ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

นายศุภกิณห์ สุดชูเกียรติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA FINGERPRINT FOR PATHOTYPE SCREENING OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* CAUSING BACTERIAL LEAF BLIGHT OF RICE

Mr Supakin Sudchukait

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 2007

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Copyright of Chulalongkorn University

501545

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว
โดย	นายศุภกิณห์ สุดชูเกียรติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.พยอม โคเบลลี่

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.พยอม โคเบลลี่)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศุภกิณห์ สุดซูเกียรติ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว (DNA FINGERPRINT FOR PATHOTYPE SCREENING OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* CAUSING BACTERIAL LEAF BLIGHT OF RICE) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.พยอม โคเบลลี่, จำนวนหน้า 62 หน้า

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จัดเป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งของข้าวเนื่องจากการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในทุกภาคของประเทศไทย เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถพัฒนาตัวเองให้เข้าไปทำลายพันธุ์ต้านทานที่มียีนต้านทานเดียวได้ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว จึงทำให้ยากต่อการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อโรคนี้ การศึกษาถึงสายพันธุ์เชื้อ (Pathotype) จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการวางแผนการใช้ยีนในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งอย่างมีประสิทธิภาพและยั้งยืน แต่การคัดกรองสายพันธุ์เชื้อเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาและแรงงาน ดังนั้นการใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อหาความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์เชื้อในการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) จะช่วยให้การคัดกรองสายพันธุ์เชื้อมีความรวดเร็วขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่แยกมาจากข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้งจาก 12 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิควิธี PCR-based ได้แก่ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 15 ไพรเมอร์ ที่ผ่านการสำรวจและคัดเลือกแล้วมาช่วยในการจัดกลุ่มของเชื้อ สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 13 กลุ่ม โดยในกลุ่มใหญ่มีการกระจายของเชื้อที่มาจาก 10 จังหวัด จากผลการจัดกลุ่มได้คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะของเชื้อในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 จำนวน 3 แถบ มาพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย โดยการสังเคราะห์ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ MG1 และ MG2 เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด ทดสอบกับเชื้อทั้ง 80 ไอโซเลท พบว่าเฉพาะในชุด MG1 ไพรเมอร์ ที่ได้ผลผลิต PCR ในขนาดที่ต้องการและจำเพาะกับเชื้อในกลุ่มที่ 1 จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าเชื้อในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีการกระจายตัวไปทุกส่วนของภูมิภาค และความหลากหลายนี้สามารถพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายได้ 1 ชุด เพื่อใช้ในการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งอย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....ศุภกิณห์ สุดซูเกียรติ.....

ปีการศึกษา.....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....พยอม โคเบลลี่.....

4772503023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : RAPD / Bacterial leaf blight / *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* / Pathotype / Genetics diversity

SUPAKIN SUDCHUKAIT : DNA FINGERPRINT FOR PATHOTYPE SCREENING OF *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* CAUSING BACTERIAL LEAF BLIGHT OF RICE. THESIS ADVISOR : TEERADA WANGSOMBOONDEE, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR PAYORM COBELLI, Ph.D, 62 pp.

Bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is one of the most important rice diseases due to the severe epidemic and causing damage to rice fields in all parts of Thailand. *X. oryzae* pv. *oryzae* has high genetic diversity, as such it is difficult to breed any resistant rice cultivars for this disease. Therefore, the pathotype study of this pathogen is important for planning the use of resistance genes in rice breeding program for disease resistance. The pathotype screening is time consuming and laborious. Thus, the use of molecular techniques for pathotype differentiation to develop molecular marker will speed up the pathotype screening. In this research, 80 isolates of *X. oryzae* pv. *oryzae* from 12 provinces in northeastern Thailand were studied. PCR-based techniques, i.e. RAPD-PCR, rep-PCR, and IS-PCR, with survey and selected 15 primers were used. *X. oryzae* pv. *oryzae* isolates could be divided into 13 groups by cluster analysis in which isolates from 10 provinces were clustered into a large group. Three DNA fragments that specific to the pathogen in group I and group III were selected to develop molecular markers. Two primer sets, MG1 and MG2, were synthesized and used to test on all 80 isolates. The result showed that only the MG1 primer set could amplify a specific PCR fragment of the pathogen in group I. In conclusion, the pathogen isolates from northeastern Thailand had genetic diversity and were distributed to all parts of the region. A molecular marker was developed from this genetic diversity which is useful for pathotype screening. Thus, this information is importance for effective rice breeding program for bacterial left blight resistance.

Field of study..Biotechnology....Student's signature.....Supakin Sudchukait.....

Academic year.....2007..... ..Advisor's signature.....

Co- Advisor's signature.....:.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. พยอม โคเบลลี่ ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะและคอยดูแลตลอดการทำงานวิจัยชิ้นนี้

ขอบคุณคณะกรรมการได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง อาจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ และ อาจารย์ ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา สำหรับคำถามและคำติชมในงานวิจัยนี้

ขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำปรึกษาในงานวิจัย อธิบายการใช้เครื่องมือต่าง ๆ รวมไปถึงอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยชิ้นนี้

ขอบคุณกลุ่มงานอารักขาข้าวศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีที่ช่วยเก็บและคัดแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 80 ไอโซเลท รวมไปถึงข้อมูลลายพันธุ์เชื้อ (Pathotype) ที่ทดสอบในสภาพการทดลอง

ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ช่วยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้ในบางครั้ง

และขอขอบคุณทุก ๆ ท่านที่มีส่วนรวมในงานวิจัยนี้ซึ่งไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพ่อ ดุสิต สุดชูเกียรติ คุณแม่ จินดาภรณ์ รัตนราชบุรี และน้องชายนายเขมกร สุดชูเกียรติ ที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาให้ตลอดงานวิจัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

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

บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร 4
2.1 ข้าวและความสำคัญ 4
2.2 ยีนต้านทานในข้าวต่อโรคขอบใบแห้ง 6
2.3 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight) 7
2.4 ความหลากหลายของประชากรเชื้อ 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 การเก็บและรวบรวมเชื้อ 12
3.2 การสกัดดีเอ็นเอ 16
3.3 การวิเคราะห์ด้วย RAPD PCR 16
3.4 การวิเคราะห์ด้วย rep-PCR และ IS-PCR 17
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 18
3.6 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ 18
3.7 ออกแบบโมเลกุลเครื่องหมาย 19
บทที่ 4 ผลการทดลอง 20
4.1 ผลการวิเคราะห์ RAPD rep-PCR และ IS-PCR 20
4.2 ผลการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) 27
4.3 โมเลกุลเครื่องหมาย 36
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

5.1 การกระจายตัวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*..... 38
5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*.....39
5.3 เปรียบเทียบการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อโดยลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics analsis) กับการเข้าทำลายของเชื้อต่อยีนต้านทานในข้าว (Pathotypic analysis) 40
5.4 โมเลกุลเครื่องหมายสำหรับ *X. oryzae* pv. *oryzae*.....41
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 43
รายการอ้างอิง..... 44
ภาคผนวก..... 47
ภาคผนวก ก เดนโดแกรมและตารางผลการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ.....48
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 โรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย (Webster และ Gunnell, 1992)..... 6
3.1 เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำการเก็บในช่วงปี 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ..... 12
3.2 ลำดับเบสของ rep-primer sets (REP ERIC และ BOX) และ IS*1112* primer set (JEL)..... 18
4.1 ลำดับเบสและจำนวนแถบดีเอ็นเอของ RAPD ไพรเมอร์..... 20
4.2 ลำดับเบสและจำนวนแถบดีเอ็นเอของ rep-PCR และ IS-PCR ไพรเมอร์..... 21
4.3 ลำดับเบสของชุดโมเลกุลเครื่องหมาย (MG1 and MG2)..... 36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ล้นฐานวิทยาของข้าว *Oryza sativa* L.....5
2.2 ลักษณะของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* 7
2.3 ลักษณะของข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้ง.....8
4.1 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_07.....22
4.2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_10.....22
4.3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_22.....22
4.4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_23.....23
4.5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_24.....23
4.6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_29.....23
4.7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_30.....24
4.8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_43.....24
4.9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_49.....24
4.10 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_83.....25
4.11 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SPC_85.....25
4.12 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ REP.....25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ หน้า

4.13 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ BOX.....26
4.14 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ERIC.....26
4.15 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ JEL.....26
4.16 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2547 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำRAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....30
4.17 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 26 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2548 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....31
4.18 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี พ.ศ. 2549 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....32
4.19 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....33
4.20 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท ที่เก็บมาจากจังหวัดอุบลราชธานีระหว่างปี พ.ศ. 2547 ถึง 2549 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....34
4.21 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 12 ไอโซเลท ที่เก็บมาจากจังหวัดสุรินทร์ระหว่างปี พ.ศ. 2547 ถึง 2549 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR.....35
4.22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุด MG1.....37
4.23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุด MG2.....37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในแต่ละปีข้าวจำนวน 55% จะถูกใช้ในการบริโภคและอีก 45% จะเป็นสินค้าส่งออก (Vanichanont, 2004) การปลูกข้าวประสบกับปัญหาหลายอย่าง เช่น สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงรวมไปถึงปัญหาโรคและแมลงศัตรูพืชด้วย ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight) เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตของข้าวเป็นอันมาก เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนี้คือ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* โดยเชื้อจะสามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนออกรวง ลักษณะข้าวที่ติดเชื้อจะมีรอยช้ำที่ขอบใบ จุดช้ำนี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวไปตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็ว ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะกล้าที่เพิ่งปักดำจะทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเฉาและตายอย่างรวดเร็วจะเรียกอาการนี้ว่า ครีเสค (Kresek) การแพร่กระจายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จะติดต่อไปได้รวดเร็วทางน้ำ โดยเฉพาะเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น ระดับน้ำในนาสูง การระบายน้ำไม่ดี ฝนตกพรำ ใต้ฝุ่น และน้ำท่วมเป็นต้น (Bogdanove, 2002; พยอม และคณะ, 2541) ฉะนั้น ถ้ามีวิธีการป้องกันและควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีประสิทธิภาพจะช่วยให้เพิ่มผลผลิตข้าวได้

วิธีการป้องกันการเกิดโรคขอบใบแห้งที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งคือการใช้สายพันธุ์ต้านทาน ซึ่งนอกจากลดมลภาวะเนื่องจากเป็นการลดการใช้สารเคมีในการควบคุมแล้ว ยังเป็นวิธีที่ง่ายในการนำไปใช้ของเกษตรกร ซึ่งข้อมูลที่จำเป็นในการปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานต่อโรค คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ได้มีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับความหลากหลายและการแยกสายพันธุ์เชื้อ (Pathotype) ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในหลายภูมิภาค ในประเทศศรีลังกามีการศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งเก็บมาจากปี ค.ศ. 1995 ใช้วิธี RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) สามารถแยกเชื้อได้เป็น 14 สายพันธุ์เชื้อ (Ochiai และคณะ, 2000) ในประเทศอินเดียมีการศึกษาโดยการใช้วิธี RFLPs ซึ่งผลที่ได้มีการนำไปเป็นข้อมูลในการพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรค (Yashitola และคณะ, 1997) นอกจากการใช้วิธี RFLPs ยังมีการนำวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) มาใช้ในการศึกษาด้วย ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 5 กลุ่มด้วยกัน (Gupta และคณะ, 2001) ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv.

oryzae ในเขตภาคเหนือของประเทศ โดยใช้วิธี AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) (Kosawang และคณะ, 2006)

ข้อมูลของประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและสายพันธุ์เชื้อ เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ด้านทานโรคและรวมไปถึงการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้ ซึ่งปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทยมีเป็นจำนวนน้อย รวมถึงการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อโดยวิธีทดสอบความรุงแรงของเชื้อต่อข้าวพันธุ์ที่มียีนด้านทานแตกต่างกัน ยังต้องใช้เวลานานและแรงงานมาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และพัฒนาวิธีที่สามารถคัดกรองสายพันธุ์เชื้อได้รวดเร็วขึ้น การใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อหาความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์เชื้อ เพื่อสร้างโมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) จะช่วยให้การตรวจสอบประชากรเชื้อมีความรวดเร็วขึ้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสายพันธุ์ด้านทานโรครวมไปถึงวิธีการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และพัฒนาวิธีคัดกรองสายพันธุ์เชื้อ โดยการสร้างโมเลกุลครื่องหมาย

ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการใช้วิธี RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR เพื่อทำการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อ (pathotype) โดยศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับผลของการจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อโดยศึกษาปฏิกิริยาการเกิดโรคบนพืชที่มียีนด้านทานที่แตกต่าง (pathotype test) ว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือไม่ คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในกลุ่มของเชื้อที่ได้จากการจัดกลุ่ม นำมาออกแบบเป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการคัดกรองกลุ่มของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลในการทำงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และพัฒนาวิธีที่สามารถคัดกรองสายพันธุ์เชื้อได้รวดเร็วขึ้น งานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลและวิธีการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาพันธุ์ต้านทานและวิธีควบคุมโรคขอบใบแห้งต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ข้าวและความสำคัญ

ข้าวเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกับหญ้าอยู่ในจีนัส *Oryza* และมีถึง 25 สปีชีส์ ซึ่งจะกระจายตัวอยู่ในหลาย ๆ ทวีป เอเชีย แอฟริกา ออสเตเรีย อเมริกากลางและเหนือ ซึ่งมีแค่ 2 สปีชีส์ที่ได้รับความนิยมในการปลูก คือ *O. glaberrima* Stend. จะนิยมปลูกในบริเวณแคบ ๆ ในทวีปแอฟริกาตะวันตก และ *O. sativa* L. จะมีการปลูกมากในเขตของเส้นศูนย์สูตรไม่ว่าจะเป็นในส่วนของพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งไปจนถึงที่มีน้ำท่วม ซึ่งข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรในประเทศแถบเอเชีย ต้นข้าวประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (Grist, 1986: 69)

ในประเทศไทยข้าว (*O. sativa* L.) เป็นพืชที่สำคัญเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ เนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรในประเทศกว่า 64.24 ล้านคน และเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นปริมาณมาก ในปี 2549 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นจำนวน 7.4 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 97,539.37 ล้านบาท เมื่อนำไปเทียบกับปริมาณส่งออกในปีก่อนหน้านี้มีปริมาณลดลง 1.4 % แต่มูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้น 4.1% และคาดว่าในปี 2550 ประเทศไทยจะสามารถส่งออกข้าวได้เป็นปริมาณสูงขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตมากขึ้นมีความจำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งเป็นวิธีที่ลดต้นทุนการผลิตแล้วทำให้ได้ผลิตผลมากขึ้น จากอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถปลูกได้ในที่นาดอนทั่วไป ทนแล้ง ทนดินเปรี้ยว ทนดินเค็ม เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2550) นอกจากสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวแล้ว โรคต่าง ๆ ยังเป็นอีกสาเหตุที่เป็นอุปสรรคในการเจริญเติบโตของข้าว จึงมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่ดีขึ้นสามารถต้านทานต่อโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 2.1) โรคขอบใบแห้งเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ข้าวเป็นจำนวนมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2.1 *Oryza sativa L.* (A) **ฐานและราก** × ½; (B) **ส่วนของลำต้นที่จะเป็นใบ** × ¼; (C) **ช่อดอก** × ½; (D) ligule **และ** ayricle × 1½; (E) spikelet × 5 (F) **ส่วนล่างของ** lemma; (G) **ส่วนบนของ** lemma; (H) **รังไข่**; (I) **ส่วนของช่อดอกที่เจริญเต็มที่**– F-I × 5 (Grist, 1986: 77)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 โรคของข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียจาก Webster และ Gunnell, 1992

