การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*,ในประเทศไทย โดยเทคนิค Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)

Genetic Diversity Assessment of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in Thailand using Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR) Technique

ไพเราะ ขวัญงาม[1,2] จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์[1,3] วิชัย โฆษิตรัตน[1,2,3] และสุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3*]

Pairoh Khwanngam[1,2] Jutatape Watcharachaiyakup[1,3] Wichai Kositratana[1,2,3] and Sujin Patarapuwadol[1,2,3*]

Abstract

Bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (XOC) was collected at various sites from 11 provinces of different rice growing region. Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) technique with DNA primer sets corresponding to BOX element (BOX), Enterobacterial repetitive intergenic concensus (ERIC) and Repetitive extragenic palindromic (REP) were employed for genetic diversity assessment of 103 isolates of XOC. The polymorphic bands of DNA fingerprinting were recorded and comparative analyzed. The BOX primer gave the highest polymorphism of 83.3% whereas 71.4% and 60.0% were observed from ERIC and REP primers. At the Dice's similarity coefficient of 0.85, rep-PCR with BOX, ERIC and REP primers grouped XOC into 5, 13, and 7 lineages with cophenetic correlation value (r) of 0.92, 0.85, and 0.91, respectively, and the combined analysis with three primers resolved XOC into 7 lineages with the r-value of 0.94. Results from three primers also revealed that most XOC isolates collected from the same area and same year were grouped into the same lineage. Moreover, most of XOC strains isolated from the same province were also clustered into one group. However, the correlation of XOC strains and rice cultivars were not observed.

Keywords: Bacterial leaf streak, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, rep-PCR, genetic diversity

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] 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.

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excelience on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

รับเรื่อง : มิถุนายน 2558

รับตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2558

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสงของข้าว, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (XOC), จำนวน 103 ไอโซเลท ที่เก็บจากแหล่งปลูกข้าวใน 11 จังหวัดของประเทศไทย นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) โดยไพรเมอร์ BOX element (BOX), Enterobacterial repetitive intergenic concensus (ERIC) และ Repetitive extragenic palindromic (REP) พบว่าประชากรของเชื้อ XOC มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ BOX มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสูงสุดอยู่ที่ 83.3% รองลงมาได้แก่ ไพรเมอร์ ERIC (71.4%) และ REP (60.0%) เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์จัดกลุ่ม ผลการจัดกลุ่มด้วยไพรเมอร์ BOX, ERIC และ REP ที่มีค่าความเหมือนด้วยค่า Dice's coefficient 0.85 พบว่าประชากรเชื้อแบคทีเรีย XOC แบ่งกลุ่มได้เป็น 5, 13 และ 7 กลุ่ม โดยมีค่า cophenetic correlation (r) ในการจัดกลุ่ม เป็น 0.92, 0.85 และ 0.91 ตามลำดับ และเมื่อรวมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากทั้ง 3 ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 7 กลุ่ม โดยมีค่า r อยู่ที่ 0.94 และพบว่าผลการจัดกลุ่มประชากรเชื้อของทั้ง 3 ไพรเมอร์ ส่วนใหญ่เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ เชื้อส่วนใหญ่ที่เก็บจากพื้นที่เดียวกัน ปีเดียวกัน จัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรีย XOC ที่เก็บได้จากพื้นที่จังหวัดเดียวกันส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยไม่พบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อ XOC ที่จัดแบ่งกับสายพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้

คำนำ

โรคใบขีดโปร่งแสง (Bacterial leaf streak) ของข้าว มีสาเหตุโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (XOC) เชื้อนี้เข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะแตกกอจนถึงระยะออกรวง โดยเข้าทางบาดแผล และช่องเปิดธรรมชาติ ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 10 – 20% เชื้อสามารถแพร่ระบาดไปกับลม ฝน และผ่านระบบการให้น้ำแบบชลประทาน รวมถึงมาจากวัชพืชที่อยู่รอบๆแปลงด้วย (OEPP/EPPO, 2007) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียมีเทคนิคที่นิยมใช้คือ เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และให้ผลการจัดกลุ่มเทียบเคียงได้กับเทคนิคอื่นๆ ในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOC Gonzalez *et al*. (2007) ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOO) และ เชื้อ XOC ในแอฟริกาตะวันตก ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เทคนิค rep-PCR และ เทคนิค Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (FAFLP) ซึ่งพบว่าทั้ง 3 เทคนิคสามารถแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOO และ XOC ในแอฟริกาตะวันตก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wonni *et al*. (2011) ที่ประเมินโครงสร้างประชากรเชื้อ XOC จำนวน 77 ไอโซเลท ที่เก็บจากพันธุ์ข้าวปลูก ข้าวป่า และวัชพืชต่างๆ ในพื้นที่ปลูกข้าวหลายแหล่งของประเทศบูร์กินาฟาโซ และมาลี ในทวีปแอฟริกาตะวันตก และพบว่าประชากรของเชื้อ XOC ในประเทศเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยที่ Zhang *et al.* (2014) ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ XOC จำนวน 94 ไอโซเลท จากพื้นที่ 11 แห่งในจังหวัด Anhui ของประเทศจีน ด้วยเทคนิค rep-PCR เพียงเทคนิคเดียวด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่

BOX, ERIC และ REP พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของประชากรเชื้อจำนวน 49 แถบ จากการวิเคราะห์พบว่า เทคนิคนี้สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเชื้อของจังหวัด Anhui ได้ และพบว่า ประชากรเชื้อส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่พบเชื้อ โดยที่เชื้อจากพื้นที่เดียวกันจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOC ร่วมกับความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ข้าว และพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ประกอบการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การเก็บและแยกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

