การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม และความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย

Assessment of Genetic and Pathogenic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Thailand

รัชดาภรณ์ เขียวหวาน[1,2], รินนภา สมสนุก[1,2],ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[3], วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,4] และ สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,4*]

Rachadaporn Keawwan[1,2], Rinnapa Somsanook[1,2],Nuttima Kositcharoenkul[3], Wichai Kositratana[1,2,4] and Sujin Patarapuwadol[1,2,4*]

Abstract

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pathogenicity assays were used for evaluation of genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO) collected from 16 rice-growing provinces in Thailand. Dendrograms were generated from the data sets obtained from AFLP analysis suggesting that XOO isolates was separated into six genetic lineages. Lineage A, the largest lineage, consisted of 70.8% of tested isolates. The AFLP analysis showed that the isolates of XOO from the north and the upper central rice growing regions were highly diverse. Inoculation of XOO isolates on seven near isogenic rice cultivars (IRBB4, IRBB5, IRBB7, IRBB10, IRBB13, IRBB21 and IR24) with 24 isolates which geographically represented, classified XOO into seven pathogenic groups. The reactions of the seven pathogenic groups in order were: RRRRSRS, RRRSSRS, RRRSSSS, SRRSSRS, SRSSRRS, SRRSSSS and SRSSSSS, which the frequencies of 8.3, 8.3, 8.3, 33.3, 8.3, 25.0 and 4.2%, respectively. Most isolates were grouped into pathogenic group 4 and 6. IR24 rice cultivar was susceptible to all tested isolates whereas IRBB5 (*xa-5*) was resistant to all tested isolates. Lineage A was highly diverse and consisted of five pathogenic groups, however, there was no correlation between virulent pathotypes and genotypes.

Keywords: Bacterial leaf blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Genetic diversity, Pathogenic diversity.

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900,Thailand.

[3] กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900.

[4] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

รับเรื่อง : เมษายน 2556

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และความรุนแรงในการเกิดโรคของประชากรเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO) ที่เก็บจากแหล่งปลูกข้าว 16 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าประชากรเชื้อแบคทีเรีย XOO แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (genetic lineage) ด้วยเทคนิค AFLP โดยกลุ่ม A เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด คิดเป็นร้อยละ 70.8 ของประชากรเชื้อที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรเชื้อจากแหล่งปลูกข้าวในจังหวัดทางภาคเหนือ และภาคกลางตอนบน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ในขณะที่ทำการประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคและจัดกลุ่มของเชื้อกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคต่างอัลลีลกัน และพันธุ์อ่อนแอ (IRBB4, IRBB5, IRBB7, IRBB10, IRBB13, IRBB21 และ IR24) โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวแทนในแต่ละพื้นที่รวม 24 ไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งเชื้อตามปฏิกิริยาการตอบสนองในการเกิดโรค ระหว่างเชื้อกับพันธุ์ข้าวได้เป็น 7 กลุ่ม (pathogenic group) ตามปฏิกิริยาที่แสดงออกว่าต้านทาน (R) หรืออ่อนแอ (S) ของข้าวที่ทดสอบดังต่อไปนี้ RRRRSRS, RRRSSRS, RRRSSSS, SRRSSRS, SRSSRRS, SRRSSSS และ SRSSSSS มีความถี่ของกลุ่มเชื้อแต่ละกลุ่มอยู่ที่ร้อยละ 8.3, 8.3, 8.3, 33.3, 8.3, 25.0 และ 4.2 ตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าประชากรเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 4 และ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ XOO ทุกไอโซเลท เกิดโรครุนแรงต่อข้าวสายพันธุ์ IR24 ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ IRBB5 ซึ่งมียีนต้านทาน *xa-5* สามารถต้านทานต่อเชื้อ XOO ทุกไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบ การศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อใน Lineage A มีประชากรเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ประกอบด้วยประชากรที่จัดกลุ่มตามปฏิกิริยาการตอบสนองในการเกิดโรค ถึง 5 กลุ่มเชื้อ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเชื้อที่จัดกลุ่มด้วยความรุนแรงในการเกิดโรค (virulent pathotypes) และกลุ่มเชื้อที่จัดกลุ่มโดยลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม (genotypes)

