกปริมาตร 900 µl ผสมสารละลายที่เหลือในหลอดให้เข้ากัน แล้วจึงดูดสารละลายเชื้อดังกล่าวปริมาตร 100 µl ไป spread บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อคัดเลือก transformant จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำ Colony PCR และทำการตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis เพื่อยืนยันการมีอยู่ของชิ้นดีเอ็นเอ ทำการเพาะเลี้ยง

เซลล์ของโคโลนีที่คัดเลือกได้นั้น นำมาสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาละลายใน TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5) ปริมาตร 20 µl แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอโดย Automatic sequencer 3730xl (Macrogen Inc., Korea) ในการอ่านค่าออกมาในรูปแบบของ fluorographs

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลผลิตที่ได้จาก PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ มาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อจัดกลุ่ม เปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยดูที่ขนาดของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบ อ่านผลจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ (Binary data) โดยให้ 1 = มี และ 0 = ไม่มี เก็บรวบรวมข้อมูลจากไพรเมอร์ทั้งหมด แ ละทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ SIMQUAL module เป็นการประมวลผลของ coeffieient จากความเหมือนของยีน โดยคำนวณตามแบบของ Dice's coefficient (Dice, 1945; Willett, 1981) จัดกลุ่มของดีเอ็นเอด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรมแกรม PAST, version 1.13

ในการวิเคราะห์ข้อมูลจากการเกิด HR จะใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลแบบเดียวกันกับการทำ PCR ข้างต้น โดยให้ 1 = ลักษณะที่ไม่ใช่การเกิด HR (Non-HR) และ 0 = การเกิด HR (HR)

3.8 ศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายที่ได้จากการเกิด HR การทำ PCR

ทำการจัดกลุ่มของเชื้อที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน *avr* กับกลุ่มที่จัดได้จากการตอบสนองแบบ HR หาความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มความหลากหลายของเชื้อจากทั้ง 2 วิธี โดยการเปรียบเทียบประชากร *Xoo* ในกลุ่มที่จัดได้ และการนำข้อมูลจากทั้ง 2 วิธีที่ได้ มาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ร่วมกันด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรมแกรม PAST, version 1.13

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avrXa* ใน *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลท กับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* ที่แตกต่างกัน

จากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Xoo* และข้าวสายพันธุ์ที่มียีน R ที่แตกต่างกัน พบว่า *Xoo* ไอโซเลทที่มาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน ส่วนใหญ่จะเกิดการตอบสนองในข้าวในลักษณะเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบในข้าวพันธุ์เดียวกัน (ตารางที่ 4.1) เช่น เชื้อที่มาจากจังหวัดหนองคาย ปี 2547 ทั้ง 3 ไอโซเลท (NKI04(1) - NKI04(3)) เชื้อจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ปี 2548 จำนวน 4 ไอโซเลท (KRS05(1) - KRS05(4)) ไม่เกิด HR ในข้าวทั้ง 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์เลย *Xoo* จากจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2549 จำนวน 10 ไอโซเลท (UBN06(1) - UBN06(10)) 80 % ไม่แสดงลักษณะ HR ในข้าวทั้ง 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์ มีเพียงบางไอโซเลทคือ UBN06(2) เกิด HR กับข้าวพันธุ์ NSG 19 ไอโซเลท UBN06(1) และ UBN06(5) เกิด HR กับข้าวสายพันธุ์ IRRIBB3 *Xoo* บางไอโซเลทมาจากจังหวัดเดียวกันแต่ให้ผลต่างกัน เช่น ไอโซเลท UBN04(1) UBN04(4) และ UBN04(7) จากจังหวัดอุบลราชธานีเก็บตัวอย่างในปี 2547 เช่นกัน ให้ผลการตอบสนองในข้าวโดยเกิด HR Non-HR1และ Non-HR2 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) *Xoo* ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันแต่ปีที่เก็บตัวอย่างต่างกันก็อาจมีการเกิด HR ที่คล้ายกัน เช่น การเกิด HR ในข้าวพันธุ์น้ำสะกุย (NSG 19) ของ *Xoo* จากจังหวัดอุบลราชธานีที่เก็บตัวอย่างในปี 2547 2548 และ 2549 และ *Xoo* ที่มาจากจังหวัดสกลนคร ที่เก็บตัวอย่างในปี 2548 และ 2549 เป็นต้น เมื่อดูปฏิสัมพันธ์ของเชื้อต่อข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน อาจระบุชนิดของยีน *avrXa* ของ *Xoo* ได้ เช่น *Xoo* จากจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2547 ไอโซเลท UBN04(1) เกิด HR กับข้าวสายพันธุ์ IRRIBB8 น่าจะมียีน *avrXa8* ไอโซเลท SKN05(3) จากจังหวัดสกลนคร ปี 2548 เกิด HR กับข้าวสายพันธุ์ IRRIBB3 น่าจะมียีน *avrXa3* เนื่องจากข้าวสายพันธุ์ IRRIBB3 มียีน *Xa3* อยู่ เมื่อเกิด HR กับ *Xoo* ไอโซเลทใด จึงคาดได้ว่า *Xoo* ไอโซเลทดังกล่าวต้องมียีน *avrXa3* ที่เข้าคู่กันได้ และจากปฏิสัมพันธ์ของ *Xoo* และข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์ต่างๆ ดังตารางที่ 4.1 *Xoo* ทั้ง 80 ไอโซเลท อาจมีบางไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่ไม่มียีน *avrXa* เลยหรือมียีน *avrXa* ที่ผิดปรกติไป และ บางไอโซเลทมียีน *avrXa* 1 ถึง 4 ยีน ในแต่ละไอโซเลท

ผลการเกิดและไม่เกิด HR ภายใน 48 ชั่วโมงหลังการปลูก *Xoo* แต่ละไอโซเลทที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับข้าว 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์ เมื่อ นำมาจัดกลุ่มเพื่อศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* จากการตอบสนองที่แตกต่างกันในข้าว โดยคำนวณตามแบบของ Dice's coefficient (Dice, 1945; Willett, 1981) กำหนดให้ HR = 0 และ N (ลักษณะอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR (Non-HR)) = 1 จัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรมแกรม

PAST, version 1.13 ที่ระดับความเหมือน $\geq$ 0.85 สามารถจัดกลุ่มจากการสร้างเดนโดรแกรม (ภาพที่ 4.1) ได้ 9 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมี *Xoo* ไอโซเลท ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดสกลนคร (SKN05(1)) ปี 2548

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี (UDN05(2)) ปี 2548

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี (UDN05(3)) ปี 2548

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Xoo* 3 ไอโซเลท จากจังหวัดมุกดาหาร (MDH04(4) ปี 2547 ขอนแก่น (KKN04) ปี 2547 หนองคาย (NKI06) ปี 2549

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Xoo* 70 ไอโซเลทจากปี 2547 ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี (UDN04(1) UDN04(3)) สกลนคร (SKN04(1) SKN04(2)) อุบลราชธานี(UBN04(1) - UBN04(8)) ร้อยเอ็ด (Roiet04) สุรินทร์ (SRN04) หนองคาย (NKI04(1) - NKI04(3)) นครพนม (NKP04) และ มุกดาหาร (MDH04(1) - MDH04(3))

ปี 2548 ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี (UBN05(1) - UBN05(9)) สุรินทร์ (SRN05(1) - SRN05(3)) หนองคาย (NKI05) กาฬสินธุ์ (KRS05(1) - KRS05(4)) สกลนคร (SKN05(2) - SKN05(4))

ปี 2549 ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ (SRN06(1) - SRN06(8)) สกลนคร (SKN06(1) - SKN06(4)) กาฬสินธุ์ (KRS06) ยโสธร (YST06) อุบลราชธานี (UBN06(1) - UBN06(10)) และชุดความคุมคือ น้ำกลั่น *E.coli* และ *Xoo*(Vir09) จากจังหวัดอุบลราชธานี ที่มีการระบาด 100 เปอร์เซนต์ เก็บตัวอย่างในปี 2552

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดมุกดาหาร (MDH04(5)) ปี 2547

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี (UDN04(2)) ปี 2547

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (UBN04(9)) ปี 2547

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอำนาจเจริญ (ANC04) ปี 2547

จากการจัดกลุ่มประชากร *Xoo* โดยดูจากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ในเชื้อและยีน *R* ในข้าว พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ 70 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่มที่ 5 ที่เหลืออีก 8 กลุ่มมีประชากร 1 และ 3 ไอโซเลท ซึ่งพบว่าไอโซเลทใน 8 กลุ่มย่อยนี้มีปฏิสัมพันธ์แบบ HR กับยีน *R* ใน ข้าว 3-4 ยีน (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ไอโซเลทที่	พันธุ์ข้าว / ชื่อย่อ *Xoo*	NSG19	KDML105	IR24	IRRIBB3	IRRIBB4	IRRIBB5	IRRIBB7	IRRIBB8	IRRIBB10	IRRIBB11	IRRIBB13	IRRIBB14	IRRIBB21
1	UBN04(1)	HR	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N
	UBN04(2)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	UBN04(3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	UBN04(4)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	UBN04(5)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR	HR
6	UBN04(6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	UBN04(7)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	UBN04(8)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	UBN04(9)	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N	HR	N
28	UBN05(1)	HR	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
29	UBN05(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	UBN05(3)	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
31	UBN05(4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N
32	UBN05(5)	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
33	UBN05(6)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
34	UBN05(7)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N
35	UBN05(8)	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
36	UBN05(9)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR
70	UBN06(1)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N

หมายเหตุ : HR = เกิด HR, N = Non-HR (การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ต่อ)

ไอโซเลทที่	พันธุ์ข้าว / ชื่อย่อ *Xoo*	NSG19	KDML105	IR24	IRRIBB3	IRRIBB4	IRRIBB5	IRRIBB7	IRRIBB8	IRRIBB10	IRRIBB11	IRRIBB13	IRRIBB14	IRRIBB21
72	UBN06(2)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
73	UBN06(3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
74	UBN06(4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
75	UBN06(5)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
76	UBN06(6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77	UBN06(7)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
78	UBN06(8)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
79	UBN06(9)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
80	UBN06(10)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	Roiet04	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	SRN04	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
37	SRN05(1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR
38	SRN05(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
39	SRN05(3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N
54	SRN06(1)	HR	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
55	SRN06(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
56	SRN06(3)	HR	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N
57	SRN06(4)	HR	N	N	N	N	HR	N	HR	N	N	N	N	N
58	SRN06(5)	N	N	HR	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N

หมายเหตุ : HR = เกิด HR, N = Non-HR (การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ต่อ)

ไอโซเลทที่	พันธุ์ข้าว / ชื่อย่อ *Xoo*	NSG19	KDML105	IR24	IRRIBB3	IRRIBB4	IRRIBB5	IRRIBB7	IRRIBB8	IRRIBB10	IRRIBB11	IRRIBB13	IRRIBB14	IRRIBB21
59	SRN06(6)	HR	N	N	N	N	N	N	HR	N	HR	N	N	N
60	SRN06(7)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
61	SRN06(8)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	HR
12	NKI04(1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	NKI04(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14	NKI04(3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
45	NKI05	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N
67	NKI06	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	HR	N	N
15	UDN04(1)	HR	N	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N	N	N
16	UDN04(2)	HR	N	N	N	N	HR	N	N	HR	HR	N	N	N
17	UDN04(3)	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N	N	N
40	UDN05(1)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	UDN05(2)	N	N	N	HR	HR	N	N	N	N	N	N	HR	HR
42	UDN05(3)	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N
43	UDN05(4)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	HR
44	UDN05(5)	N	N	N	HR	N	N	N	HR	N	HR	N	N	N
68	UDN06(1)	HR	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
69	UDN06(2)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18	KKN04	HR	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	HR	N	N

หมายเหตุ : HR = เกิด HR, N = Non-HR (การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ต่อ)

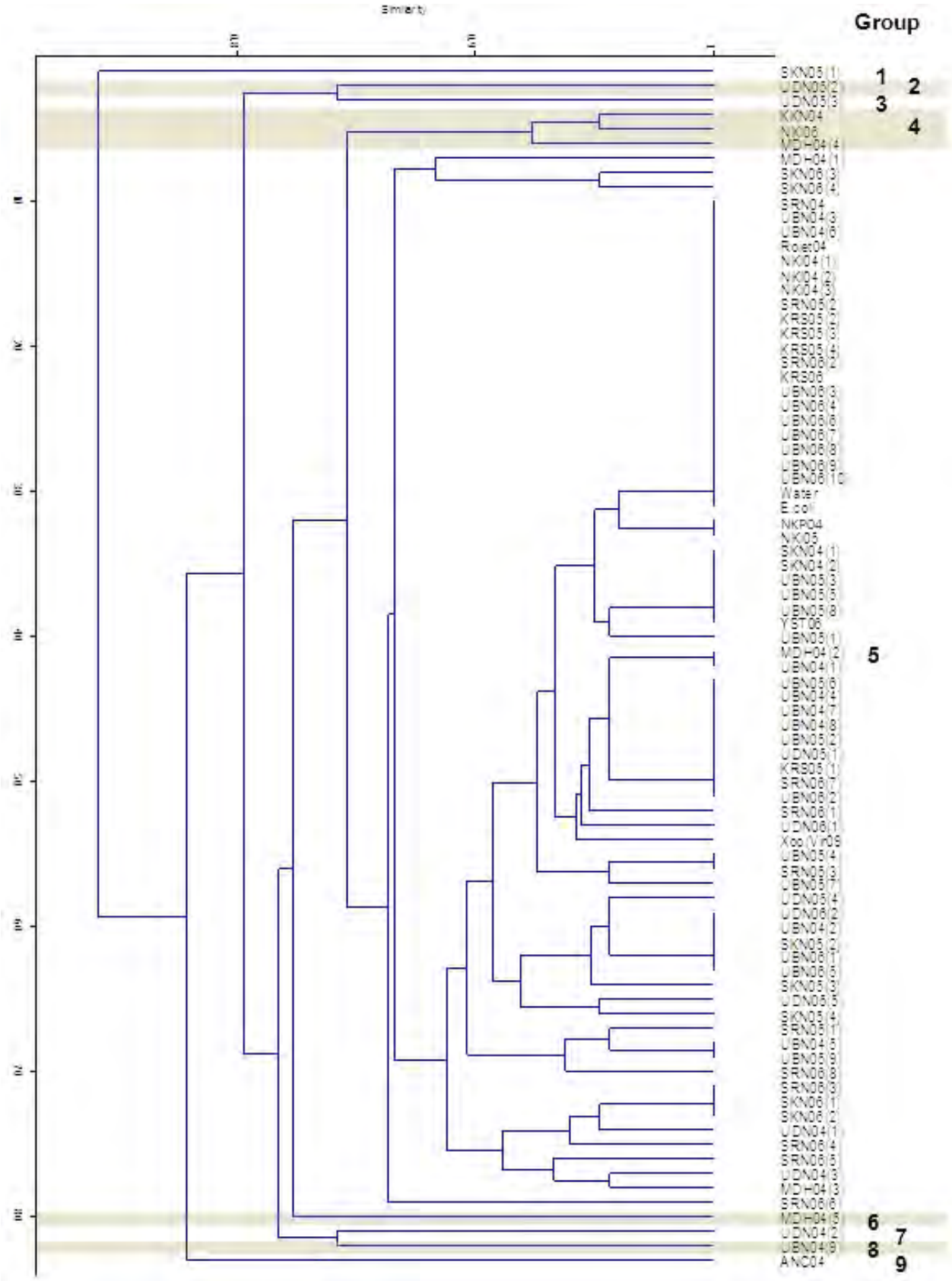
ไอโซเลทที่	พันธุ์ข้าว / ชื่อย่อ *Xoo*	NSG19	KDML105	IR24	IRRIBB3	IRRIBB4	IRRIBB5	IRRIBB7	IRRIBB8	IRRIBB10	IRRIBB11	IRRIBB13	IRRIBB14	IRRIBB21
19	SKN04(1)	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
20	SKN04(2)	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
46	SKN05(1)	HR	N	N	HR	N	N	HR	N	HR	HR	N	N	N
51	SKN05(2)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52	SKN05(3)	N	N	N	HR	N	HR	N	N	N	N	N	N	N
53	SKN05(4)	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	HR	N	N	N
62	SKN06(1)	HR	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N
63	SKN06(2)	HR	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N
64	SKN06(3)	N	N	N	N	N	HR	N	HR	N	N	HR	N	N
65	SKN06(4)	N	N	N	N	N	HR	N	HR	N	N	N	N	N
21	ANC04	N	N	HR	N	HR	N	N	HR	N	N	N	N	HR
22	NKP04	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N
23	MDH04(1)	N	N	N	N	N	N	N	HR	HR	N	N	N	N
24	MDH04(2)	HR	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N
25	MDH04(3)	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N
26	MDH04(4)	HR	N	N	N	HR	N	N	HR	N	N	HR	N	N
27	MDH04(5)	HR	N	N	HR	HR	N	N	HR	N	N	N	N	N
47	KRS05(1)	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
48	KRS05(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