เชื้อ XOC ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จำนวน 103 ไอโซเลท ได้มาจากเชื้อ 15 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมในระหว่างปี พ.ศ. 2552 - 2553 จากจังหวัดขอนแก่น บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม และนครสวรรค์ โดย Keawwan *et al*. (2012) และอีก 88 ไอโซเลท ได้จากการทดลองนี้ โดยเก็บเชื้อใน พ.ศ. 2555 - 2556 (ตารางที่ 1) จากใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบขีดโปร่งแสงที่ทำการสำรวจในจังหวัดเชียงราย สุโขทัย ชัยนาท สุพรรณบุรี ลพบุรี นครนายก นครปฐม ราชบุรี บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด และนครศรีธรรมราช การเก็บตัวอย่างใช้แผนการสุ่มตัวอย่างแบบซิกแซก (W) สุ่มเก็บตัวอย่างและเก็บบันทึกข้อมูลการเกิดโรคแต่ละจุดห่างกัน 30 ก้าว (Anonymous, 2011) นำตัวอย่างใบข้าวมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Keawwan *et al*. (2012) และเชื้อ XOC ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง คือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* หมายเลข TS8203 และ เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOO) หมายเลข XOO-0019 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.การจำแนกเชื้อโดยการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีบางประการ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทำการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบแกรม ศึกษาขนาดเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการเจริญบนอาหาร Nutrient agar (NA) และอาหาร Yeast dextrose carbonate agar (YDC) ศึกษาสรีรวิทยา และชีวเคมี ด้วยลักษณะทดสอบต่างๆ ดังนี้ การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) การทดสอบการสร้างอะซิโทอิน (Acetoin production) การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin hydrolysis) การเจริญต่อสาร cupric nitrate 0.001% การเจริญบนอาหารที่มี L-alanine การเจริญบนอาหารที่มี 0.2% vitamin-free casamino acid (OEPP/EPPO, 2007)

3.การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ 108 CFU/ml นำมาปลูกเชื้อบนต้นข้าวพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่าเป็นพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ KDML 105, ชัยนาท 1, กข47, TN1 และ IR24 และพันธุ์ต้านทานต่อโรค ได้แก่ พันธุ์ DV85 ที่มีอายุ 1 เดือน ปลูกเชื้อด้วยวิธี Spray method (Mew and Mistra, 1994) ตรวจสอบผลการเกิดโรค หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

4.การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเขี่ยแบคทีเรียด้วยลูปใส่ในหลอดที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่ต้ม 2 ไมโครลิตร สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ XOC โดยใช้ไพรเมอร์ XOC3866F/ XOC3866R ซึ่งออกแบบจากยีน wxocB ที่สร้าง LPS O-antigen biosynthesis

protein ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ XOC ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Lang *et al.* (2010) ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.1 U GoTag® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA) ไพรเมอร์ XOC3866-F และ XOC3866-R ชนิดละ 0.25 µM เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (Biometra®, Germany) ทำปฏิกิริยาด้วยรอบการทำปฏิกิริยา ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 - 4 ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 64 °C เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซิส และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

5.การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร 3X NB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุด PrestoTM Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) นำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ XOC ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ ไพรเมอร์ REP คือ REP1R-I; 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' และ REP2R-I; 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' (Louws *et al*., 1994) ไพรเมอร์ ERIC ได้แก่ ERICIR; 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' และ ERIC2R; 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (Versalovic *et al*., 1991) และไพรเมอร์ BOXA1R; 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Vera Cruz *et al*., 1996) ทำปฏิกิริยาด้วยรอบการทำปฏิกิริยา ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 7 นาที ขั้นที่ 2 – 4 ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 52 °C เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 8 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย 4% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Somsanook *et al.* (2011)

6.การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยให้ข้อมูลเป็นแบบ Binary data คือ มีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้คะแนนเป็น "1" หากไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนนเป็น "0" วิเคราะห์เดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d (Applied Biostatistic Inc., USA) โดยใช้พารามิเตอร์แบบ Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) คำนวณค่า Cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการตรวจสอบเดนโดรแกรม และวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ผลและวิจารณ์

1.เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบขีดโปร่งแสงของข้าวจากแหล่งปลูกข้าว ในระหว่างปี พ.ศ. 2555 – 2556 จากพื้นที่สำรวจ 11 จังหวัด และเก็บตัวอย่างจำนวน 55 แปลง พบโรคในจังหวัดสุพรรณบุรี ลพบุรี นครนายก นครปฐม และบุรีรัมย์ โดยพบลักษณะอาการโรคใบขีดโปร่งแสงต่างๆ ดังนี้ ใบข้าวเป็นแผลที่มีรอยขีดช้ำยาวตามเส้นใบและพบ Bacterial ooze บนใบข้าว เมื่อมีสภาพอากาศความชื้นเหมาะสม ซึ่งแหล่งที่พบโรคส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณขอบแปลงที่มีร่มไม้ หรือแปลงนาที่มีการปลูกข้าวแบบนาหว่านที่มีต้นข้าวหนาแน่น โดยแยกเชื้อ

จากใบข้าวได้ 88 ไอโซเลท จากข้าว 8 พันธุ์ ดังนี้ KDML 105, พิษณุโลก 2, กข41, กข47, กข49, กข51, CP111 และข้าวพันธุ์ลืมผัว ไม่พบโรคใบขีดโปร่งแสงในแปลงนาในจังหวัดเชียงราย สุโขทัย ชัยนาท ราชบุรี ร้อยเอ็ด และนครศรีธรรมราช ซึ่งอาจเนื่องมาจากในการสำรวจครั้งนี้สุ่มเก็บตัวอย่างโรค 5 แปลงต่อพื้นที่ที่ทำการสำรวจอาจยังไม่เป็นตัวแทนที่ดีของทั้งจังหวัด และสภาพภูมิอากาศในช่วงระยะเวลาสำรวจเป็นช่วงที่มีฝนตกน้อย แต่เกษตรกรปลูกข้าวโดยใช้น้ำระบบชลประทาน

2.การจำแนกเชื้อโดยการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

นำเชื้อที่ได้ทั้ง 103 ไอโซเลทมาทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ปลายมนอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเซลล์ต่อกันเป็นคู่ ขนาดความกว้างของเซลล์อยู่ในช่วง 0.4 – 0.6 ไมโครเมตร ความยาว 1.3 – 2.0 ไมโครเมตร ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อทดสอบคุณสมบัติการย่อยเจลาติน และเจริญบนอาหารที่มี L-alanine และบนอาหารที่มี 0.2% vitamin-free casamino acids การเจริญบนอาหาร YDC โคโลนีจะมีลักษณะผิวมันเยิ้มมีสีเหลือง แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี 0.001% cupric nitrate ไม่พบการย่อยแป้ง ไม่สร้างอะซิโทอิน ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยรายงานไว้ใน OEPP/EPPO (2007)

3. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

จากการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ 103 ไอโซเลท โดยทดสอบบนพันธุ์ข้าว 6 พันธุ์ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถทำให้เกิดโรคกับข้าวพันธุ์ทดสอบได้ พบ bacterial ooze ที่บริเวณแผลบนใบข้าวภายหลังการปลูกเชื้อได้เพียง 7 วัน และที่ 14 วัน แสดงอาการใบขีด ช้ำยาวไปตามเส้นใบ (ตารางที่ 1)

4. การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR

จากการตรวจเชื้อจำนวน 103 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ XOC3866-F และ XOC3866-R ที่จำเพาะต่อบริเวณยีน wxocB ที่สร้าง LPS O-antigen biosynthesis protein ของเชื้อ XOC (Lang *et al*., 2010) ที่มีดีเอ็นเอขนาด 691 bp. การศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 103 ไอโซเลท มีชิ้นดีเอ็นเอของ wxocB ที่มีขนาดประมาณ 690 bp. เช่นเดียวกับของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* (TS8203) ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง และไม่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุม (negative control)

5.ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ XOC ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่า ทั้ง 3 ไพรเมอร์ ให้ผลวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ BOX มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสูงสุด 83.3 รองลงมาได้แก่ ERIC และ REP มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 71.4 และ 60.0 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา goodness of fit ของการจัดกลุ่มมีค่า cophenetic correlation หรือค่า r เท่ากับ 0.92396, 0.85885 และ 0.91834 ตามลำดับ แสดงถึงการจัดกลุ่มอยู่ในระดับดีถึงดีมาก (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาจำนวนกลุ่มเชื้อที่แบ่งได้ที่ค่าความเหมือน 0.85 พบว่าไพรเมอร์ BOX แยกกลุ่มเชื้อได้น้อยสุดคือ 5 กลุ่ม แต่มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสูงสุด ในขณะที่ไพรเมอร์ ERIC และ REP มีจำนวนกลุ่มที่มากกว่าคือ 13 กลุ่ม และ 7 กลุ่ม ตามลำดับ ดังนั้นจึงรวมข้อมูลจาก 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ BOX ERIC และ REP เพื่อทำให้พบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างมากขึ้น ทำให้มีความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยจากการรวมข้อมูลพบว่าทำให้มีค่า r สูงขึ้นเป็น 0.94532 และจัดได้ 7 กลุ่มจากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 65 แถบ เช่นเดียวกับการรายงานของ Pan *et al*. (2010) ที่นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค rep-PCR ทั้ง 3 ไพรเมอร์เข้าด้วยกัน เพื่อเพิ่มจำนวนข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างให้

ได้มากขึ้น ทำให้ผลการจัดกลุ่มมีความน่าเชื่อถือสูงขึ้น

6.การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ด้วยเทคนิค rep-PCR ร่วมกับความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ข้าว และพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ XOC ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่าสามารถแยกเชื้อ XOO ออกจากเชื้อ XOC ที่ค่า Dice's similarity coefficient 0.20 ด้วยไพรเมอร์ BOX เมื่อพิจารณาที่ค่า Dice's similarity coefficient 0.85 สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ XOC ออกเป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 1) ได้แก่ กลุ่ม 1 ไอโซเลทจากจังหวัดนครปฐม ลพบุรี และฉะเชิงเทรา ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และพันธุ์ลืมผัว กลุ่ม 2 มีประชากรเชื้อมากที่สุดจำนวน 42 ไอโซเลท คิดเป็น 41.58% ของประชากรเชื้อ ซึ่งเป็นไอโซเลทจากหลายจังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี ลพบุรี นครปฐม นครสวรรค์ และขอนแก่น กลุ่ม 3 เชื้อจากจังหวัดสุพรรณบุรี ที่แยกจากข้าวพันธุ์ กข51 และ CP111 กลุ่ม 4 มีจำนวนห้าไอโซเลทจากจังหวัดนครนายก ได้แก่ 1NY2-2, 2NY1-1, 1NY2-1, 3NY2-1, และ 1NY4-1 แยกจากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และ กข47 และ กลุ่มที่ 5 มีจำนวนประชากรเชื้อมากรองลงมาจากกลุ่ม 2 ได้แก่ ไอโซเลทจากจังหวัดสุพรรณบุรี, นครปฐม, บุรีรัมย์ และนครนายก แยกจากข้าวหลายพันธุ์โดยเชื้อที่เก็บจากพื้นที่เดียวกันส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่มย่อยกลุ่มเดียวกัน

การจัดกลุ่มประชากรเชื้อ XOC ด้วยไพรเมอร์ ERIC ที่ค่า Dice's similarity coefficient 0.85 (ภาพที่ 2) พบว่าแบ่งเชื้อได้ 13 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 มี 4 ไอโซเลท จากจังหวัดนครนายก และบุรีรัมย์ แยกได้จากข้าวพันธุ์ กข47 และ KDML 105 กลุ่ม 2 เป็นไอโซเลท จากจังหวัดนครปฐม แยกจากข้าวพันธุ์ KDML 105 กลุ่ม 3 เป็นไอโซเลทจากสุพรรณบุรี คือ SP7-19 แยกจากข้าวพันธุ์ CP111 กลุ่ม 4 ไอโซเลทจากสุพรรณบุรี จากข้าวพันธุ์ กข51 และ ไอโซเลทจากลพบุรี คือ LR1-7 แยกจากข้าวพันธุ์ลืมผัว กลุ่ม 5 ไอโซเลทจากจังหวัดสุพรรณบุรี ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ กข51 และ CP111 กลุ่ม 6 ไอโซเลทจากจังหวัดสุพรรณบุรี ปราจีนบุรี และฉะเชิงเทรา จากข้าวพันธุ์ กข51, CP111 และไม่ทราบพันธุ์ข้าว กลุ่ม 7 ไอโซเลทจากจังหวัดนครปฐม ที่แยกจากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และไม่ทราบพันธุ์ข้าวจากไอโซเลท TXOC-11 กลุ่ม 8 เป็นเชื้อจากจังหวัดลพบุรี และนครสวรรค์กลุ่ม 9 มีจำนวนไอโซเลทมากสุด 33 ไอโซเลท คิดเป็น 32.03% เป็นไอโซเลทจากจังหวัดสุพรรณบุรี ลพบุรี ขอนแก่น ปราจีนบุรี บุรีรัมย์ และนครปฐม จากข้าวพันธุ์ลืมผัว CP111 และ KDML 105 กลุ่ม 10 ไอโซเลท 3NY3-2 จากจังหวัดนครนายก แยกจากพันธุ์ กข49 มีความแตกต่างจากเชื้อที่เก็บมาจากที่เดียวกัน กลุ่ม 11 ไอโซเลท 3NY1-2 จากจังหวัดนครนายก แยกจากข้าวพันธุ์ กข47 กลุ่ม 12 มีไอโซเลทมากเป็นอันดับที่ 2 ซึ่งเป็นไอโซเลทจากจังหวัดนครนายก สุพรรณบุรี และบุรีรัมย์แยกจากข้าวพันธุ์ กข41 กข47 KDML 105 และพันธุ์พิษณุโลก 2 และกลุ่มที่ 13 เป็นเชื้อจากจังหวัดนครนายก นครปฐม และสุพรรณบุรี จากข้าวหลายพันธุ์ได้แก่ กข41, กข47, กข49 และ CP111