คำนำ

โรคขอบใบแห้งของข้าวมีสาเหตุของโรค คือ เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ex Ishiyama, 1922) Swings *et al*. (1990) ในประเทศไทยพบโรคนี้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1963 ที่ จ.ปทุมธานี และมีการศึกษาความรุนแรงของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้ที่เก็บรวบรวมเชื้อตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974-1978 พบว่าแบ่งเชื้อได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีข้าวพันธุ์ DV85 ที่มียีน *xa-5* และ *Xa-7* และข้าวพันธุ์ IR1545 ที่มียีน *xa-5* เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงต่อเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO) โดยทำให้เกิดแผลบนใบข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อยาวเฉลี่ย 1.9-5.2 ซม. (Eamchit and Mew, 1982) ต่อมา Sriprakhon (2009) ได้ประเมินความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย XOO จากแหล่งปลูกข้าวทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยทดสอบกับข้าวพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแบบยีนเดี่ยว (near isogenic lines-NILS) จำนวน 9 ยีน ซึ่งประกอบด้วยยีน *Xa-3*, *Xa-4*, *xa-5*, *Xa-7*, *Xa-8*, *Xa-10*, *xa-13*, *Xa-14* และ *Xa-21* พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้ถึง 21 กลุ่ม ตามปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคกับความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย และพบว่าข้าวที่มียีนต้านทาน *xa-5* จะมีความต้านทานโรคแบบกว้าง (board spectrum resistance) ต่อเชื้อแบคทีเรียทุกกลุ่มที่นำมาทดสอบ

ด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมประชากรเชื้อ XOO ด้วยเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) พบว่าประชากรของเชื้อแบคทีเรียทางภาคเหนือของประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแบ่งกลุ่มเชื้อได้ถึง 6 กลุ่ม (Kosawang *et al*., 2006) ในขณะที่ Somsanook *et al*. (2011) ศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อที่เก็บรวบรวมจาก 21 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบว่าแบ่งเชื้อได้ 11 กลุ่ม โดยที่ชนิดของพันธุ์ข้าว และ

พื้นที่การปลูก ไม่มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ

การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม และความรุนแรงในการเกิดโรคของประชากรเชื้อ XOO ในประเทศไทย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม และความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะนำมาสู่การใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้มีความต้านทานแบบกว้าง และคงทน (board spectrum and durable resistance) ต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวที่พบในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งที่มาของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

เก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย XOO สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว จาก 16 จังหวัด ที่เป็นแหล่งปลูกข้าวทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2007-2009 ทำการยืนยันเชื้อแบคทีเรีย XOO ด้วยการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ XOR-F และ XOR-R2 (Naoto and Takashi, 2000) และทดสอบการเกิดโรคบนข้าวพันธุ์อ่อนแอ คัดเลือกเชื้อที่ตรวจพบว่าเป็น XOO นำมาเป็นตัวแทนในการศึกษาทั้งสิ้น 24 ไอโซเลท

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP

เตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจำนวน 24 ไอโซเลทด้วยวิธี CTAB method (Ausubel *et al.,* 1999) เพื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I หลังจากนั้นเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วย adapter บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาตรรวม 40 µl จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ดังนี้ EcoRI+A/MseI+0, EcoRI+C/MseI+0 และ EcoRI+G/MseI+G ดัดแปลงจาก Vos *et al*. (1995) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และตรวจผลขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining (Peya choknagul, 2002) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แบบ binary data โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่มีแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ0 ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ โดยวิธีการสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม NTSYS V.2.01d (Applied Biostatistics, Inc.) โดยคำนวณค่า similarity แบบ Dice's coefficient ดำเนินการจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) และวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม WinBoot

การวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค

นำเชื้อ XOO จำนวน 24 ไอโซเลท มาประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic lines-NILs) ที่มียีนต้านทานโรคแบบยีนเดี่ยว จำนวน 6 พันธุ์ ดังนี้ IRBB4(*Xa-4*), IRBB5(*xa-5*), IRBB7(*Xa-7*), IRBB10(*Xa-10*), IRBB13(*xa-13*), IRBB21 (*Xa-21*) และ IR24 (พันธุ์อ่อนแอ) โดยนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยเลี้ยงบนอาหาร NA อุณหภูมิ 30°C ประมาณ 48 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้ประมาณ 10^8 CFU/ml ปลูกเชื้อต่อข้าวทั้ง 7 พันธุ์ ด้วยวิธี clipping method (Kauffman *et al*., 1973) ที่ใช้กรรไกรจุ่มเซลล์แขวนลอยเชื้อและตัดปลายใบข้าวที่มีอายุ 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (RCBD) โดยทำการตัดใบข้าวแต่ละพันธุ์ 3 ต้น ต้นละ 5 ใบ ที่ปลูก 3 ต้นต่อกระถาง การทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ ประเมินความต้านทานจากใบข้าวทั้งหมด 15 ใบ และทำการหาค่าเฉลี่ย วัดความยาวของแผลที่ 10 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ลักษณะข้าวที่มีความต้านทาน (R) จะมีความยาวแผล 0-6 ซม. และข้าวที่มีลักษณะอ่อนแอ (S) มีความยาวแผลมากกว่า 6 ซม. ตามวิธีการประเมินที่ดัดแปลงจาก Sriprakhon (2009) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ DMRT และจัดกลุ่มเชื้อตามปฏิกิริยาสัมพันธ์ของความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อและพันธุ์ข้าว

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและความหลากหลายของเชื้อ

Xanthomonas oryzae pv. _oryzae_ จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค

นำผลการจัดกลุ่มเชื้อ จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOO ด้วยเทคนิค AFLP มาศึกษาหาความสัมพันธ์กับผลการจัดกลุ่มเชื้อจากการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ XOO จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝด ที่มียีนต้านทานโรค

ผลและวิจารณ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ _Xanthomonas oryzae_ pv. _oryzae_ ด้วยเทคนิค AFLP

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOO ด้วยเทคนิค AFLP พบว่าสามารถแบ่งเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลท ได้เป็น 6 กลุ่ม (Lineages) ได้แก่ A, B, C, D, E และ F ตามลำดับที่ค่า Dice's coefficient 0.80 และมีค่า Cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.96 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก (Kosawang *et al*., 2006) โดยเชื้อในกลุ่ม A มีจำนวน 17 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 70.8ของจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา และเป็นกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวพันธุ์อื่นๆจากแหล่งปลูกข้าวในภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่ม B มีเพียงเชื้อจากภาคใต้ คือ จ. พัทลุง ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์สังข์หยด กลุ่ม C ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท จากข้าวใน จ. นครปฐมกลุ่ม D ประกอบด้วยเชื้อจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือจาก จ. บุรีรัมย์ ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์หลวงประทาน กลุ่ม E ประกอบด้วยเชื้อจาก จ.พิษณุโลก และ จ.สุโขทัย ซึ่งแยกได้จากข้าวสายพันธุ์พิษณุโลก2 และข้าวหอมมะลิ 105 และกลุ่ม F เป็นเชื้อที่แยกได้จากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ที่ปลูกใน จ.สุโขทัย (ภาพที่1)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าประชากรของเชื้อ XOO ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงโดยแยกเชื้อได้ถึง 6 กลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อจากภาคเหนือที่กระจายตัวอยู่ในกลุ่มย่อยต่างๆของ lineage A ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kosawang *et al.* (2006) นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อจากแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวของภาคกลางตอนบน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเช่นกันโดยกระจายตัวอยู่ใน lineage A, Eและ F(ภาพที่ 2)

การวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ _Xanthomonas oryzae_ pv. _oryzae_ จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค

ผลการประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อ XOO ในประเทศไทย ทั้ง 24 ไอโซเลท บนข้าวที่มียีนต้านทานโรค *Xa-4*, *xa-5*, *Xa-7*, *Xa-10*, *xa-13* และ *Xa-21* และข้าวพันธุ์อ่อนแอ IR24 พบว่าสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 7 กลุ่ม โดยทุกกลุ่มเกิดโรครุนแรงสูงสุดกับข้าวสายพันธุ์ IR24 ซึ่งทำให้เกิดความยาวแผลเฉลี่ย 10.45 ซม. ในขณะที่ข้าวพันธุ์ IRBB10 (*Xa-10*) และ IRBB13 (*xa-13*) มีความยาวแผลเฉลี่ย 10.11 ซม. และ 9.89 ซม. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับความยาวแผลของข้าว IR24 และพบว่ายีน *Xa-10* และ *xa-13* อ่อนแอต่อประชากรเชื้อส่วนใหญ่ ส่วนข้าวสายพันธุ์ IRBB4 (*Xa-4*) มีความยาวแผลเฉลี่ย 8.70 ซม. และแสดงความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียบาง ไอโซเลทเท่านั้น เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ IRBB21 (*Xa-21*) เพียงแต่ความยาวแผลเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์ IRBB21 น้อยกว่าข้าวสายพันธุ์ IRBB4 ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ IRBB5 (*xa-5*) มีความยาวเฉลี่ยแผลน้อยที่สุด คือ 2.76 ซม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความยาวแผลเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์ IRBB7 (*Xa-7*) ที่มีความยาวแผลเฉลี่ย 3.41 ซม. แต่อย่างไรก็ตาม ยีน *xa-5* นั้นมีความต้านทานกว้างกว่ายีน *Xa-7* โดยครอบคลุมเชื้อได้ทั้ง 24 ไอโซเลท ในขณะที่ยีน *Xa-7* ยังอ่อนแอต่อเชื้อแบคทีเรียบางไอโซเลท (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยีนต้านทาน *xa-5* และ *Xa-7* ที่เคยมีรายงานว่ามีความต้านทานแบบกว้างต่อประชากรเชื้อ XOO ของประเทศไทย ในปีค.ศ. 1974-1978 ยังมีความต้านทานคงทนต่อประชากรของเชื้อที่พบในปัจจุบันนี้ นอกจากนี้รายงานของ Noda *et al.* (1996) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย XOO ทั่วโลก มีความหลากหลายของ race สูง โดยพบว่าเชื้อนี้มีมากกว่า 30 race ซึ่งสอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มประชากรของเชื้อแบคทีเรีย

XOO ในประเทศไทยตามปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดโรคในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่มียีนต้านทานโรค ขอบใบแห้งแบบยีนเดี่ยวในครั้งนี้ ที่พบว่าจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 24 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ถึง 7 กลุ่ม ด้วยกัน