โรค	แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ
โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight)	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
โรคใบขีดโปร่งแสง (Bacterial leaf streak)	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
โรครากเน่า (Foot rot)	*Erwinia chrysanthemi*
โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown spot)	*Helminthosporium oryzae*
โรคกาบใบเน่า (Sheath rot)	*Sarocladium oryzae*

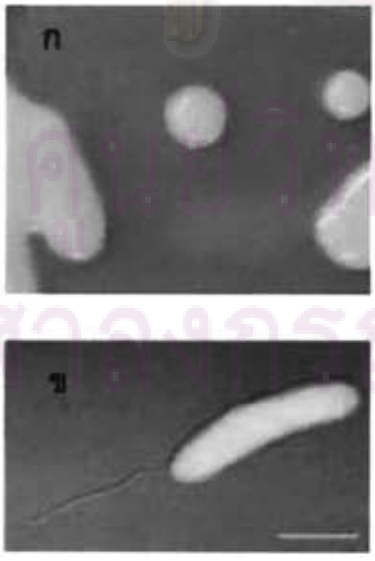
2.2 ยีนต้านทานในข้าวต่อโรคขอบใบแห้ง

พืชหลายชนิดมีความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อจุลลินทรีย์ต่าง ๆ ที่เข้ามาทำลายได้ โดยการสร้างการป้องกันตัว (Plant defense) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทาน (resistance gene) ในพืชที่มีความจำเพาะกับยีน avirulence (avr) ในเชื้อ (Mew, 1987) ซึ่งโปรตีนที่สร้างจากยีน avirulence จะมีผลในการกระตุ้นให้พืชสร้างสารที่นำมาใช้ในการต้านทานต่อการเกิดโรค ในปัจจุบันมีการค้นพบยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งถึง 29 ยีน ได้แก่ *Xa1* ถึง *Xa29* ซึ่งยีนต้านทานบางยีนมีความจำเพาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อเพียง 1-2 สายพันธุ์เชื้อ เช่น *Xa1* บางยีนมีการแสดงออกเมื่อข้าวโตเต็มที่เท่านั้น เช่น *Xa21* ยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งส่วนใหญ่เป็นยีนเด่น (dominant) แต่มีบางยีนเป็นยีนด้อย (recessive) เช่น *xa5* และ *xa13* (Nino-Liu และคณะ, 2006) ตัวอย่างของความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าว เช่น เมื่อข้าวมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง *Xa7* และ *Xa10* ที่ปลูกอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อที่มียีน avirulence *avrXa7* และ *avrXa10* ตามลำดับ จากปฏิสัมพันธ์จะทำให้เกิดความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งจากสายพันธุ์ *O. indica* IR24 ให้เป็นข้าวที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมเหมือนกันแต่ต่างกันตรงที่มียีนต้านทานต่าง ๆ (Near Isogenic Lines (NILs)) เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์และเพื่อใช้ในการทดสอบสายพันธุ์เชื้อ (pathotype) (Nino-Liu และคณะ, 2006) การปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานพันธุ์เดียวกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ส่งผลให้ยีน avirulence เกิดการเปลี่ยนแปลงไปด้วยทำให้ข้าวสูญเสียยีนต้านทานและเกิดโรคได้ (Kosawang และคณะ, 2006) ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเพื่อให้สามารถต้านทานต่อเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงไป

2.3 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight)

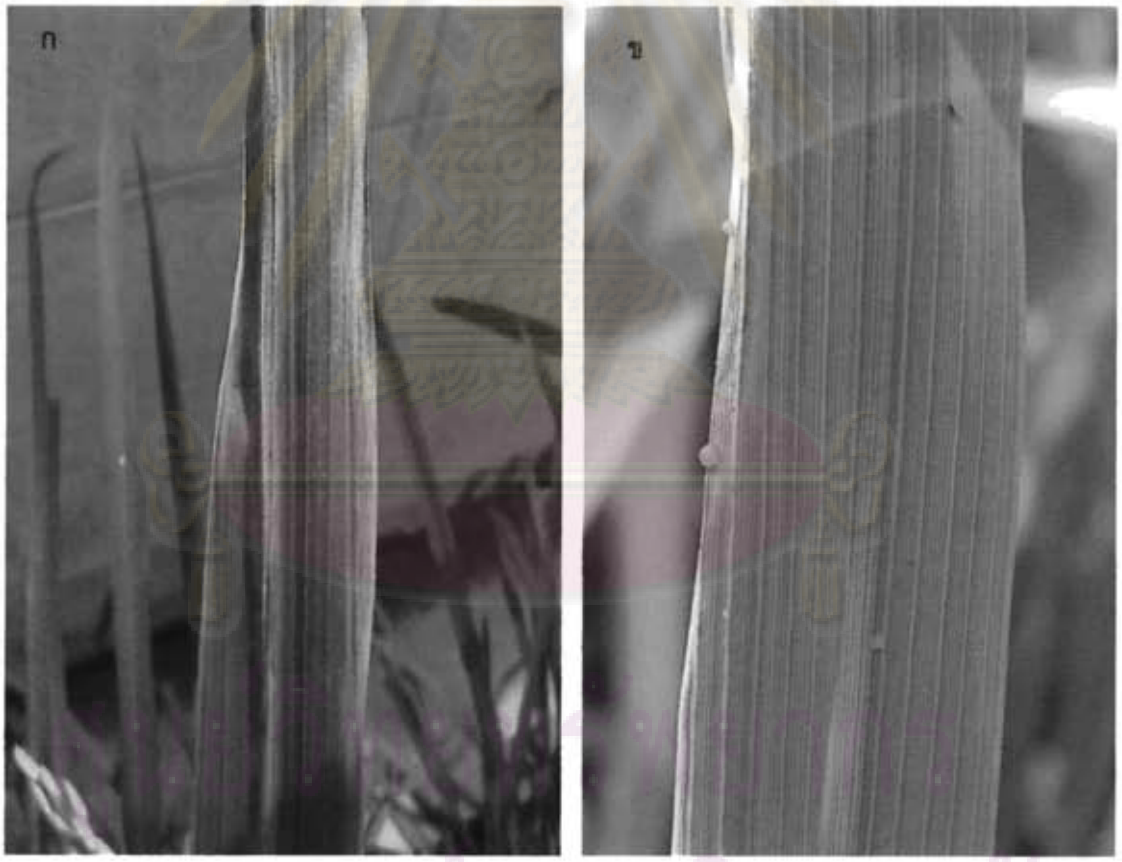
โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight) ในข้าว มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จัดเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่ง เนื่องจากพบการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในทุกภูมิภาคของโลก ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียตัวนี้ได้ทำลายผลผลิตของข้าว 20-30 % และมีรายงานความเสียหายสูงสุดถึง 50 % (Ou, 1985) และในประเทศไทยพบการระบาดของโรคขอบใบแห้ง ในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญโดยเฉพาะนาในเขตชลประทาน ส่วนในนาน้ำฝน หากสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีระดับน้ำในนาสูง การระบายน้ำไม่ดี ฝนตกพร่ำ มีพายุ น้ำท่วม การทำนาโดยใช้พันธุ์ข้าวพันธุ์เดียว มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูง และระยะปักดำชิดกัน ก็สามารถทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งระบาดรุนแรงและรวดเร็วได้ (พยอม และคณะ, 2541)

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง (rod-shape) เซลล์มีความกว้างประมาณ 0.7 µm ถึง 2.0 µm และหนาประมาณ 0.4 µm ถึง 0.7 µm สามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลคเจลลัม (flagellum) โคโลนีจะมีลักษณะกลม ผิวเรียบ โค้งนูนเป็นเมือก และมีสีเหลือง (ภาพที่ 2.2) ซึ่งสารที่ทำให้เกิดสี ได้แก่ xanthomonadin *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถผลิตสารที่มีชื่อว่า extracellular polysaccharide (EPS) ซึ่งมีความสำคัญในการช่วยให้เชื้อรวมตัวกัน (ooze) ในเวลาที่เชื้อออกมาจากบริเวณแผล ยังช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อแห้ง สามารถรักษาสภาพเวลาลอยไปในอากาศ และไม่กระจายตัวเวลาโดนน้ำฝน *X. oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30°ซ (Nino-Liu และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อ *Xanthomonas oryzae*
(ก) โคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar
(ข) ลักษณะเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบอีเล็กตรอน (bar, 1.0 µm) จาก Nino-Liu และคณะ, 2006

X. oryzae pv. *oryzae* เข้าทำลายใบข้าวทางช่องเปิดตามธรรมชาติ ไฮดราโทด (Hydratode) และทางบาดแผล เมื่อเชื้อเกิดการแบ่งเซลล์จะแพร่ไปตามท่อลำเลียงน้ำ ซึ่งเชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนออกรวง ลักษณะการติดเชื้อจะมีรอยช้ำที่ขอบใบ จุดช้ำนี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวไปตามใบข้าวใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็ว และสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา ๆ ใบม้วนตามความยาว (ภาพที่ 2.3 ก) ถ้าอากาศมีความชื้นสูงและแบคทีเรียเจริญเต็มท่อลำเลียงน้ำ แบคทีเรียจะออกมาที่ผิวใบในรูปของหยดเชื้อหรืออูซ (ooze) (ภาพที่ 2.3 ข) ถ้าเชื้อเข้าทำลายต้นข้าวในระยะกล้าหรือหลังปักดำจะทำให้ต้นข้าวเหี่ยวและเฉาตายอย่างรวดเร็วซึ่งเรียกอาการนี้ว่า **ครีเสค** (Kresek) (Ou, 1985) *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถแพร่กระจายทางน้ำ โดยจะมีการแพร่กระจายไปตามระบบชลประทาน รวมไปถึงสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ก็มีผลต่อการแพร่กระจายด้วยด้วยเช่น ฝนตกหนัก หรือ ติดไปกับเมล็ด (Bogdanove, 2002; พยอมและคณะ 2541)



ภาพที่ 2.3 (ก) ลักษณะของข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้ง และ (ข) แบคทีเรียที่ออกมาจากบริเวณที่ที่ติดเชื้อ (ooze) (กรมการข้าวและกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ความหลากหลายของประชากรเชื้อ

การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคขอบใบแห้ง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและลดการใช้สารเคมี ง่ายต่อการนำไปใช้ในการควบคุมโรค แต่เนื่องจากการใช้พันธุ์ต้านทานอย่างกว้างขวางที่มียีนต้านทานต่อโรค 1 ถึง 2 ยีน อาจเป็นการเร่งให้เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม ให้ได้เชื้อที่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรคสายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานโรคได้ ดังนั้นประชากรข้าวจึงมีอิทธิพลต่อความหลากหลายและความแปรผัน ของโครงสร้างประชากรของเชื้อ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง

การศึกษาสายพันธุ์เชื้อ (pathotype/race) โดยวิธีทางการศึกษาปฏิกิริยาการเข้าทำลายของเชื้อในข้าวที่มียีนต้านทานที่แตกต่าง (near isogenic line) ในระยะแตกกอ การแยกสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธีนี้ยังต้องใช้เวลาและแรงงานมาก ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ เช่น RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ rep-PCR (repetitive-sequence-based PCR) โดยทั้งหมดนี้อาศัยความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA) หรือ ยีนในการทำการศึกษา

เทคนิค RFLPs เป็นหนึ่งในหลาย ๆ วิธีที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบความแปรผันของจำนวนและขนาดของลำดับเบสที่ต้องการศึกษา โดยการใช้ยีนหรือส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงซึ่งเป็นวิธีที่แม่นยำในการตรวจสอบแต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการทำและต้องทราบถึงลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา Leach และคณะ (1992) นำเทคนิค RFPLs มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 98 ไอโซเลทจากฟิลิปปินส์ สามารถแยกเชื้อออกเป็น 27 สายพันธุ์เชื้อ และ 6 Races การศึกษาเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศศรีลังกาโดยใช้ส่วนของ 16S และ 23S rDNA ที่ได้มาจากการทำ PCR (Polymerase chain reaction-amplified) มาทำเป็นโพรบสำหรับ RFLPs สามารถแยกเชื้อได้เป็น 14 สายพันธุ์เชื้อ (Ochiai และคณะ, 2000) ยีน avirulence (*avrXa10*) และ repetitive DNA ในส่วนของ IS*1112* ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ถูกนำมาใช้เป็นโพรบ (probe) สำหรับ RFLP ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 308 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากประเทศในเอเชีย ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลี มาเลเซีย เนปาล และฟิลิปปินส์ สามารถแบ่งเชื้อออกได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ซึ่ง 3 ใน 5 กลุ่ม ประกอบด้วยเชื้อที่มาจาก

ประเทศเดียวกันและอีก 2 กลุ่มประกอบด้วยเชื้อที่มาจากหลายประเทศ (Adhikari และคณะ, 1995)

เทคนิค AFLP เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยการตัดจีโนมมิคดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ตามด้วยการต่อปลายของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอ็มไซม์ด้วย adaptors ที่เข้าคู่กับปลายของดีเอ็นเอ แล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptors ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็มไซม์ ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่อการตรวจ polymorphism ของดีเอ็นเอสูง ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมาก แต่ว่าข้อเสียคือในทางปฏิบัติเป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลานาน (Mueller และ Wolfenbarger, 1999)

RAPD เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้จะเป็นลำดับเบสสั้น ๆ (ประมาณ 10 เบส) โดยในการทำ PCR จะใช้อุณหภูมิในช่วงของ annealing ที่ต่ำจึงทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ง่าย จึงเป็นการจับกันแบบไม่มีความจำเพาะ (Williams และคณะ, 1990; Bardakci, 2000) เทคนิค RAPD จึงได้ถูกนำมาใช้ในงานทางด้านชีววิทยา เช่น การทำแผนที่ทางพันธุกรรม ช่วยในการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายและศึกษาถึงประชากรและการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบเทคนิคนี้กับการทำ RFLPs วิธีนี้จะมีความรวดเร็วและสะดวกมากกว่า รวมไปถึงไม่จำเป็นต้องรู้ถึงลำดับเบสของยีนก่อนอีกด้วย ฉะนั้น RAPD จึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีความนิยมใช้อย่างมากในงานวิจัยหลาย ๆ ชิ้น (Bardakci, 2000)

อีกหนึ่งเทคนิคที่มีการใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมคือ rep-PCR เทคนิคนี้ได้อาศัยหลักการของ PCR ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสในส่วน interspersed repetitive DNA sequence ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคารีโอต repetitive sequence ที่นำมาศึกษาได้แก่ BOX element (BOX) Repetitive Extragenic Palindromic (REP) และ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) ซึ่งผลที่ได้จะได้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ๆ ใน หลาย ๆ ขนาด ซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันไปก็จะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันออกไป ฉะนั้นวิธีนี้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (McDonald และ Wong, 2000) และ IS-PCR ซึ่งใช้ส่วน insertion element IS*1112* ที่มีการซ้ำของลำดับเบสสูง ที่พบมากใน *X. oryzae* pv. *oryzae* (George และคณะ 1997; Lee และคณะ 2005) มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ฉะนั้นจึงนำส่วน IS*1112* มาออกแบบเป็นชุดไพรเมอร์ JEL ซึ่งชุดไพรเมอร์ที่ใช้ใน rep-PCR และ IS-PCR ให้ความจำเพาะค่อนข้างสูงจึงสามารถแบ่งแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้และเป็นวิธีที่ค่อนข้างสะดวกเหมือนกับเทคนิค RAPD