การจัดกลุ่มเชื้อด้วยไพรเมอร์ REP สามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม Dice's similarity coefficient 0.85 (ภาพที่ 3) โดยมีผลการจัดกลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 ถูกแยกค่าที่ similarity 0.64 ได้แก่ ไอโซเลท SP7-20 จากจังหวัดสุพรรณบุรี แยกได้จากข้าวพันธุ์ CP111 ซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้อไอโซเลทอื่นๆ มากที่สุด กลุ่ม 2 เป็นเชื้อจากจังหวัดนครนายก และบุรีรัมย์ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ กข41, กข47, พิษณุโลก 2 และ KDML 105 กลุ่ม 3 เป็นไอโซเลทจากจังหวัดนครนายกเป็นส่วนใหญ่ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ กข41, กข47, กข49 และพิษณุโลก 2 และอีก 1 ไอโซเลทเป็นเชื้อจากจังหวัดนครปฐม กลุ่ม 4 ไอโซเลทจากจังหวัดนครนายก บุรีรัมย์ และสุพรรณบุรี แยกจากข้าวพันธุ์ กข41, กข47, KDML 105 และ

พิษณุโลก 2 กลุ่ม 5 ไอโซเลท 1NY3-2 และ 3NY1-1 จากจังหวัดนครนายกที่เก็บต่างปีและต่างแปลงกัน กลุ่ม 6 เป็นเชื้อไอโซเลท LR1-10 จากจังหวัดลพบุรี กลุ่ม 7 มีประชากรเชื้อมากที่สุด จำนวน 58 ไอโซเลท คิดเป็น 56.31% ของประชากรเชื้อทั้งหมด โดยเป็นเชื้อจากจังหวัดลพบุรี ปราจีนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ขอนแก่น นครนายก นครสวรรค์ ฉะเชิงเทรา และบุรีรัมย์ ที่แยกได้จากข้าวหลากพันธุ์

จากการรวมทั้ง 3 ไพรเมอร์ สามารถแบ่งเชื้อ XOC ออกได้เป็น 7 กลุ่ม Dice's similarity coefficient 0.85 (ภาพที่ 4) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลทจากจังหวัดนครนายก ที่มาจากข้าว 3 พันธุ์คือ พิษณุโลก 2, กข41 และ กข47 กลุ่มที่ 2 มีเชื้อที่อยู่ในกลุ่มนี้ 4 ไอโซเลทจากจังหวัดนครนายกที่มาจากข้าวพันธุ์ กข47 และข้าวพันธุ์ KDML105 จากจังหวัดบุรีรัมย์ กลุ่มที่ 3 มีประชากรเชื้อมากที่สุด จำนวน 35 ไอโซเลท คิดเป็น 34.65% ของเชื้อทั้งหมด โดยเป็นเชื้อจากนครนายก บุรีรัมย์, นครปฐม และสุพรรณบุรี พบในข้าว 5 พันธุ์ คือ กข41, กข47, กข49, KDML105 และพิษณุโลก 2 กลุ่ม 4 มีเชื้อเพียง 7 สายพันธุ์ แต่เป็นเชื้อจากจังหวัดเดียวกันทั้งหมด คือ จังหวัดสุพรรณบุรี และแยกได้จากข้าวพันธุ์เดียวกันด้วยคือพันธุ์ กข51 กลุ่ม 5 มีเชื้อ 6 ไอโซเลทที่มาจากจังหวัดนครปฐมเป็นส่วนใหญ่ ที่แยกจากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และอีก 1 สายพันธุ์เป็นเชื้อจากจังหวัดฉะเชิงเทรา กลุ่มที่ 6 ไอโซเลท SP7-9 และ SP7-19 เป็นไอโซเลทจากสุพรรณบุรีที่แยกจากข้าวพันธุ์ CP111 และในกลุ่ม 7 มีเชื้อมากเป็นอันดับ 2 คือ 43 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อจากหลายจังหวัด และจากข้าวหลากหลายพันธุ์

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 3 ไพรเมอร์นี้ พบว่าประชากรเชื้อส่วนใหญ่ที่มาจากพื้นที่เดียวกันจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันน้อยจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่นเดียวกับการรายงานของ Zhang *et al*. (2014) ที่ศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ XOC ที่จังหวัด Anhui ของประเทศจีนที่พบว่าเชื้อที่มาจากพื้นเดียวกันหรือใกล้เคียงกันส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