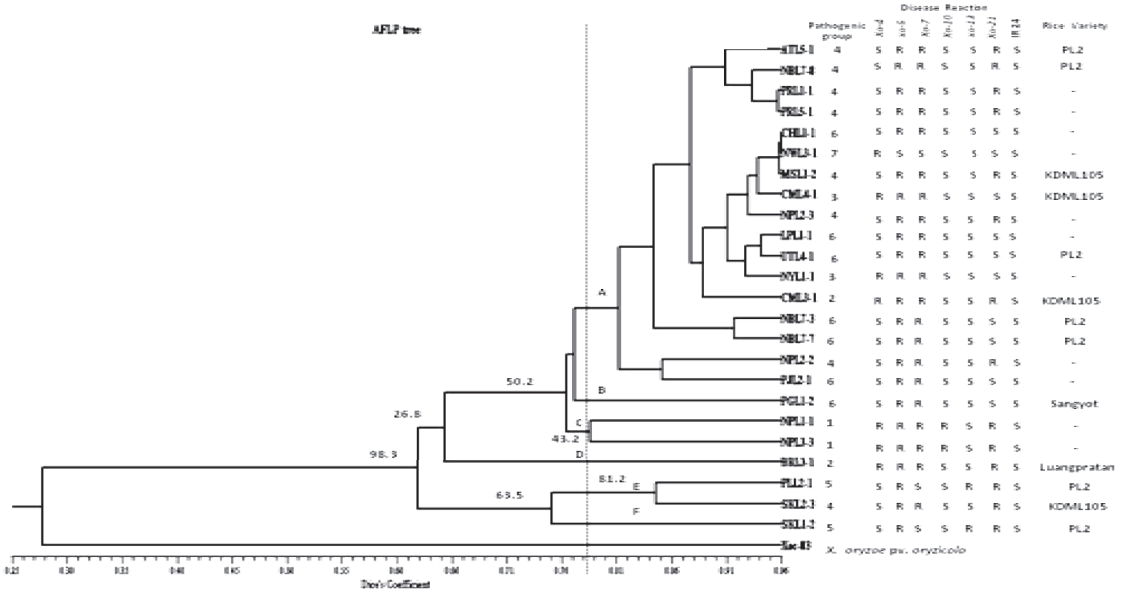
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและความหลากหลายของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP พบว่าประชากรเชื้อสามารถจัดแบ่งได้ 6 กลุ่ม ประกอบด้วย lineage A, B, C, D, E และ F ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน lineage A และกระจายตัวอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 2,3,4,6 และ 7 จากการจัดกลุ่มโดยอาศัยความรุนแรงในการเกิดโรค โดย lineage B มีเพียงไอโซเลทเดียว จากภาคใต้ จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 6 ที่ควบคุมได้ด้วยยีน *xa-5* และ *Xa-7* เชื้อ NPL3-3 และ NPL1-1 จาก จ.นครปฐม ทั้งสองไอโซเลท มีผลการจัดกลุ่มจากทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน คือ จัดอยู่ใน lineage C และกลุ่มเชื้อที่ 1 โดยเป็นกลุ่มที่เกิดโรครุนแรงน้อยที่สุด สามารถเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์ IR24 และ IRBB13 เท่านั้น lineage D มีเชื้อ BRL3-1 เพียงไอโซเลทเดียว จาก จ.บุรีรัมย์ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์หลวงประทาน จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 2 เช่นเดียวกับเชื้อ CML3-1 จาก จ.เชียงใหม่ แต่ถูกจัดอยู่ใน lineage A ในส่วนของ lineage E มีเชื้อ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ 4 และ กลุ่มที่ 5 และ lineage F มีเชื้อ SKL1-2 ไอโซเลทเดียว จาก จ.สุโขทัย ที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 5 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ NWL3-1 จาก จ.นครสวรรค์ที่จัดอยู่ใน lineage A ที่เป็นเชื้อไอโซเลทเดียวของกลุ่มที่ 7 ซึ่งมีความรุนแรงในการเกิดโรคสูงสุด โดยมีความยาวแผลเฉลี่ยของข้าวที่ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ เท่ากับ 10.61 ซม. (ภาพที่ 1 และตารางที่ 2)

ผลการจัดกลุ่มเชื้อ XOO ในประเทศไทยจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค AFLP และความหลากหลายของเชื้อ XOO จากความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวสายพันธุ์คู่แฝด ที่มียีนต้านทานโรค พบว่า ผลการจัดกลุ่มของทั้งสองวิธี ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยมีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลท จาก 24 ไอโซเลท คือเชื้อ NYL1-1, CML4-1, NPL3-3 และ NPL1-1 เท่านั้น ที่มีผลการจัดกลุ่มของทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรเชื้อส่วนใหญ่ จัดอยู่ใน lineage A (70.8%) และกลุ่มเชื้อที่ 4 (33.3%) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ควบคุมได้ด้วยยีน *xa-5, Xa-7* และ *Xa-21* รองลงมา คือ กลุ่มเชื้อที่ 6 (25.0%) ที่ควบคุมได้ด้วยยีน *xa-5* และ *Xa-7*

การศึกษาที่ผ่านมา ระบุชัดว่าประชากรของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นมีการคาดการณ์ว่า ความรุนแรงในการเกิดโรคภายในประชากรเชื้อที่อยู่ ในกลุ่มเดียวกัน (genetic lineage) จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้มีความหลากหลายในการเกิดโรคระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์ (strain) ภายในกลุ่มเชื้อเดียวกัน (Adhikari *et al*., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อใน lineage A ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มสูง โดยประกอบด้วยกลุ่มเชื้อที่เกิดโรครุนแรงถึง 5 กลุ่มเชื้อ