RAPD-PCR และ IS*1112*-PCR ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ในอินเดียจำนวน 16 ไอโซเลท และ 2 ไอโซเลท จากฟิลิปปินส์ โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์และ 2 ไพรเมอร์สำหรับ IS*1112* ด้วยระดับความเหมือนที่ 0.57 สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยเชื้อจากฟิลิปปินส์ถูกจัดแยกอยู่คนละกลุ่ม (Gupta และคณะ, 2001)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในแถบทวีปเอเชีย ส่วนมากจะทำการศึกษาในประเทศ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลี มาเลเซีย เนปาล และ ฟิลิปปินส์ ซึ่งงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประเทศไทยที่มีการตีพิมพ์ยังน้อยมาก ในปี 2549 Kosawang และคณะ ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค AFLP มีการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 19 ไพรเมอร์ เพื่อทำการศึกษาเชื้อทั้ง 30 สายพันธุ์ ที่ทำการเก็บมาระหว่างปี 2545 – 2547 จากหลาย ๆ จังหวัดในเขตภาคเหนือของประเทศไทย สามารถแยกเชื้อออกเป็นได้ 6 กลุ่ม โดยยึดสถานที่เก็บเป็นหลัก ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นรายงานเฉพาะเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคเหนือของประเทศไทย

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ก็มีพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวเป็นบริเวณกว้าง ซึ่งโรคขอบใบแห้งเป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตเสียหายมาก การปรับปรุงพันธุ์ด้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง มีความจำเป็นต้องรู้ถึงโครงสร้างประชากรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เพื่อทราบถึงความหลากหลายของเชื้อในพื้นที่ วิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ PCR-based เป็นวิธีง่าย มีความรวดเร็ว และแม่นยำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้เลือกเทคนิค RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยจะทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิธีการตรวจสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพจะช่วยงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคขอบใบแห้งในการพัฒนาการป้องกันโรคขอบใบแห้งในข้าวในให้มีประสิทธิภาพต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. การเก็บและรวบรวมเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ดร.พยอม โคเบลลี่ จากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้งในแปลงเกษตรกรและในศูนย์วิจัยข้าวต่าง ๆ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 12 จังหวัด (ตารางที่ 3.1) เป็นตัวอย่างที่เก็บในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ปี พ.ศ. 2547 จำนวน 27 ไอโซเลท ตัวอย่างที่เก็บปี พ.ศ. 2548 ในช่วงเดือนเดียวกันจำนวน 26 ไอโซเลท และ ตัวอย่างที่เก็บในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายนของปี พ.ศ. 2549 จำนวน 27 ไอโซเลท ตัวอย่างที่เก็บมาผ่านการแยกเชื้อที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง (NA) ที่อุณหภูมิ 28°ซ เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์จะเก็บรักษาในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80°ซ

ตารางที่ 3.1 เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำการเก็บในระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	จังหวัด	% การระบาด	ความรุนแรง*
1	2547-01	Kresek	KHK1-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
2	2547-02	Kresek	KHK2-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
3	2547-03	Kresek	KHK3-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
4	2547-04	Kresek	KHK4-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
5	2547-05	Kresek	KHK5-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
6	2547-06	Kresek	KHK6-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
7	2547-07	Kresek	KHK7-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
8	2547-08	Kresek	KHK8-UBN	อุบลราชธานี	5-10	9
9	2547-09	Leaf Blight	DC1-UBN	อุบลราชธานี	1-5	5
10	2547-10	Leaf Blight	RoiEt2	ร้อยเอ็ด	5-10	7
11	2547-12	Leaf Blight	SRN4	สุรินทร์	5-10	7
12	2547-13	Leaf Blight	NKI1	หนองคาย	10-20	7
13	2547-14	Leaf Blight	NKI2	หนองคาย	10-20	7
14	2547-15	Leaf Blight	NKI3	หนองคาย	10-20	9

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดแผล 1-5% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดแผล 6-12% ของพื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดแผล 13-25% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิดแผล 51-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ

ตารางที่ 3.1 เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำการเก็บในระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	จังหวัด	% การระบาด	ความรุนแรง*
15	2547-16	Leaf Blight	UND2	อุดรธานี	20-50	9
16	2547-17	Leaf Blight	UND6	อุดรธานี	20-50	9
17	2547-18	Leaf Blight	UND9	อุดรธานี	20-50	9
18	2547-20	Leaf Blight	KKN1	ขอนแก่น	1-5	5
19	2547-21	Leaf Blight	SKN4_4	สกลนคร	20-50	9
20	2547-22	Leaf Blight	SKN4_6	สกลนคร	20-50	9
21	2547-24	Leaf Blight	ANC2	อำนาจเจริญ	1-5	5
22	2547-25	Leaf Blight	NKP2	นครพนม	1-5	5
23	2547-28	Leaf Blight	MDH3	มุกดาหาร	10-20	7
24	2547-29	Leaf Blight	MDH4	มุกดาหาร	10-20	7
25	2547-30	Leaf Blight	MDH5	มุกดาหาร	10-20	7
26	2547-31	Leaf Blight	MDH6	มุกดาหาร	10-20	7
27	2547-32	Leaf Blight	MDH7	มุกดาหาร	10-20	7
28	2548-01	Kresek	KHA1.1_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	9
29	2548-02	Kresek	KH1.9_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	9
30	2548-03	Kresek	KH2.7_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	9
31	2548-06	Leaf Blight	PB7.3_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
32	2548-10	Leaf Blight	KHK1.1_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
33	2548-11	Leaf Blight	KH3.2_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
34	2548-16	Leaf Blight	SRT1.2_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
35	2548-17	Leaf Blight	SRT7.5_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
36	2548-18	Leaf Blight	SRT6.4_05UBN	อุบลราชธานี	10-20	7
37	2548-27	Leaf Blight	SRN2.5_05	สุรินทร์	1-5	5
38	2548-28	Leaf Blight	SRN1.1_05	สุรินทร์	1-5	5

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดแผล 1-5% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดแผล 6-12% ของพื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดแผล 13-25% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิดแผล 51-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำการเก็บในระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	จังหวัด	% การระบาด	ความรุนแรง*
39	2548-29	Leaf Blight	SRN4.1_05	สุรินทร์	1-5	5
40	2548-37	Leaf Blight	UDN2.3_05	อุดรธานี	10-20	9
41	2548-38	Leaf Blight	UDN6.2_05	อุดรธานี	10-20	9
42	2548-39	Leaf Blight	UDN10.5_05	อุดรธานี	10-20	9
43	2548-42	Leaf Blight	UDN17.5_05	อุดรธานี	10-20	9
44	2548-43	Leaf Blight	UDN18.5_05	อุดรธานี	10-20	9
45	2548-44	Leaf Blight	NKI2.3_05	หนองคาย	20-50	9
46	2548-55	Leaf Blight	SKN3.4_05	สกลนคร	20-50	9
47	2548-57	Leaf Blight	KRS1.4_05	กาฬสินธุ์	1-5	5
48	2548-58	Leaf Blight	KRSKD5_05	กาฬสินธุ์	1-5	5
49	2548-63	Leaf Blight	KRS1.1_05	กาฬสินธุ์	1-5	5
50	2548-65	Leaf Blight	KRS1.2_05	กาฬสินธุ์	1-5	5
51	2548-611	Leaf Blight	SKN1.2_05	สกลนคร	20-50	9
52	2548-636	Leaf Blight	SKN6.2_05	สกลนคร	20-50	9
53	2548-669	Leaf Blight	SKN1.5_05	สกลนคร	20-50	9
54	2549-871	Leaf blight	SRN1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
55	2549-868	Leaf blight	SRN(17)1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
56	2549-820	Leaf blight	SRNRD15_1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
57	2549-877	Leaf blight	SRNRD06_1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
58	2549-865	Leaf blight	SRN(7)1.1_0.6	สุรินทร์	10-20	7
59	2549-874	Leaf blight	SRN4_1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
60	2549-763	Leaf blight	SRNKD1.1_06	สุรินทร์	10-20	7
61	2549-883	Leaf blight	SRN_SKN14_06	สุรินทร์	10-20	7
62	2549-569	Leaf blight	SKNKD1.1_06	สกลนคร	10-20	7

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดแผล 1-5% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดแผล 6-12% ของพื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดแผล 13-25% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิดแผล 51-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ

ตารางที่ 3.1 เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำการเก็บในระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2549 ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ปีที่เก็บ	ลักษณะโรค	รหัส	จังหวัด	% การระบาด	ความรุนแรง*
63	2549-649	Leaf blight	SKNRD10_1.1_06	สกลนคร	10-20	7
64	2549-678	Leaf blight	SKN1.5_06	สกลนคร	10-20	7
65	2549-586	Leaf blight	SKNRD6_3.3_06	สกลนคร	10-20	7
66	2549-249	Leaf blight	KRS1.1_06	กาฬสินธุ์	1-5%	5
67	2549-484	Leaf blight	NKI1.1_06	หนองคาย	1-5%	5
68	2549-399	Leaf blight	UDNRD6_1.1_0.6	อุดรธานี	10-20%	7
69	2549-302	Leaf blight	UDNKD1.4_06	อุดรธานี	10-20%	7
70	2549-895	Leaf blight	URRC1.1_06UBN	อุบลราชธานี	1-5%	5
71	2549-170	Leaf blight	YSTKD1.2_06	ยโสธร	1-5%	5
72	2549-709	Leaf blight	SRTRD15_1.1_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
73	2549-11	Leaf blight	KHRD15_1.1_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
74	2549-11	Leaf blight	KH1.2_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
75	2549-99	Leaf blight	PB1.3_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
76	2549-67	Leaf blight	HDRD6_2.1_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
77	2549-722	Leaf blight	SRTRD15_3.2_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
78	2549-752	Leaf blight	SRT8.2_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
79	2549-138	Leaf blight	PBRD15_15.3_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7
80	2549-40	Leaf blight	KHKD4.1_06UBN	อุบลราชธานี	10-20%	7

* ระดับความรุนแรงของโรคจาก 1 = เกิดแผล 1-5% ของพื้นที่ใบข้าว 3 = เกิดแผล 6-12% ของพื้นที่ใบข้าว 5 = เกิดแผล 13-25% ของพื้นที่ใบข้าว 7 = เกิดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบข้าว 9 = เกิดแผล 51-100% ของพื้นที่ใบข้าว และมีใบแห้งตายทั้งใบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อใช้วิธีการของ Ausubel และคณะ (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลว (*Luria-Bertani* broth) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°ซ จากนั้นดูดสารละลายแบคทีเรียที่โตแล้วมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวออก เติม TE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) ปริมาณ 567 µl 10% SDS ปริมาณ 30 µl และ 20 mg/ml Proteinase K ปริมาณ 3 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เติม 5 M NaCl ปริมาณ 100 µl และ CTAB solution (10% CTAB in 0.7 M Nacl) ปริมาณ 80 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาณ 700 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 700 µl เขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนนำไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanal (-20°ซ) 0.6 เท่าของปริมาณส่วนใสที่ดูดมา พลิกหลอดไปมาให้ผสมกันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อย ๆ เทของเหลวใสออกระวังไม่ให้ตะกอนติดไปด้วยเติม 70% ethanol ปริมาณ 500 µl พลิกหลอดไปมาเบา ๆ 2-3 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งระวังไม่ให้ตะกอนติดไปด้วย ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม TE Buffer ปริมาณ 100 µl เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันเติม RNase (100 mg/ml) ปริมาณ 1 µl เขย่าให้ผสมกันนำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 60 นาที ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 0.7% (w/v) agarose gel ใน 1 x TAE Buffer สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ด้วย RAPD-PCR

ทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท จากไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสประมาณ 10 เบสจำนวน 57 ไพรเมอร์ (Pacific Science Company, LTD., Thailand and Genset Oligos) โดยใช้วิธี PCR ในหลอดขนาด 0.2 ml (PCR microtube) ใช้เครื่อง PTC-100 Peltier Thermal (USA) ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 1x Taq DNA polymerase buffer (Fermentas, USA), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 5 µM primer, 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) และ

ดีเอ็นเอปริมาณ 50 ng ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ใช้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ 94°ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94°ซ 1 นาที 36°ซ 1 นาที 72°ซ 2 นาที จำนวน 40 รอบปฏิกิริยา และ 72°ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2% (w/v) agarose gel ใน 1 x TAE Buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที ในการตรวจสอบใช้ผลผลิต PCR ปริมาณ 5 µl ผสมกับ loading Dye ปริมาณ 1 µl ทำการย่อมด้วย ethidium bromide บันทึกภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง gel documentation analysis set (BIORAD, USA) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับ DNA molecular weight markers, GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

3.4 การวิเคราะห์ด้วย rep-PCR และ IS-PCR

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วน repetitive DNA sequence ของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ REP ERIC และ BOX และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วน insertion sequence IS*1112* ของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แก่ JEL (ตารางที่ 3.2) ได้นำมาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ปฏิกิริยา rep-PCR และ IS-PCR ทำในหลอดขนาด 0.2 ml ใช้เครื่อง PTC-100 Peltier Thermal (USA) ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 1x Taq DNA polymerase buffer (Fermentas, USA), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 25 µM ต่อไพรเมอร์, 1 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA) และ ดีเอ็นเอ ปริมาณ 50 ng ปฏิกิริยาทำการดัดแปลงมาจาก Thwaites และคณะ (1999) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ใช้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ 94°ซ 7 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94°ซ 1 นาที 52, 44, 53 และ 62°ซ 1 นาที สำหรับ ERIC REP BOX และ JEL ไพรเมอร์ ตามลำดับ 65°ซ 8 นาที จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา และ 65°ซ 15 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2% (w/v) agarose gel ใน 1 x TAE Buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที ในการตรวจสอบใช้ผลผลิต PCR ปริมาณ 5 µl ผสมกับ loading Dye ปริมาณ 1 µl ทำการย่อมด้วย ethidium bromide บันทึกภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง gel documentation analysis set (BIORAD, USA) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับ DNA molecular weight markers, GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของ rep-primer sets (REP ERIC และ BOX) และ IS*1112* primer set (JEL)

รหัส	ลำดับเบส	เอกสารอ้างอิง
REP1R-I	5' IIIICGICGICATCIGGC 3'	Louws และคณะ 1994
REP2-I	5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'	
ERIC1R	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 3'	Adhikari และคณะ 1999
ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	
BOXA1R	5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'	Louws และคณะ 1994
BOXB1	5' TTCGTCAGTTCTATCTACAACC 3'	
JEL1	5' CTCAGGTCAGGTCGCC 3'	George และคณะ 1997
JEL2	5' GCTCTACAATCGTCCGC 3'	

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR โดยดูที่ขนาดของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบ ซึ่งเป็นการอ่านผลว่ามีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ (Binary data) จะให้ 1 = มีแถบดีเอ็นเอ และ 0 = ไม่มีแถบดีเอ็นเอ ข้อมูลจะเก็บรวบรวมจากชุดไพรเมอร์ทั้งหมด และทำการวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งในการวิเคราะห์ข้อมูลจะทำการคิดรวมไพรเมอร์ทั้งหมดในการจัดกลุ่ม โดยใช้ SIMQUAL module เป็นการประมวลผลของ coeffieient จากความเหมือนของยีน โดยคำนวณตามแบบของ Dice จัดกลุ่มของดีเอ็นเอโดยอาศัยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม PAST, version 1.13