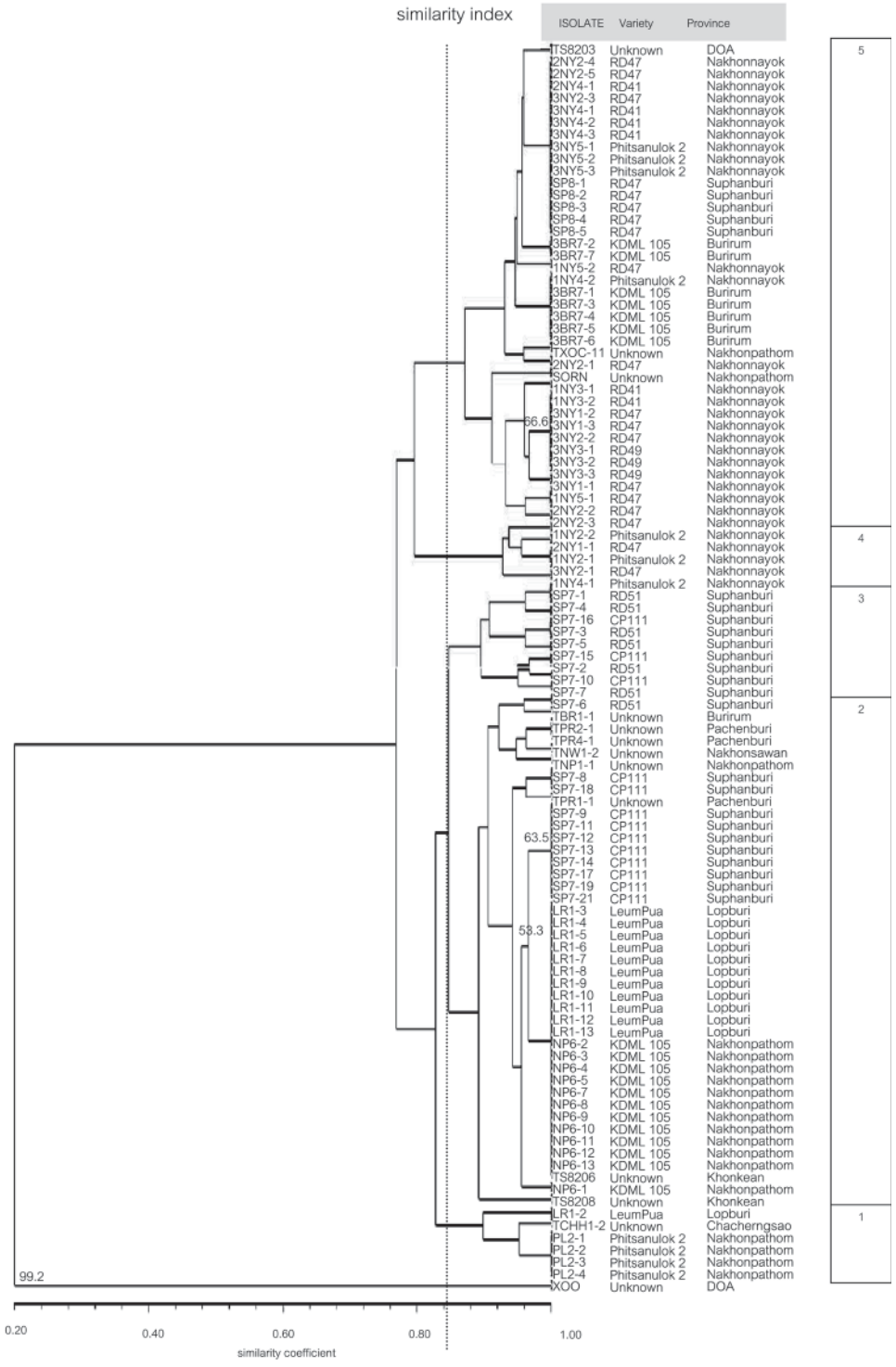
การศึกษาครั้งนี้พบว่าพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้ไม่มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ดังผลการจัดกลุ่มของเชื้อที่เก็บได้จากข้าวพันธุ์เดียวกัน พบว่ามีการจัดอยู่ในหลายกลุ่มเช่น เชื้อที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ KDML105 จัดอยู่ในกลุ่ม 2, 3 และ 7 ในขณะที่ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม 1, 3 และ 5 ในการจัดกลุ่มด้วยการรวม 3 ไพรเมอร์ (ภาพที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Raymundo *et al*. (1999) ที่ศึกษาความแตกต่างของประชากรเชื้อ XOC ในประเทศฟิลิปปินส์ และไม่พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ XOC และพืชที่แยกเชื้อได้

นอกจากนี้การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep-PCR ในครั้งนี้ พบว่าทั้ง 3 ไพรเมอร์สามารถแยกกลุ่มเชื้อ *Xanthomonas oryzae* ได้ในระดับ pathovar โดยแยกเชื้อ XOO ออกจากเชื้อ XOC ได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ Louws *et al*. (1999) ที่พบว่า เทคนิค rep-PCR สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อในระดับ pathovar และ strain ได้

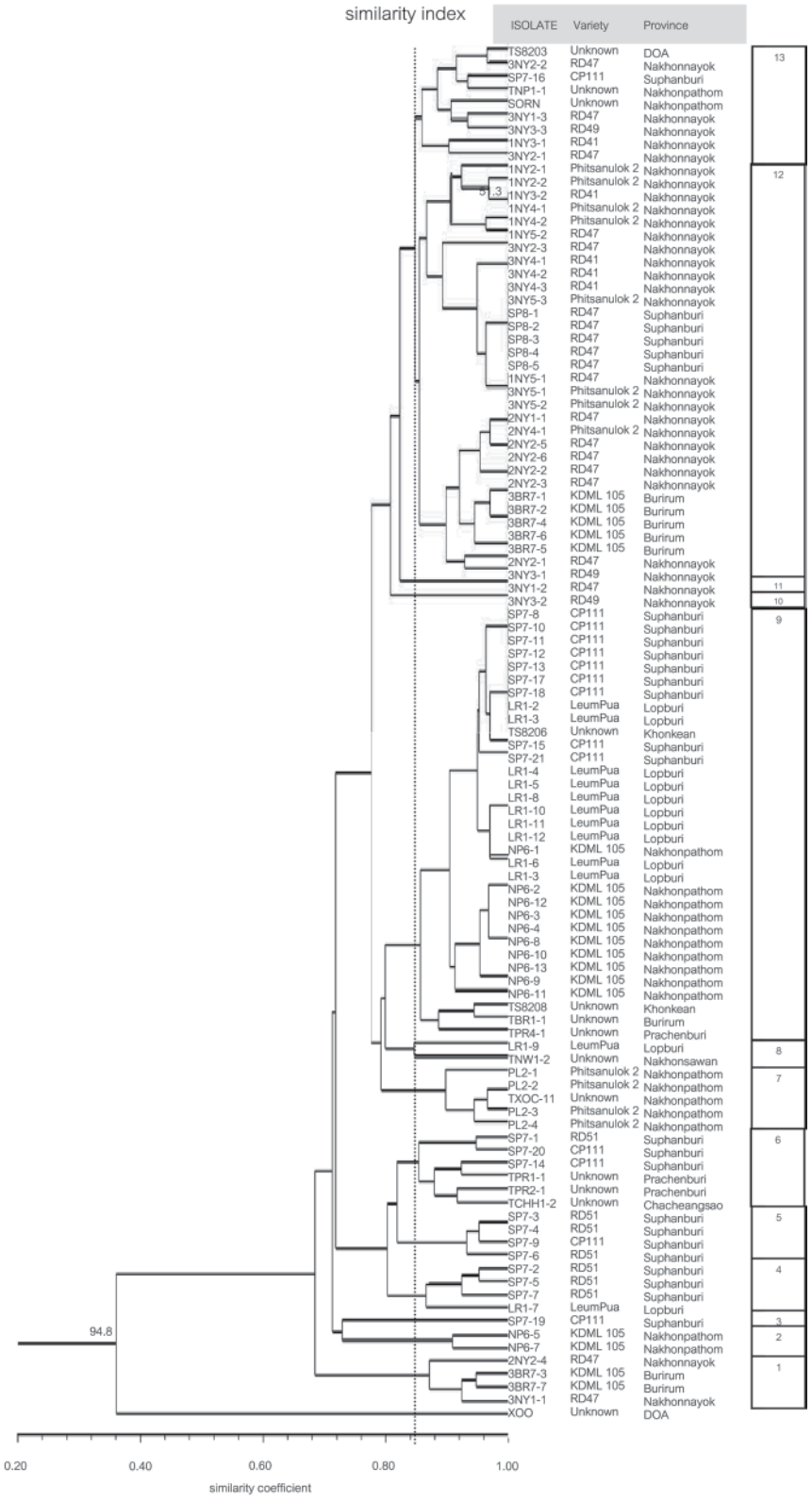
สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XOC ในประเทศไทย จำนวน 103 ไอโซเลท ที่เก็บในช่วงปี พ.ศ. 2552 – 2556 จากพื้นที่ปลูกข้าว 11 จังหวัดในประเทศไทย ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยไพรเมอร์ BOX, ERIC และ REP พบว่าเชื้อ XOC ในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยแบ่งกลุ่มประชากรเชื้อออกเป็น 5, 13 และ 7 กลุ่มตามลำดับ ที่ค่าความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.85 – 0.92 และเมื่อรวมข้อมูลของทั้ง 3 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 7 กลุ่มที่ค่าความ