ผลการศึกษาของ Eamchit และ Mew (1982) ที่จัดกลุ่มความรุนแรงในการเกิดโรคของประชากรเชื้อ XOO ที่เก็บรวบรวมช่วงปี ค.ศ. 1974-1978 ที่พบว่ายีน *xa-5* สามารถต้านทานเชื้อ XOO ทุกไอโซเลท ในการทดลองครั้งนั้น สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่เก็บรวบรวมเชื้อ XOO ในปี ค.ศ. 2007-2009 โดยพบว่ายีน *xa-5* ยังคงสามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย XOO ที่พบระบาดอยู่ในปัจจุบันได้ ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถป้องกันโรคขอบใบแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเชื้อ XOO ทุกไอโซเลทในประเทศไทยได้ด้วยการผสมพันธุ์ข้าวที่ต้องการกับข้าวที่มียีน *xa-5* ซึ่งเป็นยีนที่มีลักษณะความต้านทานแบบยีนด้อย (recessive gene) แต่มีความต้านทานโรคแบบกว้างเข้าไป



ภาพที่ 1 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP และการจัดกลุ่มเชื้อตามปฏิกิริยาความสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวต่อเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิเคราะห์กลุ่ม pathotype โดยให้ R คือ ต้านทาน มีความยาวแผล 0-6 ซม. และ S คือ อ่อนแอ มีความยาวแผล มากกว่า 6 ซม.

สายพันธุ์ข้าว NILs (gene)	ความยาวเฉลี่ยของแผล (ซม.) ที่ทดสอบด้วยเชื้อ 24 ไอโซเลท	กลุ่ม pathotype						
		1	2	3	4	5	6	7
IRBB 4 (*Xa -4*)	8.70 b*	R	R	R	S	S	S	S
IRBB 5 (*xa -5*)	2.76 d	R	R	R	R	R	R	R
IRBB 7 (*Xa -7*)	3.41 d	R	R	R	R	S	R	S
IRBB 10 (*Xa -10*)	10.11 a	R	S	S	S	S	S	S
IRBB 13 (*xa -13*)	9.89 a	S	S	S	S	R	S	S
IRBB 21 (*Xa -21*)	5.21 c	R	R	S	R	R	S	S
IR24	10.45 a	S	S	S	S	S	S	S
ความถี่ของเชื้อแต่ละกลุ่ม(%)		8.3	8.3	8.3	33.3	8.3	25.0	4.2