หมายเหตุ : HR = เกิด HR, N = Non-HR (การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์จากการปลูกเชื้อด้วย*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ต่อ)

ไอโซเลทที่	พันธุ์ข้าว / ชื่อย่อ *Xoo*	NSG19	KDML105	IR24	IRRIBB3	IRRIBB4	IRRIBB5	IRRIBB7	IRRIBB8	IRRIBB10	IRRIBB11	IRRIBB13	IRRIBB14	IRRIBB21
49	KRS05(3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	KRS05(4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
66	KRS06	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N	N
71	YST06	N	N	N	N	HR	N	N	N	N	N	N	N	N
	Water	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	E.coli	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Xoo(Vir09)	HR	N	N	N	N	N	N	N	HR	N	N	N	N

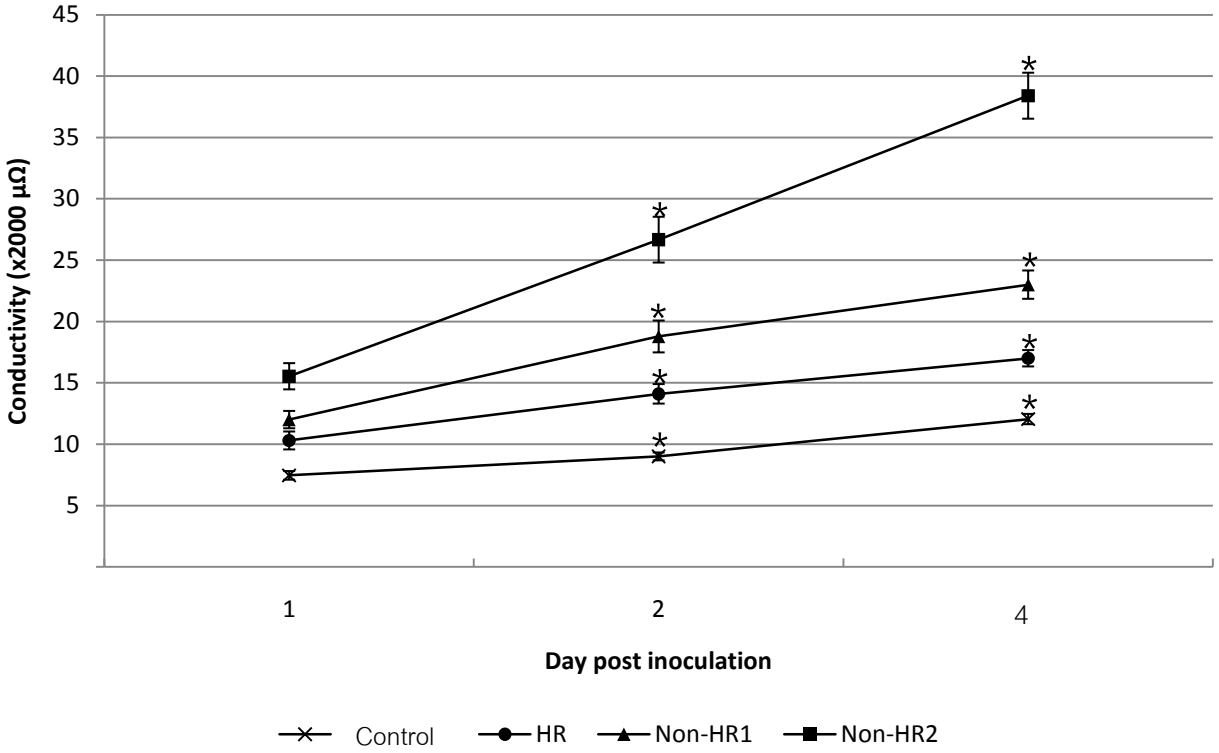
หมายเหตุ : HR = เกิด HR, N = Non-HR (การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR)



ภาพที่ 4.1 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) ด้วยวิธี UPGMA

4.2 ค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากใบข้าวที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุม

ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* เข้าไปในข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์ที่มียีน *R* แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.1) มีผลให้เกิดการตอบสนองในรูปแบบที่ไม่เหมือนกัน ได้แก่ การเกิด HR หรือ อาการที่ไม่ใช่ HR ซึ่งได้แก่ ข้าวที่แสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผล (Non-HR1) และข้าวที่แสดงอาการเหลืองและมีการลุกลามของการเกิดโรค (Non-HR2) หลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน (ภาพที่ 3.3) ลักษณะการตอบสนองดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์พืชถูกทำลายในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถวัดเซลล์ที่ถูกทำลายได้จากการรั่วไหลของไอออนออกนอกเซลล์ เมื่อนำ ใบข้าวที่แสดงอาการในลักษณะต่างๆที่เกิดขึ้นมาทำการวัดค่าการรั่วไหลของไอออน โดยการวัดผลการทดลอง 3 ครั้ง คือ วันที่ 1 2 และ 4 หลังจากการปลูกเชื้อ พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าการรั่วไหลของไอออนในเซลล์ข้าว ที่แสดงการเกิด HR การตอบสนองแบบอื่นๆที่ไม่ใช่การเกิด HR และในชุดควบคุมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) หลังจากการปลูกเชื้อแล้ว 2 และ 4 วัน (ภาพที่ 4.2 ; ตาราง ก.1-ก.2 ภาคผนวก) ค่าการรั่วไหลของไอออนในใบข้าวที่เกิดการตอบสนองแบบ Non-HR2 มีค่ามากที่สุด รองล งมาคือใบข้าวที่เกิดการตอบสนองแบบ Non-HR1 ใบข้าวที่เกิด HR และ ในชุดควบคุม ซึ่งมีค่าการรั่วไหลของไอออนเท่ากับ 38.40 23.00 17.00 และ 12.05 μΩ ตามลำดับ ค่าการรั่วไหลของไอออนของแต่ละปฏิสัมพันธ์เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อเพิ่มมากขึ้น การวัดค่าการรั่วไหลของไอออนจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะสามารถแยกลักษณะการตอบสนองที่เกิดขึ้นได้ นอกจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ และเป็นการยืนยันผลของการทดสอบการเกิด HR ว่าเป็นการประเมินที่มีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าการรั่วไหลของไอออนในการตอบสนองแต่ละรูปแบบ

HR = เกิด HR ภายใน 48 ชั่วโมง

Non-HR 1 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน

Non-HR 2 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน

Control = ชุดควบคุมซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ

หมายเหตุ : * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95 % ของค่าเฉลี่ยในแต่ละลักษณะการตอบสนอง

4.3 ผลที่ได้จากการหาลำดับเบสของยีน *avrXa* และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa*

จากการศึกษาลำดับเบสของยีน *avrXa* ที่มีการตีพิมพ์ลำดับเบสแล้ว 4 ยีน คือ *avrXa5* *avrXa7* *avrXa10* และ *avrXa27* (GenBank: AAQ79773.2, AAS58128.2, AAA92974.1, AAY54168.1, NCBI) นำมาเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ด้วย Multiple Sequence Alignment (ClustalW) พบว่ายีน *avrXa* มีความเหมือนกันในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกัน (repeat

sequence) ที่มีขาด 102 bp ซึ่งอยู่บริเวณส่วนกลางของยีน *avrXa* โดยมีความแตกต่างกันที่จำนวนซ้ำ (ตารางที่ 4.2) ส่วนลำดับเบสที่อยู่ก่อนและหลังบริเวณซ้ำของแต่ละยีน *avrXa* มีความแตกต่างกัน และลำดับเบสของยีน *avrXa* ทั้ง 4 ยีน นั้นมีปริมาณเบส G และ C ที่ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 4.2 จำนวนซ้ำของบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกันในยีน *avrXa* 4 ยีน ที่นำมาออกแบบไพรเมอร์

ยีน	จำนวนซ้ำ	ขนาดจำนวนซ้ำ (bp)
avrXa5	5.5	561
avrXa7	25.5	2,601
avrXa10	15.5	1,581
avrXa27	16.5	1,683

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa* ทำโดยออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมระหว่างลำดับเบสที่เริ่มต้นของบริเวณซ้ำและส่วนท้ายของบริเวณซ้ำหรือให้ห่างออกมาจากบริเวณที่ซ้ำประมาณ 100-200 bp ตรวจสอบคุณสมบัติไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับส่วนของยีน *avrXa* ด้วยโปรแกรม blast (ภาพที่ 4.3) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งหมด 8 คู่ คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสม คือ ไพรเมอร์มีความยาวประมาณ 20-22 bp ค่า Tm (melting temperature) ไม่ต่างกันเกินไป และเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ (Dimers) น้อย จำนวน 2 คู่ (ตารางที่ 3.1) เพื่อใช้ในทำการ PCR

GenBank: AY377126.2

ภาพที่ 4.3 แสดงตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ 2 คู่ บนยีน *avrXa5* ส่วนแรเงาสีเทา คือส่วนที่มีลำดับเบสที่ซ้ำกัน

* คือ ตำแหน่งที่ไพรเมอร์ avrXooIn จับบนยีน

\+ คือ ตำแหน่งที่ไพรเมอร์ avrXooOut จับบนยีน

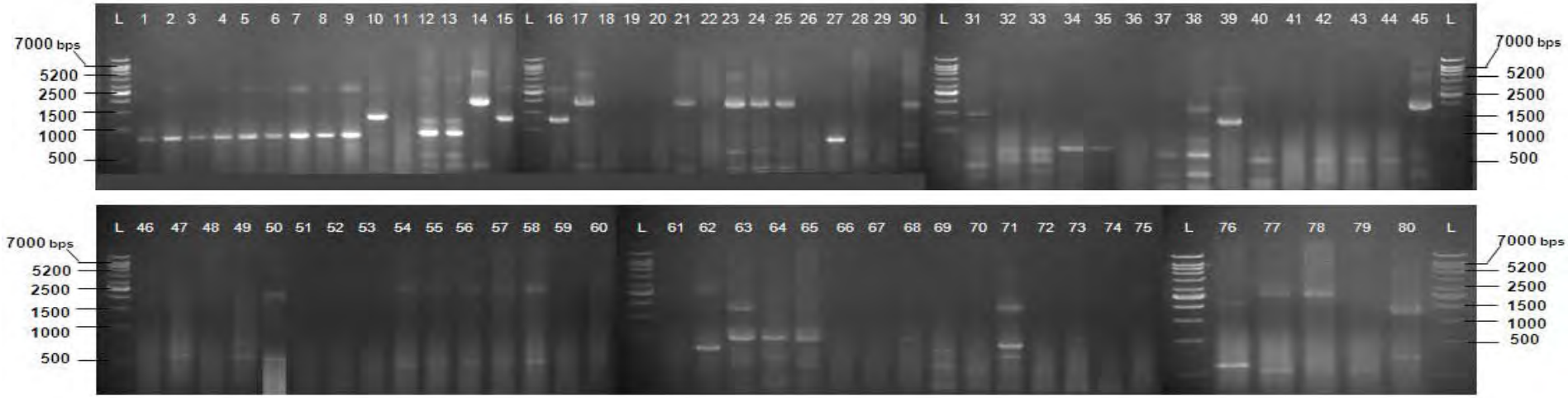
● คือ ตำแหน่งเบสเริ่มต้นและสุดท้ายของจำนวนซ้ำ

4.4 ความหลากหลายของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการทำ PCR และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

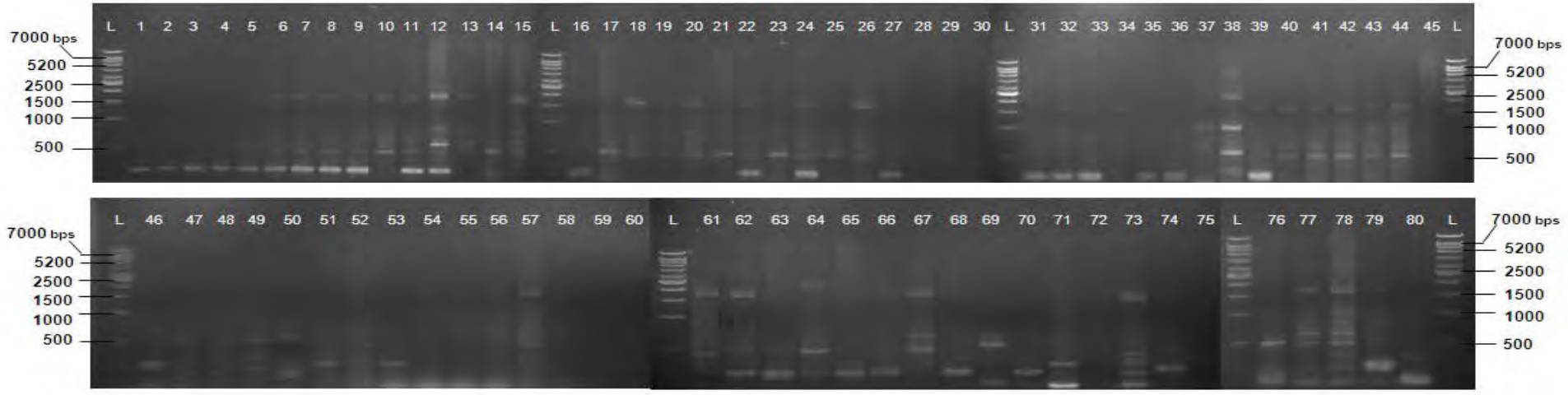
จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีน *avr* จำนวน 2 คู่ นำมาใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ในบริเวณซ้ำของยีน *avrXa* ใน *Xoo* ทั้งหมด 80 ไอโซเลท พบว่าสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 31 แถบ ซึ่งเกิดแถบดีเอ็นเอในไพรเมอร์ avrXooIn 17 แถบ และไพรเมอร์ avrXooOut 14 แถบ (ภาพที่ 4.4-4.5) ไพรเมอร์ avrXooIn ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับ *Xoo* ได้ 65 ไอโซเลท มี 15 ไอโซเลทที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับไพรเมอร์นี้ ส่วนไพรเมอร์ avrXooOut ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับ *Xoo* 76 ไอโซเลท ไม่เกิด 4 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาจากขนาดของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไอโซเลท พบว่า *Xoo* ที่เก็บมาจากจังหวัดและปีเดียวกันให้แถบดีเอ็นที่มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน เช่น กลุ่มของ *Xoo* ที่มาจากจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2547 ได้แก่ UBN04(1)-UBN04(9) (Lane 1-9) *Xoo* ที่มาจากจังหวัดอุดรธานี ปี 2548 ได้แก่ UDN05(1)-UDN05(4) (Lane 41-44) *Xoo* บาง