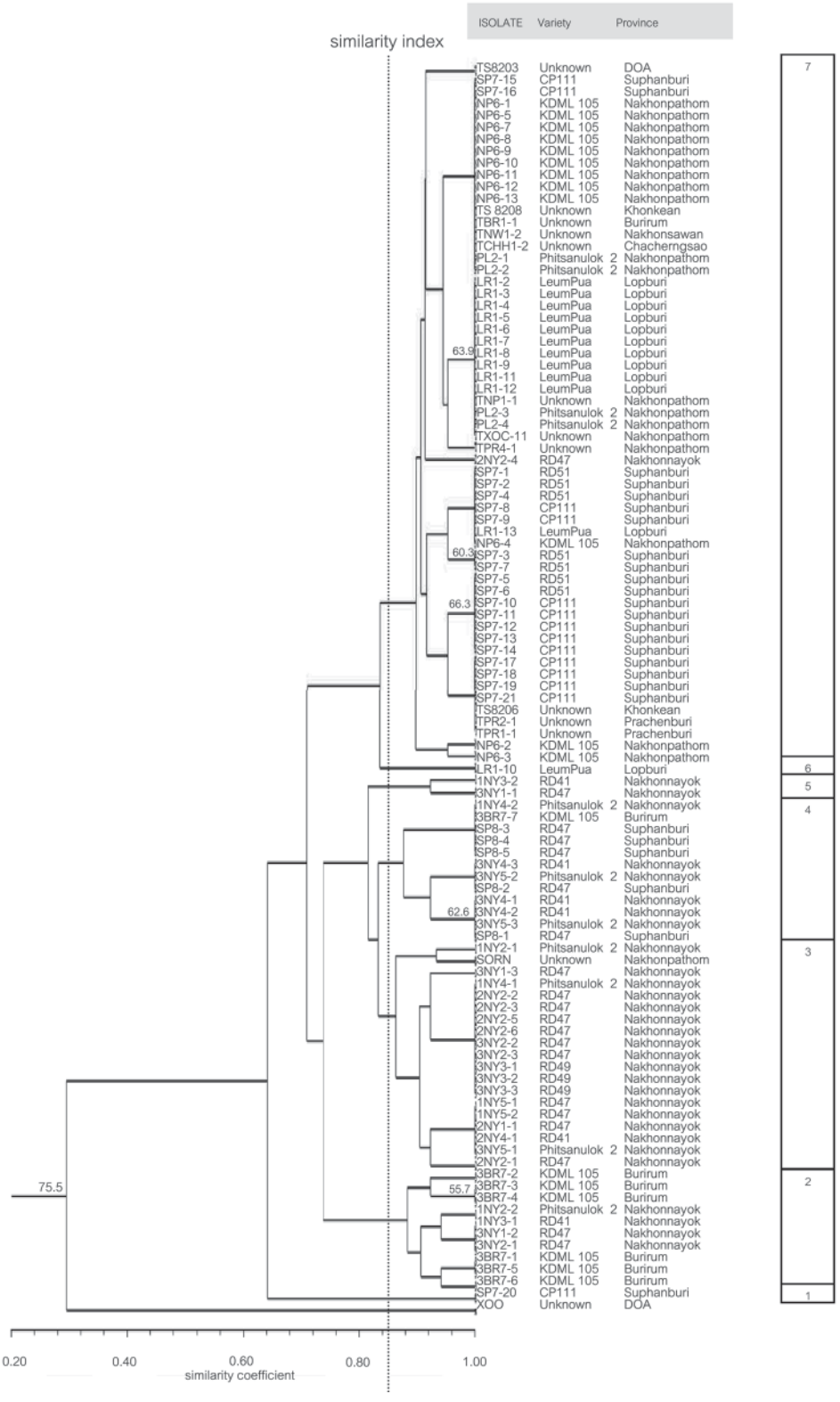
น่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม คือ 0.94 จากผลการจัดกลุ่มเชื้อนี้ พบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่พบเชื้อ แต่ไม่พบความสัมพันธ์โดยตรงกับพันธุ์ข้าวที่นำมาแยกเชื้อ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบขีดโปร่งแสงต่อไป