3.6 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

ทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในแต่ละกลุ่มของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แก่ ไพรเมอร์ SPC_22 จากกลุ่มที่ 1 จำนวน 1แถบ และไพรเมอร์ SPC_30 จากกลุ่มที่ 3 จำนวน 2 แถบมาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยการตัดแถบดีเอ็นเอทำการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Leusden, Netherlands) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาละลายใน TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5 1mM EDTA) ปริมาณ 30 µl นำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแบบทิศทางเดียว โดยหน่วยวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาล

รามาธิบดี ด้วยเครื่องวิเคราะห์ ABI3100 Applied Biosystem ใช้โปรแกรม Chromas version 1.45 ในการอ่านค่าออกมาในรูปแบบของ fluorographs

3.7 ออกแบบโมเลกุลเครื่องหมาย

การออกแบบโมเลกุลเครื่องหมาย ได้มาจากการหา PCR ไพรเมอร์จากลำดับดีเอ็นเอที่ได้จาก 3.6 โดยใช้โปรแกรม Primer3 และส่งไปสังเคราะห์ที่ BSU (Bio Service Unit, Thailand) การทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายจะใช้เทคนิค PCR ทำในหลอดขนาด 0.2 ml (PCR microtube) ใช้เครื่อง PTC-100 Peltier Thermal (USA) ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 1x Taq DNA polymerase buffer (Fermentas, USA), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 µmol ต่อไพรเมอร์, 1 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA) และดีเอ็นเอปริมาณ 50 ng โดยในแต่ละขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ใช้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ 94°ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94°ซ 1 นาที 53°ซ 1 นาที 72°ซ 2 นาที จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา และ 72°ซ 10 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2% (w/v) agarose gel ใน 1 x TAE Buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที ในการตรวจสอบใช้ผลผลิต PCR ปริมาณ 5 µl ผสมกับ loading Dye ปริมาณ 1 µl ทำการย่อมด้วย ethidium bromide บันทึกภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง gel documentation analysis set (BIO RAD, USA) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับ DNA molecular weight markers, GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 57 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์เพียง 11 ไพร์เมอร์เท่านั้น ที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ คิดเป็นจำนวนแถบดีเอ็นเอ 179 แถบ (ตารางที่ 4.1) ไพรเมอร์สำหรับ rep-PCR (3 ชุดไพรเมอร์) และ IS-PCR (1 ชุดไพรเมอร์) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอรวม 79 แถบ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจากไพรเมอร์ทั้งหมด 15 ไพรเมอร์ที่มีขนาดตั้งแต่ 0.2 ถึง 5.5 kb ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 258 แถบ ซึ่งเป็น Polymorphic band ทั้งหมด ไพรเมอร์ SPC_83 ให้จำนวนแถบน้อยที่สุดเท่ากับ 9 แถบ ส่วนไพรเมอร์ SPC_24 ให้จำนวนแถบมากที่สุดเท่ากับ 28 แถบ (ภาพที่ 4.1-4.15)

ตารางที่ 4.1 ลำดับเบสและจำนวนแถบดีเอ็นเอของ RAPD ไพรเมอร์

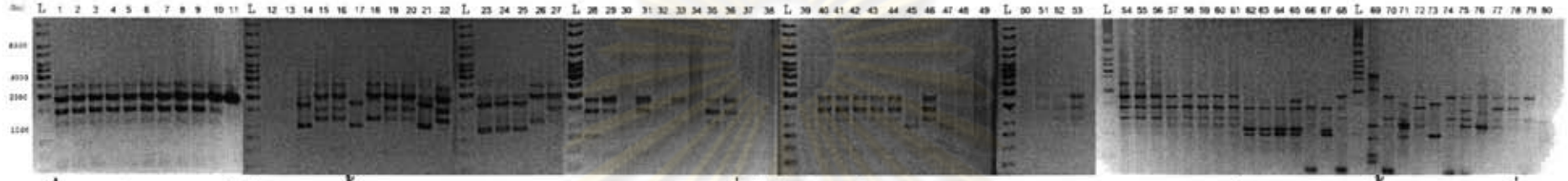
รหัส	ลำดับเบส	จำนวนแถบ DNA
SPC_07	5' GGTGACGCAG 3'	20
SPC_10	5' CTGCTGGGAC 3'	12
SPC_22	5' TGCCGAGCTG 3'	17
SPC_23	5' AGTCAGCCAC 3'	23
SPC_24	5' AATCGGGCTG 3'	28
SPC_29	5' GGGTAACGCC 3'	18
SPC_30	5' GTGATCGCAG 3'	16
SPC_43	5' GTCGCCGTCA 3'	13
SPC_79	5' GTTGCCAGCC 3'	13
SPC_83	5' GAGCCCTCCA 3'	9
SPC_85	5' CTGAGACGGA 3'	10
รวม		179

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

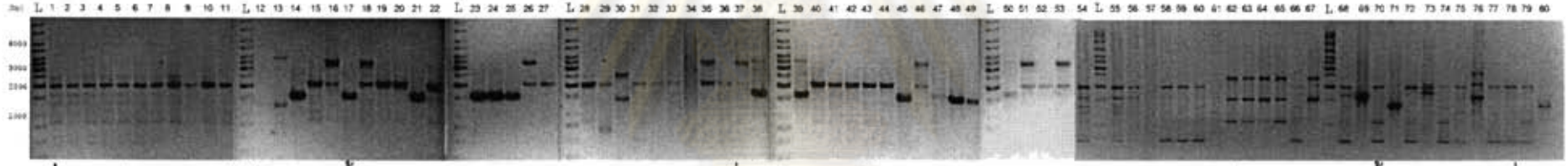
ตารางที่ 4.2 ลำดับเบสและจำนวนแถบดีเอ็นเอของ rep-PCR และ IS-PCR ไพรเมอร์

รหัส	ลำดับเบส	จำนวนแถบดีเอ็นเอ
REP1R_I	5' IIIICGICGICATCIGGC 3'	11
REP2_I	5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'	
ERIC1R	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 3'	25
ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	
JEL1	5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'	23
JEL2	5' TTCGTCAGTTCTATCTACAACC 3'	
BOXA1R	5' CTCAGGTCAGGTCGCC 3'	20
BOXB1	5' GCTCTACAATCGTCCGC 3'	
รวม		79

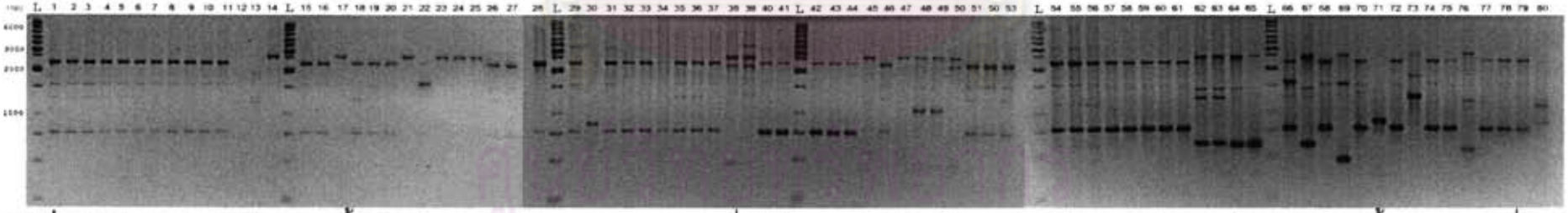
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_07 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

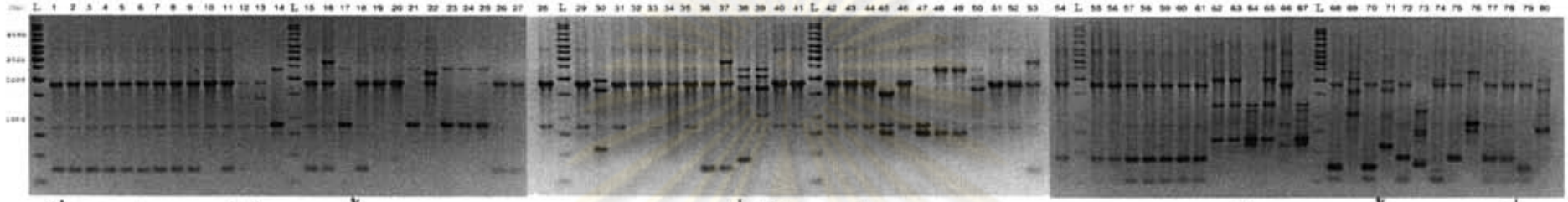


ภาพที่ 4.2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_10 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

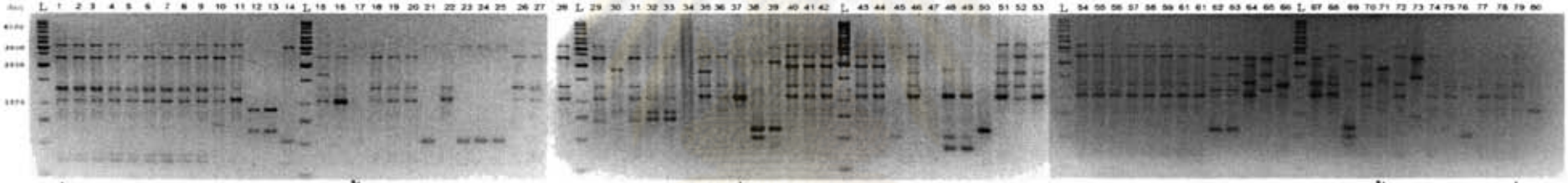


ภาพที่ 4.3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_22 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

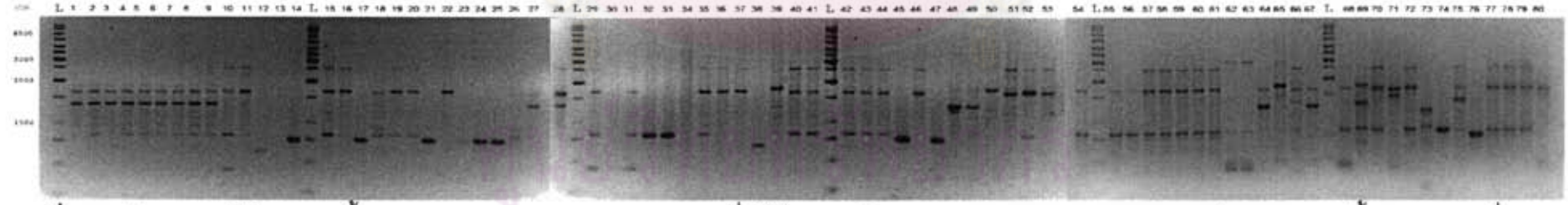
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_23 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

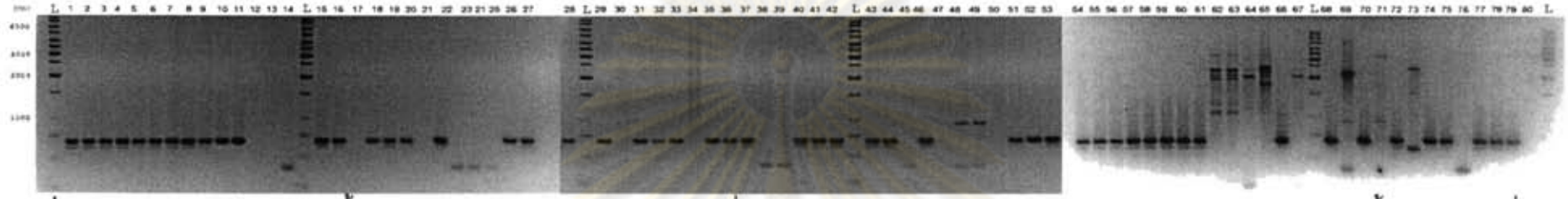


ภาพที่ 4.5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_24 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

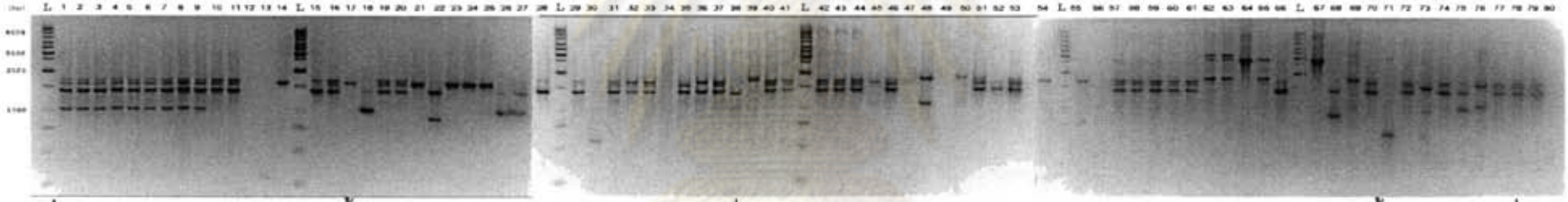


ภาพที่ 4.6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SP_29 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

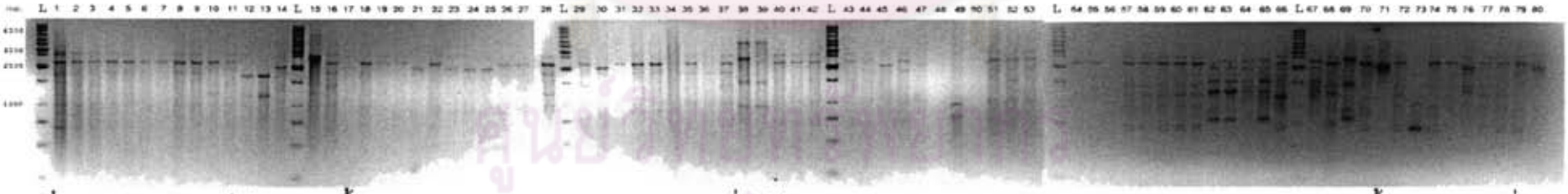
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_30 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

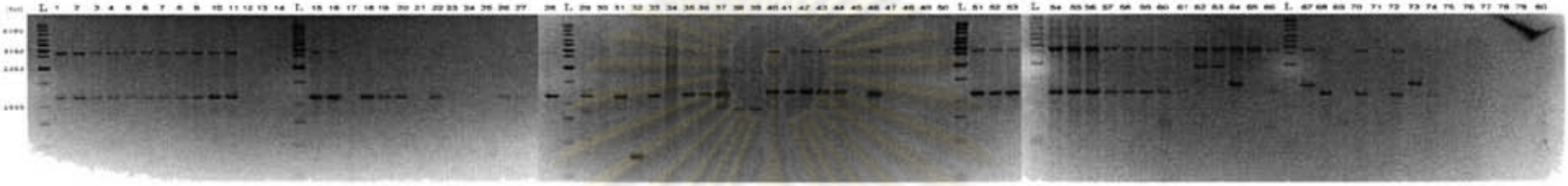


ภาพที่ 4.8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_43 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