ไอโซเลทที่มาจากจังหวัดเดียวกัน ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป เช่น กลุ่มของ *Xoo* ที่มาจากจังหวัดสกลนคร ปี 2549 ได้แก่ SKN06(1)- SKN06(4) (Lane 62-65) *Xoo* ที่มาจากจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2549 ได้แก่ UBN04(1)- UBN04(10) (Lane 71-80) ส่วน *Xoo* ที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดและปีที่ต่างกันส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างกัน มีเพียงบางแถบที่อาจมีขนาดเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณารูปแบบโดยรวมแล้วจะมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมี *Xoo* ที่มาจากปีเดียวกันแต่จังหวัดต่างกันที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันมาก เช่น *Xoo* ที่มาจากจังหวัดขอนแก่นและสกลนคร ปี 2547 ได้แก่ KKN04 และ SKN04(2) (Lane 18 และ 20) จากจังหวัดอำนาจเจริญและมุกดาหาร ปี 2547 ได้แก่ ANC04 และ MDH04(1) (Lane 21 และ 23) มีบางไอโซเลทที่มาจากจังหวัดร้อยเอ็ดคือ RoiEt04 (Lane 10) และยโสธร ได้แก่ YST06 (Lane 70) ที่เก็บตัวอย่างมาเพียงจังหวัดละ 1 ไอโซเลทและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากจังหวัดอื่นๆ

ในการทดลองเอาชิ้นส่วนของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ avrXooIn ของ *Xoo* ไอโซเลท UBN04(2) ที่มีความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอน้อยมีความจำเพาะค่อนข้างสูง แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa5* (≈500-700 bps) ของ *Xoo* ที่มีในฐานข้อมูล ไปทำการหาลำดับเบสพบว่า ไม่มีความเหมือนกับยีน *avrXa* ของ *Xoo* แต่จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล มีความ คล้ายคลึงกับ 16s rDNA ของ uncultured bacteria accession No. GenBank: FM252220.1 (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ avrXooIn แถว 1-80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 1 แถว L คือ VC 1kb Ladder (Vivantis, Poland)



ภาพที่ 4.5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ avrXooOut แถว 1-80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 1 แถว L คือ VC 1kb ladder (Vivantis, Poland)

```
XooSamplePCR_cloneT7Promoter          ---------- NNNNNGGGNGANTCG- CATGCTCCGGCCG      30
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  ACGTATCAAGACATAATCACGGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGACAT     500
                                                 *    **   ** **  *    * *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTG- - - - - TGCCCCCCTGAA-CCTGAC
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CGTTGGCGTCGGCAAACAGTTGTCCGGCGCACGCGCCCTGGAGGCCTTGC
                                 *  *****  * **    * * *    *       **  ***  **   ***   *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CAACTGCCCTGACGGTACAA ACGGCGTAACCGCAACACTGAGCGGTACAT    130
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  TCACGAAGGCGGGGGAGTTGAGAGGTCCGCCGTTACAGTTGGACACAGGC     600
                                   **       *   **       *  *       ***  *** *  *     *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CAGACATCAACGGTAAC- - - - TTCAGCAAT GAGGGCACGGCCGGAGACAT
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CAACTTCTC AAGATTGCAAGACGTGGCGGCGTGAC CGCAGTGGAGGCAGT
                                 **        * * *  *          **    * *   *  * *   *  *  *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GGCTGTACAGTTGCAGACACTGACTGGAC TTCAGCTGACATCAGGAAGCA    230
gi|35395759_1-2118_Xanthomonas  GCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCCTGAACCTGACCCCGG     700
                                 *  **  *  *     *  *******  **     *  ****

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GCCTGCAGACGGCTGTCGATCAGTCACAGAGTGCGTCATT CAGTCTTAAG
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  ACCAAGTGGTGGCCATCG- CCAGCAATAGTG -GCGGCAAGCAGGCGCTGG
                                 **     *   ***   ***   *** *  ** *  ***  **   *** *    *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GCGCGG-GCGATAA CGCCTGGCGGTA—ATCCCA - - - CCTCAGGTACGCT  330
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  AGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACC     800
                                     *** **       *    ** ****     *  ***    **   *       *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CCAGTC—GGCTA T TGATATCACCTAT- ACG-TGGCAGT AAG-ACATT CT
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CCGGACCAGGTCGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT
                                 **  *  *   **    * *  *** **     ***  **** * *** *     **

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GCACTTG – TATTGCGGAAATATAATAC GGATTGACGAGATTTACG- - -GA  430
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GGAGACG GTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGA    900
                                *  *    *  *    ****    *         *    ** *   **      *   **

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GACCAAATGAGTTACTTTAA AAGACGGATTAAACTTGCCACAAGATTTTC
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAG-CAGGC
                                  **   *  **  *  *     *   *     * *  *  **   ****     *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CCTGGGAATTAT AGTTCTTATGTTGCCAGGGCTGTCCTGGG - - - - - -CC  530
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCC   1000
                                  ****   *    *     *    ***** **  * *****  *  **         **

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    GGAAATTCGCGTATTTCGTGTACGCCGCCTCCGGTTTACGATGCAGGCAG
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  TGACCCCGGACCAGGTCGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCAG
                                 **       *   *  *** **  *  ****   *  * *  *  *** ****

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    AAACTGGGCTGATGC TTCAGTACCTATTC CGGTTCCTCTGCCTAGTATAA   630
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GCGCTGGA - -GACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCC-AGGACCA  1100
                                     ****    **  *  * ***    ** **  * * * **  **** **  *  *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    TGGAACAAGGTACCGGTGTGGATGTTGATCCTGCACAGGTAGTTCAGTGC
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  TGG- - CCTGACCCCGGACCAGGTCGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGG
                                 ***   *  *   ****     * *  **  * *    ***  *  *  * *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    ATGCTGATTGCCTCTGCT GTTATTCAGAG TATAGGCAATCACGGCACCAC   730
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGT- GCTGTGCCAG  1200
                                        **     *  * *       *  * * * *  *  *  * *   ***

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    AATGCCTAATGTAATAT C- - ACCCTATTTAAGTCAT -GCCGATAATAAAA
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GAC- CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTCGTGGCCATCGCCAGCAATGGCG
                                 *   * *     *  *    *  ***    *     *  *** ***    ***

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    ATATAATAT TCTTAATGAG T-CAGCGGGTAAACAACAGAGTTATTATCTA   830
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GCAAGCAGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCG  1200
                                  *          *    ***    *  *   *   *    *    *  ***

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    CAGC - -GCATCATCAAGTGGGAATTATC- CATTATCTT - - -TCACTTCAA
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGG
                                   *   **   * *  *       *  * * * *   ***       *  **

XooSamplePCR_cloneT7Promotere   CAGGCAAGCAGCGCTGGAGAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC -CTGC   930
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  CGGACGTCCTGCCCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGG  1400
                                 * * *    * **  *****   *  * *  *  *  ***   **   ***  * *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    AGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTA
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  AATTGATCAGAAGAG TCAATAGCCGTATTGGCGAACGCACGTCCCATCGC
                                 * *  ** **  * * *  *     **      *  * *  ***    *

XooSamplePCR_cloneT7Promoter    TTCTATAGTGTCACC-----------------------------------      995
Xoo_avrXa5 _AY377126.2Database  GTTGCCGACCTCGCGCACGTGGTGCGCGTGCTTGGTTTTTTCCAGAGCCA  1500
                                  *         **  *
```

ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณซ้ำของยีน *avrXa5* ในฐานข้อมูลกับลำดับเบสตัวอย่าง ของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการทำPCR โดยใช้โปรแกรม ClustalW

4.5 ผลการจัดกลุ่มความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ (Cluster analysis) ที่ได้จากการทำ PCR

จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ สามารถจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อ (Cluster analysis) *Xoo* 80 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ SIMQUAL module ซึ่งเป็นการประมวลผลของ coeffieient จากความเหมือนของยีน โดยคำนวณตามแบบของ Dice's coefficient (Dice, 1945; Willett, 1981) จัดกลุ่มของดีเอ็นเอด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรมแกรม PAST, version 1.13 ที่ระดับความเหมือน $\geq$ 0.05 ได้ 20 กลุ่ม จากเดนโดรแกรม (ภาพที่ 4.7) โดยแต่ละกลุ่มมี *Xoo* ไอโซเลท ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Xoo* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดสุรินทร์ จากปี 2548 (SRN05(1) SRN05(2))

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดยโสธร จากปี 2549 (YST06)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี จากปี 2549(UDN06(2))

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดหนองคาย จากปี 2548(NKI05)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Xoo* 3 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี จากปี 2548 (UBN05(1)) และ 2549 (UBN06(2) UBN06(5))

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *Xoo* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดหนองคาย จากปี 2547(NKI04(1) NKI04(2))

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดสุรินทร์ จากปี 2548 (SRN05(3))

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย *Xoo* 7 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี จากปี 2548 (UBN05(1) UBN05(4) UBN05(5) UBN05(6)) และ สกลนคร จากปี 2549 (SKN06(2) SKN06(3) SKN06(4))

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย *Xoo* 24 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี จากปี 2548 (UDN05(1) - UDN05(5)) สกลนคร จากปี 2548 (SKN05(1) SKN05(3))สุรินทร์ จากปี 2547 (SRN04) และ 2549 (SRN06(1) - SRN06(8)) หนองคาย จากปี 2549 (NKI06) กาฬสินธุ์ จากปี 2548 (KRS05(1) - KRS05(4)) และ อุบลราชธานี จากปี 2549 (UBN06(7) - UBN06(9))

กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดหนองคาย จากปี 2547 (NKI04(3))

กลุ่มที่ 11 ประกอบด้วย *Xoo* 6 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี จากปี 2547 (UDN04(3)) มุกดาหาร จากปี 2547 (MDH04(1) - MDH04(3)) อำนาจเจริญ จากปี 2547 (ANC04) และ อุบลราชธานี จากปี 2549 (UBN06(9))

กลุ่มที่ 12 ประกอบด้วย *Xoo* 6 ไอโซเลท จากจังหวัดนครพนม (NKP04) จากปี 2547 ขอนแก่น (KKN04) จากปี 2547 สกลนคร จากปี 2547 (SKN04(1) SKN04(2)) มุกดาหาร (MDH04(4)) จากปี 2547 และอุบลราชธานี จากปี 2548 (UBN05(2))

กลุ่มที่ 13 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (UBN06(3)) จากปี 2549

กลุ่มที่ 14 ประกอบด้วย *Xoo* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดร้อยเอ็ด จากปี 2547 (RoiEt04) และ อุดรธานี จากปี 2547 (UDN04(1))

กลุ่มที่ 15 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี จากปี 2547 (UDN04(2))

กลุ่มที่ 16 ประกอบด้วย *Xoo* 11 ไอโซเลท จากจังหวัดมุกดาหาร จากปี 2547 (MDH04(5)) สกลนคร จากปี 2549 (SKN06(1)) และอุบลราชธานี จากปี 2547 (UBN04(1) - (UBN04(9))

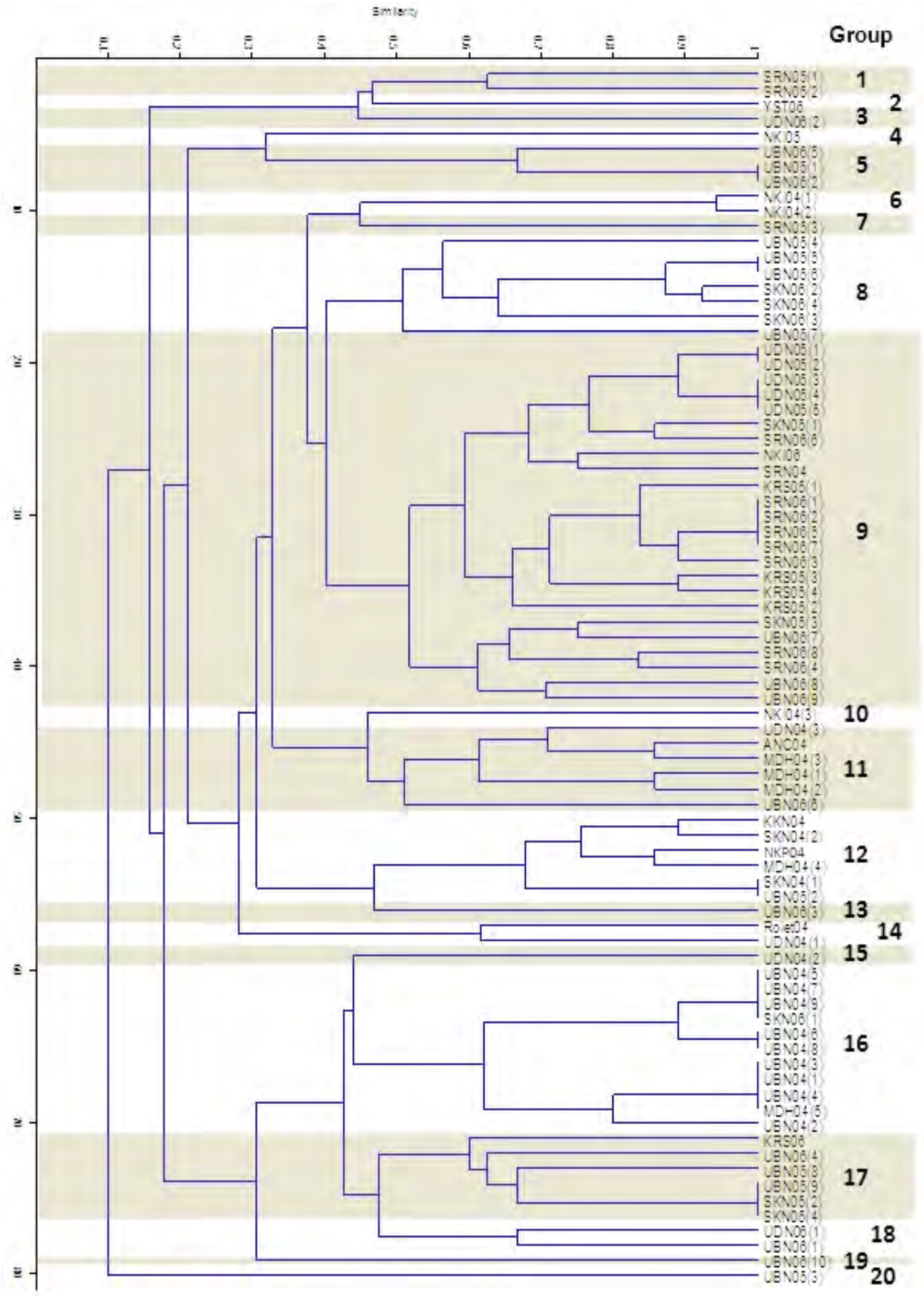
กลุ่มที่ 17 ประกอบด้วย *Xoo* 6 ไอโซเลท จากจังหวัดสกลนคร จากปี 2548 (SKN05(2) SKN05(4)) กาฬสินธุ์ จากปี 2549 (KRS06) และ อุบลราชธานี จากปี 2548 (UBN05(8) UBN05(9)) และ ปี 2549 (UBN06(4))