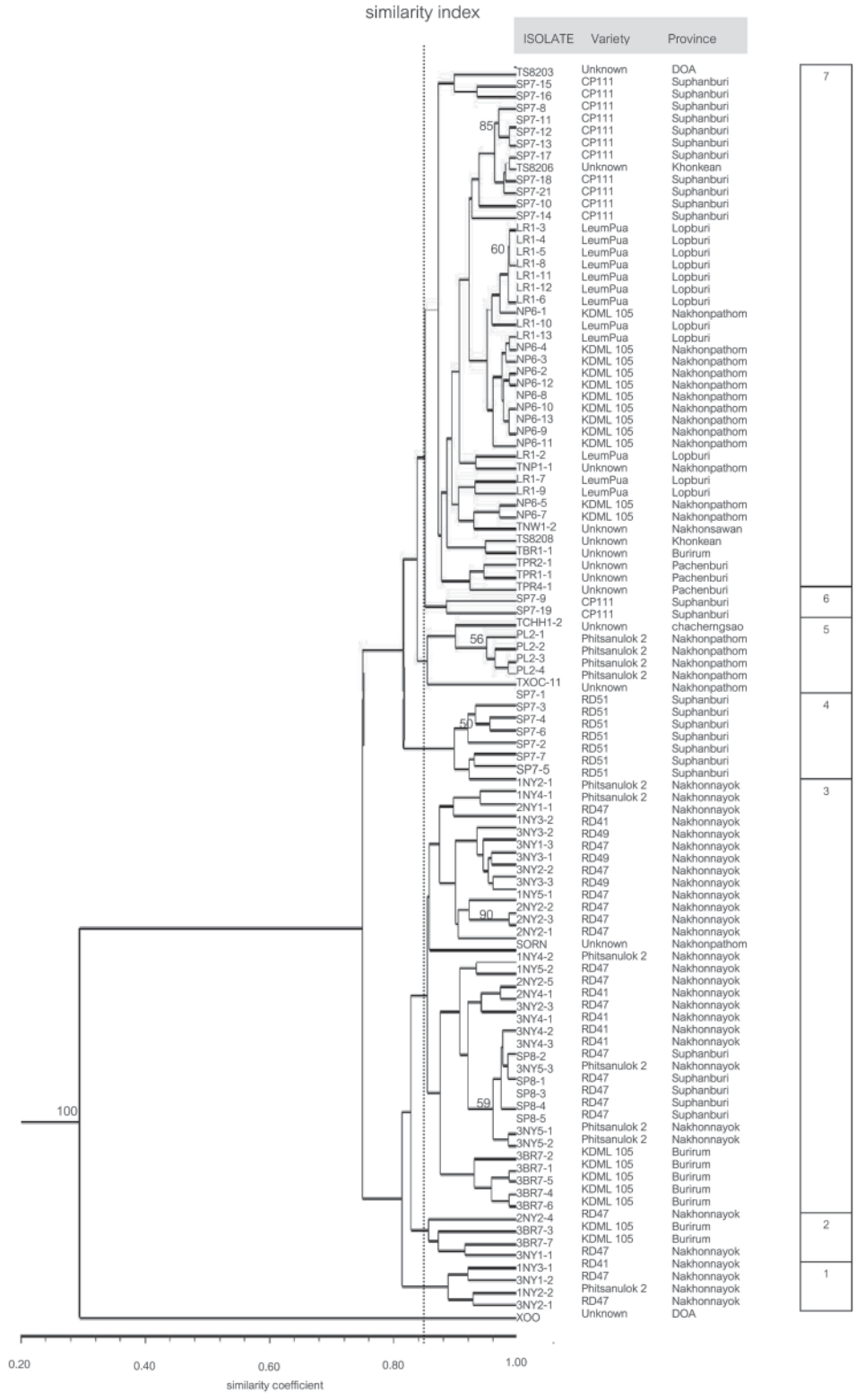
ภาพที่ 1 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่ได้จากเทคนิค rep-PCR ด้วย ไพรเมอร์ BOX วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)



ภาพที่ 2 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่ได้จากเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)



ภาพที่ 3 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่ได้จากเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)



ภาพที่ 4 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ที่ได้จากเทคนิค rep-PCR รวม 3 ไพรเมอร์ คือ BOX, ERIC และ REP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)

ตารางที่ 1 แหล่งเก็บและคุณสมบัติของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* จำนวน 103 ไอโซเลทที่ใช้ศึกษา