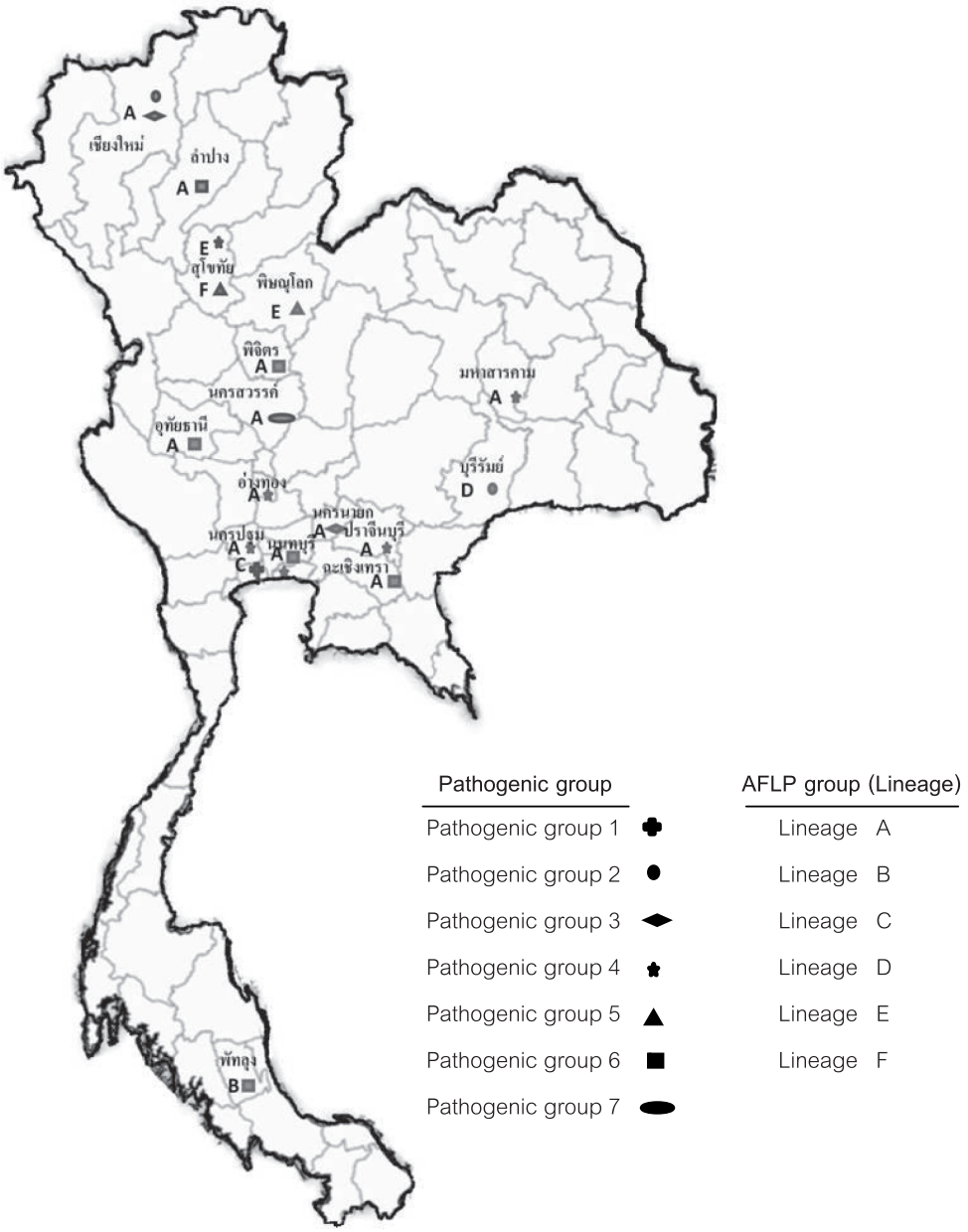
หมายเหตุ

*ตัวอักษรอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP และการจัดกลุ่มเชื้อตามปฏิกิริยาความสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคของข้าวต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

กลุ่ม AFLP (Lineage)	กลุ่มเชื้อ (Pathogenic group)	ไอโซเลท	พันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้	จังหวัด	ความยาวเฉลี่ยของแผล (ซม.)
A	2	CML3-1	หอมมะลิ 105	เชียงใหม่	5.48 kl*
A	3	NYL1-1	ไม่ทราบพันธุ์	นครนายก	6.53 hijk
A	3	CML4-1	หอมมะลิ 105	เชียงใหม่	8.02 defghi
A	4	ATL5-1	พิษณุโลก2	อ่างทอง	6.83 ghijk
A	4	PRL1-1	ไม่ทราบพันธุ์	ปราจีนบุรี	6.84 ghijk
A	4	PRL5-1	ไม่ทราบพันธุ์	ปราจีนบุรี	7.46 fghij
A	4	NPL 2-2	ไม่ทราบพันธุ์	นครปฐม	8.32 cdefg
A	4	NPL 2-3	ไม่ทราบพันธุ์	นครปฐม	9.59 bcd
A	4	MSL1-2	ไม่ทราบพันธุ์	มหาสารคาม	9.30 bcde
A	4	NBL7-8	พิษณุโลก2	นนทบุรี	10.00 abc
A	6	NBL7-3	พิษณุโลก2	นนทบุรี	7.76 efghij
A	6	CHL1-1	ไม่ทราบพันธุ์	ฉะเชิงเทรา	7.84 efghij
A	6	PJL2-1	ไม่ทราบพันธุ์	พิจิตร	8.38 cdefg
A	6	LPL1-1	ไม่ทราบพันธุ์	ลำปาง	8.66 cdef
A	6	UTL4-1	ไม่ทราบพันธุ์	อุทัยธานี	9.32 bcde
A	6	NBL7-7	พิษณุโลก2	นนทบุรี	10.12 abc
A	7	NW3-1	ไม่ทราบพันธุ์	นครสวรรค์	10.61 ab
B	6	PGL1-2	สังข์หยด	พัทลุง	7.02 ghijk
C	1	NPL3-3	ไม่ทราบพันธุ์	นครปฐม	4.38 l
C	1	NPL1-1	ไม่ทราบพันธุ์	นครปฐม	6.46 ijk
D	2	BRL3-1	หลวงประทาน	บุรีรัมย์	7.57 fghij
E	4	SKL2-3	หอมมะลิ 105	สุโขทัย	6.33 jk
E	5	PLL2-1	พิษณุโลก2	พิษณุโลก	8.28 defg
F	5	SKL1-2	พิษณุโลก2	สุโขทัย	8.18 defgh