กลุ่มที่ 18 ประกอบด้วย *Xoo* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (UBN06(1)) จากปี 2549 อุดรธานี (UDN06(1)) จากปี 2549

กลุ่มที่ 19 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (UBN06(10)) จากปี2548

กลุ่มที่ 20 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (UBN05(3)) จากปี2548

จากการจัดกลุ่มที่ได้ 20 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่ม ที่มีประชากร 24 ไอโซเลท รองลงมามีจำนวนประชากร 11 ไอโซเลท และมีกลุ่มย่อยอีก 18 กลุ่ม ซึ่งเชื้อที่ทำการศึกษานั้นมีการกระจายตัวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งตอนบน ตอนกลาง และตอนล่าง เชื้อที่เก็บมาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกันจะมีความใกล้เคียงกันเมื่อทำการจัดกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อปี 2547 จากจังหวัดอุบลราชธานี ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ 16 ซึ่งต่างกับเชื้อปี 2548 และ 2549 จากจังหวัดอุบลราชธานี ที่มีความหลากหลายและกระจายตัวมากกว่า โดยจัดอยู่ ใน 10 กลุ่ม คือ กลุ่ม 5 กลุ่ม 8 กลุ่ม 9 กลุ่ม 11 กลุ่ม 12 กลุ่ม 13 กลุ่ม 17 กลุ่ม 18 กลุ่ม 19 และกลุ่ม 20



ภาพที่ 4.7 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA

4.6 ความสัมพันธ์ของกลุ่มเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) และการทำ PCR

เมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่ม *Xoo* จากข้อมูลการเกิด HR และการทำ PCR พบว่าการจัดกลุ่มจากข้อมูลการเกิด HR ให้จำนวนกลุ่มที่น้อยกว่าการจัดกลุ่มจากข้อมูลการทำ PCR ที่ระดับความเหมือน $\geq$0.85 และ $\geq$0.50 ตามลำดับ ไอโซเลทส่วนใหญ่ (70 ไอโซเลท) รวมอยู่ในกลุ่มใหญ่กลุ่มเดียวและมีความหลากหลายมาก เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลการเกิด HR *Xoo* ในกลุ่มนี้รวมไอโซเลทที่มาจากหลายจังหวัดและมาจากการเก็บเชื้อทั้ง 3 ปี ซึ่งการจัดกลุ่มโดยใช้ผลของการทำ PCR สามารถแยกกลุ่มใหญ่ดังกล่าว ออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้ โดยเชื้อในกลุ่มย่อยนี้มีความจำเพาะของไอโซเลทที่มาจากจังหวัดและปีเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ ความสอดคล้องของก ารจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากทั้ง 2 วิธี พบได้ในบางกลุ่มเท่านั้น เช่น เชื้อจากจังหวัดมุกดาหารในปี 2547 (MDH04 (1-5)) ถูกจัดอยู่ใน 3 กลุ่ม โดยใช้ข้อมูลจากทั้ง 2 วิธี

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมาจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ร่วมกันด้วยโปรแกรมเดียวกันกับการจัดกลุ่มด้วยข้อมูล PCR และการเกิด HR พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้ 14 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน $\geq$0.75 จากเดนโดรแกรม (ภาพที่ 4.8) โดยแต่ละกลุ่มมี *Xoo* ไอโซเลท ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Xoo* 5 ไอโซเลท จากปี 2547 ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น (KKN04) สกลนคร (SKN04(2)) และมุกดาหาร (MDH04(4)) จากปี 2549 สุรินทร์ (SRN06(8)) และหนองคาย (NKI06)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Xoo* 42 ไอโซเลท จากปี 2547 ได้แก่ จังหวัดสกลนคร (SKN04(1)) อุบลราชธานี (UBN04(1) - UBN04(9)) ร้อยเอ็ด (Roiet04) สุรินทร์ (SRN04) นครพนม (NKP04) และ มุกดาหาร (MDH04(5))

ปี 2548 ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี (UBN05(2) - UBN05(3) และ UBN05(7) - UBN05(9)) สุรินทร์ (SRN05(3)) กาฬสินธุ์ (KRS05(1) - KRS05(4)) สกลนคร (SKN05(2) - SKN05(4)) และ อุดรธานี (UDN05(1) และ UDN05(4))

ปี 2549 ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี (UDN06(1)) สกลนคร (SKN06(1) กาฬสินธุ์ (KRS06) อุบลราชธานี (UBN06(1) - UBN06(10))

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Xoo* 6 ไอโซเลท จากปี 2547 จังหวัดหนองคาย (NKI04(1) และ NKI04(2)) จากปี 2548 อุบลราชธานี (UBN05(5) และ UBN05(6)) และจากปี 2549 สกลนคร (SKN06(2) และ SKN06(4))

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Xoo* 2 ไอโซเลท จากปี 2547 จังหวัดมุกดาหาร (MDH04(1) และ MDH04(2))

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Xoo* 7 ไอโซเลท จากปี 2548 จังหวัดหนองคาย (NKI05) จากปี 2549 จังหวัดสุรินทร์ (SRN06(1) - SRN06(5) และ SRN06(7))

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *Xoo* 4 ไอโซเลท จากปี 2547 ได้แก่ จังหวัดหนองคาย (NKI04(3)) อุดรธานี (UDN04(3)) อำนาจเจริญ (ANC04) และมุกดาหาร (MDH04(3))

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี (UDN05(2)) ปี 2548

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย *Xoo* 4 ไอโซเลท จากปี 2548 ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี (UDN05(3) และ UBN05(5)) และ สกลนคร (SKN05(1)) จากปี 2549 จังหวัดสุรินทร์ (SRN06(6))

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากปี 2548 จังหวัดอุบลราชธานี (UBN05(1))

กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วย *Xoo* 4 ไอโซเลท จากปี 2547 จังหวัดสุรินทร์ (SRN05(1) และ SRN05(2)) ปี 2549 ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี (UDN06(2)) และยโสธร (YST06)

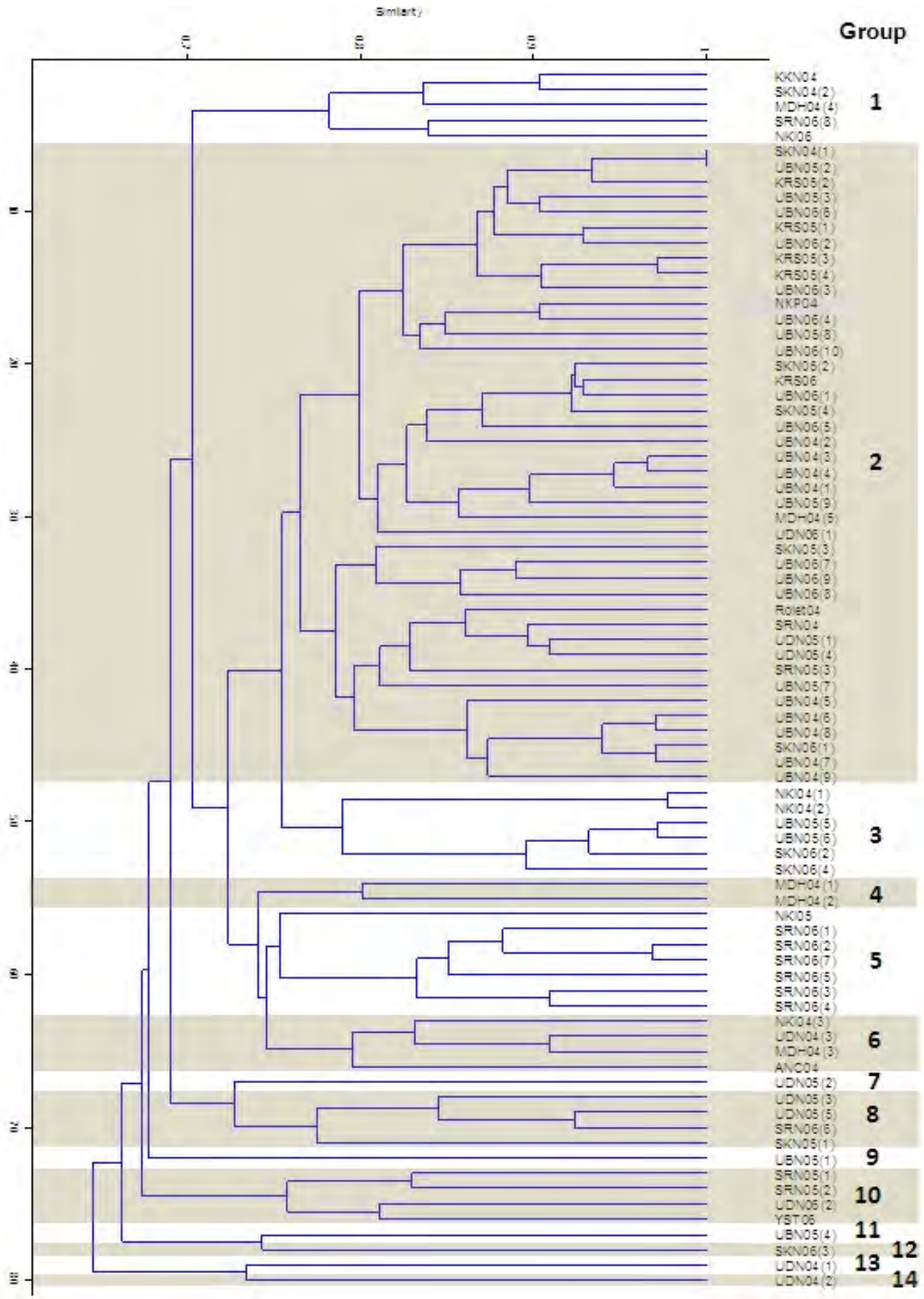
กลุ่มที่ 11 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากปี 2548 จังหวัดอุบลราชธานี (UBN05(4))

กลุ่มที่ 12 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากปี 2549 จังหวัดสกลนคร (SKN06(3))

กลุ่มที่ 13 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากปี 2547 จังหวัดอุดรธานี (UDN04(1))

กลุ่มที่ 14 ประกอบด้วย *Xoo* 1 ไอโซเลท จากปี 2547 จังหวัดอุดรธานี (UDN04(2))

กลุ่มที่จัดได้ทั้ง 14 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่ม ที่มีประชากร 42 ไอโซเลท รองลงมามีจำนวนประชากร 4-7 ไอโซเลท 6 กลุ่ม และมีกลุ่มย่อยอีก 7 กลุ่ม ที่มีประชากรภายในกลุ่ม 1-2 ไอโซเลท *Xoo* ที่เก็บมาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน เช่น *Xoo* จากจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2547 และ 2549 ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ 2 ซึ่งต่างกับ *Xoo* ปี 2548 จากจังหวัดอุบลราชธานี ที่ มีความหลากหลายและกระจายตัวมากกว่า โดยจัดอยู่ใน 4 กลุ่ม และจากการเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลในแต่ละวิธีพบว่า มีความเหมือนและแตกต่างกันของกลุ่ม *Xoo* ที่จัดได้ในบางกลุ่มเท่านั้น การจัดกลุ่มจากข้อมูลของวิธีทั้งสองจึงไม่มีความสัมพันธ์กันที่ชัดเจน



ภาพที่ 4.8 เดนโดรแกรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลการเกิด HR และข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การตอบสนองแบบสูงเกิน (HR) จากปฏิสัมพันธ์ของยีน *avr* ของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลทกับต้นข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* ที่แตกต่างกัน

การเกิด HR เป็นการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของการมีอยู่ของยีน *avr* ใน *Xoo* และยีน *R* ในพืช ผลผลิตโปรตีนที่สร้างจากยีนทั้งสองชนิดถ้าจดจำกันได้จะมีผลให้เซลล์ในบริเวณที่มีการติดเชื้อตายอย่างรวดเร็ว และสามารถป้องกันการลุกลามของเชื้อได้ ในทางกลับกันหากยีนนั้นไม่สามารถจดจำกันได้ก็จะทำให้พืชเกิดโรคตามทฤษฎี gene-for-gene (gene-for-gene hypothesis) (Flor, 1955; Elingboe, 1976; Leach และ White, 1996; Gabriel, 1999) จากการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* 80 ไอโซเลท ในข้าวที่เป็น NILs 11 สายพันธุ์ ที่มียีน *R* แตกต่างกัน พบการตอบสนองของข้าว 2 รูปแบบคือ เกิด HR และไม่เกิด HR (ภาพที่ 3.3) ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นและแบคทีเรีย *E. coli* ที่ไม่ใช่สาเหตุโรคในข้าว ผลการทดสอบที่ทำให้เกิด HR คิดเป็น 10.58 % ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด น้ำสะกุย เป็นพันธุ์ ข้าวที่มีการทดสอบว่าเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งมาก เกิด HR กับ *Xoo* ได้มากที่สุด (33.75%) ส่วนใหญ่พันธุ์ข้าวที่พบว่ามีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้มากจะมียีน *R* หลายยีน (Huang และคณะ, 1997; Sanchez และคณะ, 2000; Singh และคณะ, 2001; Jeung และคณะ, 2006) ส่วน KDML105 และ IR24 เป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อการเกิดโรค *Xoo* ทั้ง 80 ไอโซเลท ทำให้เกิดโรค (Non-HR) ในข้าวทั้งสองพันธุ์นี้คิดเป็น 100 % และ 96.25 % ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์อื่นๆ เกิดการตอบสนองได้ทั้งแบบ HR และ Non-HR ซึ่งการตอบสนองส่วนใหญ่เป็นแบบ Non-HR และจากข้อมูลที่ได้สามารถจัดกลุ่ม *Xoo* ได้ 9 กลุ่ม ที่ความเหมือน $\geq$ 0.85 โดยมีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มที่มีประชากรในกลุ่มคิดเป็น 87.5% ของประชากร *Xoo* ทั้งหมด จากการตอบสนองต่อ *Xoo* ที่มีรูปแบบคล้ายกันมาก อาจเป็นไปได้ว่า *Xoo* มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันหรือมาจากแหล่งเดียวกัน และเกิดการกระจายตัวไปในพื้นที่ใกล้เคียงโดยอาจแฝงในเมล็ดได้ (Sakthivel และคณะ, 2001; Kosawang และคณะ, 2006) นอกจากนี้ *Xoo* ยังสามารถแพร่กระจายได้ง่ายและรวดเร็วไปตามน้ำ ดังนั้นเมื่อเกิดน้ำท่วม หรือฝนตกหนัก จ ะทำให้เกิดการกระจายตัวในวงกว้างได้ (พยอม ศรีจำปาและคณะ , 2541; Yashitola และคณะ, 2000) จากปฏิสัมพันธ์อาจสรุปได้ว่า *Xoo* ในกลุ่มนี้อาจมียีน *avrXa* 1-2 ยีน หรือบางไอโซเลทอาจไม่มียีน *avrXa* หรือมียีนที่เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนกลุ่มย่อยอาจมียีน *avrXa* 3-4 ยีน จากการเกิด HR กับข้าวได้ 3-4 พันธุ์หรือสายพันธุ์ ข้าวที่ถูก *Xoo* เข้าทำลายได้จนเกิดโรคจะมีวิวัฒนาการในการสร้างความต้านทานต่อโรคให้มากขึ้นเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของ *Xoo* ในรุ่นต่อๆไปได้ ขณะเดียวกัน *Xoo* ที่

ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวได้จึงต้องมีวิวัฒนาการเพื่อเข้าทำลายข้าวให้มากขึ้นเช่นกัน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวและ *Xoo* มีความเกี่ยวข้องกันแบบ co-evolution ซึ่งยีน *avr* ใน *Xoo* และยีน *R* ในข้าวมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดความสัมพันธ์นี้ขึ้น (Jones and Dangl, 2006)

ความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรคขึ้นอยู่กับจำนวนยีน *R* ในพืช ข้าวที่นำมาทดสอบ HR 10 สายพันธุ์มียีน *Xa* ที่แตกต่างกันอยู่สายพันธุ์ละ 1 ยีน (ตารางที่ 3.1) เมื่อปลูกเชื้อด้วย *Xoo* ที่มีความสามารถในการเข้าทำลายสูง จึงมีแนวโน้มจะเกิดโรคได้มากขึ้น เนื่องจากการมีอยู่ของยีน *R* เพียงยีนเดียว (Mew และคณะ, 1992; Huang และคณะ, 1997) ซึ่งยีนที่มีความเกี่ยวกับความต้านทานโรค ในพืชส่วนใหญ่มีลักษณะในเชิงปริมาณ โดยหากในพืชมียีน *R* มากกว่า 1 ยีน (pyramiding genes) พืชจะมีความต้านทานต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ดีกว่าพืชที่มียีน *R* เพียงยีนเดียว (Li และคณะ, 2001) จากการศึกษาข้าวพันธุ์ IR24 ที่มียีน *R* อยู่ร่วมกันหลายยีน ได้แก่ *Xa4 xa5 xa13* และ *Xa21* พบว่ามีระดับความต้านทานต่อ *Xoo* มากกว่าพันธุ์ที่มียีน *R* แต่ละยีนเพียงยีนเดียว เมื่อทดสอบกับ *Xoo* ที่มียีน *avrXa4 avrxa5 avrxa13* และ *avrXa21* (Huang และคณะ, 1997; Jeung และคณะ, 2006) รวมถึงสภาวะแวดล้อมล้วนมีอิทธิพลต่อการตอบสนองที่เกิดขึ้นในข้าว นอกจากนี้ยีนอื่นๆ ที่ทำหน้าที่สนับสนุน และเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ *Xoo* ในข้าว เช่น ยีนที่มีการแสดงออกให้เกิดโปรตีน PR (Pathogen Related Protein) หรือยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับความรุนแรงของโรคใน *Xoo* เช่น ยีน *hrp* และ ยีน *path* รวมถึงอิทธิพลจากยีน *avrXa* ที่ต่างชนิดกัน ก็มีผลต่อการตอบสนองในข้าวด้วย (White และคณะ, 1996; Chan และ Goodwin, 1999; Jeung และคณะ, 2006) การมีอยู่ของยีน *R* เพียงยีนเดียวในข้าวจะทำให้สูญเสียความสามารถในการต้านทานโรคต่อ *Xoo* ที่มีการพัฒนาการเข้าทำลายข้าวได้ง่าย เช่น การสูญเสียความสามารถในการต้านทานของยีน *Xa4* (Mew และคณะ, 1992; Huang และคณะ, 1997) ซึ่งอาจเกิดมาจากการพัฒนายีน *avr* ในการเข้าทำลายข้าวของ *Xoo* ยีน *avr* ของ *Xoo* มีการพัฒนาโดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนก็อปปี้ของลำดับเบสที่ซ้ำกัน ทำให้ใน *Xoo* แต่ละสายพันธุ์มียีน *avr* ได้มากกว่า 1 ยีน (Leach และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Yang และคณะ (2005) ยังพบว่ายีน *avrXa7* ใน *Xoo* สามารถเปลี่ยนแปลงตำแหน่งในยีนบริเวณ C-terminal ทำให้มีความสามารถในการเข้าทำลายที่มากขึ้น

การตอบสนองของพืชต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรียสาเหตุโรค นอกจากแสดงออกในลักษณะที่มองเห็นได้ เช่น บริเวณเซลล์ที่ตายอย่างรวดเร็วจากการเกิด HR หรือการเกิดโรคที่มีการลุกลาม ยังมีการเปลี่ยนแปลงระดับไอออนภายในเซลล์ เมื่อตัดใบข้าวที่ปลูกเชื้อด้วย *Xoo* ที่แสดงการเกิด HR Non-HR1 และ Non-HR2 ทำการวัดการรั่วไหลของไอออนในแต่ละลักษณะพบว่าวัดค่าเฉลี่ยของการรั่วไหลของไอออนในใบข้าวที่เกิด Non-HR2 ได้มากที่สุด รองลงมาคือการ Non-HR1 และการเกิด HR ตามลำดับ ซึ่งการรั่วไหลของไอออนที่วัดได้น่าจะเกิดจากการที่เซลล์พืชถูก

ทำลายจากเชื้อสาเหตุโรค (Cook และ Stall, 1977; Gürlebeck และคณะ, 2009) พืชที่มีการเกิด HR จะมีการป้องกันการลุกลามของเชื้อโดยการตายของเซลล์ ทำให้มีการรั่วไหลของไอออนน้อยกว่าพืชที่เกิด Non-HR แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจะมีค่าการรั่วไหลของไอออนที่มากกว่าเพราะชุดควบคุมจะไม่ทำให้เกิดการไหลของไอออนที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ของ *Xoo* และข้าว หรือ เกิดการรั่วไหลของไอออนได้เล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการที่เซลล์ถูกทำลายในเชิงกล เช่น การตัดใบมาทดสอบ แรงกระทำขณะปลูกเชื้อ นอกจากนี้ค่าการรั่วไหลของไอออนที่วัดได้อาจเกี่ยวข้องกับการรั่วไหลของ *Xoo* ออกมาจากแผลที่ได้จากการปลูกเชื้อด้วย ในใบข้าวที่เกิด Non-HR นั้นจะมีการแสดงอาการของโรคขอบใบแห้ง จึงย่อมมีการเจริญของ *Xoo* ภายในเซลล์ที่มากกว่า การตัดหรือทำลายเซลล์จึงอาจมี *Xoo* บางส่วนรั่วไหลออกมาร่วมด้วย พบว่าสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมากจะมีค่าการรั่วไหลของไอออนมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (ไม่มีการแสดงผล) ค่าการรั่วไหลของไอออน สามารถนำมาใช้ในการยืนยันลักษณะการตอบสนองของข้าวต่อการเข้าทำลายของ *Xoo* ได้ อย่างไรก็ตามหากวัดค่าการรั่วไหลของไอออนเกินกว่าวันที่ 4 หลังการปลูกเชื้ออาจทำให้เกิดการคลาดเคลื่อนในการอ่านผลได้ เนื่องจากตั้งแต่วันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ จะเริ่มเกิดการเสื่อมถอย (Senescense) ของใบข้าว (Ponciano และคณะ, 2006) ซึ่งใบของข้าวแต่ละพันธุ์และในแต่ละช่วงอายุ จะมีระยะเวลาที่เข้าสู่การเสื่อมถอยที่ต่างกัน อาจมีผลต่อค่าการรั่วไหลของไอออนเนื่องจากภาวะการเสื่อมถอยของเซลล์ร่วมด้วย

5.2 **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

มีการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเป็นจำนวนมาก ยีน *avrXa* เป็นอีกหนึ่งยีนที่มีความจำเพาะและมีความสำคัญต่อการเกิดโรคในข้าวและสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของ *Xoo* ได้ ความแตกต่างของยีน *avrXa* ใน *Xoo* 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อนำมาวิเคราะห์และทำการจัดกลุ่ม สามารถจัดได้ 20 กลุ่ม มีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่ม ที่มีจำนวนไอโซเลทคิดเป็น 30% (24) ของไอโซเลททั้งหมด กลุ่มใหญ่รองลงมามีจำนวนประชากร 11 ไอโซเลท และมีกลุ่มย่อยอีก 18 กลุ่ม กลุ่มย่อยนั้นจะมีประชากรในกลุ่มจากหลายจังหวัด หรือบางกลุ่มอาจมีประชากรที่มาจากจังหวัดเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ และมีกลุ่มที่มีประชากรในกลุ่มเพียงไอโซเลทเดียวถึง 10 กลุ่ม จากผ ลการจัดกลุ่มจะเห็นว่า *Xoo* ในกลุ่มใหญ่จะมีการกระจายอยู่ทุกส่วนทั้งตอนบน ตอนกลาง และตอนล่างของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีการกระจายตัวเป็นวงกว้างในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง Kosawang และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* 30 ไอโซเลท จาก 10 จังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยเทคนิค AFLP สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 6 กลุ่ม (lineages) ที่ระดับความเหมือน $\geq$0.85 พบว่า 4 กลุ่มที่จัดได้มีสมาชิกที่มาจากหลายจังหวัด และแต่ละกลุ่มมีการ

กระจายตัวของ *Xoo* ไปทุกส่วนในภาคเหนือของประเทศไทยเช่นกัน ซึ่งการกระจายตัวของแบคทีเรีย ไปในหลายพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่เกษตรกรใช้เมล็ดพันธุ์จากแหล่งเดียวกันที่มี *Xoo* แฝงอยู่ (Sakthivel และคณะ, 2001; Kosawang และคณะ, 2006) หรือเกิดการแพร่กระจายของ *Xoo* ในธรรมชาติจากการที่มีฝนตกหนักหรือการเกิดน้ำท่วม (พยอม ศรีจำปา และคณะ, 2541; Yashitola และคณะ, 2000)

ในด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลในหลายประเทศนั้น พบว่า *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก (Leach และคณะ, 1992; Adhikari และคณะ, 1999; Gupta และคณะ, 2001; Ochiai และคณะ, 2000; 2005; Kosawang และคณะ, 2006) *Xoo* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากเช่นกัน *Xoo* ที่เก็บมาจากจังหวัดและปีเดียวกันมีความใกล้เคียงกันเมื่อทำการจัดกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อปี 2547 จากจังหวัดอุบลราชธานี ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ 16 ซึ่งต่างกับ *Xoo* ปี 2548 และ 2549 จากจังหวัดอุบลราชธานีที่มีความหลากหลายมากกว่า โดยจัดอยู่ใน 10 กลุ่ม ซึ่งผลการจัดกลุ่มที่ได้ของจังหวัดอุบลราชธานีเหมือนกับการจัดกลุ่มโดยใช้ RAPD rep-PCR และ IS-PCR ก่อนหน้านี้ (ศุภกิณห์ สุดชูเกียรติ, 2550) ส่วนการกระจายของ *Xoo* ที่เก็บตัวอย่างในปีเดียวกันพบว่าในปี 2547 แบ่งได้ 7 กลุ่ม ปี 2548 แบ่งได้ 9 กลุ่ม และปี 2549 แบ่งได้ 12 กลุ่ม ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า *Xoo* ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันมักอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ ก .1-ก.3 ภาคผนวก) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของ *Xoo* ที่มาจากจังหวัดเดียวกันแต่ต่างปี จะมีความแตกต่างและเหมือนกันในบางแถบ ซึ่งอาจเกิดเพราะสภาพแวดล้อมและภูมิประเทศ หรือสภาพดินฟ้าอากาศที่ต่างกันในแต่ละปี นอกจากนี้การที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการทำนาข้าวแบบการปลูกซ้ำที่เดิม และปลูกข้าวพันธุ์เดียวติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมของ *Xoo* และ *Xoo* อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป (ศุภกิณห์ สุดชูเกียรติ, 2550) ทำให้ *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งระหว่างพื้นที่และปีที่เก็บตัวอย่าง สอดคล้องกับผลงานการทำวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* ได้แก่ Yashitola และคณะ (1997) ศึกษา *Xoo* 67 ไอโซเลท โดยใช้ *avrXa10* เพื่อตรวจสอบ สามารถแบ่งได้ 9 haplotypes จาก 18 พื้นที่ ในประเทศอินเดีย Ochiai และคณะ (2000) ศึกษา *Xoo* 60 ไอโซเลท โดยใช้ rDNA และ *IS1112* เพื่อตรวจสอบ มีการแบ่งกลุ่มได้ 5 cluster จาก 29 พื้นที่ ในประเทศศรีลังกา Adhikari และคณะ (1999) ศึกษา *Xoo* 171 ไอโซเลท โดยใช้ PCR based ไพรเมอร์ *IS1112* และ *IS1113* จัดกลุ่มได้ 31 haplotype จาก 8 พื้นที่ ในประเทศเนปาล ต่างให้ผลสรุปที่สอดคล้องกันว่า สภาพภูมิประเทศและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมีผลต่อลักษณะทางพันธุกรรม

ของ *Xoo* นอกจากนี้การที่เกษตรกรใช้สารเคมีในการกำจัดวัชพืช ศัตรูพืช และการทำการเกษตรกรรมโดยไม่มีการพักนา อาจเป็นสาเหตุให้ *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงได้

การจัดกลุ่ม *Xoo* เพื่อคัดกรองสายพันธุ์เชื้อจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญต่อการป้องกันและควบคุมโรค แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การจัดกลุ่ม *Xoo* ด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลยังไม่มีความชัดเจนหรือไม่มีความสัมพันธ์กันมากนัก เนื่องจาก *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง การศึกษายีนที่ มีความจำเพาะและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของ *Xoo* เช่น ยีน *avr* น่าจะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ได้ Hu และคณะ (2007) ใช้เทคนิค RFLP ศึกษาความหลากหลายใน *Xoo* โดยใช้ยีน *avrXa27* ตรวจสอบ พบว่า *Xoo* แต่ละสายพันธุ์ที่มาจาก 9 ประเทศ ให้แถบดีเอ็นเอ 4-8 แถบ แสดงให้เห็นว่า *avrXa* ใน *Xoo* แต่ละสายพันธุ์อาจมีหลายก็อปปี้ สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *avrXa* ให้จำนวนของแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบกับ *Xoo* แต่ละไอโซเลท ซึ่งมีรายงานที่ว่าไอโซเลทของ *Xoo* อาจมีจำนวนก็อปปี้ และจำนวนยีนใน *avrBs3/pthA*-family มากกว่า 1 ยีน (Yang และ White, 2004)

จากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *avrXa* ใน *Xoo* และยีน *Xa* ในข้าว ที่มีความสำคัญในการเกิด HR ในข้าว การทราบการมีอยู่ของยีน *avrXa* จะสามารถคาดเดาการตอบสนองของข้าวที่มีต่อ *Xoo* ได้ระดับหนึ่ง ความคาดหมายจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ กับบริเวณซ้ำของยีน *avrXa* เพื่อที่จะสามารถรู้ขนาดและจำนวนซ้ำของยีน และสามารถระบุชนิดของยีน *avrXa* ได้ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอตัวอย่างไปหาลำดับเบสพบว่าลำดับเบส ไม่มีความเหมือนกับยีน *avrXa* ใน *Xoo* จึงยืนยันไม่ได้ว่าแถบดีเอ็นเอนั้นเป็นส่วนของยีน *avrXa* โดยผลของลำดับเบสที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ 16s rRNA ของ uncultured bacteria accession No. GenBank: FM252220.1 ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากลำดับเบสใน 16s rRNA ในเซลล์โปรคาริโอทหรือแบคทีเรียนั้นมีความเปลี่ยนแปลงน้อย (conserve) อาจมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันได้ เมื่อนำ 16s rRNA ของ *Xoo* accession No. GenBank: HM747118.1 มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blast พบว่ามีความเหมือนกัน 86 % (ไม่ได้แสดงผล) ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ที่ใช้ในการทดสอบลำดับเบสของยีน *avrXa* ทุกยีนเป็นยีนที่มาจาก *Xoo* สายพันธุ์ KACC10331 แต่ *Xoo* ที่ทำการศึกษานั้นอาจไม่ใช่สายพันธุ์เดียวกัน จึงอาจมีความต่างกันของลำดับเบสระหว่างสายพันธุ์ และส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ นอกจากนี้จากการศึกษาจีโนมของ *Xoo* ยังพบว่ามีการสูญเสียยีนภายในจีโนมปริมาณมาก เช่น hybrid histidine kinase ใน *Xoo* สายพันธุ์ KACC10331 จากแนวโน้มในการเกิดการสูญหายของยีนได้ทำให้เกิดความแปรผันและส่งผลให้ *Xoo* เกิดวิวัฒนาการที่รวดเร็ว (Lee และคณะ, 2005; Ochiai และคณะ, 2005; Qian และคณะ, 2005) จากลักษณะที่จำเพาะของยีน *avrXa* ที่มีบริเวณซ้ำในจำนวนที่แตกต่างกัน การเกิดการ

แลกเปลี่ยนลำดับเบสภายในของบริเวณซ้ำ (intragenic recombination) เป็นลักษณะของยีนในกลุ่ม *avrBs3/PthA* เพื่อจะพัฒนาให้เกิดความจำเพาะที่มากขึ้นต่อพืชอาศัย อาจทำให้แบคทีเรียสาเหตุโรคมีพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป (Yang และคณะ, 2005) และจากการศึกษาลำดับเบสของจีโนมใน *Xoo* (Lee และคณะ, 2005) พบว่ามี transposable element ที่สามารถเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่างๆ ในจีโนมได้ เป็นจำนวนมาก เช่น *IS1112 IS1113* และ *IS1114* ซึ่งเป็นส่วนสำคัญให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในจีโนม และทำให้เกิดความหล ากหลายทางพันธุกรรมของ *Xoo* ด้วย Nelson และคณะ (1994) ใช้เทคนิค RFLP โดยใช้ *IS1112* และ *IS1113* ในการตรวจสอบความหลากหลายของ *Xoo* 87 สายพันธุ์ ในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่า แถบดีเอ็นเอของ *Xoo* แต่ละสายพันธุ์มีจำนวนหลายก็อปปี้ ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ Cook และ Stall (1997) ทำการปลูกเชื้อในพริก (*Capsicum annuum*) ด้วย *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุด (bacterial spot) โดยแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบมีการแทรกของ *IS476* ในยีน *avr* ทำให้พริกที่ปรกติต้องเกิด HR กับแบคทีเรียไอโซเลทนี้กลับแสดงอาการของโรคได้

จากความแปรผันของดีเอ็นเอใน *Xoo* หากต้องการพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อที่จะสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายให้จำเพาะขึ้น หรือจำแนกชนิดของยีน *avrXa* จากขนาดของผลผลิต PCR ได้ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในลำดับเบสของผลผลิต PCR โดยปรับเปลี่ยนลำดับที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ตลอดจนสภาวะของ PCR ที่เหมาะสม เช่นอุณหภูมิในขั้นต่างๆ ของกระบานการ PCR ชนิดของเอนไซม์ DNA polymerase ที่มีความสามารถในการตรวจสอบลำดับเบสที่ผิดพลาดได้ (proof reading DNA polymerase) เพื่อให้การทำ PCR มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพให้ข้อมูลได้แม่นยำและมีรายละเอียดที่มากขึ้นได้

5.3 การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อโดยลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics analysis) และการเกิดการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR)

การจัดกลุ่ม *Xoo* ด้วยการเกิด HR สามารถบอกคุณสมบัติทางกายภาพเกี่ยวกับความสามารถในการทำให้ข้าวเป็นโรคของประชากร *Xoo* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ว่า *Xoo* ส่วนใหญ่ทำให้ข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *R* เพียง 1 ยีนที่แตกต่างกันมีแนวโน้มจะแสดงอาการของโรคได้มาก แสดงให้เห็นจากการที่ *Xoo* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเกือบทั้งหมด เพราะเชื้อมีการตอบสนองที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับการจัดกลุ่มจากการทำ PCR ของยีน *avrXa* พบว่าสามารถแยก *Xoo* ออกมาเป็นกลุ่มย่อยได้มากกว่า โดยการทำ PCR สามารถจัดกลุ่ม *Xoo* ที่มาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน ได้ดีกว่าการจัดกลุ่มด้วยวิธีการเกิ ด HR การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากพันธุกรรมมีความเปลี่ยนแปลงค่อนข้างยาก โดยศึกษาผลผลิต PCR จากจีโนมของ *Xoo* โดยตรง

ให้ผลที่ค่อนข้างแน่นอน สามารถให้ผลผลิต PCR ของแต่ละไอโซเลทเหมือนกันทุกครั้ง แต่การจัดกลุ่มด้วยการเกิด HR ถ้า *Xoo* ไอโซเลทที่ทำให้เกิด HR ในพันธุ์ข้าว 1-2 สายพันธุ์ หรือไม่เกิด HR เลย จะมีแนวโน้มที่จะอยู่กลุ่มเดียวกันได้ เชื้อส่วนใหญ่แสดงลักษณะการตอบสนองแบบ Non-HR1 เนื่องจากการมีอยู่ของยีน *avrXa* ในเชื้อ หรือ ยีน *R* ในข้าวนั้น มีอิทธิพลต่อการเกิด HR และ Non-HR แม้ยีนที่มีอยู่จะไม่สามารถให้โปรตีนที่เข้าคู่กันได้ และการต้านทานโรคในพืชเป็นลักษณะในเชิงปริมาณ ที่มียีนหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง (Zhu และคณะ, 1998; Bai และคณะ, 2000) รวมทั้งสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ก็มีผลต่อรูปแบบการตอบสนองที่เกิดในข้าวด้วย การทำ PCR จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจและสะดวกกว่าการศึกษาความหลากหลายด้วยการทดสอบการเกิด HR ที่ต้องใช้ระยะเวลา และแรงงานเป็นอย่างมาก แต่ด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงของ *Xoo* จึงต้องศึกษาในส่วนของพันธุศาสตร์โมเลกุลในยีนหรือส่วนของยีนต่างๆ ที่มีความจำเพาะมากขึ้นเพื่อให้ผลที่ได้จากการศึกษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ลักษณะทางพันธุกรรมนี้สามารถจัดกลุ่ม *Xoo* ได้ระดับหนึ่ง แต่ยังไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ ต้องทำการศึกษาหลายวิธีทั้งทางกายภาพและพันธุศาสตร์โมเลกุลร่วมกัน

เมื่อทำการจัดกลุ่ม *Xoo* โดยใช้ข้อมูลของการเกิด HR และการทำ PCR ร่วมกัน พบว่าสามารถจัดให้ *Xoo* ภายในแต่ละกลุ่มมีไอโซเลทที่มาจากจังหวัดและปีเดียวกันได้มากกว่าการใช้ข้อมูลชนิดเดียว ซึ่งความสอดคล้องของการจัดกลุ่ม *Xoo* โดยใช้ข้อมูลการเกิด HR และการทำ PCR ยังไม่มีความชัดเจนมากนัก อย่างไรก็ตามผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า ในข้าวบาง พันธุ์หรือสายพันธุ์ เช่น IRRIBB3 IRRIBB4 IRRIBB5 IRRIBB8 และ IRRIBB11 ที่เกิด HR ต่อ *Xoo* ได้หลายไอโซเลท แสดงถึงการมีแนวโน้มของข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์ที่มียีน *R* ดังกล่าว ในการต้านทานต่อโรคได้มาก และทราบว่า *Xoo* ที่มีการกระจายตัวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในหลายจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่น่าจะมียีน *avrXa* ยีนใด ทำให้การปรับปรุงพันธ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อการมีอยู่ของยีน *avrXa* ยีนนั้นง่ายขึ้น ซึ่งข้อมูลพื้นฐานของการมีอยู่ของยีน *avrXa* ใน *Xoo* หากทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียีน *R* หลายยีน (pyramiding gene) จะทำให้ข้าวมีความต้านทานมากว่าข้าวที่มียีน *R* เพียงยีนเดียว การนำข้าวพันธุ์หรือสายพันธุ์ดังกล่าวนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กับข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคและการค้าอาจทำให้ข้าวมีความต้านทานต่อโรคและมีผลผลิตที่มากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณข้าวที่เพียงพอต่อการบริโภคและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้

จากการศึกษาความหลากหลายของ *Xoo* ที่พบว่าทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งจาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยวิธี PCR และการศึกษาการตอบสนองแบบสูงเกินต่อข้าวพันธุ์ต่างๆ ทำให้ได้ข้อมูลความหลาก หลายทางพันธุกรรม การกระจายตัวของเชื้อ และชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณยีน *avrXa* ใน *Xoo* ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ ถึงแม้ว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้า นจีโนไทป์และด้านฟีโนไทป์ของ *Xoo* จะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจน เนื่องจาก *Xoo* มีความหลากหลายของทางพันธุกรรมสูงแต่ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานโรค ตลอดจนพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคขอบใบแห้งในข้าวต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาการตอบสนองแบบสูงเกินของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในข้าว

จากการศึกษาการเกิด HR ในพันธุ์ข้าวทั้งหมด 13 พันธุ์หรือสายพันธุ์ ด้วยการปลูกเชื้อด้วย *Xoo* 80 ไอโซเลท ที่เก็บตัวอย่างจาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปี 2547-2549 โดยสามารถแยก *Xoo* ที่ระดับความเหมือน $\geq$ 0.85 ที่ให้ผลการตอบสนองแบบ HR ภายใน 48 ชั่วโมง ได้ 9 กลุ่ม มีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มที่คิดเป็น 87.5% ของเชื้อทั้งหมด กลุ่มย่อย 8 กลุ่ม ซึ่งเป็นกลุ่มเดี่ยว 7 กลุ่ม *Xoo* ไอโซเลทที่มาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน ส่วนใหญ่จะให้ผลของการตอบสนองในลักษณะเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบในข้าวพันธุ์ หรือสายพันธุ์เดียวกัน เมื่อศึกษาค่าเฉลี่ยการรั่วไหลของไอออนที่วัดได้จากลักษณะการตอบสนองแบบต่างๆ พบว่า การเกิดการตอบสนองที่ไม่ใช่ HR (Non-HR) มีค่ามากกว่าการเกิด HR และ การตอบสนองที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง มีค่ารองลงมาตามลำดับ

2. การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีน *avrXa* จำนวน 2 คู่ จัดกลุ่ม *Xoo* ทั้งหมด 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2547- 2549 พบว่าสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 31 แถบ ซึ่งเกิดแถบดีเอ็นเอในไพรเมอร์ avrXooIn 17 แถบ และไพรเมอร์ avrXooOut 14 แถบดีเอ็นเอของ *Xoo* แต่ละไอโซเลทมีความแปรผันมาก ทำให้ *Xoo* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงด้วย จากข้อมูลนี้สามารถจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อ (Cluster analysis) ที่ระดับความเหมือน $\geq$ 0.50 ได้ 20 กลุ่ม มีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มที่มีจำนวนไอโซเลทคิดเป็น 30% (24) ของไอโซเลททั้งหมด กลุ่มใหญ่รองลงมามีจำนวนประชากร 11 ไอโซเลท และมีกลุ่มย่อยอีก 18 กลุ่ม ซึ่งมีกลุ่มเดี่ยว 9 กลุ่ม เชื้อที่เก็บมาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกันจะมีความใกล้เคียงกัน

3. การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อโดยลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics analysis) และการเกิดการตอบสนองแบบสูงเกิน (HR)

เมื่อพิจารณาจาก *Xoo* ส่วนใหญ่แล้วพบว่าในการทำ PCR สามารถจัดกลุ่มของ *Xoo* ที่มาจากจังหวัดเดียวกันและปีเดียวกัน ได้ดีกว่าการจัดกลุ่มด้วยการเกิด HR เมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายของ *Xoo* พบว่าบางไอโซเลท เช่น *Xoo* ที่มาจากจังหวัดอุบลราชธานีนั้น ถูกจั ดอยู่ในกลุ่มได้สอดคล้องกัน การศึกษาความหลากหลาย

ของ *Xoo* จากลักษณะทางพันธุกรรมด้วย PCR จะสามารถแยก *Xoo* ได้แต่ยังไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อโดยวิธีนี้เพียงวิธีเดียว ต้องศึกษาร่วมกับวิธีอื่นเช่นการตอบสนองแบบสูงเกินต่อข้าวที่มียีนต้านทานพันธุ์ต่างๆ การศึกษาการเข้าทำลายของ แบคทีเรียสาเหตุโรค หรือปรับปรุงการศึกษาด้วยวิธี PCR โดยพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายจากยีนหรือลำดับเบสที่จำเพาะ จะทำให้ได้ข้อมูลที่จำเพาะขึ้น

การจัดกลุ่ม *Xoo* โดยใช้ข้อมูลของการเกิด HR และการทำ PCR ร่วมกัน สามรถจัดกลุ่ม *Xoo* ได้ 14 กลุ่ม มีกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มที่มีประชากรคิดเป็น 52.5% ของไอโซเลททั้งหมด และมีกลุ่มเดี่ยว 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่จัดได้มีความเหมือนและแตกต่างกันในบางกลุ่ม ความสอดคล้องในการจัดกลุ่ม *Xoo* จึงยังไม่ชัดเจน แต่การทราบถึงกรมีอยู่ของยีน *avrXa* ใน *Xoo* จะเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อการมีอยู่ของยีน *avrXa* ยีนนั้นได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพื่อควบคุมและป้องกันโรคขอบใบแห้งในข้าวต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

การข้าวและกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรม. 2549. โรคขอบใบแห้ง (Bacterial Leaf Blight or Bacterial Blight) [online]. Avaulable from; http:www.ricethailand.go.th/rkb/Data_005/rice_xx2-05_newDisease009.html/var01.html [2010, Sep 1].