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ปีที่เก็บ	พันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อ	ทดสอบการเกิดโรค	ตรวจเชื้อด้วย PCR
TBR1-1	บุรีรัมย์	2552	-*	+	+
TPR2-1	ปราจีนบุรี	2552	-	+	+
TPR4-1	ปราจีนบุรี	2552	-	+	+
TNW1-2	นครสวรรค์	2552	-	+	+
TS8206	ขอนแก่น	2553	-	+	+
TS8208	ขอนแก่น	2553	-	+	+
TPR1-1	ปราจีนบุรี	2553	-	+	+
TNP1-1	นครปฐม	2553	-	+	+
TCHH1-2	ฉะเชิงเทรา	2553	-	+	+
PL2-1	นครปฐม	2553	พิษณุโลก 2	+	+
PL2-2	นครปฐม	2553	พิษณุโลก 2	+	+
PL2-3	นครปฐม	2553	พิษณุโลก 2	+	+
PL2-4	นครปฐม	2553	พิษณุโลก 2	+	+
TXOC-11	นครปฐม	2553	-	+	+
SORN	นครปฐม	2553	-	+	+
SP7-1	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-2	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-3	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-4	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-5	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-6	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-7	สุพรรณบุรี	2555	กข51	+	+
SP7-8	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-9	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-10	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-11	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-12	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-13	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-14	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-15	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ปีที่เก็บ	พันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อ	ทดสอบการเกิดโรค	ตรวจเชื้อด้วย PCR
SP7-16	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-17	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-18	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-19	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-20	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
SP7-21	สุพรรณบุรี	2555	CP111	+	+
LP1-2	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-3	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-4	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-5	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-6	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-7	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-8	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-9	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-10	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-11	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-12	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
LP1-13	ลพบุรี	2555	ลืมผัว	+	+
2NP6-1	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-2	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-3	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-4	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-5	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-7	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-8	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-9	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-10	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-11	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
2NP6-12	นครปฐม	2555	KDML105	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ปีที่เก็บ	พันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อ	ทดสอบการเกิดโรค	ตรวจเชื้อด้วย PCR
2NP6-13	นครปฐม	2555	KDML105	+	+
1NY2-1	นครนายก	2555	พิษณุโลก 2	+	+
1NY2-2	นครนายก	2555	พิษณุโลก 2	+	+
1NY3-1	นครนายก	2555	กข41	+	+
1NY3-2	นครนายก	2555	กข41	+	+
1NY4-1	นครนายก	2555	พิษณุโลก 2	+	+
1NY4-2	นครนายก	2555	พิษณุโลก 2	+	+
1NY5-1	นครนายก	2555	กข47	+	+
1NY5-2	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY1-1	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-1	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-2	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-3	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-4	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-5	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY2-6	นครนายก	2555	กข47	+	+
2NY4-1	นครนายก	2555	กข41	+	+
3BR7-1	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-2	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-3	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-4	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-5	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-6	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3BR7-7	บุรีรัมย์	2555	KDML105	+	+
3NY1-1	นครนายก	2556	กข47	+	+
3NY1-2	นครนายก	2556	กข47	+	+
3NY1-3	นครนายก	2556	กข47	+	+
3NY2-1	นครนายก	2556	กข47	+	+
3NY2-2	นครนายก	2556	กข47	+	+
3NY2-3	นครนายก	2556	กข47	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ปีที่เก็บ	พันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อ	ทดสอบการเกิดโรค	ตรวจเชื้อด้วย PCR
3NY3-1	นครนายก	2556	กข49	+	+
3NY3-2	นครนายก	2556	กข49	+	+
3NY3-3	นครนายก	2556	กข49	+	+
3NY4-1	นครนายก	2556	กข41	+	+
3NY4-2	นครนายก	2556	กข41	+	+
3NY4-3	นครนายก	2556	กข41	+	+
3NY5-1	นครนายก	2556	พิษณุโลก 2	+	+
3NY5-2	นครนายก	2556	พิษณุโลก 2	+	+
3NY5-3	นครนายก	2556	พิษณุโลก 2	+	+
SP8-1	สุพรรณบุรี	2556	กข47	+	+
SP8-2	สุพรรณบุรี	2556	กข47	+	+
SP8-3	สุพรรณบุรี	2556	กข47	+	+
SP8-4	สุพรรณบุรี	2556	กข47	+	+
SP8-5	สุพรรณบุรี	2556	กข47	+	+

หมายเหตุ *- หมายถึง ไม่ทราบพันธุ์

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการจัดกลุ่มเชื้อจากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* จำนวน 103 ไอโซเลท โดยเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX

ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (% Polymorphism)	ค่า Cophenetic correlation (r)	จำนวนกลุ่มเชื้อที่แยกได้
BOX	30	25	83.3	0.92396	5
ERIC	35	25	71.4	0.85885	13
REP	25	15	60.0	0.91834	7
รวม 3 ไพรเมอร์	90	65	72.2	0.94532	7

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุน จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้โปรแกรม “ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยในอนาคต” ในโครงการผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำของข้าว ประจำปีงบประมาณ 2554

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 2011. Specific survey designing. Available Source: http: //aciar.gov.au/files /node/8516/MN119c%20Part%203.pdf. 2 July 2014.

Gonzalez, C., B. Szurek, C. Manceau, T. Mathieu,Y. Sere and V. Verdier. 2007. Molecular and pathotypic characteriza tion of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. Molecular Plant-Microbe Interactions 20(5): 534-546.

Keawwan, R, S. Patarapuwadol, W. Kositrata na and N. Kositcharoenkul. 2012. Potential re-emerging of bacterial leaf streak disease of rice in Thailand. *In* Proceeding of The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases. 7 - 10 February 2012. The Empress hotel, Chiang Mai,Thailand .

Lang, J. M., J. P. Hamilton, M. G. Q. Diaz, M. A. Van Sluys, M. R. G. Burgos, C. M. Vera Cruz, C. R. Buell, N. A. Tisserat and J.E. Leach. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv.*ory zicola*. Plant Disease 94:311-319.

Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. T. Stephns and F. J. D. Bruijn. 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.

Louws, J. L. W. Randemaker and F. J. D. Bruijn. 1999. The three ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. Annual Reviews of Phytopathology 37: 81-125.

Mew, T. W. and J. K. Mistra. 1994. A Manual of Rice Seed Health Testing. IRRI, Manila.

OEPP/EPPO. 2007. Xanthomonas oryzae quar antine pests for Europe. 2nd ed. pp. 1129–1136. CAB International, Walling ford (GB). Available Source: http://www. eppo.int/QUARANTINE/bacteria/ Xan thomonas_oryzae/XANTOR_ds.pdf, March 14, 1998.

Pan, R. W., W. C. Zou, D. G. Xu, R. Q. Pan and C. Y. Ji. 2010. Genotypic and pathotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *ory zicola* in southern China. Phytopathology 90: 415-421.

Raymundo, A. K., A. M. Briones, Jr, E. Y. Adales, M. T. Perez, L. C. Fernandez, J. E. Leach, T. W. Mew, M. A. Ynalvez, C. G. McLaren

and R. J. Nelson. 1999. Analysis of DNA polymorphism and virulence in Philippine strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola.* Plant Disease 83: 434-440.

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 Thai Phytopathological Society 25(1-2): 56-59. (in Thai)

Vera Cruz, C. M., E. Y. Ardales, D. Z. Skinner, J. Talag, R. J. Nelson, F. J. Louws, H. Leung, T. M. Mew and J. E. Leach. 1996. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. Phytopathology 86: 1352-1359.

Versalovic, J., T. Koeuth and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterium and application of fingerprinting of bacterium genomes. Nucleic Acids Research 19: 6823-6831.

Wonni, I., L. Detemmerman, S. Dao, L. Ouedraogo, S. Soungalo, O. Koita, B. Szurek, R. Koebnik, L. Triplett, B. Cottyn and V. Verdier. 2011. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* strains from West Africa. Phytopathology 101: S193

Yap, I. V. and R. J. Nelson. 1996. Winboot a program for performing bootstrap analysis of binarydata to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. IRRI discussion paper series 14. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines. 22p.

Zhang, L. X., T. He, J. H. Yu and G. J. Tan. 2014. Analysis of genetic structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* population from Anhui Province. Acta Phytopathologica Sinica 44(5): 521-526.