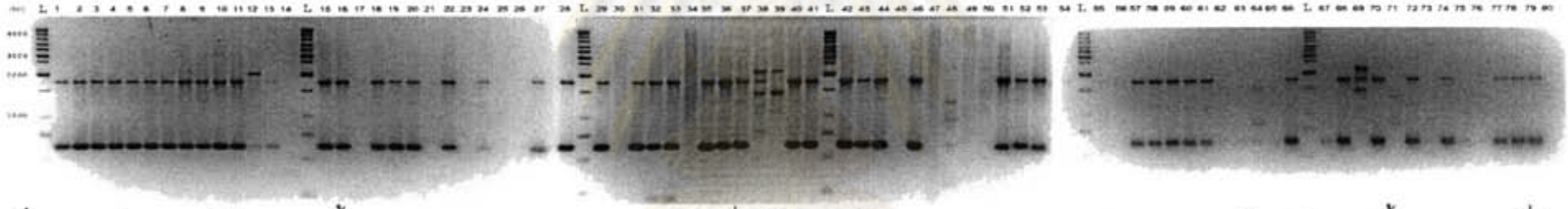


ภาพที่ 4.9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_79 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

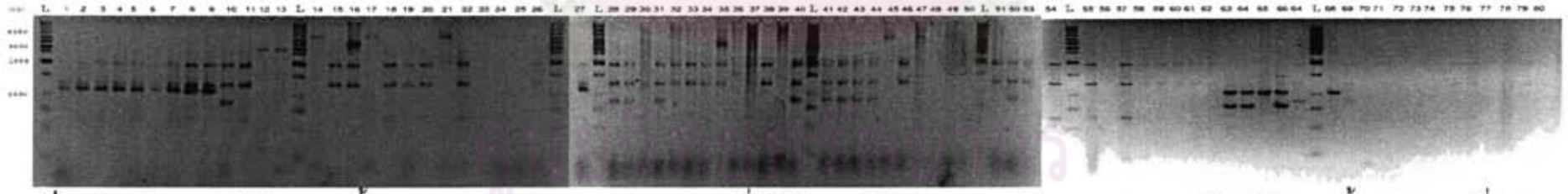
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.10 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_83 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

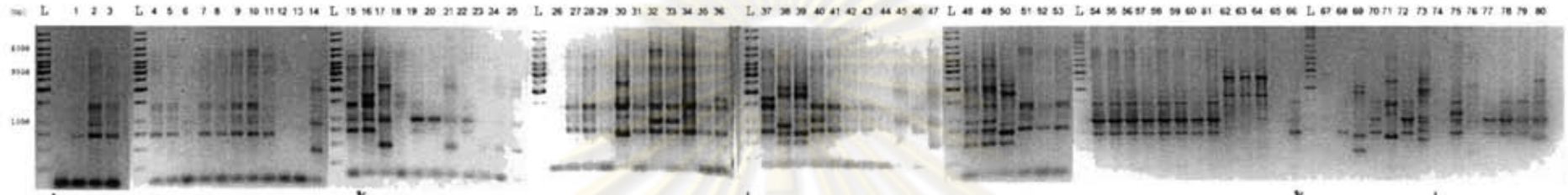


ภาพที่ 4.11 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ SPC_85 แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)



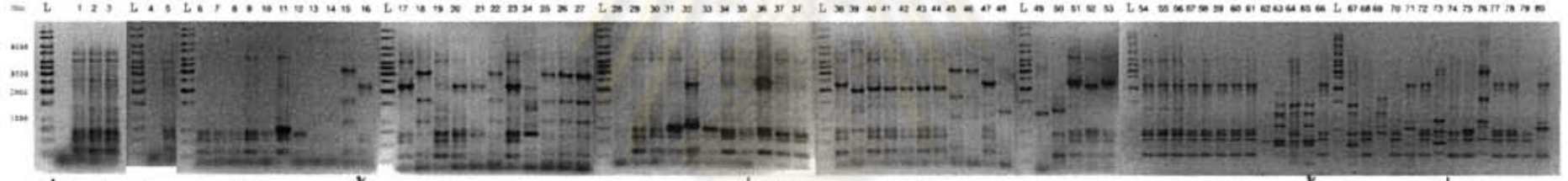
ภาพที่ 4.12 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ REP แถว 1 – 80 แถบ แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



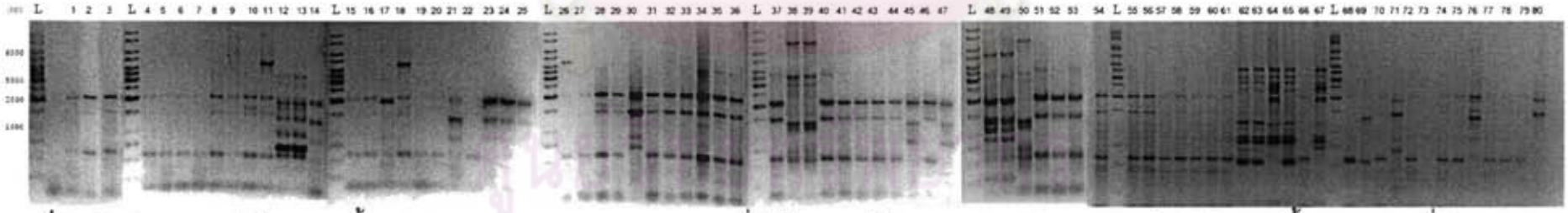
ภาพที่ 4.13 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ BOX แถว 1 – 80 แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1

แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)



ภาพที่ 4.14 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ ERIC แถว 1 – 80 แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1

แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)



ภาพที่ 4.15 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ JEL แถว 1 – 80 แสดงผลผลิต PCR จากเชื้อตามตารางที่ 3.1

แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 **ผลการจัดกลุ่มชนิดของสายพันธุ์เชื้อ** (Cluster analysis)

ในการจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ทำเป็น 3 รูปแบบคือ จัดตามปีที่ทำการเก็บ จัดกลุ่มเชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท มาทำการจัดกลุ่มโดยไม่คำนึงถึงปีและจังหวัดที่ทำการเก็บเชื้อ และจัดตามจังหวัดที่ทำการเก็บเชื้อ

รูปแบบที่ 1 การจัดกลุ่มตามปีที่เก็บเชื้อจากปี 2547 สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้จำนวน 3 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.50 (ภาพที่ 4.16) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 6 ไอโซเลท จาก 4 จังหวัด คือ หนองคาย (NKI3) อำนาจเจริญ (ANC2) มุกดาหาร (MDH3 MDH4 และ MDH5) และ อุบลธานี (UND9)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 19 ไอโซเลท จาก 8 จังหวัด คือ ขอนแก่น (KKN1) มุกดาหาร (MDH6 และ MDH7) นครพนม (NKP2) ร้อยเอ็ด (Roiet2) อุดรธานี (UND2 และ UND3) สกลนคร (SKN4_4 และ SKN4_6) อุบลราชธานี (KHK1-UBN KHK2-UBN KHK3-UBN KHK4-UBN KHK5-UBN KHK6-UBN KHK7-UBN KHK8-UBN และ DC1-UBN) และ สุรินทร์ (SRN4)

กลุ่มที่3 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดหนองคาย (NKI1 and NKI2)

เชื้อจากปี 2548 สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้จำนวน 6 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.50 (ภาพที่ 4.17) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 3 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ สุรินทร์ (SRN2.5_05 และ SRN1.1_05) และ กาฬสินธุ์ (KRS1.4_05)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จาก 1 จังหวัด คือ กาฬสินธุ์ (KRS1.4(K)_05 และ KRS1.1_05)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ กาฬสินธุ์ (KRS1.2_05) และ หนองคาย (NKI2.3_05)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 17 ไอโซเลท จาก 4 จังหวัด คือ อุบลราชธานี (KHA1.1_05UBN KH1.9_05UBN PB1.3_05UBN KHK1.1_05UBN KH3.2_05UBN SRT7.5_05UBN และ SRT6.4_05UBN) อุดรธานี (UDN2.3_05 UDN6.2_05 UDN10.5_05 UDN17.5_05 และ UDN18.5_05) สกลนคร (SKN3.4_05 SKN1.2_05 SKN6.2_05 และ SKN1.5_05) และ สุรินทร์ (SRN4.1_05)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (SRT1.2_05UBN)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (KH2.2_05UBN)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อจากปี 2549 สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้จำนวน 5 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.50 (ภาพที่ 4.18) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (KHRD15_1.1_06UBN)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 5 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ สกลนคร (SKNKD1.1_06 SKNRD10_1.1_06 SKN1.5_06 และ SKNRD6_3.3_06) และ หนองคาย (NKI1.1_06)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 19 ไอโซเลท จาก 5 จังหวัด คือ ยโสธร (YSTKD1.2_06) อุบลราชธานี (URRC1.1_06UBN SRTRD15_1.1_06UBN KH1.2_06UBN PB1.3_06UBN SRTRD15_3.2_06UBN SRT8.2_06UBN PBRD15_15.3_06UBN และ KHKD4.1_06UBN) กาฬสินธุ์ (KRS1.1_06) อุดรธานี (UDNRD6_1.1_0.6) และ สุรินทร์ (SRN1.1_06 SRN(17)1.1_06 SRNRD15_1.1_06 SRNRD6_1.1_06 SRN(7)1.1_0.6 SRN4_1.1_06 SRNKD1.1_06 และ SRN_SKN14_06)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี (UDNKD1.4_06)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี (HDRD6_2.1_06UBN)

รูปแบบที่ 2 นำเชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท มาทำการจัดกลุ่มรวมสามารถแบ่งออกได้เป็น 13 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.50 (ภาพที่ 4.19) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 5 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ สกลนคร หนองคาย

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 53 ไอโซเลท จาก 10 จังหวัด คือ อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด สุรินทร์ หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น สกลนคร นครพนม มุกดาหาร และ กาฬสินธุ์

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ ยโสธร และ อุบลราชธานี

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดหนองคาย

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อ 6 ไอโซเลท จาก 4 จังหวัด คือ หนองคาย อำนาจเจริญ มุกดาหาร และ อุดรธานี

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ หนองคาย และ กาฬสินธุ์

กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยเชื้อ 3 ไอโซเลท จาก 2 จังหวัด คือ สุรินทร์ และ กาฬสินธุ์

กลุ่มที่ 12 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดกาฬสินธุ์

กลุ่มที่ 13 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดอุดรธานี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

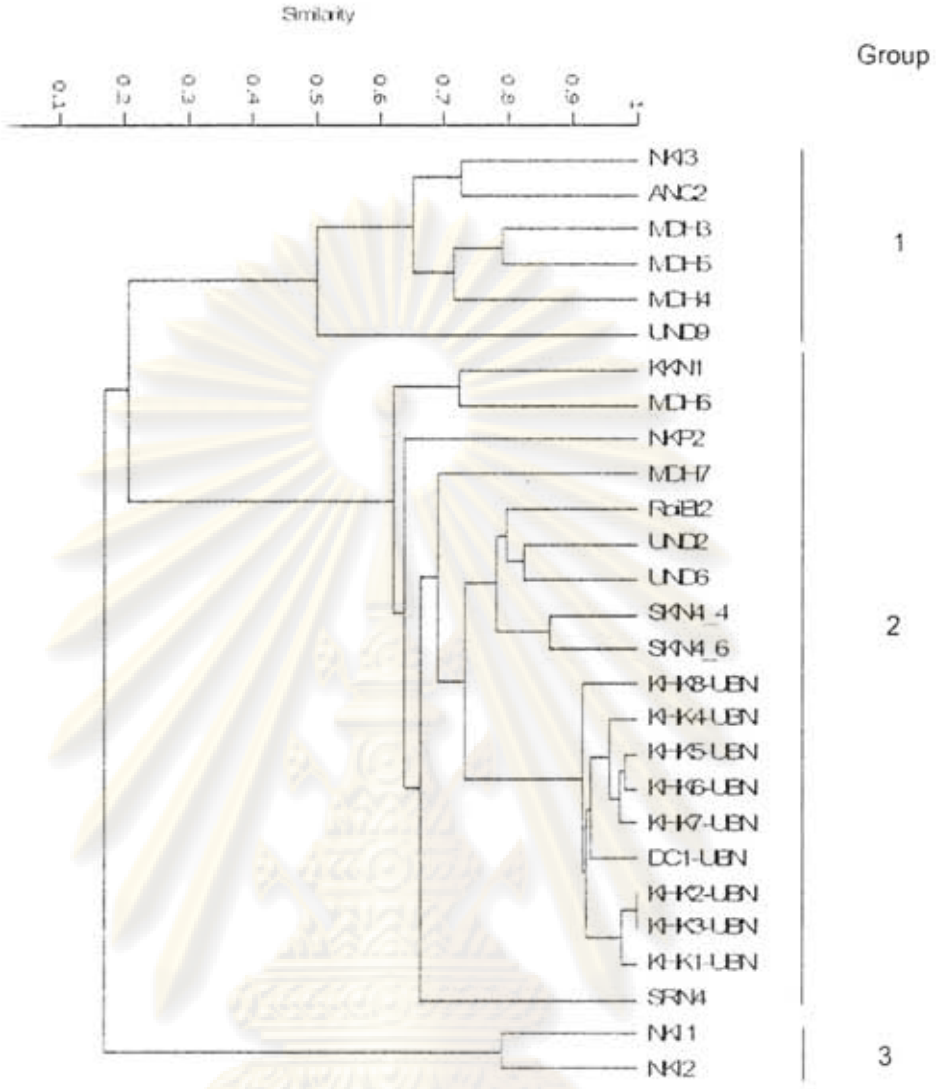
รูปแบบที่ 3 การจัดกลุ่มกลุ่มเชื้อโดยยึดแหล่งที่เก็บตัวอย่างเชื้อมาเป็นหลัก โดยได้ทำการเลือก 2 จังหวัด ที่มีตัวอย่างเชื้อจำนวนมากมาทำการจัดกลุ่มคือ จังหวัดอุบลราชธานี จากเชื้อ 28 ไอโซเลท สามารถนำมาจัดเป็นกลุ่ม ๆ ได้ 8 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.70 (ภาพที่ 4.20) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2549
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2549
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2548
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2548
กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ 7 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2549
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อ 7 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2548
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อ 9 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2547
กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2549

จังหวัดสุรินทร์มีเชื้อ 12 ไอโซเลท สามารถแยกได้ 4 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน 0.70 (ภาพที่ 4.21) ได้แก่