หมายเหตุ *ตัวอักษรอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงการกระจายตัวประชากรของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* กลุ่มต่างๆในการทดลอง

สรุป

เชื้อแบคทีเรีย XOO ในประเทศไทย จำนวน 24 ไอโซเลท จากการทดลองครั้งนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) และความหลากหลายของความรุนแรงในการเกิดโรค (pathogenic diversity) สูง แบ่งตามความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ได้ 6 lineage และแบ่งได้ 7 กลุ่ม ตามความรุนแรงในการเกิดโรค ประชากรของเชื้อร้อยละ 70 จัดอยู่ใน lineage A โดยเชื้อที่มาจากภาคเหนือ และภาคกลางตอนบน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด ในขณะที่การแบ่งกลุ่มเชื้อตามความรุนแรงในการเกิดโรคกับข้าวพันธุ์ต้านทาน ที่มียีนต้านทานแบบเดี่ยว ได้แก่ ยีน *Xa-4*, *xa-5*, *Xa-7*, *Xa-10*, *xa-13* และ *Xa-21* พบว่า แบ่งเชื้อได้ 7 กลุ่ม โดยมีประชากรของเชื้อร้อยละ 33.3 และร้อยละ 25.0 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 4 และ 6 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *xa-5* เป็นยีนที่ต้านทานเชื้อ XOO ทุกไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง ผลการจัดกลุ่มเชื้อจากความหลากหลายทางพันธุกรรม และความรุนแรงในการเกิดโรค ส่วนใหญ่ให้ผลการจัดกลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน มีเพียงเชื้อ 4 ไอโซเลท จาก 24 ไอโซเลท เท่านั้น ที่มีผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอขอบคุณ หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว (Rice Gene Discovery Unit, RGDU) แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic lines-NILs)

เอกสารอ้างอิง

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

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl.1999. Shortprotocols in Molecular Biology.4 th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Eamchit, S., and T.W. Mew, 1982. Compararison of virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Thailand and the Philippines. Plant Disease 66: 556-559.

Kauffman, H.E., A.P.K. Reddy., S.P.Y. Hsieh. and S.D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation of resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Disease Rep. 57: 537 - 541.

Kosawang, C., P. Smitamana1, T. Toojinda, N. Nilpanit and P. Sirithunya. 2006. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting differentiates genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from northern Thailand. Phytopathology 154: 550–555.

Naoto, A, and O. Takashi. 2000. PCR-mediated detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region sequence. Journal of General Plant Pathology 66: 303-309.

Noda T, T. Yamamoto, T. Ogawa, H. Kaku. 1996. Pathogenic race of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in south and east Asia. JIRCAS 3 : 9-15.

Peyachoknagul, S. 2002. Genome and DNA marker: RAPD and RFLP laboratory. Department of Genetics, Faculty of Science. Kasetsart University. (in Thai)

Somsanook, R., J. Watcharachaiyakup, W. Kositratana and S. Patarapuwadol. 2011. Genetic diversity analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Thailand using AFLP. The Journal of Thailand Phytopathological Society. 25 (1-2): 56-69. (in Thai)

Sriprakhon, S. 2009. Identification and geographical distribution of bacterial leaf blight isolates (*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae*) and tagging resistance genes in a landrace rice cv. Chiang Rung (*Oryza sativa* L.). Master of science, Kasetsart University. (in Thai)

Swings, J., M.V. Mooter, L. Vauterin, B. Hoste, M. Gillis, T.W. Mew and K. Kersters. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight of rice (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv.*oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex. Ishiyama 1992).Sp. Nov.Nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 30 – 31.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.