พยอม โคเบลลี่. 2550. การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าว. เอกสารประกอบการประเมินผลงานของบุคคลเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 8ว. ตำแหน่งเลขที่ 666. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. กรมการข้าว. 37หน้า.

พยอม ศรีจำปา, สมาน คำมา, ธวัทชัย พรหมรักษา, จิรพงศ์ ใจรินทร์, และกิจติพงษ์ เพ็งรัตน์. 2541. ผลการสำรวจและประเมินผลโรคแมลงและสัตว์ศัตรูข้าวในสภาพแปลงนาข้าวน้ำฝนเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ประเทศไทย. รายงานผลการสำรวจโรคแมลงและสัตว์ศัตรูข้าวในนาน้ำฝน กันยายน 2540.ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 9 หน้า.

วิชาการเกษตร, กรม. 2550. พันธุ์ [online]. Avaulable from; http:www.doa.go.th/pl_data/RiCE/3var/var01.html [2010, Sep 1].

ศุภกิณห์ สุดชูเกียรติ. 2550. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ข้าวรวมทั้งหมด : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน [online]. Avaulable from; http:www.oae.go.th/statistic/ export/1301RI.xls [2010, Sep 1].

ภาษาอังกฤษ

Adhikari, T.B., Vera Cruz, C.M., Zhang, Q., Nelson, R.J., Skinner, D.Z., Mew, T.W., and Leach, J.E. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. Applied and Environmental Microbiology 61:966-971.

Adhikari, T.B., Mew, T.W., and Leach, J.E. 1999. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. Phytopathology 89:687-694.

Alfano, J.R., and Collmer, A. 1996. Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. Plant Cell 8:1683 -1698.

Andaya, C.B. and Ronald, P.C. 2003. A catalytically impaired mutant of the rice Xa21 receptor kinase confers partial resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 62:203–208.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 2002. Short protocols in molecular biology. 5th ed. Wiley and Sons, N.Y.

Bai, J., Choi, S.H., Ponciano, G., Leung, H., and Leach, J.E. 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. Molecular Plant-Microbe Interactions 13:1322–1329.

Bardakci, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markeras. Turkish Journal of Biology 25: 185-196.

Bogdanove, A. 2002. Method to inoculating rice with *Xanthomonas*. Plant Pathology Laboratory Iowa state university.

CABI and EPPO. 1997. Data sheets on quarantine pests *Xanthomonas oryzae* [online]. Avaulable from; http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/ Xanthomonas_oryzae/XANTOR_ds.pdf [2010, Aug 20]

Cardoso, D.C., Cristiano, M.P., Vilela, L.C.M., and Martins, T.D.A. 2009. Does Trichomes on the Plant Epidermic Surface Disturb Ants Locomotion?. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 4(1):1-6.

Chan, W.Y.F.J., and Goodwin, P.H. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris.* Biotechnology Advances 17: 489–508.

Chaudhary, R.C. 1996. Standard evaluation system for rice. 4th edition. International Rice Research Institute (IRRI). Inger genetic resources center.

Chu, Z., Yuan, M., Yao, J., Ge, X., Yuan, B., Xu, C., Li, X., Fu, B., Li, Z., Bennetzen, J.L., Zhang, Q., and Wang, S. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Development 20:1250-1255.

Collmer, A. 1998. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. Current Opinion in Plant Biology 1:329-325.

Cook, A.A., and Stall, R.E. 1977. Effects of watersoaking on response to *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. Phytopathology 67:1101-1103.

Dice, L.R. 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. Ecology 26:297–302.

Elingboe, A.H. 1976. Genetics of host–parasite interactions. In Encyclopedia of Plant Physiology. Physiological Plant Pathology 4:179–192.

Flor, H.H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other Implications. Phytopathology 45:680-685.

Gabriel, D.W. 1999. The *Xanthomonas* avr/pth gene family. Plant-Microbe Interactions 4:39-55.

George, M.L.C., Bustamam, M., Cruz, W.T., Leach, J.E., and Nelson, R.J. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. Phytopathology 87:302-309.

Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, l., Wang, D., Sreekala, C., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z. 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435:1122-1125.

Guevara, Y., and Maselli, A. 1999. El TIZÓN BACTERIANO DEL ARROZ EN VENEZUELA. Agronomía Tropical 49:505-516.

Gupta, V.S., Rajebhosale, M.D., Sodhi, M., Singh, S., Gnanamanickam, S.S., Dhaliwal, H.S., and Ranjekar, P.K. 2001. Assessment of genetic variability and strain identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using RAPD-PCR and IS1112-based PCR. Current Science 80:1043-1049.

Gürlebeck, D., Jahn, S., Gürlebeck, N., Szczesny, R., Szurek, B., Hahn, S., Hause, G., and Bonas, U. 2009. Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4. Molecular Plant Pathology 2:175–188.

Hopkins, C.M., White, F.F., Choi, S.H., Guo, A., and Leach, J.E. 1992. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 5:451-459.

Hoang, D.D., Nghi, K.O., Nguyen, D.T., Pham, V.D., and Le, C.L. 2008. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuulong rever delta. Omonrice 16:34-40.

Hu, J., Zhang, Y., Qian, W., and He, C. 2007. Avirulence gene and insertion element based RFLP as well as RAPD markers reveal high levels of genomic polymorphism in the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Systematic and Applied Mycrobiology 30:587-600.

Huang, N., Angeles, E.R., Domingo, J., Magpantay, G., Singh, S., Zhang, G., Kumaravadivel, N., Bennett, J., and Khush, G.S. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-aided selection using RFLP and PCR. Theory Applied Genetics 95:313-320.

International Rice Research Institute (IRRI). 2007. Frequently asked questions [online]. Available from; http://www.irri.org/about/faq1.asp [2010, Aug 4].

Jeung, J.U., Heu, S.G., Shin, M.S., Vera Cruz, C.M., and Jena, K.K. 2006. Dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Populations in Korea and their relationship to known bacterial blight resistance genes. Phytopathology 96:867-875.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature 444:323-329.

Jongdee, B., Pantuwan, G., Fukai, S., Fischer, K. 2006. Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An example from Thailand. Agricultural Water Management. 80:225–240.

Kosawang, C., Smitamana, P., Toojinda, T., Nilpanit, N., and Sirithunya, P. 2006. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting differentiates genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Northern Thailand. Phytopathology 154:550-555.

Leach, J. E., Rhoads, M. L., Vera Cruz, C. M., White, F. F., Mew, T. W., and Leung, H. 1992. Assessment of Genetic Diversity and Population Structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a Repetitive DNA Element. Applied and Environmental Microbiology 58(7):2188-2195

Leach, J.E., and White, F.F. 1996. Bacterial avilurence gene. Annual Review Phytopathology 34:153-179.

Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., and Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. Annual Review Phytopathology 39:187-224.

Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H., Koh, N.H., Seo, J.S., and Go, S.J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Research 33:577-586.

Li, Z.K., Sanchez, A., Angeles, E., Singh, S., Domingo, J., Huang, N., and Khush, G.S. 2001. Are the dominant and recessive plant disease resistance gene similar : A case study of rice *R* genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races. Genetics 159:757-765.

Liang, B., Yu, T.G., Gu, O.B., Yang, C., Dai, L., and Shen, D.L. 2004. Cloning and characterization of a novel avirulence gene (arp3) from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. DNA Sequence 15:110-117

Matthews, B. 2007. The Hypersensitive Response. Agricultural Research Service: Plant Science Institute. The United States Department of Agriculture.

Mew, T.W., Vera Cruz, C.M., and Medella, E.S. 1992. Change in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to the planting of rice cultivars in the Philippines. Plant Disease 76:1029-1032.

Miah, M.A.A., Pathan, M.S., and Quayum, H.A. 1996. Production of salt tolerant rice breeding line via doubled haploid. .Euphytica 91 : 285-288.

Mueller, U.G., and Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Review Trends in Ecology and Evolution 14: 389-394.

Nelson, R.J., Baraoidan, M.R., Vera Cruz, C.M., Yap, I.V., Leach, J.E., Mew,T.W. and Leung, H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. Applied and Environmental Microbiology 60:3275–3283.

Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bognadove, A.J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Molecular Plant Pathology 7:303-324.

Ochiai, H., Horino, O., Miyajima, K., and Kaku, H. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv*. oryzae* from Sri Lanka. Phytopathology 90:415-421

Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A., and Kaku, H. 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of Effector genes and insertion sequences to its race diversity. Japan Agricultural Research Quarterly 39:275-287.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases, Commonwealth Agricultural Bureau. The Commonwealth Mycological Institute UK. 380 p.

Park, J.M. 2005. The hypersensitive response. a cell death during disease resistance. The Plant Pathology Journal 21(2): 99-101

Peter, A.J., and Shanower, T.G. 1998. Plant glandular trichomes chemical factories with many potential uses. Resonance 3:41-45

Pontier, D., Balague, C., and Roby, D. 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 9:721–734.

Ponciano, G., Webb, K., Bai, J., Vera Cruz, C.M., and Leach, J.E. 2004. Molecular characterization of the *avrXa7* locus from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* field isolates. Physiology Molecular Plant Pathology 64:145-153

Ponciano, G., Yoshikawa, M., Lee, J.L., Ronald, P.C., and Whalen, M.C. 2006. Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled Xa21-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae.* Physiological and Molecular Plant Pathology 69:131–139

Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L., and He, C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Genome Research 15:757–767.

Reimers, P.J., and Leach, J. E. 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice *(Oryza sativa)* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. Physiology Molecular Plant Pathology 38:39-55.

Ryals, A.J., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, D.M. 1996. Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell 8:1809-1819.

Sakthivel, N., Mortensen, C.N., and Mathur, S.B. 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificaially inoculated and naturaly infected rice seeds and plants by molecular techniques. Applied microbiology and biotechnology 56:435-441.

Sanchez, A.C., Brar, D.S., Huang, N., Li, Z., and Khush, G.S. 2000. Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. Crop Science 40:792-797

Shen, Y., and Ronald, P. 2002. Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv*. oryzae* and rice. Microbes and Infection 4:1361-1367.

Singh, S., Sidhu, J.S., Huang, N., Vikal, Y., Li, Z., Brar, D.S., Dhaliwal, H.S., and Khush, G.S. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. Theory Applied Genetics 102:1011-1015.

Song, F., and Goodman, R.M. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. Physiological and Molecular Plant Pathology 59:1-11.

Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J., and Galan, J.E. 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. Science 38:39-55.

Vera Cruz, C.M., Bai, J., Oña, I., Leung, H., Nelson, R.J., Mew, T.W., and Leach, J.E. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences United State of America 97:13500-13505.

White, F.F., Chittoor, J.M., Leach, J.E., Young, S.A., and Zhu, W. 1991. Molecular analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. Physiological and Molecular Plant Pathology 38:39-55.

White, F.F., Yang, B., and Johnson, L.B. 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. Current Opinion in Plant Biology 3:291-298.

Willet, P. 1981. A fast procedure for the calculation of similarity coefficients in automatic classification. Information Processing & Management 17:53-60.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Xiong, L., and Yang, Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid–inducible mitogen-activated protein kinase. The Plant Cell 15: 745–759.

Yang, B., and White, F.F. 2004. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:1192-1200.

Yang, B., Sugio, A., and White, F.F. 2005. Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interaction 18:142-149.

Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes Devision 11:1621-1639.

Yashitola, J., Krishnaveni, D., Reddy, A.P.K., and Sonti, R.V. 1997. Genetic diversity within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India. Phytopathology 87:760-765.

Yashitola, J., Reddy, A.P.K., and Sonti, R.V. 2000. A widely distributed lineage of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India may have come from native wild rice. Plant Disease 84:465-469.

Zhu, W., Magbanua, M.M., and White, F.F. 2000. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Journal of Bacteriology 182(7): 1844–1853.

Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J.M., Johnson, L.B., and White, F.F. 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. Molecular Plant-Microbe Interactions 11(8): 824-832.

ภาคผนวก

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** NB (Nutrient broth)

Peptone	5	g
Beef Extract	3	g

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับปริมาตรเป็น 1 L (ถ้าเตรียมอาหารแข็งให้เติม วุ้นผง 15 g) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** LB (Luria-Bertani Medium)

Tryptone	10	g
NaCl	10	g
Yeast Extract	5	g

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับปริมาตรเป็น 1 L (ถ้าเตรียมอาหารแข็งให้เติม วุ้นผง 15 g) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. 5X TBE buffer (1 L)

Tris base	54.0	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA pH8	20.0	ml

นำ Tris base และ Boric acid มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม 0.5 M EDTA pH8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 L

ตารางที่ ก.1 ค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในข้าวตัวอย่าง 11 พันธุ์หรือสายพันธุ์

พันธุ์ข้าวทดสอบ	Isolate *Xoo* ทดสอบ	ค่าConductivity(x2000 μΩ)			ลักษณะอาการ
		1DPI	2DPI	4DPI	
NSG19	Water	8	8	12	0
	E. coli	9	7	15	0
	MDH04(2)	10	13	17	HR
	UBN04(5)	8	12	15	HR
	SRN06(1)	11	15	18	HR
KDML105	Water	4	7	10	0
	E. coli	7	9	13	0
	ANC04	16	27	44	Non-HR2
	NPK04	12	15	18	Non-HR1
	MDH04(1)	23	32	42	Non-HR2
	MDH04(2)	13	15	33	Non-HR2
IR24	Water	8	8	12	0
	E. coli	9	7	12	0
	Roiet04	11	20	32	Non-HR2
	NKI04(1)	18	28	44	Non-HR2
	MDH04(2)	9	12	20	Non-HR1

หมายเหตุ : HR = เกิด HR ภายใน 48 ชั่วโมง, Non-HR 1 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, Non-HR 2 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, 0 = ชุดควบคุมซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ

ตารางที่ ก.1 ค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในข้าวตัวอย่าง 11 พันธุ์หรือสายพันธุ์(ต่อ)