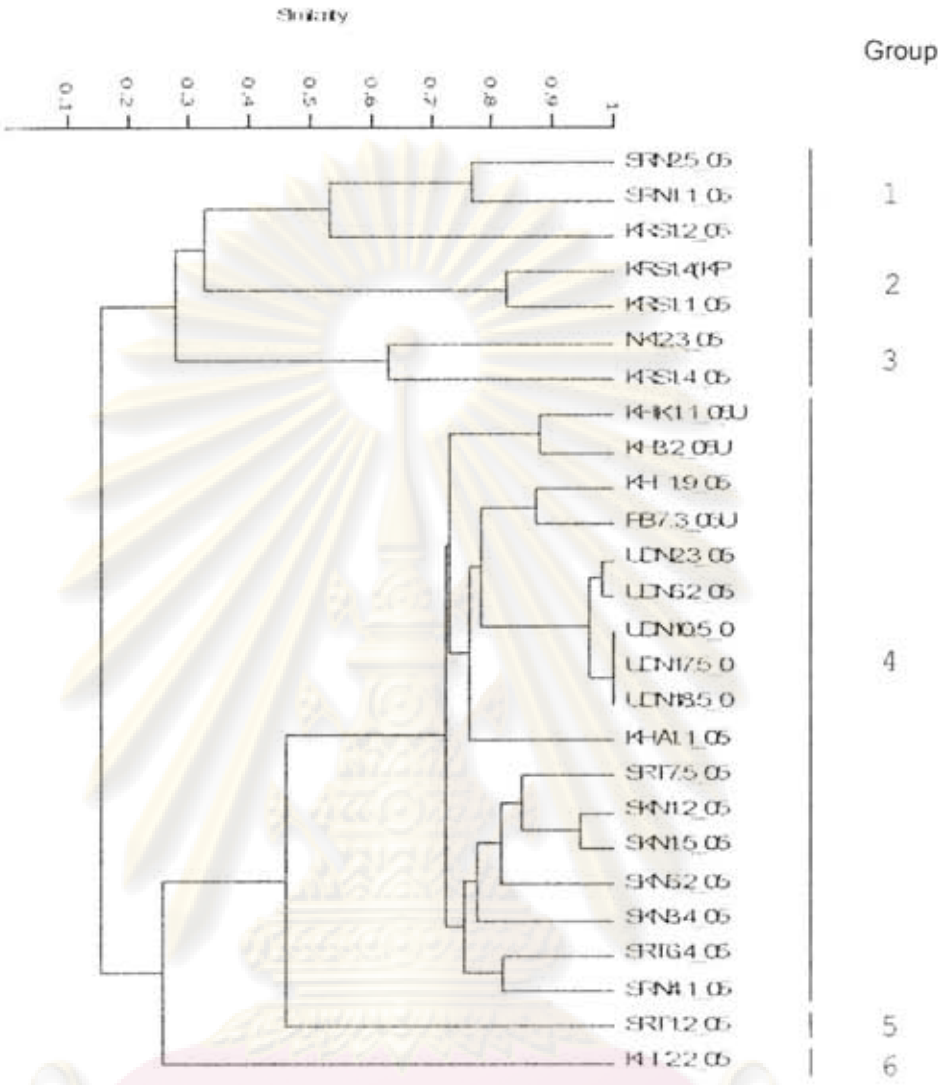
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2548
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2548
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 8 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2549
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลท ที่มาจากปี 2547

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



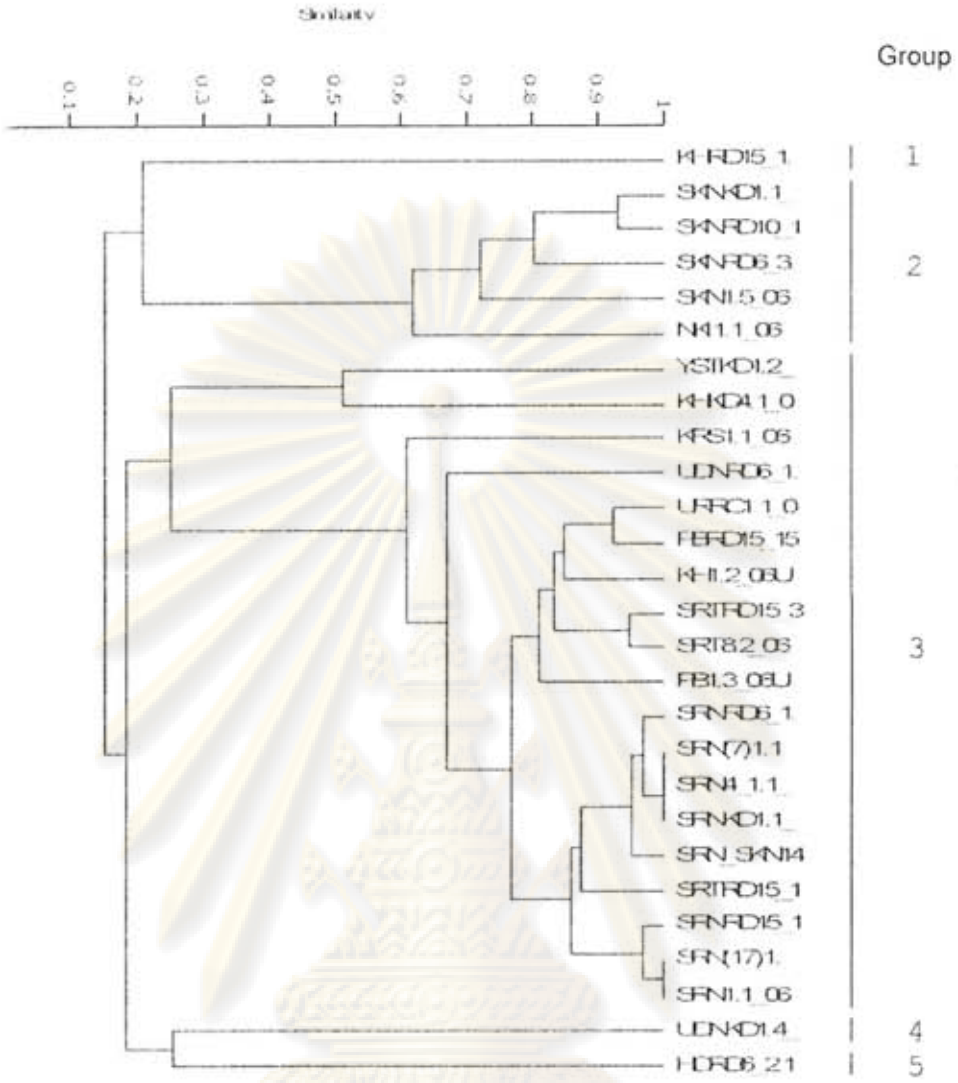
ภาพที่ 4.16 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี 2547 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



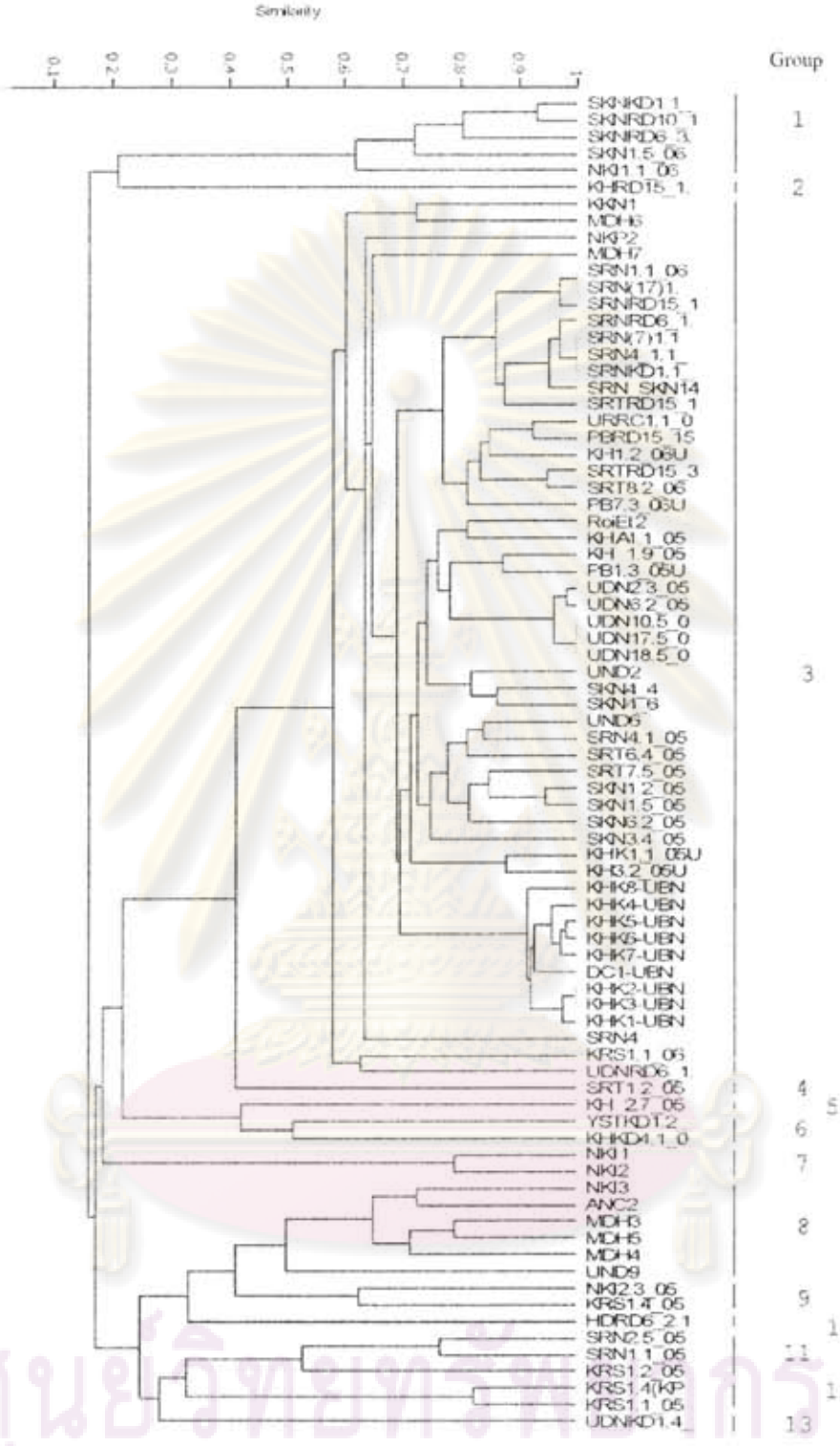
ภาพที่ 4.17 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 26 ไอโซเลท จากปี 2548 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



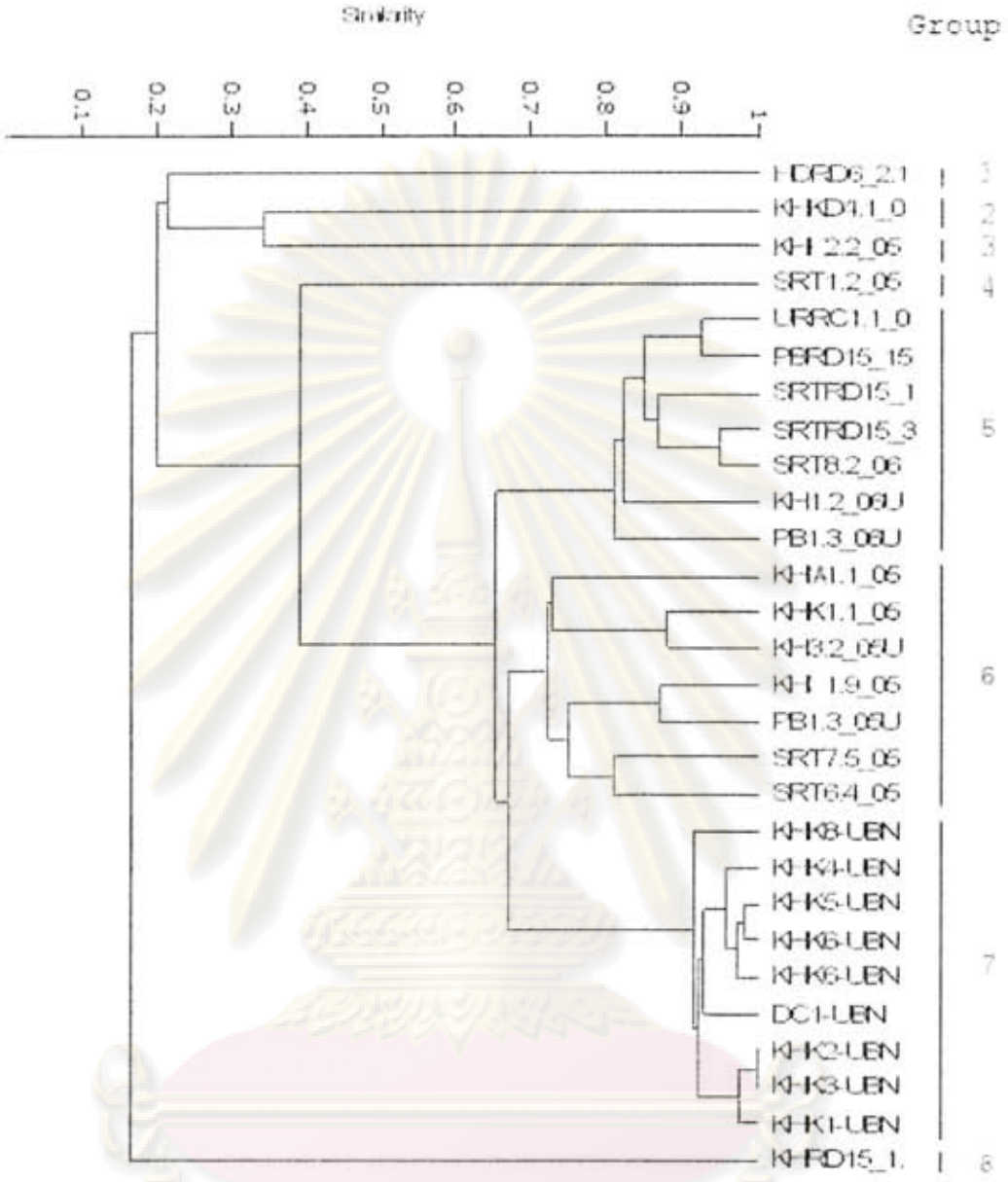
ภาพที่ 4.18 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 27 ไอโซเลท จากปี 2549 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



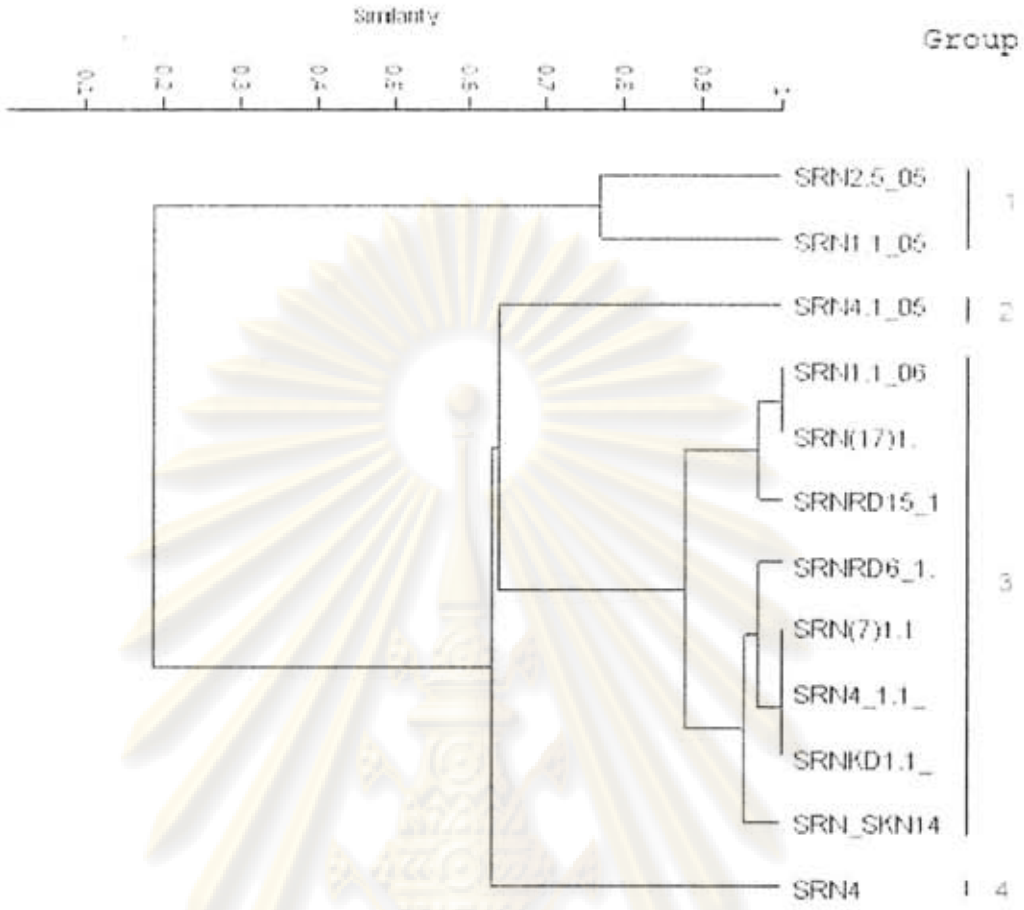
ภาพที่ 4.19 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลท ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.20 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 28 ไอโซเลท ที่เก็บมาจากจังหวัดอุบลราชธานีระหว่างปี พ.ศ. 2547 ถึง 2549 ที่จัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.21 เดนโดแกรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 12 ไอโซเลท ที่เก็บมาจากจังหวัดสุรินทร์ระหว่างปี พ.ศ. 2547 ถึง 2549 ที่จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลจากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 โมเลกุลเครื่องหมาย