พันธุ์ข้าวทดสอบ	Isolate *Xoo* ทดสอบ	ค่าConductivity$_1$(x2000 μΩ)			ลักษณะอาการ
		1DPI	2DPI	4DPI	
IRRIBB3	Water	8	8	9	0
	E. coli	9	10	12	0
	SKN04(1)	14	22	24	Non-HR1
	SKN04(2)	7	12	18	HR
	UBN05(6)	10	13	32	Non-HR2
IRRIBB4	Water	8	10	11	0
	E. coli	9	11	11	0
	ANC04	12	13	17	HR
	NKI05	12	16	19	Non-HR1
	KRS05(2)	13	28	46	Non-HR2
IRRIBB5	Water	8	9	13	0
	E. coli	9	11	14	0
	SKN05(3)	13	20	22	HR
	KRS05(4)	11	24	26	Non-HR1
	UDN06(1)	15	30	36	Non-HR2
IRRIBB8	Water	8	11	12	0
	E. coli	10	12	15	0
	UBN04(9)	9	19	24	Non-HR1
	UDN04(2)	16	35	55	Non-HR2
	NPK04	7	15	15	HR

หมายเหตุ : HR = เกิด HR ภายใน 48 ชั่วโมง, Non-HR 1 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, Non-HR 2 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, 0 = ชุดควบคุมซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ

ตารางที่ ก.1 ค่าการรั่วไหลของไอออน (Ion leakage) จากการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในข้าวตัวอย่าง 11 พันธุ์หรือสายพันธุ์(ต่อ)

พันธุ์ข้าวทดสอบ	Isolate *Xoo* ทดสอบ	ค่าConductivity(x2000 μΩ)			ลักษณะอาการ
		1DPI	2DPI	4DPI	
IRRIBB10	Water	5	8	8	0
	E. coli	9	11	12	0
	SKN05(1)	10	12	15	HR
	UBN05(9)	15	28	35	Non-HR2
	NKI04(1)	12	22	26	Non-HR1
IRRIBB11	Water	5	8	10	0
	E. coli	6	9	11	0
	ANC04	14	18	22	Non-HR1
	SKN04(1)	18	20	32	Non-HR2
	UBN04(9)	12	13	16	HR
IRRIBB13	Water	6	8	11	0
	E. coli	7	10	12	0
	UBN04(5)	14	24	28	Non-HR2
	UBN04(6)	14	38	44	Non-HR2
	UBN05(8)	12	35	39	Non-HR2
IRRIBB21	Water	5	8	14	0
	E. coli	7	8	16	0
	UDN04(1)	25	27	34	Non-HR2
	UBN05(1)	15	21	28	Non-HR1
	UDN05(4)	13	16	17	HR

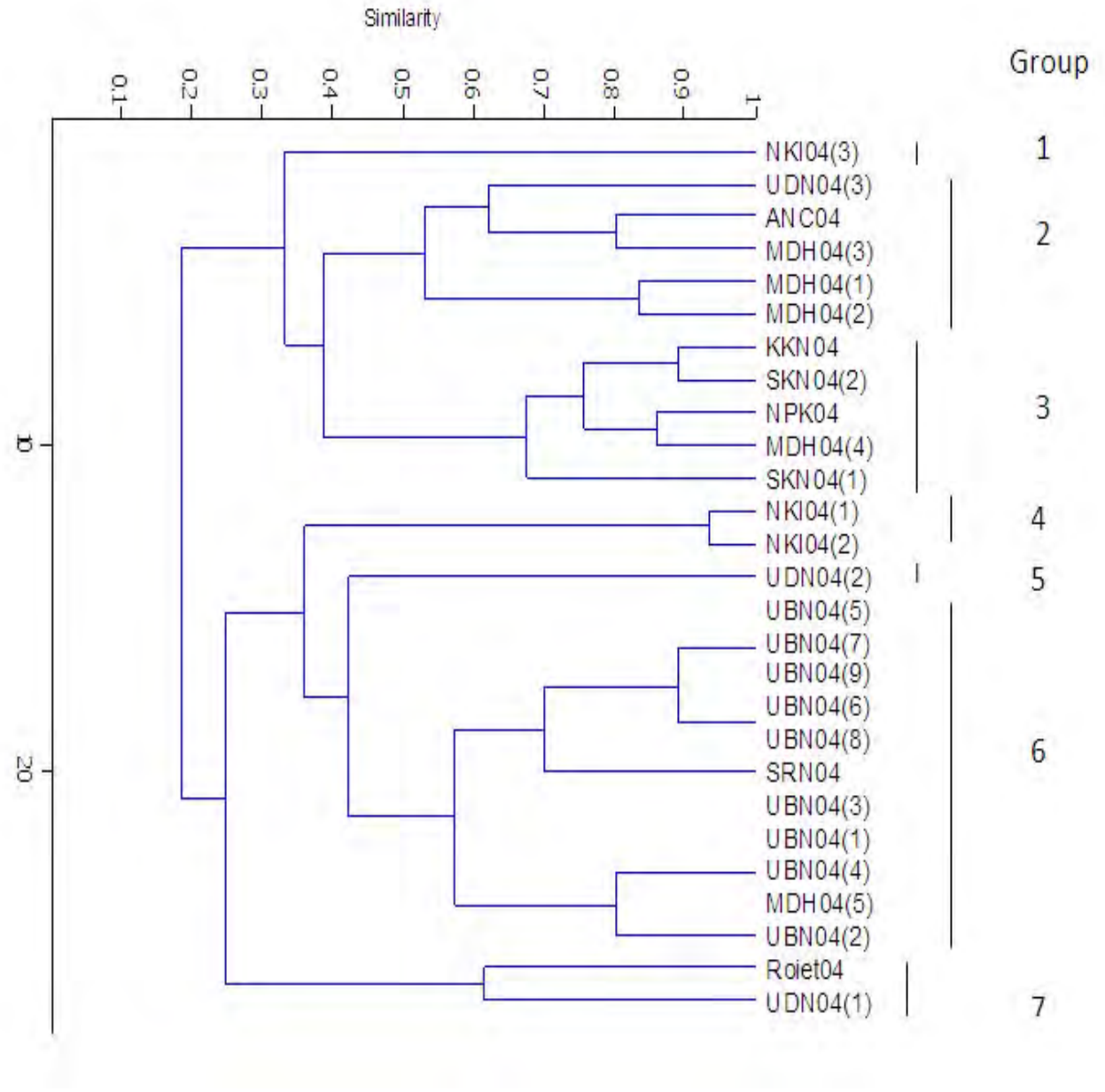
หมายเหตุ : HR = เกิด HR ภายใน 48 ชั่วโมง, Non-HR 1 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่มีการขยายขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, Non-HR 2 = ไม่แสดงการเกิด HR แต่ข้าวแสดงอาการเหลืองและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 4-8 วัน, 0 = ชุดควบคุมซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ

ตารางที่ ก.2 ค่าเฉลี่ยของค่าการรั่วไหลของไอออนในแต่ละรูปแบบการตอบสนองจากการปลูกเชื้อ ด้วย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และชุดควบคุมต่อพันธุ์ข้าวบางสายพันธุ์

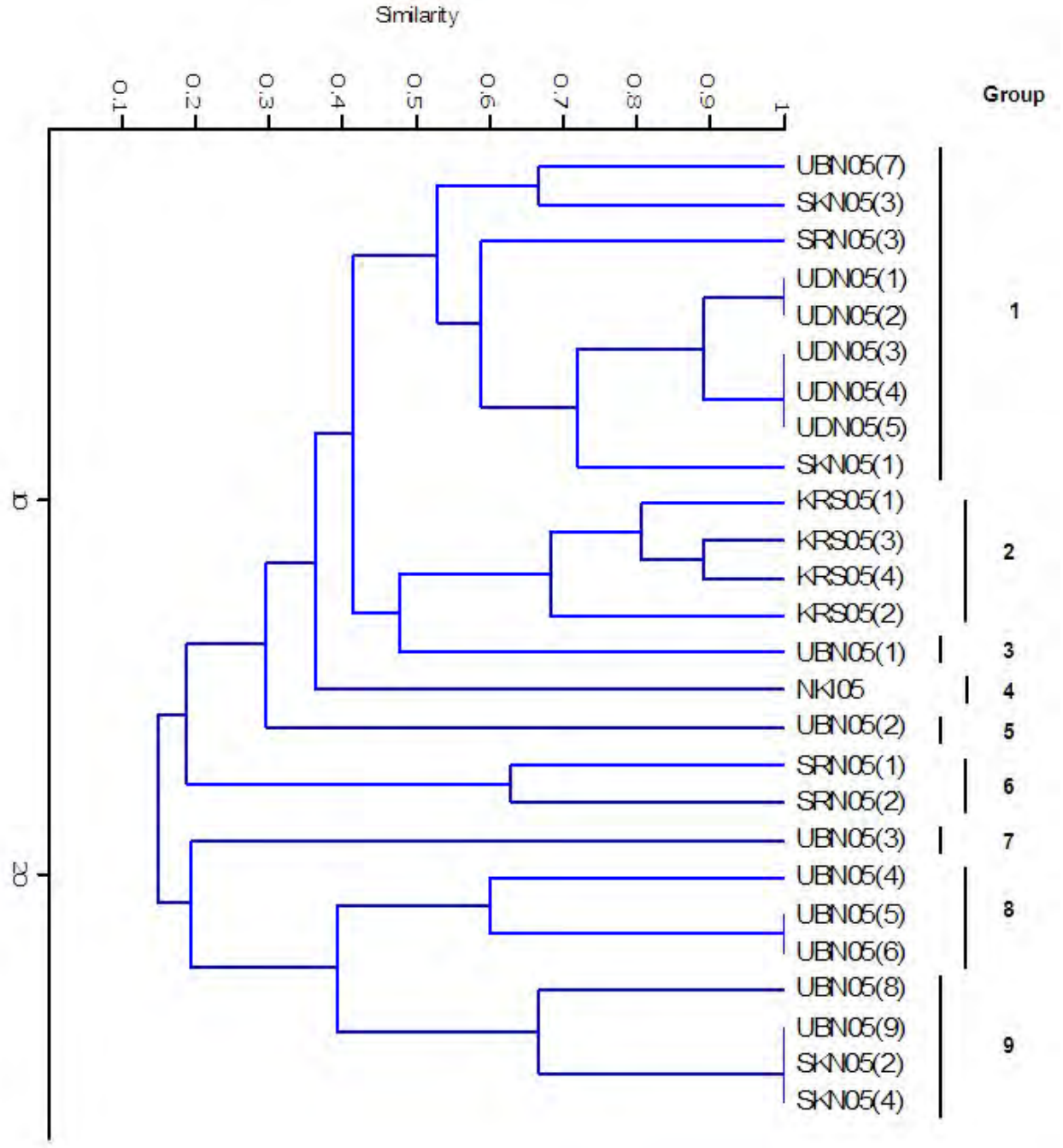
ลักษณะการตอบสนอง	ค่าเฉลี่ยของค่าการรั่วไหลของไอออน (x2000μΩ)		
	1DPI	2DPI	4DPI
ไม่มีการเปลี่ยนแปลง(0)	7.45[a]	9.00[a]	12.05[a]
เกิด HR	10.30[b]	14.10[b]	17.00[b]
Non-HR1	12.00[b]	18.78[c]	23.00[c]
Non-HR2	15.53[c]	26.67[d]	38.40[d]

DPI คือ Day Post Inoculation

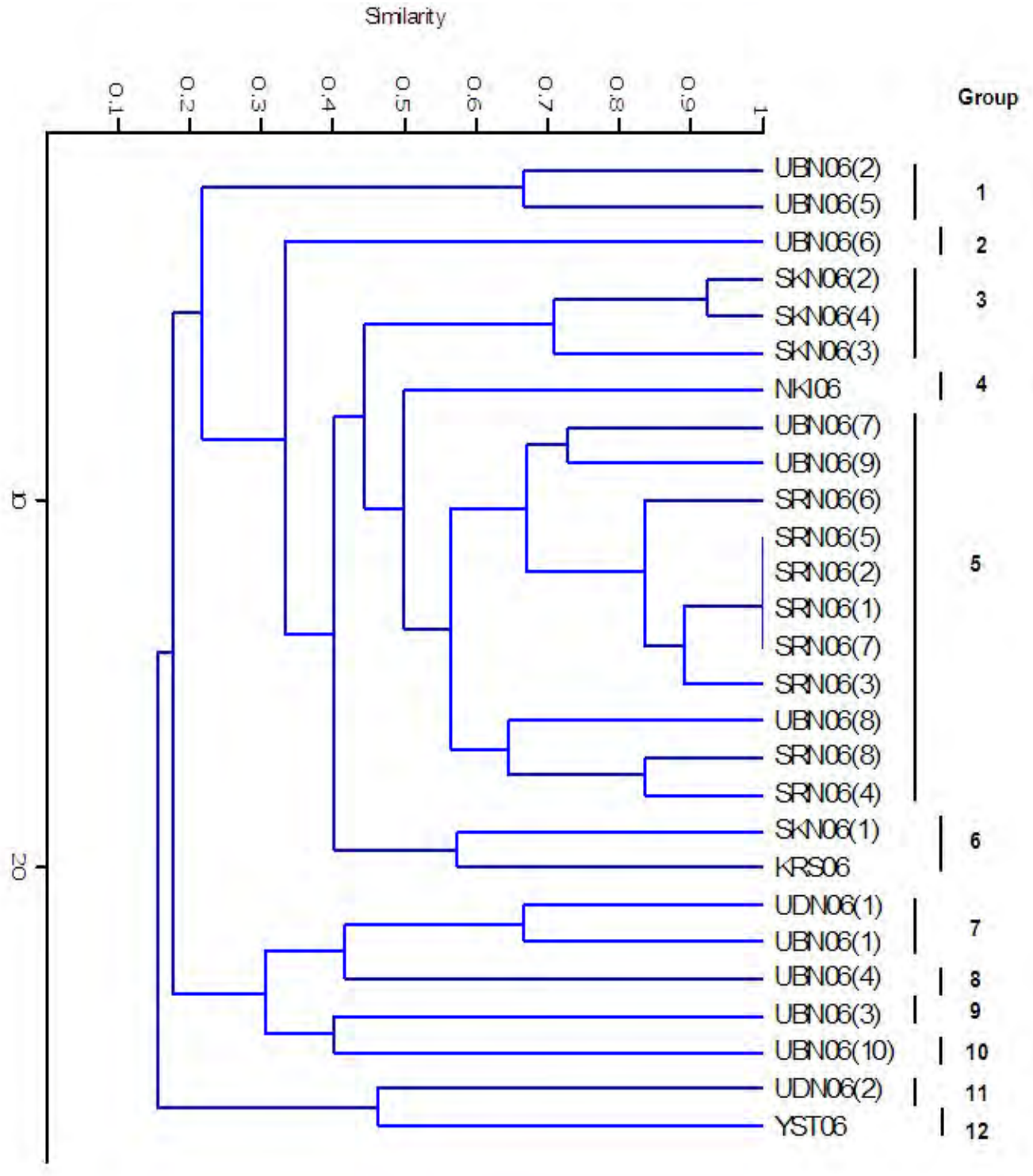
abcd แสดงความเหมือนหรือแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ ก.1 เดนโดรแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2547 ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA



ภาพที่ ก.2 เดนโดรแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 26 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2548 ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA



ภาพที่ ก.3 เดนโดรแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2549 ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากการทำ PCR ด้วยวิธี UPGMA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุธิดา เรืองบุญ เกิดเมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 จังหวัดสกลนคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549