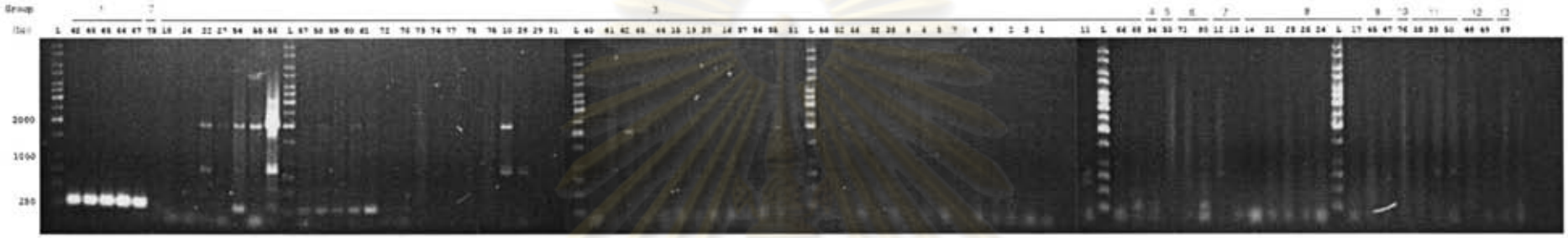
ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR rep-PCR และ IS-PCR และใช้กลุ่มของเชื้อที่ได้จากเดนโดแกรมภาพที่ 4.19 มาหาแถบดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงในกลุ่มพบว่า ไพรเมอร์ SPC_22 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 590 bp จากเชื้อ SKNRD10_1.1_06 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่จัดอยู่ในเชื้อกลุ่มที่ 1 และไพรเมอร์ SPC_30 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 bp ที่มีความจำเพาะกับเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งในไพรเมอร์ SPC_30 ได้ทำการเลือกแถบดีเอ็นเอมาจากเชื้อ 2 ไอโซเลทในเชื้อกลุ่มที่ 3 คือ SRN4 และ UDN18.5_05 เพื่อนำมาเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่าส่วนของดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสเหมือนกัน เมื่อนำลำดับเบสทั้งหมดไปตรวจสอบกับฐานข้อมูล (NCBI) พบว่าลำดับเบสที่ได้จากไพรเมอร์ SPC_22 มีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ค่า E value 3×10^{-23} และลำดับเบสที่ได้จากไพรเมอร์ SPC_30 พบว่ามีความเหมือนกับ *Enterobacter sakazakii* ที่ค่า E value 10^{-90} เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ไพรเมอร์ ไปทำการสร้างชุดไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 ได้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด คือไพรเมอร์ MG1 ให้ผลผลิต PCR ขนาด 277 bp สำหรับกลุ่มที่ 1 และไพรเมอร์ MG2 ให้ผลผลิต PCR ขนาด 278 bp สำหรับกลุ่มที่ 2 (ตารางที่ 4.3)

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด MG1 และ MG2 กับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 80 ไอโซเลท พบว่ามีเพียงแค่ MG1 ที่สามารถให้ผลผลิตขนาด 277 bp กับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในกลุ่มที่ 1 ไพรเมอร์สามารถให้ผลผลิตในกลุ่มอื่นแต่ขนาดของผลผลิตต่างออกไป (ภาพที่ 4.22) เชื้อจากกลุ่ม 3 บางไอโซเลทสามารถให้ผลผลิตได้แต่ขนาดแถบดีเอ็นเอต่างกัน ในส่วนของ MG2 นอกจากกลุ่มเชื้อในกลุ่มที่ 3 แล้ว กลุ่มที่ 4 ถึง 13 ก็สามารถพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 278 bp ด้วยจึงไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในกลุ่มที่ 3 ได้ (ภาพที่ 4.23)

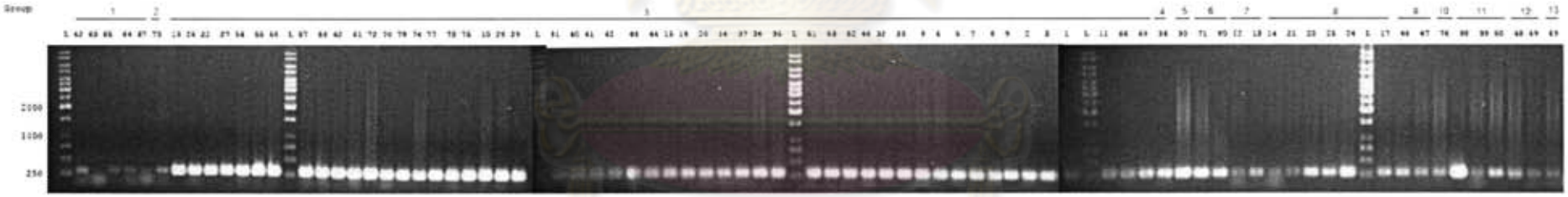
ตารางที่ 4.3 ลำดับเบสของชุดโมเลกุลเครื่องหมาย

รหัส	ลำดับเบส	ขนาดแถบ DNA (bp)
MG1_F	5' GTACATGCACGCCTAACGAG 3'	277
MG1_R	5' GCTGGCAATCAATGAACCG 3'	
MG2_F	5' GACCTATATCCACAACGAAG 3'	278
MG2_R	5' CGTGTTTCAAGGCTCAATAC 3'	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุด MG1 โดยแบ่งเชื้อตามกลุ่มที่ได้จากเดนโดแกรมภาพที่ 4.19 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)



ภาพที่ 4.23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุด MG2 โดยแบ่งเชื้อตามกลุ่มที่ได้จากเดนโดแกรมภาพที่ 4.19 แถว L คือ GeneRuler™ 1kb ladder (Fermentas, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การกระจายตัวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยวิธี PCR-based ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทำให้ทราบถึงการกระจายตัวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการศึกษาเชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัด ที่ทำการเก็บในระยะเวลา 3 ปี (2547 2548 และ 2549) เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์และจัดกลุ่มสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 13 กลุ่ม โดยจะประกอบด้วย 1 กลุ่มใหญ่ และ 12 กลุ่มย่อย ในกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 3 (ภาพที่4.19) จะประกอบด้วยเชื้อที่มาจากหลาย ๆ จังหวัดจำนวนไอโซเลทคิดเป็น 79% ของตัวอย่างเชื้อที่เก็บมาทั้งหมด ซึ่งเชื้อที่ทำการศึกษามีการกระจายตัวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ตอนกลาง และตอนล่าง เชื้อที่เก็บมาจากจังหวัดเดียวกัน และปีเดียวกันจะมีความใกล้เคียงกันเมื่อทำการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ส่วนในอีก 12 กลุ่มย่อย ที่เหลือก็มีการกระจายตัวของเชื้อ โดยที่เชื้ออยู่ในกลุ่มย่อยทั้ง 12 กลุ่ม ก็เป็นเชื้อที่มาจากหลาย ๆ จังหวัด หรือในบางกลุ่มก็จะมาจากจังหวัดเดียวกัน หรือมีเพียงแค่ 1 ไอโซเลทเท่านั้น จากผลการจัดกลุ่มจะเห็นได้ว่าเชื้อมีการกระจายตัวไปทุก ๆ ส่วนในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย อาจมีผลมาจากธรรมชาติของเชื้อตัวนี้สามารถแฝงอยู่ในเมล็ดพันธุ์ได้ (Sakthivel และคณะ, 2001) ฉะนั้นถ้าหากว่าเมล็ดพันธุ์ที่เกษตรกรซื้อจากทางส่วนกลางเป็นแหล่งเดียวกันมีการติดเชื้อ เมื่อเกษตรกรนำไปปลูกจึงทำให้เชื้อมีการกระจายตัวไปทุก ๆ ส่วนของเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kosawang และคณะ (2006) George และคณะ (1997) และ Yashitola และคณะ (1997) อีกสาเหตุหนึ่งในการกระจายตัวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* คือ ความสามารถในการแพร่กระจายตามธรรมชาติของเชื้อตัวนี้ซึ่งจะแพร่กระจายไปตามน้ำ ฉะนั้นถ้าเกิดน้ำท่วมหรือฝนตกหนักก็จะทำให้เชื้อตัวนี้แพร่กระจายได้ในวงกว้าง (Yashitola, 2000)

จากการจัดกลุ่มเชื้อโดยยึดปีที่เก็บเชื้อเป็นหลัก ทั้ง 3 ปี คือ 2547 2548 และ 2549 พบว่าสายพันธุ์เชื้อที่อยู่ในกลุ่มใหญ่ ๆ ในของแต่ละปีจะเป็นสายพันธุ์เชื้อที่มีการระบาดรุนแรงอยู่ในระดับสูง คือ ระดับ 7 และ 9 (ตารางที่ 1.7) ซึ่งจากความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อเป็นผลทำให้มีการระบาดมาก จึงเป็นผลให้มีการกระจายตัวของเชื้อเป็นวงกว้างตามไปด้วย และการปลูกข้าวพันธุ์เดียวกันเป็นพื้นที่ขนาดใหญ่และมีระยะเวลานานส่งผลต่อความรุนแรงของโรคได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ** *X. oryzae* pv. *oryzae*

จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลในหลายประเทศพบว่า เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก (Yashitola และคณะ, 1997; Ochiai และคณะ, 2000; Adhikari และคณะ, 1999; และ Leach และคณะ, 1992) จากการศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR-based สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้ถึง 13 กลุ่ม (ภาพที่ 4.19) แสดงว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากเช่นกัน การศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากจังหวัดเดียวกันแต่ว่าเก็บมาจากคนละปี จะสังเกตได้ว่ามีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแต่ว่าจะมีแถบดีเอ็นเอประมาณ 1-2 แถบของแต่ละไพรเมอร์ ที่จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละปีหรือในปีเดียวกันเองก็จะมีบ้างที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันออกไป เช่น ในจังหวัดอุบลราชธานีเมื่อทำการสังเกตแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 3 ปี ก็จะพบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำมาจัดเป็นกลุ่มก็สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ถึง 8 กลุ่มด้วยกัน โดยในแต่ละกลุ่มก็จะเป็นเชื้อที่เก็บในปีเดียวกัน แต่เชื้อส่วนใหญ่จะเกาะกลุ่มกันอยู่ในส่วนของกลุ่มที่ 5 6 และ 7 ซึ่งเป็นเชื้อที่มาจากปี 2549 2548 และ 2547 ตามลำดับ และในจังหวัดสุรินทร์ที่นำเชื้อทั้ง 3 ปีมาจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 4 กลุ่มก็ได้ผลเช่นเดียวกับในจังหวัดอุบลราชธานี คือในแต่ละกลุ่มจะเป็นเชื้อที่เก็บในปีเดียวเท่านั้น แสดงว่าเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลง เนื่องมาจากในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการทำนาข้าวแบบการปลูกซ้ำที่เดิมเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมของเชื้อและเชื้ออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ตามสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป

ถ้ามาดูตามปีที่ทำการเก็บเชื้อเป็นหลักในส่วนของปี 2547 จังหวัดที่เมื่อทำการจัดกลุ่มเชื้อแล้วมีความหลากหลายของรูปแบบดีเอ็นเอ สามารถจัดให้อยู่ในหลายกลุ่มมีอยู่ 3 จังหวัด คือ หนองคาย จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 3 มุกดาหารและอุดรธานี จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ในส่วนของปี 2548 สามารถแบ่งเชื้อออกเป็นได้ 6 กลุ่ม เชื้อที่ทำการเก็บมาจากจังหวัดสุรินทร์ กาฬสินธุ์ และอุบลราชธานี มีการกระจายตัวของเชื้อไปในหลาย ๆ กลุ่ม ส่วนในปี 2549 สามารถแบ่งเชื้อออกเป็นได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม มีเพียงเชื้อจากจังหวัด อุบลราชธานีและอุดรธานีที่มีเชื้อไปอยู่ในหลาย ๆ กลุ่ม การที่เชื้อแยกไปอยู่ในหลาย ๆ กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่มาจากจังหวัดดังกล่าวในปีนั้น ๆ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อดูจากผลการจัดกลุ่มของเชื้อทั้ง 80 ไอโซเลท ไม่ว่าจะเป็นจะแบ่งแยกตามปี หรือการจัดเชื้อทั้งหมด หรือจะแบ่งแยกตามจังหวัด จะเห็นได้ว่าเชื้อที่มาจากจังหวัดเดียวกันได้มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันไป แสดงให้เห็นถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับเชื้อตัวนี้ ซึ่งอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมภูมิประเทศหรือสภาพดินฟ้า

อากาศที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ซึ่งตรงกับผลงานวิจัยที่เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แก่ Yashitola และคณะ (1997) ในประเทศอินเดีย Ochiai และคณะ (2000) ในประเทศศรีลังกา และ Adhikari และคณะ (1999) ในประเทศเนปาล อีกสาเหตุคืออาจมาจากการที่เกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูวัชพืชหรือพืชรวมไปถึงการใช้พื้นที่นาเพื่อทำการเกษตรโดยไม่มีการพักแปลงนา ก็เป็นปัจจัยที่จะส่งผลให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมได้ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นในเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาลำดับเบสของจีโนม (genome sequence) ทั้งหมดของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lee และคณะ 2005) พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในจีโนมได้ (transposable element) เป็นจำนวนมาก เช่น IS*1112* IS*1113* และ IS*1114* ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในจีโนม และการแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ

การปลูกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ อาจมีผลต่อความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จะเห็นได้ว่าเชื้อจากจังหวัดสุรินทร์ในปี 2548 สามารถจัดกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม เชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 ทำให้เกิดโรคในบริเวณที่ปลูกข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) แต่เชื้อในกลุ่มที่ 4 ทำให้เกิดโรคในบริเวณที่ปลูกข้าวสายพันธุ์ กข6 (RD6) (เดนโดแกรมภาพที่ 4.17) ซึ่งข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่ได้จากการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในพันธุ์ข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 โดยการนำเอาเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไปอาบรังสีแกมม่าขนาด 20 กิโลแรด (กรมวิชาการเกษตร, 2550) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของข้าวอาจจะมีผลต่อวิวัฒนาการของเชื้อเพื่อที่จะเข้าทำลายข้าวได้ (Mew และคณะ 1992)

5.3 เปรียบเทียบการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อโดยลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics analsis) กับการเข้าทำลายของเชื้อต่อยีนต้านทานในข้าว (Pathotypic analysis)

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่ทำการเก็บในปี 2547 โดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยการทำ RAPD rep-PCR และ IS-PCR และการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อในข้าวที่มียีนต้านทานต่างกันไป ในระยะแตกกอ พบว่าไอโซเลทจากจังหวัด อุบลราชธานี สุรินทร์ มุกดาหาร อุดรธานี จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันไม่ว่าจะเป็นการจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมหรือความสามารถในการเข้าทำลายข้าว (ภาคผนวก) ส่วนเชื้อไอโซเลทจากจังหวัดนครพนม และหนองคาย พบว่าการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ฉะนั้นการใช้ลักษณะทาง

พันธุกรรมสามารถแยกเชื้อออกเป็นสายพันธุ์เชื้อได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งยังไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการจัดทำสายพันธุ์เชื้อโดยวิธีตามลักษณะทางพันธุกรรมเพียงวิธีเดียว ส่วนการทดสอบสายพันธุ์เชื้อของเชื้อที่เก็บในปี 2548 และ 2549 ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปผลการเปรียบเทียบได้ในการศึกษาครั้งนี้

5.4 การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับ *X. oryzae* pv. *oryzae*

จากไพรเมอร์ทั้งหมด 15 ไพรเมอร์ ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยวิธี PCR-based ไพรเมอร์ SPC_22 และ SPC_30 ถูกเลือกมาใช้ในการออกแบบโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดย SPC_22 ใช้เป็นตัวแทนในการออกแบบโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในกลุ่มที่ 1 และ SPC_30 สำหรับกลุ่มที่ 3 ภาพที่ 4.19) โดยทำการเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มที่ต้องการ และมีขนาดประมาณ 650 bp มาหาลำดับเบสเพื่อที่จะนำมาเป็นข้อมูลในการออกแบบหรือพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย จากผลการหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอที่ทำการคัดเลือกแล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าไม่ตรงกับส่วนของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ไปตรงกับลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีส่วนของลำดับเบสที่เหมือนกันหรือส่วนของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษายังไม่มีในฐานข้อมูล

MG1 และ MG2 เป็นชุดไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโมเลกุลเครื่องหมาย โดย MG1 จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อในกลุ่มที่ 1 และ MG2 จะใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อในกลุ่มที่ 3 แต่จากการทดสอบพบว่ามีเพียงแค่ MG1 เท่านั้นที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้เพราะเมื่อนำไปทำการทดสอบกับเชื้อทั้ง 80 ไอโซเลท ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเพียงแค่เชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 เท่านั้นที่มีแถบดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการปรากฏขึ้นมาชัดเจน ส่วนในอีก 12 กลุ่มที่เหลือคือ 2 ถึง 13 นั้น จะมีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นมาเพียงไม่กี่ไอโซเลทและไม่ค่อยชัดเจนเท่ากับที่ปรากฏในกลุ่มที่ 1 และแถบดีเอ็นเอบางแถบที่ปรากฏก็มีขนาดที่ไม่เท่ากับที่ต้องการ ในส่วนของ MG2 ที่ใช้สำหรับทดสอบเชื้อในกลุ่มที่ 3 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นมาชัดเจนในทุกกลุ่ม และปรากฏขึ้นมาไม่ชัดเจนในเชื้อกลุ่มที่ 1 เมื่อเทียบกับที่ปรากฏในเชื้อในอีก 12 กลุ่ม จากการที่คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในแต่ละกลุ่มมาทำการออกแบบโมเลกุลเครื่องหมาย แต่เมื่อนำมาใช้จริงกลับพบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อกลุ่มอื่นได้ ซึ่งเราไม่ทราบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในกลุ่มอื่นเป็นแถบดีเอ็นเอเดียวกับที่ปรากฏในกลุ่มที่ 3 หรือไม่ อาจเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับเบสที่ต่างกัน ซึ่งอาจใช้เทคนิค SSCP (Single-Strand Conformation

Polymorphism) ช่วยในการบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มได้ว่าเหมือนหรือต่างกันอย่างไร

ดังนั้นไพรเมอร์ชุด MG1 สามารถนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 ได้ แต่ยังไม่สามารถระบุถึงกลุ่มของสายพันธุ์เชื้อ เนื่องจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่เก็บในปี 2549 ซึ่งข้อมูลทางด้านการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อในข้าวสายพันธุ์ NILs เพื่อแบ่งกลุ่มสายพันธุ์เชื้อยังไม่ดำเนินการ

จากผลการศึกษาเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลวิธี PCR-based ทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อและการกระจายตัวของเชื้อ และได้ชุดไพรเมอร์ MG1 ที่สามารถระบุกลุ่มเชื้อได้ ซึ่งทั้งหมดนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒณาข้าวสายพันธุ์ต้านทานและวิธีความคุมป้องกันโรคขอบใบแห้งในข้าวต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. **การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae***

จากการศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งหมด 80 ไอโซเลท จาก 12 จังหวัด ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยวิธี PCR-based แล้วนำผลที่ได้มาจัดกลุ่มสามารถแยกจัดกลุ่มสายพันธุ์ชื้อได้ 3 รูปแบบ คือ จัดกลุ่มของเชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท แบ่งเชื้อได้เป็น 13 กลุ่ม เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยยึดปีที่เก็บเชื้อเป็นหลัก เชื้อจากปี 2547 จำนวน 27 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม จากปี 2548 จำนวน 26 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 6 กลุ่ม และจากปี 2549 จำนวน 27 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 5 กลุ่ม ถ้านำมาจัดกลุ่มโดยยึดจังหวัดที่เก็บเป็นหลัก เชื้อจากจังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 28 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 8 กลุ่ม ส่วนเชื้อที่เก็บมาจากจังหวัดสุรินทร์จำนวน 12 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 4 กลุ่ม

2. **การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย**

ในส่วนของการทำโมเลกุลเครื่องหมายในการตรวจสอบเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด คือ MG1 และ MG2 เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 80 ไอโซเลทมีเพียงแค่ MG1 เท่านั้นที่มีความจำเพาะกับเชื้อในกลุ่มที่ 1 แต่ก็ไม่สามารถบอกถึงกลุ่มของ สายพันธุ์เชื้อได้เนื่องจากไม่มีของมูลชนิดสายพันธุ์เชื้อในเชื้อในกลุ่มที่ 1 (ปี 2549) ส่วน MG2 ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อในกลุ่มที่ 3

3. **เปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อที่ได้จากการทดสอบการเกิดโรคกับสายพันธุ์เชื้อที่ได้มาจากวิธีพันธุศาสตร์โมเลกุล**

เมื่อนำผลการจัดกลุ่มสายพันเชื้อที่เก็บจากปี พ.ศ. 2547 ทั้ง 2 วิธี มาเปรียบเทียบพบเชื้อจาก 4 จังหวัด คือ อุบลราชธานี สุรินทร์ มุกดาหาร อุดรธานี จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้ง 2 วิธี ส่วนที่มาจากจังหวัดอื่นไม่พบความสัมพันธ์

จากข้อมูลการแบ่งกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 80 ไอโซเลท โดยวิธี PCR-base พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งยังไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุสายพันธุ์เชื้อได้ อาจต้องใช้ยีนที่เฉพาะเจาะจงอื่น ๆ เช่น ยีน avirulence มาช่วยในการคัดกรองสายพันธุ์เชื้อต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2550. พันธุ์ [online]. Available from: http://www.doa.go.th/pl_data/RICE/3var/var01.html [2007, Sep 15].

กรมการข้าวและกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. โรคขอบใบแห้ง (Bacterial Leaf Blight or Bacterial Blight)[online]. Available from: http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_newDisease009.html [2007, Sep 15].

พยอม ศรีจำปา, สมาน คำมาม, ธวัทชัย พรหมรักษา, จิรพงศ์ ใจรินทร์, และกิจติพงษ์ เพ็งรัตน์. 2541. ผลการสำรวจและประเมินผลโรคแมลงและสัตว์ศัตรูข้าวในสภาพแปลงนาข้าวน้ำฝนเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ประเทศไทย. รายงานผลการสำรวจโรค แมลง และสัตว์ศัตรูข้าวในนาน้ำฝน กันยายน 2540. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 9 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ข้าวรวมทั้งหมด : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน [online]. Available from: http://www.oae.go.th/statistic/export/1301RI.xls [2007, Sep 10].

Adhikari, T.B., Cruz, V.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.

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.

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

Grist, D.H. 1986. Rice. 6th ed. New York: Longman.

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.

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., Cruz, V.C. M., White, F.F., Mew, T.W., and Leung, H. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Applied and Environmental Microbiology 58: 2188-2195.

Lee, B. M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, K.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 o of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Research 33: 577-536

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., and De Brujin, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60: 2286-2295.

McDonald, J.G., and Wong, E. 2001. Use of a monoclonal antibody and genomic fingerprinting by repetitive-sequence-based polymerase chain reaction to identify *Xanthomonas populi* pathovars. Plant Pathology 23: 41-51.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Mew, T.W. 1987. Current status and future propects of research on bacterial blight of rice. Annual review in Plant Pathology 25: 359-382.

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

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

Nino-Liu, O.D., Ronald, C.P., and Bogdanove, J.A. 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* strains from Sri Lanka. Plant Pathology 90: 415-421.

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

Sakthivel, N., Mortensen, C.N., and Mathur, S.B. 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. Applied Microbiology and Biotechnology 56:435–441.

Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S., and Seal, S. 1999. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. Plant Pathology 48:121-128.

Vanichanont, P. 2004. Thai rice : sustainable life for rice growers. FAO rice conference 04: 1-7.

Webster, R.K., and Gunnell, P.S. 1994. Compendium of rice diseases. The American phytopathological society. St. Paul, Minnesota.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

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. Plant Pathology 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เดนโดแกรมและตารางผลการจำแนกสายพันธุ์

ตารางที่ ก.1 ผลการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ (Pathotype/Race) ของเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคขอบใบแห้ง จำนวน 9 ไอโซเลทที่เก็บจากปี 2547 ในสภาพแปลงทดลองในสภาพเรือนทดลอง ศูนย์วิจัยข้าว อุบลราชธานี 2549

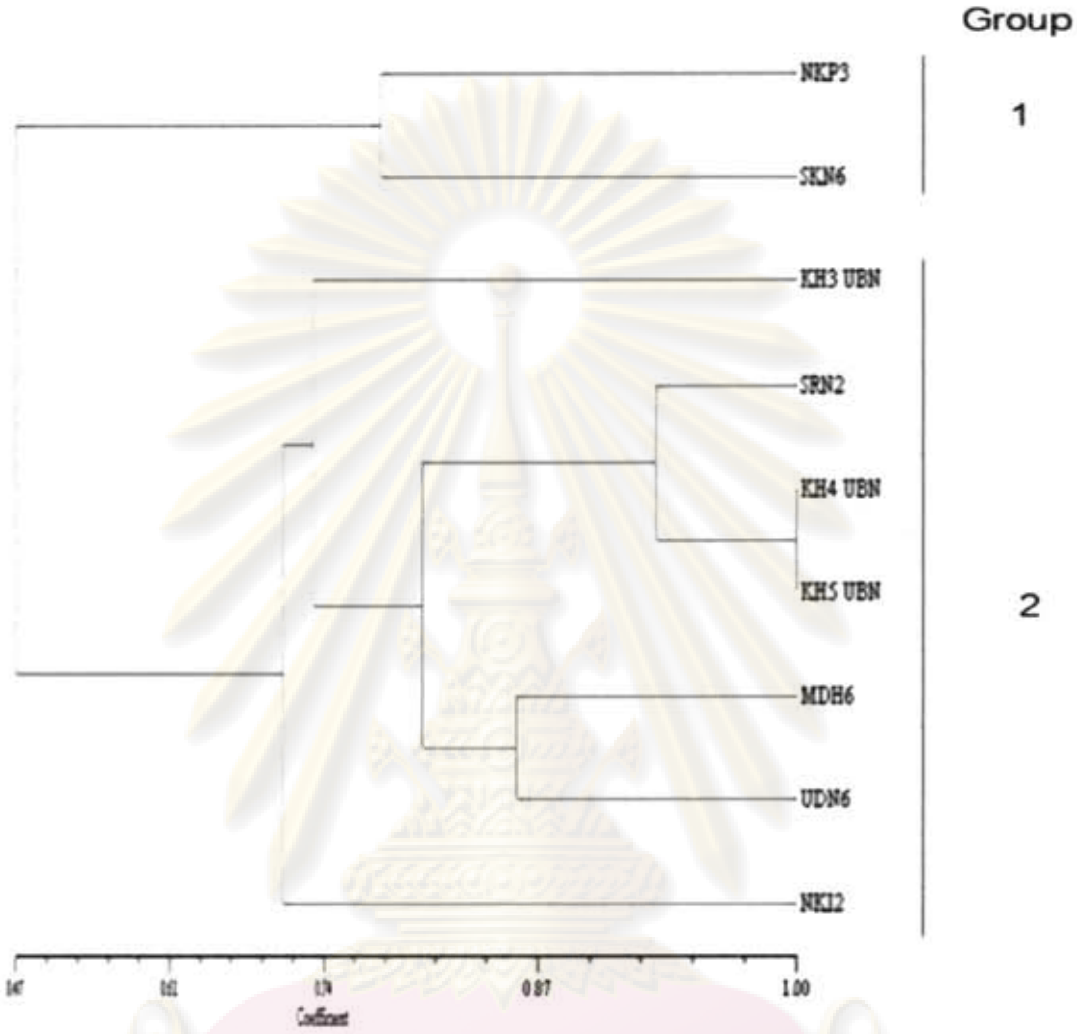
พันธุ์/สายพันธุ์	ยีนต้านทาน	ระดับคะแนนหลังปลูกเชื้อ 21วัน*								
		NKP3	SKN6	SRN2	KH3	UBN	KH4	UBN	KH5	UBN	MDH6	UDN6	NKI2
TN1	*Xa14*	1	1	1	1		1		1		1	1	0
KDML105	?	0	0	1	1		0		0		1	1	1
NSG19	?	1	1	0	1		0		0		1	0	0
IR8	*Xa11*	1	0	0	1		0		0		0	0	0
IRBB3	*Xa3*	1	1	0	1		0		0		0	0	0
IRBB4	*Xa4*	0	0	0	0		0		0		0	0	0
IRBB5	*xa5*	1	1	0	0		0		0		0	0	0
IRBB7	*Xa7*	0	0	0	0		0		0		0	0	0
IRBB8	*xa8*	1	0	0	0		0		0		0	0	0
IRBB10	*Xa10*	1	0	0	0		0		0		0	0	0
IRBB11	*Xa11*	0	0	0	0		0		0		0	1	1
IRBB13	*xa13*	0	0	0	0		0		0		1	1	0
IRBB14	*Xa14*	1	1	0	0		0		0		0	0	0
IRBB21	*Xa21*	1	1	0	0		0		0		0	0	1

*SES (IRRI, 1996)

? =ไม่ทราบยีนต้านทาน
NKP = นครพนม
KH_UBN = อุบลราชธานี
UDN = อุดรธานี

SRN = สุรินทร์ MDH = มุกดาหาร
SKN = สกลนคร NKI = หนองคาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ก.1 เดนโดแกรมแสดงการจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง 2 สายพันธุ์เชื้อ จากเชื้อจำนวน 9 ไอโซเลท (isolates) โดยจากดูค่าคะแนนในการเกิดโรคบนสายพันธุ์ข้าว NILs ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่แตกต่าง รวมทั้งหมด 14 สายพันธุ์ แล้วยังมีการแปลงค่าคะแนนการเกิดโรคเป็น Binary data แล้ววิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ Cluster analysis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศุภกิณห์ สุดซูเกียรติ เกิดที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ณ วันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2524 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2547 ในปัจจุบันได้ทำการศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย