



วิทยานิพนธ์

ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุ
โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

BIOLOGY AND DETECTION
OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
CAUSING CITRUS CANKER DISEASE IN THAILAND

นางณัฐจิมา โหมิตเจริญกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืช
ตระกูลส้มในประเทศไทย

Biology and Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Causing Citrus Canker
Disease in Thailand

นามผู้วิจัย นางณัฏฐิมา โหมิตเจริญกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โหมสิตรัตน์, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์อรรถวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์นิพนธ์ ทวีชัย, Ph.D.)

รักษาราชการแทน
ประธานสาขาวิชา

(ศาสตราจารย์สุนทรี ยิ่งชัชวาลย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน ๗.๗ พ.ศ. ๒๕๕๐

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

Biology and Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing citrus canker disease in Thailand

โดย

นางณัฐริมา โหมยิตเจริญกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2550

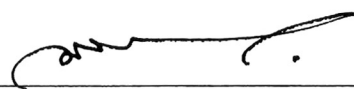
ณัฐริมา โมยิตเจริญกุล 2550: ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุ
โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย ปรินญาปรัชญาคุณภักดิ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัย โมศิริตัน, Ph.D. 136 หน้า

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญพบระบาดทำความเสียหายอย่างกว้างขวางในแหล่งปลูกส้มในประเทศไทย จากการศึกษาลักษณะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 113 สายพันธุ์ พบว่า เป็นแกรมลบ มีหางเดี่ยวที่ส่วนปลาย ใช้ออกซิเจน รูปร่างท่อนตรง ขนาด $0.5 \times 1.7 \mu\text{m}$ สามารถย่อยแป้ง เจลาติน เคซีน และทวิน 80 สร้างเอ็นไซม์ lecithinase สาร acetoin และก๊าซไข่เน่า ไม่รีดิวซ์ไนเตรด ไม่ใช้ arginine และ gluconate ไม่สร้างเอ็นไซม์ urease เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 36°C และที่ความเข้มข้นของ NaCl 3% 5% และ 7% สามารถใช้น้ำตาล arabinose esculin xylose fructose galactose mannose maltose lactose trehalose sucrose glycerol mannitol glycogen dextrin malonate citrate succinate และ ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-methyl D-glucoside raffinose inositol inulin dulcitol gluconate oxalate acetate และ tartrate มีความผันแปรในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ rhamnose salicin และ sorbitol เชื้อทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์บนพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน เลมอน เกรฟฟรุต และส้มโอ

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ของประเทศไทย ด้วยเทคนิค rep PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX และ ERIC พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อกลุ่ม canker A ยกเว้นเชื้อ 4 สายพันธุ์ที่มาจากส้มโอ จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2547 ที่แตกต่างออกจากกลุ่ม

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1 (GGCCTGATCAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ออกแบบจากยีน *pthA* และวิธี one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/pth3R (GGTGAGGGGGCAGGG GGAGA) และ D3 (GGTGT GGTGCCTCGATAGAT)/D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT) ซึ่งออกแบบจากยีน *pthA* เปรียบเทียบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาเชื้อได้ โดยให้ความไวในการตรวจของดีเอ็นเอของเชื้อที่ 25 และ 0.5 pg/ปฏิกิริยา ตามลำดับ และ เซลล์แขวนลอยที่ 8.1×10^2 และ $9.4 \text{ CFU/ปฏิกิริยา}$ ตามลำดับ จากการนำวิธี immunomagnetic separation มาใช้ร่วมกับวิธี one tube nested PCR (IMS-nested PCR) ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้มพบว่า มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ 5.8 เซลล์/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี nested PCR 10 เท่า และจากการนำวิธี IMS-nested PCR ไปทดสอบในการตรวจหาเชื้อจาก 50 ตัวอย่างของพืชตระกูลส้มในแปลงปลูกพบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่นๆ สามารถตรวจหาเชื้อได้ทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ โดยตรวจพบเชื้อถึง 44 ตัวอย่าง (88%) ในขณะที่วิธี nested PCR และ PCR ตรวจได้ 38 ตัวอย่าง (76%) และ 15 ตัวอย่าง (30%) ตามลำดับ

ณัฐริมา โมยิตเจริญกุล
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

29 / พ.ค. / 2550

Nuttima Kositcharoenkul 2007: Biology and Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Causing Citrus Canker Disease in Thailand. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 136 pages.

Citrus canker disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, is serious diseases of *Citrus* spp. in worldwide including Thailand. Biochemical and physiological characteristic studies of 113 strains of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand isolated strains were performed. *X. axonopodis* pv. *citri* is a rod shaped with 0.5x1.7µm in size, Gram-negative aerobic bacterium, single polar flagellum, utilization of starch, gelatin, casein, tween 80 and esculin hydrolysis positive, lecithinase and hydrogen sulfide production, nitrates not reduced, arginine and gluconate utilization negative, urease negative, growth at 36°C and tolerance NaCl 3% 5% and 7%. They can utilized of arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose maltose, lactose, trehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, malonate, citrate, and succinate but can not utilized L-methyl D-glucoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, oxalate, and acetate. They were varied on the utilization of rhamnose, sorbitol, and salicin. All strains produced typical erumpent bacterial canker lesions on Mexican lime, sweet orange, grapefruit, lemon and pomelo.

The rep PCR with BOX and ERIC primers was used for characterization of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand. The result showed that most of bacterial strains of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand were grouped with canker A group. However, four strains of *X. axonopodis* pv. *citri* isolated from pomelo at Kanchanaburi province in 2004 were different.

The detection of *X. axonopodis* pv. *citri* was successfully done by using PCR with primers D1(GGCCTTGATCAAAAGAACCA)/D2 (TTGAAGTAGGGGACG GTTTA) and one tube nested PCR with primer Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/ pth3R (GGTGAGGGGGCAGGGGG AGA) and D3(GGTGT GGTGCCTCGATAGAT)/ D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT). All primers were designed from *pthA* gene. The sensitivity of detection by PCR and one tube nested PCR were at the minimum DNA concentration of 25 and 0.5 pg/reaction respectively and the lowest concentration of cell suspension at 8.1x10² and 9.4 CFU/reaction respectively. An immunomagnetic separation and nested PCR method (IMS-nested PCR) were developed for detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in the field sample. The results showed that IMS-nested PCR assay had high specificity for *X. axonopodis* pv. *citri*. The sensitivity for detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in plant extract was 5.8 cells/reaction and 10-fold more sensitive than the nested PCR. With 50 samples of naturally infected material, The IMS-nested PCR achieved better results than other PCR techniques. The IMS-nested PCR can detect *X. axonopodis* pv. *citri* in symptomatic and asymptomatic samples and showed positive results in 44 samples (88%), whereas nested PCR and PCR and showed positive results in 38 samples (76%) and 15 samples (30%), respectively.

Nuttima Kositcharoenkul

Student's signature



Thesis Advisor's signature

29 / May / 2007

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โฉมรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ในความกรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อรรณพ ชีवालการพาณิชย์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ ทวีชัย กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริภัทร พรหมณีย์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณ คุณอุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช ที่ได้กรุณาให้ตัวอย่างเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli* สายพันธุ์ canker B, C และ D และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณทิพวรรณ กันหาญติ และพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานבקเทรีวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณพี่ ๆ น้องๆ นักวิชาการโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณ ทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในเรื่องการศึกษาตลอดมา

ณัฐริมา ไม้ยิตเจริญกุล

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	41
ผล	41
วิจารณ์	86
สรุป	96
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เปรียบเทียบการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ D1/D2 ไพรเมอร์ Pth 3F/ Pth 3F และ ไพรเมอร์ D3/D4 ที่ออกแบบจากยีน avirulence/ pathogenicity (<i>pthA</i>) ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
3	สารเคมีและโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ D1/D2, 2/3 และ one tube nested PCR ด้วยไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
4	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้
5	การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีระหว่างสายพันธุ์ของแคงเกอร์จากประเทศไทย สายพันธุ์ของแคงเกอร์ A จากญี่ปุ่นและสายพันธุ์ของแคงเกอร์ B จากอาร์เจนตินา
6	การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้น้ำตาลระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากประเทศไทย สายพันธุ์ของแคงเกอร์ A จากญี่ปุ่นและสายพันธุ์ของแคงเกอร์ B จากอาร์เจนตินา
7	เปรียบเทียบการทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยตระกูลส้ม 5 ชนิด ด้วยเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆกับเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่พบในประเทศไทย
8	ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 939 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/D2
9	ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเซลล์ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 939 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/D2

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	เปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจสอบเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ D1/D2 และไพรเมอร์ 2/3 วิธี one tube nested PCR ด้วยไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 และ วิธี IMS ร่วมกับ nested PCR	72
11	ความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 939 โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4	73
12	ความไวในการตรวจสอบเซลล์ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 939 โดยไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4	74
13	ผลของน้ำคืบสั้ม ไอต่อปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	76
14	เปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างจากใบพืชตระกูลส้ม ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ด้วยเทคนิค PCR, one tube nested PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะ	77
15	การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ในน้ำคืบสั้มด้วยวิธี IMS-nested PCR กับวิธี standard PCR และ วิธี one tube nested PCR	81
16	การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ของตัวอย่างจากแปลงปลูก	82

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ตำแหน่งของยีน <i>pthA</i> บนพลาสมิด pXAC64 ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> และ โคอะแกรมแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ D1, D2, Pth3F, Pth3R, D3 และ D4 บนยีน <i>pthA</i>	31
2 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่เกิดในธรรมชาติและจากการปลูกเชื้อบนใบมะนาวและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค	42
3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX	59
4 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ BOX	60
5 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ที่แยกจากส้มโอในประเทศไทย ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ BOX	61
6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC	62
7 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC	63
8 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ที่แยกจากส้มโอในประเทศไทย สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1และ D2 กับดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์ 66
10	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 กับดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์ 71
11	การเปรียบเทียบความไว(sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)ในน้ำใบส้มด้วยวิธี standard PCR (A), วิธี one tube nested PCR (B) และ วิธี IMS-nested PCR (C) 80
12	การเปรียบเทียบความเหมือนของการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์D1และD2 ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> กับยีน <i>pthA</i> โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST N จาก เว็บไซต์ http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 84
13	การเปรียบเทียบความเหมือนของการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 ในการตรวจหาเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> กับยีน <i>pthA</i> โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST N จาก เว็บไซต์ http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 85

ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของ พืชตระกูลส้มในประเทศไทย

Biology and Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing citrus canker disease in Thailand

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตสินค้าเกษตรแหล่งใหญ่แห่งหนึ่งของโลก มีสินค้าเกษตรหลายชนิดที่มีศักยภาพในการส่งออก พืชตระกูลส้มจัดเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ส้มเขียวหวาน (Tangerine) (*Citrus reticulata* Blanco), ส้มตรา (Sweet orange) (*C. sinensis* (L.) Osbeck), มะนาว (Lime) (*C. aurantifolia* Swingle) ส้มโอ (Pomelo) (*C. maxima* Burm) เป็นต้น ถิ่นกำเนิดดั้งเดิมของพืชตระกูลส้มอยู่ในแถบเอเชียอาคเนย์ แต่สามารถปลูกได้ดีและแพร่หลายทั่วไปในบริเวณกึ่งเขตร้อน เขตร้อน เขตอบอุ่นของโลก ทั้งในยุโรปและอเมริกา (ไชยา, 2531) ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดพืชตระกูลส้มแห่งหนึ่ง มีการปลูกพืชตระกูลส้มเป็นจำนวนมาก เนื่องจากภูมิอากาศของประเทศไทยเหมาะแก่การเจริญเติบโตของพืชตระกูลส้ม จึงทำให้มีการปลูกพืชตระกูลส้มได้เกือบทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกพืชตระกูลส้มที่สำคัญของประเทศไทย ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ น่าน พิจิตร กำแพงเพชร เป็นต้น ภาคกลางได้แก่ จังหวัด ปทุมธานี สระบุรี ชัยนาท อุดรธานี เพชรบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม กาญจนบุรี เป็นต้น ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร นราธิวาส เป็นต้น จากสถิติการเพาะปลูกปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้มประมาณ 705,352 ไร่ แยกออกเป็นพื้นที่ปลูกส้มแต่ละชนิดดังนี้ ส้มเขียวหวาน พื้นที่ปลูกรวม 465,321 ไร่ ผลผลิตรวมทั้งหมด 585,796.58 ตัน ส้มโอ พื้นที่ปลูกรวม 229,051 ไร่ ผลผลิตรวมทั้งหมด 238,600.23 ตัน ส้มตรา ส้มเกลี้ยง ส้มจุก มีพื้นที่ปลูกรวม 10,980 ไร่ ผลผลิตรวม 7,774.50 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547) ประเทศไทยส่งผลไม้ในกลุ่มพืชตระกูลส้มออกไปยังต่างประเทศเป็นจำนวนมากในปี 2547 มีมูลค่าทั้งสิ้น 176.4 ล้านบาท โดยมีส้มโอมีปริมาณและมูลค่าส่งออกมากที่สุด ปริมาณส่งออก 7,313 เมตริกตัน มูลค่า 102 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการปลูกพืชตระกูลส้มของประเทศไทย คือปัญหาเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) ในประเทศอเมริกามีรายงานการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว และทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมส้มเป็นจำนวนมากจนทำให้รัฐบาลกลางออกกฎควบคุมการระบาด และใช้เงินเป็นจำนวนมากในการป้องกันกำจัด (Schoulties *et al.*, 1987) แต่ปัจจุบันนี้ก็ยังมียางานการระบาดของโรคแคงเกอร์ในอเมริกา (Schubert *et al.*, 1996) โรคนี้ที่พบแพร่ระบาดมากในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ที่มีอุณหภูมิสูงและฝนตกชุก (Civerolo, 1994) โรคแคงเกอร์มีจุดกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และปัจจุบันระบาดไปทั่วโลก โดยพบโรคนี้ระบาดมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (EPPO/CABI, 2005) ประเทศไทยพบโรคแคงเกอร์นี้ระบาดอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะฤดูฝนการระบาดของโรคจะยิ่งรุนแรงขึ้นโรคทำให้ต้นโทรม ผลผลิตลดลง และคุณภาพของผลต่ำ การระบาดของโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยสามารถแพร่กระจายโดยติดไปกับผลและกิ่งพันธุ์พืชตระกูลส้ม โดยเฉพาะกิ่งพันธุ์ ถ้ามีโรคนี้ติดไปจะทำให้เกิดการระบาดไปยังต้นอื่น ๆ ต่อไป

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญทางกักกันพืชของหลายประเทศ เชื้อสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย โดยเฉพาะสหภาพยุโรป เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรง (EPPO/CABI, 2005) การนำเข้าพืชตระกูลส้ม จึงมีกฎหมายและระเบียบควบคุม การนำเข้าอย่างเข้มงวด

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตส้มโอรายใหญ่ ที่มีส้มโอพันธุ์ดี ตรงความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ นโยบายที่สำคัญของการส่งออกส้มโอไปขายต่างประเทศของประเทศไทย มุ่งเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตส้มโอคุณภาพ เพื่อให้เป็นผู้นำในการผลิตและการตลาดส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) สหภาพยุโรป เป็นตลาดใหญ่แห่งหนึ่งของโลกมีความต้องการนำเข้าส้มโอ แต่ติดเรื่องกฎหมายและระเบียบการนำเข้าที่เข้มงวด ทำให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในฐานะผู้รับผิดชอบในเรื่องนี้ ต้องหามาตรการแก้ไขให้สอดคล้องกับกฎหมายและระเบียบการนำเข้าของสหภาพยุโรป โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures; ISPM) ฉบับที่ 10 มีข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช และหาวิธีการเฝ้าระวังและติดตาม ตลอดจนพัฒนาวิธีการตรวจสอบรับรองแปลง

ปลูกพืชให้เป็นที่ยอมรับของประชนนาเข้า ซึ่งการเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเกอร์และวิธีการตรวจรับรองแปลง จำเป็นต้องทราบชนิดและลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทยให้ละเอียดและสามารถวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้อง และที่สำคัญต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ วิธีการอนุชีววิทยา เป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ ในขณะที่การใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยามีข้อจำกัดในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อซาโปรไฟต์ชนิดอื่นๆทำให้เกิดผิดพลาดในการตรวจสอบ นอกจากนี้วิธีทางเซรุ่มวิทยายังมีความไวในการตรวจสอบต่ำกว่าวิธีทางอนุชีววิทยา

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มที่พบในประเทศไทย และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยเทคนิคอนุชีววิทยา

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มที่พบในประเทศไทย
2. พัฒนารูปแบบการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

การตรวจเอกสาร

โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) พืชตระกูลส้ม (*Citrus spp.*) เกือบทุกชนิดพบว่ามีโรคแคงเกอร์ระบาดทำลายทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงมากโรคหนึ่ง โรคนี้สามารถเกิดได้กับทุกส่วนของต้นและมักจะพบระบาดรุนแรงในฤดูฝน (อำไพวรรณ, 2527) เมื่อเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายอย่างรุนแรงจะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วง ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ ผิวไม่สวยและต้นแคระแกร็นถึงตายได้ (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

โรคแคงเกอร์เป็นที่รู้จักดีและเริ่มก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในหลายประเทศ (Fawcett, 1936) โรคแคงเกอร์มีแหล่งกำเนิดจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบจากส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ที่ได้มาจากพื้นที่นั้นๆ ในราวกลาง ค.ศ. 1800 และคาดคะเนว่าโรคแคงเกอร์แพร่กระจายจากเกาะในหมู่เกาะมหาสมุทรแปซิฟิกไปยังญี่ปุ่น ในสหรัฐอเมริกาพบโรคแคงเกอร์นี้ครั้งแรก โดยติดมากับท่อนพันธุ์ของต้นส้มในปี 1910 ที่ส่งมาจากญี่ปุ่น ต้นส้มที่มีโรคแคงเกอร์จากญี่ปุ่นได้นำไปปลูกในมลรัฐฟลอริดาและเท็กซัส ทำการขยายพันธุ์และนำไปปลูกต่อตามแหล่งต่าง ๆ ของมลรัฐอลาบามา, จอร์เจีย, หลุยส์เซียนา, มิสซิสซิปปี, และเซาท์แคโรไลนา (Schoulties *et al.*, 1987) ซึ่งกิ่งพันธุ์ส้มที่ได้ขยายพันธุ์ โดยการตอนกิ่งหรือทาบกิ่ง ที่มีเชื้อนี้แพร่กระจายทำให้เกิดการระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่นๆ โดยในฟลอริดาซึ่งเป็นแหล่งปลูกส้มที่ใหญ่ พบการระบาดรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียแคงเกอร์ ในปี 1917 ในแหล่งปลูกส้มต่างๆ ทั้งในบริเวณ Gulf Coast State และ Rio Grande Valley ทำให้มีการณรงค์เพื่อกำจัดทำลายต้นส้มที่เป็นโรค โดยความร่วมมือกันของผู้ปลูกส้มในมลรัฐฟลอริดา (Schoulties *et al.*, 1987) มลรัฐฟลอริดาได้ร่วมมือกับรัฐบาลกลางของประเทศสหรัฐอเมริกาทำการรณรงค์กำจัดโรคนี้จนหมด โดยเริ่มกำจัดในปี 1917 ต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ถูกทำลาย จนถึงในปี 1933 มลรัฐฟลอริดาจึงปลอดจากโรคแคงเกอร์ส้ม รัฐบาลใช้เงินในการกำจัดจำนวนมากถึง 6 ล้านดอลลาร์อเมริกา ในปี 1947 ต้นส้มที่เป็นโรคนี้ได้ถูกกำจัดให้หมดไปจากสหรัฐอเมริกา (Stall and Seymour, 1983) นอกจากนี้ในอเมริกายังมีมาตรการทางกักกันพืช ที่ทำคู่ขนานกันไปกับการกำจัดให้หมดสิ้นของต้นส้มที่เป็นโรค มีข้อจำกัดที่เข้มงวดในการนำสินค้าพวกส้มหรือต้นส้มเข้าประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศผู้ส่งสินค้าพวกส้มเข้าประเทศสหรัฐอเมริกา ต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดของทางสหรัฐอเมริกาและต้องมีใบรับรองว่าปลอดจากโรคนี้ (Stall and

Seymour, 1983) ในแหล่งปลูกส้มอื่นๆ เช่น อเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศบราซิล, อาร์เจนตินา, ปารากวัย, อุรุกวัย และเม็กซิโก พบโรคแคงเกอร์ระบาดในแหล่งปลูกส้ม โดยเฉพาะในอาร์เจนตินา สภาพอากาศเหมาะสมสำหรับการแพร่ระบาดของโรคมก ทำให้แพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว ทางรัฐบาลได้พยายามกำจัดโรคแคงเกอร์ให้หมดไปจากประเทศแต่ไม่ได้ผล (Stall and Seymour, 1983) ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีรายงานการระบาดของโรคแคงเกอร์ ได้มีการทำการทดลองโดยใช้ สารประกอบทองแดงฉีดพ่นทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยฉีด 6-7 ครั้ง จะสามารถป้องกันโรคได้ (Stall and Seymour, 1983) ในประเทศไทย ชาวสวนเรียกโรคแคงเกอร์ว่าโรคใบจุดหรือโรคจึกกลาก (อำไพวรรณ, 2527) ในรายงานครั้งแรกประมาณปี 2500-2504 โรคนี้รุนแรงกับมะนาว, ส่วน มะกรูด, ส้มเขียวหวาน, ส้มเกลี้ยง, ส้มคลี่โอพัตรา, ส้มสามใบ อาการไม่รุนแรงมาก (อำไพวรรณ และคณะ, 2527) ตั้งแต่ปี 2515 เป็นต้นมามีรายงานว่าโรคแคงเกอร์ได้ทำความเสียหายให้แก่ ส้มเขียวหวานเป็นจำนวนมาก (วิเชียร, 2519) จนถึงปัจจุบันยังพบการระบาดของโรคแคงเกอร์อย่าง กว้างขวาง ในทุกแหล่งปลูกส้มของไทย ในประเทศไทยนิยมป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ โดยใช้ สารเคมีที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบฉีดพ่นเป็นประจำ สารประกอบทองแดงที่ใช้ได้แก่ คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ คอปเปอร์ออกไซด์ หรือบอร์โดมิกเจอร์ เป็นต้น

อาการของโรคแคงเกอร์

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถเข้าทำลายบริเวณส่วนเหนือดินของพืช ตระกูลส้ม (Goto, 1969) สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชที่อายุน้อย ทั้งใบ กิ่ง ลำต้นและผล โดยส่วนของใบอ่อนและกิ่งอ่อนที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย จะแสดงอาการภายใน 10-12 วัน หลังจากเริ่มแตกยอดอ่อน (EPPO/CABI, 2005) ใบแก่จะมีความต้านทานต่อโรคมกกว่าใบอ่อน เนื่องจากใบแก่มีปากใบที่เปิดแคบ เพราะมีคิวติเคิลปกคลุมทำให้ปากใบหนา เชื้อจึงเข้าทำลายได้ ยาก ในทางตรงกันข้ามใบอ่อนปากใบจะเปิดกว้าง เชื้อจึงเข้าทำลายได้ง่าย (Goto, 1969) เมื่อเชื้อเข้า ทำลายรุนแรง จะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วง ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ ผิวไม่สวย และต้น แคระแกรนอาจตายได้ในที่สุด (อำไพวรรณ, 2527)

อาการที่พบบนใบเริ่มแรก เกิดเป็นจุดกลมขนาดเท่าหัวเข็มหมุด สี และลำนํ้า มีสีซีดกว่าสี ใบปกติ เป็นสีเหลืองโปร่งแสง ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น มีลักษณะฟูคล้ายฟองนํ้าขึ้น มีสีเหลือง อ่อน แผลเกิดขึ้นทั้งสองด้านของใบหรืออาจเกิดเพียงด้านใดด้านหนึ่ง ต่อมาแผลจะเริ่มเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะนูนฟูจะยุบตัวและแตกเป็นสะเก็ดขรุขระและแข็งตรงกลางปุ่มลงไปเล็กน้อย ทุกระยะของการพัฒนาการของโรค บริเวณรอบๆ แผล คลอโรฟิลล์จะซีดลงจากเนื้อเยื่อปกติ ทำให้

ปรากฏเป็นวงสีเหลืองล้อมรอบแผล (halo) แผลจะเกิดในทุกส่วนของใบรวมทั้งก้านใบด้วย ทำให้ใบเหลืองร่วงก่อนกำหนด (วิวัฒน์, 2510; อำไพวรรณ และคณะ, 2527; Fawcett, 1936)

อาการบนกิ่งและต้นมักจะเกิดกับกิ่งอ่อน โดยเฉพาะกิ่งอ่อนของมะนาว แผลที่เกิดขึ้นใหม่คล้ายอาการบนใบ ต่อมาแผลจะแห้ง แตกแข็งเป็นสีน้ำตาล ลามขยายรอบกิ่งหรือขยายตามความยาวกิ่ง รูปร่างแผลไม่แน่นอนและไม่เห็นวงเหลืองล้อมรอบ (วิวัฒน์, 2510; อำไพวรรณ และคณะ, 2527; Fawcett, 1936)

อาการบนผลจะเป็นมากในต้นที่พบโรคมามากที่ใบ ลักษณะอาการคล้ายอาการบนใบแต่จะเกิดเดี่ยวๆ มีลักษณะกลม แผลจะฝังลึกลงไปในผิวของผล แผลจะเริ่มขยายมีขนาดใหญ่เป็นสะเก็ดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน พบวงสีเหลืองล้อมรอบชัดเจน (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse 1915) Vauterin *et al.* 1995

Synonymes: *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson

Xanthomonas campestris pv. *citri* (Hasse) Dye 1978

Xanthomonas campestris pv. *aurantifolii* Gabriel *et al.* 1989

Xanthomonas axonopodis pv. *aurantifolii* (Gabriel *et al.*) Vauterin *et al.* 1995

การจัดจำแนกและระบบการตั้งชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (Taxonomy and Nomenclature)

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ถูกจัดจำแนกและเปลี่ยนแปลงระบบการตั้งชื่อใหม่หลายครั้ง โดยแรกสุดมีการตั้งชื่อคือ *Xanthomonas citri* (Hasse) Dawson ต่อมาได้มีการศึกษารายละเอียดของเชื้อเพิ่มเติมมากขึ้นตามเทคโนโลยีที่เกิดขึ้นเรื่อยมา ในปี 1980 ที่ประชุม International Society for Plant Pathology (ISPP) Dye *et al.* (1980) ได้เสนอให้เปลี่ยนชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เป็น *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye

ในปี 1989 Gabriel *et al.* ได้เสนอให้มีการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บางสายพันธุ์ในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ใหม่จาก *X. campestris* pv. *citri* เป็น *X. campestris* pv. *aurantifolii* โดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของเชื้อจากเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่งในขณะนั้นข้อมูลสนับสนุนอื่นๆ มิได้เพียงพอทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับและตกไป

ในปี 1995 Vauterin *et al.* ได้ศึกษารายละเอียดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เพิ่มเติมโดยศึกษาทางด้าน DNA-DNA hybridization และข้อมูลการใช้แหล่งอาหาร (carbon source) ของเชื้อ โดยใช้ Biolog microplates จึงเสนอเปลี่ยนแปลงชื่อเป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ซึ่งชื่อนี้ได้รับการยอมรับจาก คณะกรรมการระดับนานาชาติจัดทำระบบอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (International committee on the systematic of Bacteria (ICSB)) (Yong *et al.*, 1996)

ต่อมา Schaad *et al.* (2005) ได้เสนอระบบการตั้งชื่อใหม่อีกครั้งโดยทำการศึกษารายละเอียดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เพิ่มเติมทางด้าน DNA-DNA relatedness assays ลำดับเบสของ 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) และผลวิเคราะห์จากเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) จากเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ 44 สายพันธุ์จาก 5 กลุ่มของโรคแคงเกอร์และภายใต้สภาพ DNA reassociation (T_m 15⁰C) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามจีโนมได้เป็น 3 taxon จึงขอเปลี่ยนแปลงจากชื่อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ตามลักษณะ genotype และ pathotype ทั้ง 3 กลุ่มออกเป็น

Taxon I เป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (ex Hasse, 1915) sp. nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker A

Taxon II เป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (ex Gabriel *et al.*, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker B C และ D

Taxon III เป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker E

แต่ระบบการตั้งชื่อของ Schaad *et al.* (2005) ไม่ถูกต้องตามกฎหมายของ ICSB จึงไม่เป็นที่ยอมรับ ต่อมา Schaad *et al.* (2006) จึงได้ตีพิมพ์บทความแก้ไข โดยได้เสนอข้อมูล DNA-

DNA reassociation ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียตามระบบสมัยใหม่ (modern classification) เพื่อสนับสนุนระบบการตั้งชื่อของ Gabriel *et al.* (1989) โดยเสนอเปลี่ยนชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม เป็น *Xanthomonas citri* pv. *citri* ซึ่งบทความนี้พิมพ์ในวารสาร Systematic and applied microbiology ประจำเดือน ธันวาคม 2006 และยังไม่มีการตอบรับจาก ICSB

ชีววิทยา (Biology) และ ลักษณะ (Characteristic) ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นแกรมลบ (gram negative) เซลล์เดี่ยว รูปท่อน (rod shape) ขนาด 0.5-0.75 x 1.5-2.0 ไมโครเมตร เป็นพวกที่มี flagellum อันเดียวอยู่ด้านข้าง (polar flagella) จะเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25-30 °C (วิวัฒน์, 2510; Fawcett, 1936) โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองเป็นมันเยิ้ม ขอบเรียบนูน (วิวัฒน์, 2510) จากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่าเชื้อไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ เกิด H₂S ไม่สามารถเกิดกรดและแก๊สในน้ำตาลต่างๆ ไม่สร้างสารพวกอินโดล (indole) สามารถย่อยแป้ง ย่อยสาร aesculin ย่อย casein และ gelatin ได้ (Goto *et al.*, 1980) สร้างเอ็นไซม์ catalase และ tyrosinase ไม่สามารถสร้างพวก oxidase และ carbohydrate พบว่าสามารถใช้ glucose, galactose, mannose, trehalose, sucrose, maltose และ mannitol แต่ไม่สามารถใช้ arabinose, rhamnose และ sorbitol (วิวัฒน์, 2510)

การจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

จากการศึกษาทางการแพร่ระบาดในสถานที่ต่างๆ (Geographic distribution), พืชอาศัย (Host range) ทำให้แบ่งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ออกเป็น 5 กลุ่ม :

1. CBCD-A (citrus bacterial canker disease-A) เป็นพวก Asiatic canker หรือ Canker A หรือ common form เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุด (Schubert *et al.*, 2001) พบระบาดเรื้อรังในเอเชีย, แอฟริกา, หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก (oceania) และในอเมริกาใต้ เชื้อสาเหตุของโรคในกลุ่มนี้จะเป็นพวกที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด Verniere *et al.* (1998) ได้รายงานการศึกษาลักษณะทาง phenotype ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่พบในแถบประเทศทางเอเชียตะวันตก

เฉียงใต้หรือตะวันออกกลาง ได้แก่ โอมาน ซาอุดีอาระเบีย อิหร่าน และอินเดีย พบว่าเชื้อที่พบสามารถทำให้เกิดโรคร่วมมะนาวเท่านั้นและพบว่าลักษณะทาง phenotype และ genotype คล้ายคลึงกับ canker A แต่ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาแตกต่างกันจึงแยกออกมาจากกลุ่ม cankerA เป็นสายพันธุ์ canker A* ต่อมา Sun *et al.* (2004) ได้รายงานการพบสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มลรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้เกิดโรคได้เฉพาะในมะนาวเท่านั้น เรียกว่าสายพันธุ์ cankerA^w

2. CBCD-B (Concrosis B, canker B หรือ flase canker) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบก่อโรคร่วมกับพวงมะนาวหวาน (lemon) ในประเทศอาร์เจนตินา ในปี 1923 (Schubert *et al.*, 2001) ต่อมามีการแพร่ระบาดมายังประเทศใกล้เคียงได้แก่ ประเทศอุรุกวัยและปารากวัย เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเข้าทำลาย มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเปรี้ยว และส้มโอ ได้ แต่ไม่สามารถเข้าทำลายเกรฟฟรุตได้ (Schubert *et al.*, 2001) ปัจจุบันได้มีการเสนอให้แยกเชื้อสาเหตุ canker B ออกมาเป็นตั้งชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*

3. CBCD-C (Maxican lime concrosis) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบก่อโรคเฉพาะมะนาว [lime : *C. aurantifolia* (christm)] Swigh “Mexican” ในประเทศบราซิลในปี 1963 (Schoulties *et al.*, 1987) และพบเฉพาะในประเทศบราซิลเท่านั้น ปัจจุบันได้มีการเสนอให้แยกเชื้อสาเหตุออกมาเป็นชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* เช่นเดียวกับ canker B

4. CBCD-D (Mexican bacteriasis) โดยในปี 1987 ได้พบโรคของ Maxican lime ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุแคงเกอร์ แต่พบในเมืองโกลิมา ประเทศเม็กซิโก พบว่ามักเกิดเป็นแผลลักษณะแคงเกอร์บนใบและกิ่ง ไม่พบบนผล (Schoulties *et al.*, 1987) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่พบในพื้นที่มานานแล้วและปัจจุบันสันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อรา *Alternaria limicola* (Schubert *et al.*, 2001)

5. CBCD-E (Citrus bacterial spot) โดยในปี 1984 ได้เกิดการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ในฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษพบว่าลักษณะอาการของโรคไม่เหมือนโรคแคงเกอร์โดยทั่วๆ ไป พบในต้นกล้าส้ม (nursery form of citrus canker) จากการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาและ phage พบว่าเชื้อแบคทีเรียตัวนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ กับที่กล่าวมาแล้ว แต่พบที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *X. campestris* pv. *alfalfae* จัดเป็นกลุ่มใหม่

(Schoulties *et al.*, 1987) ปัจจุบันได้แยกออกมาตั้งชื่อใหม่ว่า *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Gabriel *et al.*, 1989; Graham and Gootwald, 1991; Stall and Civerolo, 1991)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการทำให้เกิดโรคนบนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ

Canker group	<i>C. sinensis</i> (Sweet orange)	<i>C. paradisi</i> (Grapefruit)	<i>C. limon</i> (Lemon)	<i>C. aurantifolia</i> (Mexican lime)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (canker A)	++++	+++	+++	++++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (canker A*)	-	-	-	++++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (canker A ^w)	-	HR	-	++++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (canker B)	+	+	+++	++++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (canker C)	HR	HR	HR	++++

+ หมายถึง การเกิดโรคนบนพืชอาศัยเล็กน้อย (weak canker)

++++ หมายถึง การเกิดโรครุนแรงบนพืชอาศัย (strong canker)

- หมายถึง ไม่มีอาการโรคแคงเกอร์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Brunings and Gabriel (2003)

พืชอาศัย (host range)

Civerolo (1984) ได้รายงานรายชื่อพืชตระกูล Rutaceae ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ *X. axonopodis* pv. *citri* ดังนี้

พืชตระกูลส้มที่อ่อนแอต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้แก่

เกรฟฟรุต (*C. paradise* Macf)

มะนาว (*C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle)

มะนาวหวาน (*C. limettioides* Tan., Palestine)

ส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)

พืชตระกูลส้มที่อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible)

ส้มตรา (*C. sinensis* (L.) Osbeck)

ส้มจี๊ด (*C. aurantium* L.)

เลมอน (*C. limon* (L.) Burm)

พืชตระกูลส้มที่ต้านทานปานกลาง (Moderately Resistant)

ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata* Blanco)

ส้มโอ (*C. maxima* (Burm) Merr.)

มะนาวตาฮิติ (*C. aurantifolia* (Christ.) Swingle)

พืชตระกูลส้มที่ต้านทานสูง (Highly Resistant)

ซีตรอน (Citron: *C. medica*)

กัมก๊วท (Kumquat: *Fortunella* spp.)

ยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

Swarup (1991) ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงการจำแนกและโคลนยีน *pthA* จากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยพบว่ายีน *pthA* เป็นยีนที่ก่อให้เกิดอาการจุดแผลแห้งแตกสีน้ำตาลของโรคแคงเกอร์อย่างเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลส้ม ยีน *pthA* อยู่บนพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้มีการทดลองยืนยันการเป็นยีนก่อโรคแคงเกอร์อย่างเฉพาะเจาะจงโดย Swarup et al. (1991) ได้แยกยีน *pthA* และใส่เข้าไปในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ แล้วนำไปปลูกเชื้อบนพืชตระกูลส้ม พบว่าสามารถทำให้พืชตระกูลส้มแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ได้ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* ที่ได้รับยีน *pthA* เหล่านั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย เช่น ฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว พบว่าไม่สามารถทำให้พืชอาศัยเหล่านั้นแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ แต่เกิดอาการตอบสนองยับยั้ง (hypersensitive response (HR)) แทน (Swarup et al., 1992)

ยีน *pthA* เป็นยีนที่จำเป็นในการเกิดอาการของโรคแคงเกอร์ โดยพบในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A (Swarup *et al.*, 1992) พบยีน *pthA* หลายตำแหน่งในเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และจะไม่พบยีนนี้ในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* อื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม (Cubero and Graham, 2002; Swarup *et al.*, 1992)

ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ได้จากการศึกษา ยีน *pthA* พบว่ามีอย่างน้อย 3 อัลลีล มีลำดับเบสที่คล้ายกันมากกับยีน *pthA* โดย 2 อัลลีลที่เป็นยีนที่ก่อโรคในพืชตระกูลส้ม ส่วนอีก 1 อัลลีลไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Kanamori and Tsuyumu, 1998; Swarup *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B และสายพันธุ์ canker C คือยีน *pthB* และ *pthC* ซึ่งยีนเหล่านี้มีลำดับเบสและกรดอะมิโนคล้ายกับยีน *pthA* เมื่อแยกยีน *pthB* และ *pthC* ออกมาแล้ว ย้ายเข้าสู่เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A พบว่าสามารถเกิดโรคกับพืชตระกูลส้มได้ทุกชนิดในขณะที่ยีน *pthB* และ *pthC* อยู่ในเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จะก่อโรคกับพืชตระกูลส้มชนิดเดียวคือมะนาวเท่านั้น แต่เมื่อย้ายมาอยู่ในเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สายพันธุ์ canker A สามารถเกิดโรคกับพืชตระกูลส้มได้หลายชนิดขึ้น แสดงว่ายีนก่อโรคเหล่านั้นไม่เกี่ยวข้องกับพืชอาศัย (Brunings and Gabriel, 2003)

Duan *et al.* (1999) ได้ทดลองแยกยีน *pthA* ออกมา แล้วถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์ในพืชตระกูลส้ม โดยใช้วิธี bombardment และวิธี *Agrobacterium* inoculation พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ของพืชตระกูลส้มแสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ภายใน 10-14 วัน และเมื่อย้ายยีน *pthA* เข้าสู่เซลล์พืชอื่น ๆ เช่น ยาสูบ พืชตระกูลถั่ว และฝ้าย พบว่าเกิดอาการตอบสนองยับยั้งหรือพืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitive response (HR) แทน

ยีน *pthA* เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน *avr/pthA* ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้จะพบกระจายเฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ปัจจุบันมีการค้นพบสมาชิกในกลุ่มนี้ถึง 27 ยีน (Gabriel, 1999; Leach and While, 1996) ยีน *pthA* เป็นสมาชิกแรกของกลุ่มยีน *avr/pthA* ที่พบว่าเป็นยีนที่จำเป็นในการเกิดโรคบนพืชอาศัย (Gabriel, 1999) สมาชิกของกลุ่มยีนนี้ได้แก่ยีน *avr Bs3*, *avr Bs3-2* จากเชื้อ *X.*

campestris pv. *vesicatoria*, ยีน *avrb6*, *avrb7*, *avr B101*, *avrB106* จาก *X. axonopodis* pv. *malvacearum* และ *avrXa* จากเชื้อ *X. oryzae* และ *pthA*, *pthB*, *pthC* จาก *X. axonopodis* pv. *citri* ยีน *avr/pth* นี้ สมาชิกส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็นยีน *avirulence* (ยีน *avr*) อย่างเดียวไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ยกเว้นในยีน *pthA*, *pthB*, *pthC* ใน *X. axonopodis* pv. *citri* และ ยีน *pth N pth N2* และ *avrb6* ใน *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคในพืชอาศัย (host-specific pathogenicity function) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นยีน *avr* ตาม gene for gene hypothesis ทำให้เกิดความจำเพาะในการเกิดโรค (race-specific) และยังเกี่ยวข้องกับการรับรู้ของเชื้อโรคในพืชอื่นที่ไม่ใช่พืชอาศัย (non host plant species) (Gabriel, 1999)

โครงสร้างของกลุ่มยีน *avr/pth* นี้มีลักษณะลำดับสำคัญคือ จะมีลำดับเบส 102 คู่เบส จำนวน 14 ถึง 23 ชุด เรียงต่อกัน (tandemly arrange) บริเวณส่วนกลางของยีนนี้ (Yang *et al.*, 1994) สมาชิกของกลุ่มยีนนี้จะเป็นยีนที่เป็นยีนอนุรักษ์สูง (high conserved) และมี encode protein ของกรดอะมิโนเหมือนกัน 90-97% ความผันแปรของแต่ละยีนจะไม่เหมือนกัน อยู่ที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ encode ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 12-13 ของแต่ละยีน โครงสร้างของยีนภายในกลุ่มยีนนี้ พบว่าตรง control domain จะประกอบด้วยชุดของลำดับเบสจำนวน 102 คู่เบสที่ซ้ำๆ แต่ละยีนจะมีจำนวนชุดของลำดับเบส 102 คู่เบสที่ซ้ำกันแตกต่างกัน (Yang *et al.*, 1994) ตั้งแต่ 15.5 ซ้ำ ของยีน *avr Bp* ของ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* จนถึง 27.5 ซ้ำของ *avr Xa7* จาก *X. oryzae* และจากการศึกษาลำดับเบสของยีน *pthA* เปรียบเทียบกับยีน *avrb6* และยีน *avrBs3* พบว่าเหมือนกัน 97% (Gabriel, 1999)

การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามพันธุกรรม (Genotype)

Repetitive DNA PCR-based method

การจัดจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียมีความสำคัญมากในการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อม อุตสาหกรรม สาธารณสุข การเกษตร และศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ ความก้าวหน้าของการศึกษาในระดับโมเลกุลและเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ทำให้การศึกษการจัดจำแนก และการวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ มีการพัฒนาและสะดวกขึ้น เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการจัดจำแนก และศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ และประชากรจุลินทรีย์ได้ เทคนิค Repetitive DNA PCR-based method (rep-

PCR) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย เทคนิค rep-PCR พัฒนามาจากการพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำๆ (repetitive sequence) และมีลักษณะอนุรักษ์สูง กระจายอยู่ทั่วจีโนม ของแบคทีเรียแกรมลบทุกชนิด และบางชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก

rep-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพดีในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ repetitive sequence 3 ชนิด คือ BOX element REP (repetitive extragenic palindromic) และ ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) โดยแต่ละไพรเมอร์จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณระหว่าง repetitive sequence

BOX เป็น repetitive sequence ที่มีลักษณะอนุรักษ์สูง พบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยคือ BOX A B และ C มีขนาด 59 45 50 คู่เบสตามลำดับ จากการศึกษาลำดับเบสพบว่า เป็นลำดับเบสที่อยู่ระหว่างโปรโมเตอร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *S. pneumoniae* ถึงแม้ลำดับเบสในแต่ละหน่วยย่อยของ BOX จะแตกต่างกันบ้าง แต่โดยทั่วไปแล้วมีลำดับเบสคล้ายกับ ERIC และ REP ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม enterobacteria (Martin *et al.*, 1992)

ERIC เป็นลำดับเบสที่พบในแบคทีเรียพวก enterobacteria เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* รวมทั้ง enterobacteria ชนิดอื่น ๆ โดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่เป็น non-coding region ต่าง ๆ จากข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank และ EMBL พบว่า ERIC มีขนาด 126 คู่เบส แพร่กระจายทั่วไปบริเวณที่มีการถอดรหัส (transcribed region) บริเวณระหว่าง polycistronic operon และบริเวณ upstream และ downstream ของ open reading frames (Hulton *et al.*, 1991)

REP พบในแบคทีเรีย *E. coli* *S. typhimurium* และ eubacteria Versalovic *et al.* (1991) ออกแบบลำดับไพรเมอร์ REP จากดีเอ็นเอตัวตรวจ REPALL โดยใช้ลำดับเบสทางปลายแต่ละข้างของ palindrome sequence ของดีเอ็นเอตัวตรวจนี้ จากการทำ PCR ในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด พบว่าจะได้แถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (strain-specific) เช่น *E. coli* สายพันธุ์ 3094 ประกอบไปด้วยแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 1636 1400 และ 1018 คู่เบสตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ 4038 มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 3000 1636 1400 800 และ 700 คู่เบสตามลำดับ

จากคุณสมบัติของลำดับเบสทั้ง 3 แบบ จึงมีการนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ BOXA1R (Louws *et al.*, 1994) ERIC2 กับ ERIC1R และ REP1R กับ REP2 (Versalovic *et al.*, 1991) และนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับ สายพันธุ์ และ pathovar ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด

Selenska-Pobell *et al.* (1995) พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก rep-PCR มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อ *Rhizobium galegae* จำนวน 7 สายพันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP พบว่าไพรเมอร์ ERIC และ REP เหมาะสมที่จะนำมาใช้จัดกลุ่มและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อนี้ เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแตกต่างกันอย่างเด่นชัดในทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

Selenska-Pobell *et al.* (1996) เปรียบเทียบเทคนิค RELP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิค AP-PCR (Arbitrary Primers Polymerase chain reaction) และ rep-PCR เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ hedysari พบว่าเทคนิค AP-PCR และ rep-PCR แยกความแตกต่างของเชื้อและเหมาะสมที่จะใช้ในการจัดหมวดหมู่ (taxonomical identification) Laguerre *et al.* (1997) ศึกษาเชื้อ *Astagarus* spp. *Oxytropis* spp. และ *Onobrychis* spp. ด้วยไพรเมอร์ ERIC และ REP พบว่าเชื้อแบคทีเรียจีสเดียวกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับเชื้อแบคทีเรียต่างจีส สามารถจัดแบ่งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 จีส ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ได้เป็น 34 กลุ่ม โดยพบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ที่แยกมาจากพืชอาศัยและแหล่งเดียวกัน แต่ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และในทางตรงข้ามบางสายพันธุ์ที่แยกเชื้อมาจากพืชอาศัยที่ต่างชนิด และ/หรือจากแหล่งที่ต่างกันมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน

McManus and Jones (1995) ศึกษาเชื้อ *Erwinia amylovora* จำนวน 189 สายพันธุ์ ซึ่งแยกมาจากพืชอาศัยต่างๆ จากบริเวณที่ปลูกไม้ผลในอเมริกาเหนือ และในประเทศนิวซีแลนด์ด้วยเทคนิค rep-PCR และ PCR-ribotyping จากผลการศึกษาด้วย rep-PCR สามารถจัดแบ่งเชื้อ *E. amylovora* ที่แยกมาจากไม้ผลออกจากกลุ่มเชื้อ *E. amylovora* ที่แยกมาจาก *Rubus* spp. ได้ และแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. amylovora* ที่เข้าทำลายไม้ผลมีลักษณะพันธุกรรมเหมือนกัน ทั้งๆ ที่แยกมาจากภูมิประเทศที่มีความแตกต่างกัน

Louws *et al.* (1995) ศึกษาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ โดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ สามารถจัดแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม A ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับมะเขือเทศและพริก และให้ผลลบในปฏิกิริยา starch hydrolysis และ pectinolytic กลุ่ม B ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับมะเขือเทศ และให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับการจัดแบ่งด้วยเทคนิค rep-PCR ที่จัดแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มเช่นกัน โดยแต่ละกลุ่มจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ Bouzar *et al.* (1999) ใช้เทคนิค rep-PCR ศึกษาเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคเดียวกันของมะเขือเทศและพริกมากกว่า 400 สายพันธุ์จากอเมริกากลาง และประเทศแถบคาบสมุทรแคริบเบียน เพื่อดูความสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์บางประการของเชื้อ เช่น ความสามารถในการย่อยแป้ง ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน และสารประกอบทองแดง เป็นต้น พบว่ามีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ใช้ศึกษากับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค rep-PCR ในการศึกษาโครงสร้างประชากรของ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 130 สายพันธุ์ ที่แยกจากแปลงนาข้าวของเกษตรกรในประเทศฟิลิปปินส์ด้วยเทคนิค rep-PCR และ RFLP โดยไพรเมอร์ที่ใช้คือ ERIC และ REP เปรียบเทียบกับเทคนิค RFLP ผลที่ได้จากการศึกษา พบว่า *X. oryzae* pv. *oryzae* แบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยให้ผลการจัดกลุ่มจากเทคนิคทั้งสองวิธีเหมือนกันคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ race 2 3 และ 7 ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ใน race 1 และ 4 (Vera *et al.*, 1996)

Sadowsky *et al.* (1996) ศึกษา *Streptomyces* sp. เชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค rep-PCR เพื่อการจำแนกเชื้อ เช่น จำแนกเชื้อ *S. scabies* ออกจากเชื้อปฏิปักษ์โรคพืช (antagonist) โดยใช้ไพรเมอร์ BOXA1R ผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสม่ำเสมอ (reproducible) Matheson *et al.* (1997) พัฒนาดิเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะในระดับสายพันธุ์ ในการตรวจหาแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่ในดินและในน้ำ เช่นเชื้อ *Burkholderia cepacia* จากเทคนิค rep-PCR โดยทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งจำเพาะกับเชื้อ ทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอตัวตรวจด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าดีเอ็นเอตัวตรวจมีความจำเพาะสูงกับ *B. cepacia* สายพันธุ์ G4 และให้สัญญาณการตรวจที่ชัดเจน

Cubero and Graham (2002) ได้นำเทคนิค rep-PCR มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์และศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในฟลอริดา กับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากแหล่งปลูกส้มทั่วโลก พบว่าเทคนิค rep-PCR

แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามการเกิดโรคของพืชอาศัยได้ ได้แก่ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* และภายในกลุ่มยังมีความแตกต่างที่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มย่อย (subgroup) ได้ โดยพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากเมืองมานาตี (Manatee) ฟลอริดา มีความเหมือนกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มาจากประเทศจีน และมาเลเซีย และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากไมอามี ตรงกันกับจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มาจากแถบทวีปเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้และอเมริกาใต้

ศุภรนา (2543) ได้รายงานการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในประเทศไทย จำนวน 111 สายพันธุ์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Rep PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX, ERIC และ REP พบว่า เชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ต่างๆของประเทศไทยมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ที่ค่า similarity มากกว่า 0.40 ขึ้นไปเชื้อที่อยู่ในไบโอวาร 3 และ 4 จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ที่ค่า similarity 0.80 เชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากงา ปทุมมา จะแยกกลุ่มออกจากพืชอาศัยอื่นๆ โดยสายพันธุ์จากปทุมมาจัดกลุ่มร่วมกันกับเชื้อบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากจิง ไม่พบว่ามีสหสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ กับสายพันธุ์เชื้อ และแหล่งปลูกของพืชอาศัยที่แยกเชื้อได้

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชต้องการวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ ซึ่งแต่เดิมวิธีการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยทั่วไป จะแยกเชื้อจากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการโรค เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป แล้วนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งต้องใช้เวลานานมากกว่า 7 วัน และต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการจำแนกลักษณะแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

มีการนำความรู้ทางด้านเซรุ่มวิทยา มาใช้ในงานตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยใช้วิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แต่การตรวจสอบโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อย มีความไวในการตรวจสอบเชื้อค่อนข้างต่ำ ต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเฉพาะ (enrichment- ELISA method) จึงจะตรวจสอบได้ แต่ต้องใช้เวลาราว 3 วันในการตรวจสอบ และเกิดปฏิกิริยาข้ามทางเซรุ่มวิทยากับเชื้ออื่นๆ ทำให้ผลการตรวจสอบผิดพลาด (Llop *et al.*, 2000)

Civerolo and Fan (1982) ได้พัฒนาเทคนิค ELISA ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตมาจากเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* นำไปใช้ตรวจสอบด้วยวิธี double antibody sandwich ELISA พบว่า มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในระดับ 10^3 - 10^4 CFU/ml ความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมพบว่าแอนติซีรัมเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B จากประเทศอาร์เจนตินา และ บราซิล แต่พบว่าแอนติซีรัมเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ได้

Alvarez *et al.* (1991) ได้ผลิต monoclonal antibodies (MAb) สำหรับตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* โดยได้ผลิต MAb A1 ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และไม่เกิดปฏิกิริยากับสายพันธุ์อื่นๆ แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ได้

เทคนิค Polymerase chain reaction

ต่อมาได้มีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยามาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

Hartung *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 572 คู่เบส จากพลาสมิดดีเอ็นเอของ *X.*

campestris pv. *citri* XC62 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC9 จากนั้นนำไปหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ขนาด 18 คู่เบส จำนวน 7 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค PCR กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* และแบคทีเรียอื่น ๆ พบว่ามี 4 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* และไม่เพิ่มปริมาณในเชื้ออื่น ๆ และพบว่ามีไพรเมอร์ 2/3 สามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* pathotype A (canker A)

Cubero and Graham (2002) ได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดหนึ่งออกแบบมาจากส่วน internally transcribed spacer (ITS) และอีกชุดออกแบบจากยีน *pthA* ที่อยู่บน plasmid เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแคงเกอร์บนพืช อาศัยพบว่า ไพรเมอร์ทั้งสองชุดถูกนำไปตรวจวินิจฉัยกับเชื้อ *Xanthomonas* ที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม พบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจาก ITS มีความเฉพาะเจาะจงกับ canker A ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มาจากยีน *pthA* ที่อยู่บน plasmid สามารถตรวจวินิจฉัยได้กว้างขวางกว่าโดยสามารถตรวจ canker B บางสายพันธุ์ได้

Lertsuchatavanich (2005) ได้ออกแบบไพรเมอร์ 354 R/F เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี PCR จากชิ้นส่วนโครโมโซมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเป็นส่วนของ conserved hypothetical protein พบว่า ไพรเมอร์ 354 R/F มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และ A* โดยทำปฏิกิริยากับทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มหลายชนิดในประเทศไทย สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น สายพันธุ์จากประเทศซาอุดีอาระเบีย ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ซึ่งไพรเมอร์ 354R/F นี้แสดงให้เห็นว่ามีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

เทคนิค Nested PCR

เทคนิค nested PCR เป็นการใช้คู่ไพรเมอร์ 2 ชุด ในการตรวจยืนยันเป้าหมายที่ต้องการ (single locus) โดยคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 จะออกแบบเหมือนกับการตรวจยืนยันเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ซึ่งอาจเรียกว่า external primer และมีคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ซึ่งเรียกว่า nested primer หรือ internal primer ซึ่งจะออกแบบให้อยู่ส่วนในของระหว่าง external primer ซึ่งจะทำให้ผลผลิตการขยายยีนมีขนาดสั้นกว่าคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะทำให้การตรวจยืนยันเป้าหมายมีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่ง

ถ้าหากไพรเมอร์ชุดที่ 1 เกิดการขยายผิดพลาดไป ปฏิริยาดังกล่าวก็จะถูกแก้ไข ป้องกันการเกิดความผิดพลาดของ false positive ได้ McManus and Jones (1995) ได้นำหลักการของ nested PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Erwinia amylovora* พบว่าวิธีนี้ยังให้ผลดีในการลดปัญหาของสารยับยั้ง PCR (PCR inhibitors) ซึ่งทำให้เป็นปัญหาในการเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างพืช

Hartung *et al.* (1996) ได้ศึกษาการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axodopodis* pv. *citri* โดยใช้ specific primer ในการเพิ่มปริมาณในส่วน of plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณต่ำที่ระดับ 10 CFU/ml. แต่เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลง ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อลดลง 10 เท่า และพบปัญหาการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของกลุ่มสารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีผลต่อการปฏิริยา nested PCR

เทคนิค Single closed tube nested PCR หรือ One tube nested PCR

จากการใช้วิธี Nested PCR ซึ่งต้องมีการคัดย้ายตัวอย่างทดสอบจากหลอดหนึ่งไปสู่อีกหลอดหนึ่งในการทำปฏิริยากับคู่ไพรเมอร์ที่ 2 ทำให้มีโอกาสเกิดปัญหาการปนเปื้อนในตัวอย่างเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น จึงได้มีการพัฒนาการทำปฏิริยา nested PCR ในหลอดเดียวกัน (Single closed tube) (Llop *et al.*, 2000) ขึ้นมา โดยวิธีนี้จะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่เบสที่ออกแบบให้ทำปฏิริยาในหลอดเดียวกัน ซึ่งทำได้ง่าย สะดวก ป้องกันการปนเปื้อนได้ ประหยัดเวลา และสารเคมีที่ใช้

การออกแบบไพรเมอร์ของ one tube nested PCR มีหลักในการเลือกไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่เบสดังนี้

1. ไพรเมอร์คู่แรก (external primer) จะต้องเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะสามารถออกแบบไพรเมอร์คู่ที่สอง (internal primer) ภายในขึ้นดีเอ็นเอได้ เพราะขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรกจะเป็นต้นแบบ (template) ให้กับไพรเมอร์คู่ที่สอง

2. อุณหภูมิสำหรับจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperatures) ของไพรเมอร์ของคู่แรกและคู่สอง ต้องแตกต่างกันเพื่อให้ปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่แยกจากกัน

Llop *et al.* (2000) ได้รายงานผลการพัฒนาวิธี one tube nested PCR ว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *E. amylovora* จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค (symptomatic) ได้ มีความไวในการตรวจมากกว่า two tube nested PCR และ PCR โดยตรวจได้ 78% ในขณะที่ two tube nested PCR และ PCR ตรวจพบได้เพียง 71% และ 55% ตามลำดับ นอกจากนี้วิธีการนี้ยังสามารถตรวจสอบพืชที่ยังไม่แสดงอาการของโรค (asymptomatic) จากแปลงที่มีการระบาดของโรค fire blight พบว่าวิธี one tube nested PCR สามารถตรวจสอบเชื้อได้ถึง 25% ในขณะที่ two tube nested PCR และ PCR ตรวจพบได้เพียง 20% และ 17% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธี one tube nested PCR เหมาะสำหรับงานกักกันพืช ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีความไวสูง เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และง่ายต่อการทำงาน

Bertolini *et al.* (2003) ได้รายงานการพัฒนาวิธี nested PCR ในหลอดเดียว หรือ one tube nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* โดยพบว่า วิธี one tube nested PCR ร่วมกับ dot blot hybridization สามารถตรวจหาเชื้อได้ในระดับหนึ่งเซลล์ของเชื้อ *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ในน้ำคั้นจากต้นมะกอก (Olive) จำนวน 1 ml เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างพืชมะกอกที่ยังไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 240 ตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่า วิธี one tube nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อพบใน 82 ตัวอย่าง ในขณะที่ วิธี PCR และ การแยกเชื้อ (isolation) ตรวจหาเชื้อพบใน 50 ตัวอย่าง

วิธี Immunomagnetic separation

จากปัญหาสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่ปลดปล่อยออกจากพืชส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยตรงจากตัวอย่างพืช (Hartung *et al.*, 1996) จึงได้มีการนำวิธี immunomagnetic separation (IMS) หรือ immunocapture มาใช้ร่วมกับวิธี PCR หรือ nested PCR เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวและเพิ่มประสิทธิภาพและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืช (Hartung *et al.*, 1996; Walcott and Gitaitis, 2000; Poussier *et al.*, 2002) วิธี IMS เป็นเทคนิคทางชีววิทยา โดยการใช้ immunomagnetic beads เคลือบด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช แล้วนำ bead ไปยัดจับกับเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช แยกออกจากเซลล์

แบคทีเรียอื่นๆ และสารยับยั้งที่มาจากพืชได้ และตรวจเชื้อที่ถูกจับยึดด้วยวิธี PCR หรือ nested PCR เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบและสามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืช (Alvarez, 2004)

Hartung *et al.* (1996) ได้พัฒนาวิธี nested PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยตรงจากตัวอย่างพืช พบปัญหาการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ พวงสาธคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีผลต่อการปฏิกิริยา nested PCR จึงได้ใช้เทคนิค Immunocapture ร่วมกับ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยตรงจากตัวอย่างใบส้มในแปลงปลูก พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ nested PCR อย่างเดียวถึง 100 เท่า

Van der Wolf *et al.* (1996) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *Erwinia carotovora* subpv. *carotovora* บนผิวเปลือกของมันฝรั่ง โดยการใช้วิธี IMS ร่วมกับวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจหาเซลล์ของเชื้อ *E. carotovora* subpv. *carotovora* ในระดับ 2×10^3 CFU/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี PCR 100 เท่า

Walcott and Gitaitis (2000) ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* ในเมล็ดแตงโม โดยใช้วิธี IMS ร่วมกับ PCR พบว่า วิธี IMS-PCR ให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *A. avenae* pv. *citrulli* เพิ่มขึ้นกว่าวิธี PCR ถึง 100 เท่า และสารที่ปลดปล่อยออกมาจากเมล็ดแตงโมไม่มีผลต่อวิธี IMS-PCR

Pooler *et al.* (1997) ได้รายงานการใช้วิธี IMS ร่วมกับวิธี nested PCR ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* ในแมลงพาหะกลุ่มเพลี้ยกระโดด จำนวน 347 ตัว จาก 16 ชนิด (species) ที่เก็บมาจากต้น American elm ในโรงเรียนปลูกพืชที่พบโรคใบไหม้ (leaf scorch) ผลการตรวจพบว่า วิธี IMS-nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *X. fastidiosa* ที่มีปริมาณต่ำ ในตัวแมลงพาหะได้ โดยตรวจพบในแมลงพาหะเพลี้ยกระโดด จำนวน 37 ตัวจาก 4 ชนิด ในขณะที่วิธี nested PCR ตรวจไม่พบเชื้อในตัวแมลงพาหะ วิธี IMS-nested PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *X. fastidiosa* ในระดับที่มีเชื้อเพียง 5 เซลล์ต่อปฏิกิริยา

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์และการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว และมะกรูดที่แสดงอาการโรคแคงเกอร์ จากแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วประเทศไทย ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ ภาคใต้ โดยทำการเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการ ที่ใบ กิ่ง ลำต้น หรือผล

แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยนำตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาล้างให้สะอาด โดยผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 5 นาที ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดตรงบริเวณแผลที่เป็นใหม่ ๆ เป็นรูปสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นำไปแช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นนำไปบดในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อให้ละเอียด นำสายละลายเชื้อ มาฉีดให้เป็นเส้น (streak) ด้วยลูป (loop) ที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว บนอาหาร Wakimoto's medium (Koizumi, 1971) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 3-4 วัน คัดเลือกโคโลนีสีเหลือง มั่น นูน ขอบเรียบ นำไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อไว้ภายใต้ไขมัน (paraffin oil) และในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 10 °C

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่รวบรวมได้ มาเลี้ยงในอาหาร Wakimoto's medium เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง นำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามที่ Goto *et al.* (1980) ได้รายงานไว้ โดยทำการจำแนกชนิดการติดสีแกรม (gram staining) โดยใช้ด่าง 3 % ตามวิธี KOH Solubility test จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ Oxidation-Fermentative test (Hugh *et al.*, 1953) hydrolysis of arginine (Thornley, 1960) lecithinase (Mc Clung *et al.*, 1947) และบางปฏิกิริยาใช้วิธีการตาม Schaad (1988) ได้แก่ liquefaction of gelatin, hydrolysis of aesculin, production of urease, production of hydrogen sulphide, tyrosinase, reduction of nitrate, litmus milk, production of acetoin, NaCl 3% 5% และ 7% การเจริญเติบโตที่ 36 °C นอกจากนี้ยังมี hydrolysis of starch, hydrolysis of Tween 80 (Lelliott and Stead, 1987), hydrolysis of casein (Smibert and Krieg,

1981), Gluconate test (Lelliott and Stead, 1987) และทดสอบการใช้น้ำตาล (Utilization of carbohydrates) ตามวิธีของ Schaad (1988) และ Goto *et al.* (1980) บันทึกผลการทดลอง

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการเกิดโรคบนพืชทดสอบ

พืชทดสอบ

พืชตระกูลส้ม 5 ชนิด ได้แก่ มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata* Blanco) เลมอน (*C. limon* L. Burm) เกรฟฟรุ๊ต (*C. paradisi* Macf.) และส้มโอ (*C. maxima* Burm) พันธุ์ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวใหญ่ ขาวแตงกวา และท่าข่อย เป็นพืชทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การเตรียมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การเตรียมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สำหรับทดสอบความรุนแรงโดยนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่รวบรวมไว้เลี้ยงในอาหาร Wakimito's medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ละลายเชื้อด้วยน้ำเกลือ (NaCl ความเข้มข้น 0.85%) นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer Hitachi model 2001 ให้มีค่าความดูดกลืนแสง (optical density) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เชื้อจะมีความเข้มข้นประมาณ 8.8×10^7 CFU/ ml

การปลูกเชื้อบนพืชทดสอบโดยวิธี detached leaf

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ใช้วิธีการปลูกเชื้อโดยวิธี detached leaf (Duan *et al.*, 1999) นำใบพืชทดสอบจากต้นพันธุ์ปลอดโรค มาล้างผิวใบด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 % นาน 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง วางใบที่ล้างผิวแล้วลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี water agar 1% โดยคว่ำใบให้ด้านหลังใบอยู่ด้านบน ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ โดยใช้เข็มทำให้เกิดแผล (pricking method) ที่ผิวใบส่วนระหว่างเส้นใบ โดยใช้เข็มสะกิดผิวให้เกิดแผลแล้วหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียบนแผล หลังจากปลูกเชื้อบนใบแล้วปิดจานเลี้ยงเชื้อด้วยเทปใสเพื่อกันความชื้นออกนอกจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 °C ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตอาการของโรคที่

เกิดขึ้นบนใบส้มแต่ละชนิด ของแต่ละสายพันธุ์ ผลที่แสดงอาการโรคจะเป็นขุยสีขาวฟูขึ้นมาจากผิวใบตรงส่วนที่ปลูกเชื้อไว้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การเตรียมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB (Luria & Bertani medium) (Sambrook *et al.*, 1989) อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ให้บริสุทธิ์

ใช้การแยกสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอ โดยตามวิธีของ Pitcher *et al.* (1989) ใช้เชื้อบริสุทธิ์ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูปมาเชื้อแต่ละเชื้อ แบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูปละลาย ใน 1 ml ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 μ l ของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น Vortex เติมด้วย 500 μ l ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 μ l ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นไว้ในตู้เย็น -20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 μ l ของสารผสม chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24/1 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นไว้ในตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 μ l ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer, pH. 8.0 ปริมาณ 100 μ l วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260 และ A280 ด้วย เครื่อง UV/Vis spectrophotometer และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/ μ l เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ในการทดลองได้แก่ enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC) และ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al.*, 1994) ซึ่งมีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังนี้

ERIC (ERIC1R) 5' – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC – 3'
(ERIC2) 5' – AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3'

BOX (BOXA1R) 5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 μ l ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv..citri 50 ng ผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 mM MgCl_2 , 30 mM 2-mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 μ M, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 50 pM และไพรเมอร์ BOX จำนวน 100 pM แล้วเติมน้ำกลั่นหนึ่งมาเพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 25 μ l ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Louws *et al.* (1994)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	53 (BOX)	1
	53 (ERIC)	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	65	8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 μ l มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol

blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 μ l จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

วิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ที่ได้จากเชื้อ *X.axonopodis* pv. *citri* แต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) (Rohlf, 1993) ค่า coefficient ที่ใช้คือค่า Dice วิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) วิเคราะห์ dendrogram ที่ได้เปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มของเชื้อ โดยลักษณะการจัดกลุ่มอื่น ๆ เช่น การเกิดโรคกับพืชอาศัย แหล่งที่มาของเชื้อ และช่วงเวลาที่แยกเชื้อ

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี Polymerase chain reaction PCR และวิธี one tube nested PCR

การเตรียมดีเอ็นเอความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939, 1012 และ 1046 โดยการแยก ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Pitcher *et al.* (1989) ตามข้างต้นและมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 50, 5, 0.5 ng/ μ l และ 5, 0.5, 0.05 , 0.005 pg/ μ l

การเตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939, 1012 และ 1046 เลี้ยงในอาหาร LB medium ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วัดความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าดูดซับคลื่นแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ 600 nm สารละลายเชื้อที่ได้นำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ทุกความเข้มข้นของ dilution นำไปตรวจที่ปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 50 μ l เติบโตให้ทั่วหน้าอาหาร Semi-selective for

Xanthomonas (SX medium) (Schaad, 1988) เก็บไว้ที่ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจำนวน โคลนินที่เจริญบนอาหาร

การตรวจหาเชื้อโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค PCR

การออกแบบไพรเมอร์

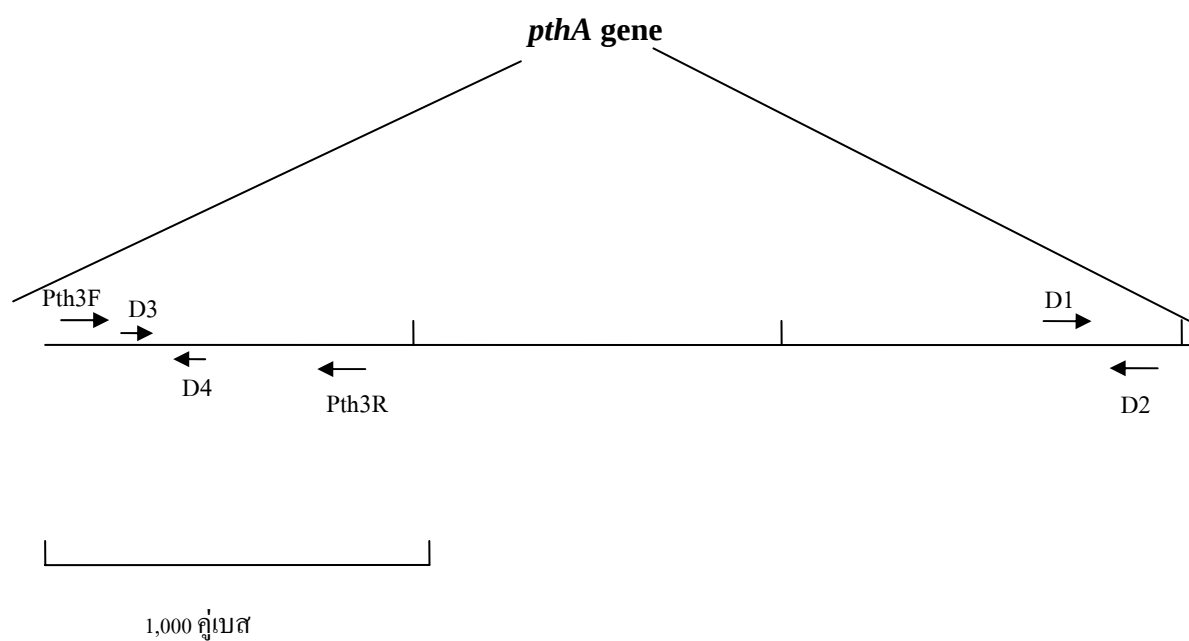
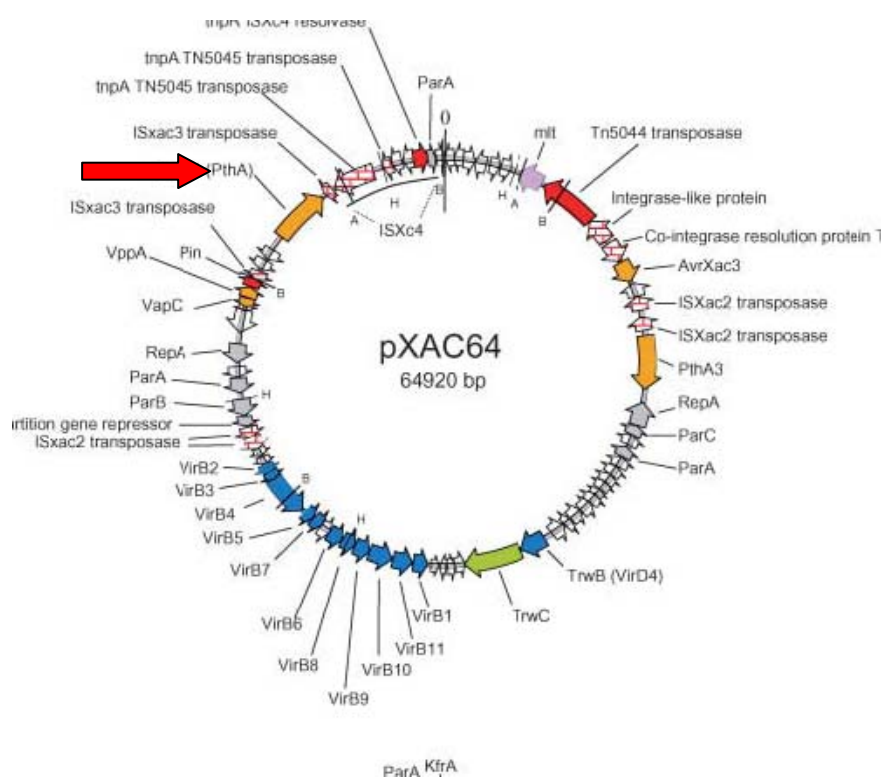
ออกแบบไพรเมอร์จากยีน *X. axonopodis* pv. *citri* pathogenicity gene (*pthA* gene) ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยทำการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pthA* (Genbank Accession U28802) จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ primer design software ชื่อ OligoPerfect™ Designer ไพรเมอร์ที่ได้คือ ไพรเมอร์ D1/D2 โดยคุณสมบัติดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และมีตำแหน่งของไพรเมอร์บนยีน *pthA* แสดงในภาพที่ 1 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบส่งไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยใช้บริการการสังเคราะห์ไพรเมอร์จาก หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

ทดสอบความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของไพรเมอร์ D1/D2

ทดสอบความไวในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของ ไพรเมอร์ D1/D2 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ และสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากยีน *pthA* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยปฏิกิริยาในหลอดรวมทั้งหมด 25 µl สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 3 โดยมีไพรเมอร์ 2/3 ที่ Hartung *et.al* (1993) รายงานว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ D1/D2 ที่ออกแบบไว้ ด้วยเครื่อง PE2400 Thermal Cycler (Applied Biosystem)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ D1/D2 ไพรเมอร์ Pth 3F/ Pth 3R และ ไพรเมอร์ D3/D4 ที่ออกแบบจากยีน avirulence/ pathogenicity (*pthA*) ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (เบส)	อุณหภูมิ Tm (°C)	% G+C	หมายเหตุ
D1	5'-GGCCTTGATCAAAAGAACCA-3'	20	60	45	งานวิจัยครั้งนี้
D2	5'-TTGAAGTAGGGGACGGTTTG-3'	20	59	50	งานวิจัยครั้งนี้
2	5'-CACGGGTGCAAAAATCT-3'	18	-	-	Hartung <i>et al.</i> (1993)
3	5'-TGGTGTCGTCGCTTGAT-3'	18	-	-	Hartung <i>et al.</i> (1993)
Pth3R	5'-GGTGAGGGGGCAGGGGAGA-3'	20	72.58	75	งานวิจัยครั้งนี้
Pth3F	5'-GGTACCCGGCGTCGCATGA-3'	20	72.09	70	งานวิจัยครั้งนี้
D3	5'-GGTGTGGTGCCTCGATAGAT-3'	20	59.96	55	งานวิจัยครั้งนี้
D4	5'-CGAACAGACCATTGCCCTAT-3'	20	59.69	50	งานวิจัยครั้งนี้



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของยีน *pthA* บนพลาสมิด pXAC64 ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* และ ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ D1, D2, Pth3F, Pth3R, D3 และ D4 บนยีน *pthA*

ตารางที่ 3 สารเคมีและโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ D1/D2, 2/3 และ one tube nested PCR ด้วยไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในการตรวจหาเชื้อ

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา (PCR reaction mixture)	PCR		one tube nested PCR
	D1/D2	2/3	Ptha3F/Ptha3R และ D3/D4
10 X PCR buffer	1X	1X	1X
MgCl ₂	3mM	3mM	3mM
dNTPs	0.25 mM	0.2 mM	0.2 mM
ไพรเมอร์	0.5 uM	1 uM	0.01 uM (Ptha3F/Ptha3R)
			2 uM(D3/D4)
Taq polymerase (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA)	1 U	1 U	3 U
ดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น 50 ng/ul	1ul	1ul	1ul
โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา			
	1. 94°C 5 นาที	1. 94°C 10 นาที	1. 94°C 4 นาที
	2. 93°C 30 วินาที	2. 95°C 70 วินาที	2. 94°C 30 วินาที
	3. 59°C 30 วินาที	3. 58°C 60 วินาที	3. 72°C 1 นาที
	4. 72°C 45 วินาที	4. 72°C 60 วินาที	4. ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2-3 ซ้ำ เป็นวงจรถูกใช้ทั้งหมด 10 รอบ
	5. ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2-4 ซ้ำ เป็นวงจรถูกใช้ทั้งหมด 40 รอบ	5. ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2-4 ซ้ำ เป็นวงจรถูกใช้ทั้งหมด 40 รอบ	5. 94°C 4 นาที
	6. 72°C 10 นาที	6. 72°C 10 นาที	6. 94°C 30 วินาที
			7. 56°C 30 วินาที
			8. 72°C 45 วินาที
			9. ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 6-8 ซ้ำ เป็นวงจรถูกใช้ทั้งหมด 40 รอบ
			10. 72°C 10 นาที

ผลผลิตจากการขยายยีนด้วยปฏิกิริยา PCR ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 x TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ นาน 15 นาที นำมาย้อมด้วย 0.1% เอซีดีเอ็มโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง ultraviolet transilluminator model GPS 7500 ถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลาไรซ์ Type 760

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ D1/D2 โดยใช้ ดีเอ็นเอ และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตามตารางที่ 4 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 CFU/ml ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยปฏิกิริยาในหลอดรวมทั้งหมด 25 μ l สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 3

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี one tube nested PCR

การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pthA* จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำสายนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pthA* ที่สืบค้นมาได้นำมาเทียบลำดับเบส (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W version 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันของยีน *pthA* และยีน *avr/pth* อื่น ๆ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Oligo Perfect™ Designer โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด

ไพรเมอร์ชุดแรก (external primers) ออกแบบบริเวณปลายด้าน 3 และ 5 เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขนาด 800 คู่เบส ไพรเมอร์มีความยาวประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ ปริมาณ G+C ประมาณ 55-65% และมีอุณหภูมิ Tm อยู่ในช่วง 70°-72° C โดยได้ไพรเมอร์ชุดแรกคือ Pth3F/Pth3R มีคุณสมบัติดังที่แสดงในตารางที่ 2 และ ตำแหน่งของไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R บนยีน *pthA* แสดงไว้ในภาพที่ 1

ไพรเมอร์ชุดสอง (internal primers) ออกแบบให้อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอ 800 คู่เบส ที่เพิ่มปริมาณได้จากการใช้ไพรเมอร์ชุดแรก โดยได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณ ขนาด 136 คู่เบส ไพร

เมอร์มีความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ ปริมาณ G+C ประมาณ 50% มีอุณหภูมิ Tm ประมาณ 52⁰-58⁰ C โดยได้ไพรเมอร์คู่สองคือ D3/D4 มีคุณสมบัติดังที่แสดงในตารางที่ 2 และ ตำแหน่งของไพรเมอร์ D3/D4 บนยีน *pthA* แสดงไว้ในภาพที่ 1

ทดสอบความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ด้วยวิธี one tube nested PCR

ทดสอบความไวในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ และสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *pthA* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยปฏิกิริยา one tube nested PCR โดยปฏิกิริยาในหลอดรวมทั้งหมด 25 µl สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาดังที่แสดงในตารางที่ 3

ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา one tube nested PCR นำมาวิเคราะห์โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 x TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 15 นาที นำมาเชื่อมด้วย 0.1% เอทิลียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง ultraviolet transilluminator model GPS 7500 ถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลาไรซ์ Type 760

ทดสอบความจำเพาะ ของไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในปฏิกิริยา one-tube nested PCR โดยใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียตามตารางที่ 4 โดยความเข้มข้นของสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ 10⁸ CFU/ml ทดสอบตามวิธี one-tube nested PCR

ทดสอบผลของน้ำคปสั่มไอต่อปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR

เตรียมน้ำคั่นจากใบส้มโอ

นำใบส้มโอพันธุ์ทองดี จำนวน 5 กรัม มาบดในเครื่องบดอาหาร (Blender) โดยบดใน 0.85% NaCl จำนวน 50 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำข้างบน แบ่งใส่หลอดทดลอง จำนวน 9 ml จำนวน 6 หลอด นำเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เตรียม

เป็นสารละลายเชื้อ ที่มีความค่าดูดซับคลื่นแสงที่ 600 nm เท่ากับ 0.1 จำนวน 1 ml เติมลงในน้ำคั้นใบส้มโอในหลอดทดลอง จำนวน 9 ml จากนั้น ทำ serial dilution ด้วยน้ำคั้นใบส้มโอ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4} ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยใช้ 50 μ l ของแต่ละตัวอย่าง เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30⁰ C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโคโลนีปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

ทดสอบปฏิกิริยา PCR และ ปฏิกิริยา one tube nested PCR

นำน้ำคั้นจากใบส้มโอ ที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 1 μ l และ 10 μ l มาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ทดสอบปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรรวม 25 μ l โดยทำการทดสอบกับปฏิกิริยา PCR มาตรฐานที่ใช้ไพรเมอร์ D1/D2 ไพรเมอร์ 2/3 เปรียบเทียบกับ one-tube nested PCR โดยทำทั้งหมด 10 ซ้ำ มีตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ สารละลายเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความค่าดูดซับคลื่นแสง ที่ 600 nm เท่ากับ 0.1 เป็นค่าเปรียบเทียบที่ให้ผลบวก (Positive control) และน้ำคั้นใบส้มโอที่ไม่มีเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นตัวเปรียบเทียบที่ให้ผลลบ (negative control)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

เก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของส้มโอจากแปลงปลูกของเกษตรกร อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์จากใบส้มโอที่มีอายุใกล้เคียงกันและมีจุดแผลแคงเกอร์ที่มีขนาดเท่ากัน นำมาตัดตรงจุดแผล 1 จุดแผลโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำแต่ละจุดของตัวอย่างมาเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี โดยทดสอบแต่ละวิธีจำนวน 10 ซ้ำ ดังนี้

การเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 1

นำตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่ตัดด้วย cork borer 1 จุดแผล ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติมด้วย 100 μ l ของ 0.85% NaCl บดด้วย plastic disposable pestle ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 3,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนน้ำใส จำนวน 5 μ l เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี PCR และ one tube nested PCR ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยดู 50 μ l ของแต่ละตัวอย่าง เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้

แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโคโลนีปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

การเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2

นำตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่ตัดด้วย cork borer 1 จุดแผล ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมน้ำด้วย 100 µl ของ 0.85% NaCl นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง คูดตัวอย่างจำนวน 5 µl เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี PCR และ one tube nested PCR ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยใช้ 50 µl ของแต่ละตัวอย่าง เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโคโลนีปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี immunomagnetic separation ร่วมกับปฏิกิริยา nested PCR (IMS-nested PCR)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ No.987, No.1012, No.1693 และ No. 1887 และ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ที่แยกได้จากฝ้ายจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ No. 584, No. 1035, No.1051 และ No. 1232 อายุ 48 ชั่วโมง นำมาละลายด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH. 7.4 (NaCl 8.0 g KH₂PO₄ 0.2 g Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g KCl 0.2 g และ NaN₃ 0.2 g ละลายในน้ำ 1 L) วัดค่าดูดซับคลื่นแสงของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 เพื่อเตรียมสต็อกเชื้อไว้สำหรับการทดลองต่อไป

การเตรียม immunomagnetic bead

นำ immunomagnetic beads (IMB) (Dynabead M280 sheep anti- mouse; Dynal Biotech Inc., Oslo, Norway) มาเคลือบด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (CAB 92200; Agdia, USA) โดยมีวิธีโดยสังเขปดังนี้ นำ IMB จำนวน 180 µl (~10⁸ bead) ย้ายลง

ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้งๆ ละ 3 นาที โดยใช้ magnetic particle concentrator (MPC; Dynal, Oslo, Norway) ดูดจับ IMB ไว้ข้างหลอด ในระหว่างเปลี่ยนสารละลาย PBS แต่ละครั้ง ละลาย IMB ด้วย สารละลาย PBS จำนวน 1 ml จากนั้นเติมด้วย แอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จำนวน 10 μ l นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง ล้าง IMB ด้วย สารละลาย PBS ที่เติมด้วย 0.1 % bovine serum albumin (PBS-BSA) จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 3 นาที ละลาย IMB ด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 1 ml

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี IMS ร่วมกับปฏิกิริยา nested PCR

โดยการนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามตารางที่ 4 โดยใช้ความเข้มข้นของ สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ 10^8 CFU/ml จำนวน 500 μ l ย้ายลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมด้วย IMB ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 50 μ l ($\sim 10^5$ bead) เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ละลาย IMB ด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 15 μ l ใช้จำนวน 1 μ l ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ตามที่กล่าว มาแล้วข้างต้น

ทดสอบความไวการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำคั้นใบส้มโดยวิธี IMS - nested PCR

โดยนำใบส้มโอพันธุ์ทองดี จำนวน 5 กรัม มาบดในเครื่องบดอาหาร (Blender) โดยบดใน 0.85% NaCl จำนวน 50 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใส แบ่งใส่หลอด ทดลอง จำนวน 9 ml จำนวน 7 หลอด จากนั้นนำสารละลายเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939, 1012 และ 1046 ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 1 ml เติมลงในน้ำคั้นใบส้มโอในหลอดทดลอง จำนวน 9 ml จากนั้น ทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7} ด้วยน้ำคั้นใบส้มโอและทำการตรวจ นับจำนวนเซลล์เชื้อโดยตรงจาก haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำน้ำคั้นจากใบส้มโอที่ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 500 μ l ย้ายลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมด้วย IMB ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 50 μ l เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ละลาย IMB ด้วยน้ำกลั่น

นิ่งมาเชื้อ จำนวน 15 µl คูดไปใช้จำนวน 1 µl ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยทดลองเปรียบเทียบกับการใช้วิธี one tube nested PCR และ standard PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/D2 ตามวิธีข้างต้น

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของตัวอย่างใบพืชจากแปลงปลูก

ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์ โดยเก็บตัวอย่างใบของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มโอ (*Citrus maxima*), ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*), มะนาว (*C. aurantifolia*) และมะกรูด (*C. hystrix*) ที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ และตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 50 ตัวอย่าง นำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่เติมด้วย 25 ml ของสารละลาย PBS นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นน้ำใส เก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS จำนวน 500 µl เติมด้วย IMB ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 50 µl เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ละลาย IMB ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ จำนวน 15 µl คูดไปใช้จำนวน 1 µl ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยทดลองเปรียบเทียบกับการใช้วิธี one tube nested PCR และ standard PCR ด้วยไพรเมอร์ D1/D2 ตามวิธีข้างต้น โดยทำการตรวจเชื้อบนอาหาร SX medium ในทุกตัวอย่าง

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ D1/D2 และผลผลิต nested PCR จากไพรเมอร์ ptha3F/ptha3R และ D3/D4

การเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิดพาหะ

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ D1/D2 และผลผลิต nested PCR จากไพรเมอร์ Ptha3F/Ptha3R และ D3/D4 ข้างต้น มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Wizard[®] Plus SV minipreps DNA purification system (Promega[®], USA) นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega[®], USA) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ผลผลิต PCR จากการตรวจยีน *pthA* โดยคู่ไพรเมอร์ข้างต้น จำนวน 100 ng เติม 2 x T4

DNA ligase buffer 10 μ l pGEM-T Easy vector 50 ng T4 DNA ligase 1 หน่วย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ซ้ำมกั้น (ประมาณ 15 ชั่วโมง)

การโยกย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

โยกย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* XL 1-Blue โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) โดยดูดพลาสมิดพาหะที่ต่อเชื่อมกับผลผลิต PCR แล้วใส่ลงในหลอดที่มี *E. coli* ที่เป็น competent cells ปริมาตร 100 μ l พลิกหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่หลอดไว้ในน้ำแข็งนาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที เติมหอาหาร SOC media จำนวน 1 ml ลงไปทันที นำไปเพาะเชื้อโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนอาหารทิ้งไป ละลายตะกอนที่เหลือให้ผสมกันด้วย อาหาร SOC media ใช้สารละลายเชื้อ 100 และ 200 μ l เกลี่ยให้บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ppm ที่เกลี่ยผิวอาหารด้วย 100 mM IPTG จำนวน 100 μ l และ X-gal (20mg/ml) จำนวน 50 μ l บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ppm เพื่อเก็บไว้เป็นสต็อกเชื้อและสกัดพลาสมิดสายผสมเพื่อการตรวจสอบ

การสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย

สกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2X-YT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ppm ปริมาตร 1 ml บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาอาหารเหลวออก เติม solution I (50mM glucose, 10mM EDTA, pH 8.0, 25mM Tris, pH 8.0) ปริมาตร 100 μ l ลงในหลอดผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมด้วย 200 μ l ของ solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) ที่เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน ผสมให้เข้ากัน แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นเติม solution III (3M potassium acetate, 5M acetic acid) ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยแรงที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1 V/V) ปริมาตร 450 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้ว หมุนเหวี่ยงด้วยแรงที่ 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที ดูด

สารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol จำนวน 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วแช่หลอดไว้ที่ -20°C นาน 20 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยแรงที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ล้างตะกอนพลาสติกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 μl นำไปตกตะกอนที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ตากตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer จำนวน 20 μl

ตรวจสอบพลาสติกสายผสมโดยตัดพลาสติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอบน UV-transilluminator

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR

นำพลาสติกสายผสมที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pthA* ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) และ โปรแกรม CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

ผลและวิจารณ์

ผล

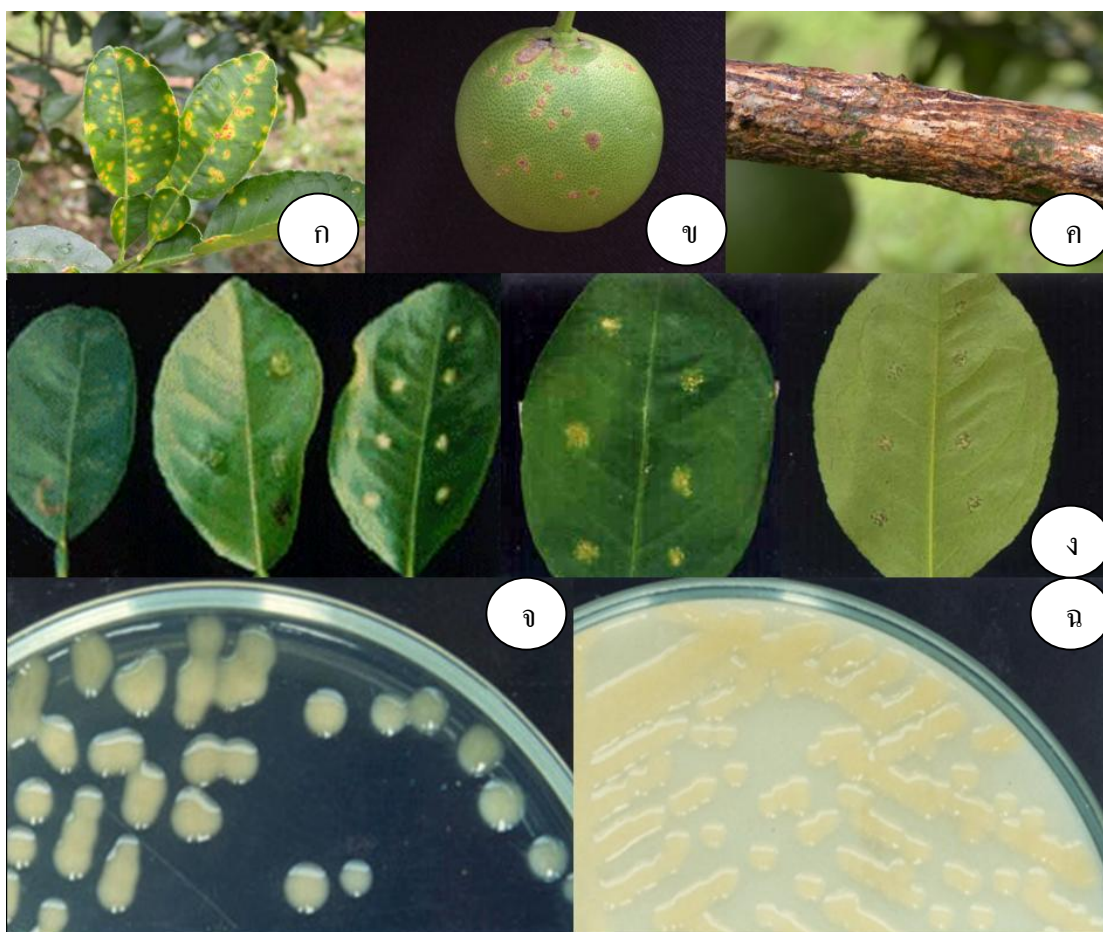
การเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์และการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว และมะกรูด ที่แสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ ลักษณะอาการเป็นแผลตกสะเก็ดนูน สีน้ำตาล ตรงกลางแผลจะแตกบุ๋มลงไปข้างในรอบแผลมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ(ภาพที่ 2) โดยทำการเก็บอาการของโรคทั้งบนใบ กิ่ง และผล จากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศไทย นำมาแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จะได้ เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนิกรวม สีเหลือง นูนมันเยิ้ม ขอบเรียบ บนอาหาร Wakimoto's medium และอาหาร Yeast extract dextrose agar (Schaad *et al.*, 2006)(ภาพที่ 2) เชื้อที่แยกได้ทั้งหมด รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ดังแสดงใน ตารางที่ 4

คุณสมบัติทางชีวเคมี

จากผลการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทั้ง 113 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแกรมลบ ไม่สร้าง spore มีหาง (flagellation)หางเดียวที่ส่วนปลาย มีการใช้ oxygen (oxidation) มีรูปร่างท่อนตรง (rod shape) มีขนาด $0.5 \times 1.7 \mu\text{m}$ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถย่อยแป้ง (starch) ย่อย gelatin, ย่อย tween 80 และย่อย casein สร้างเอนไซม์ lecithinase ได้ ไม่ใช้ arginine และ gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ urease เกิดก๊าซ hydrogen sulphide (H_2S) สร้างสาร acetoin เกิด proteolysis ใน litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36°C สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ tyrosinase (ตารางที่ 5)

ผลการทดสอบการใช้น้ำตาล (utilization of carbohydrates) พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose maltose, lactose, trehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate ไม่สามารถใช้ L-methyl-d-glucoside, raffinose, inositol, inulin, ducitol, gluconate, oxalate, acetate



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่เกิดในธรรมชาติและจากการปลูกเชื้อบนใบมะนาวและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค

- ก-ค ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์บนใบ ผลและกิ่งก้านที่เกิดโรคในธรรมชาติ
- ง อาการของโรคแคงเกอร์บนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อ โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 7 วัน
- จ-ฉ เชื้อสาเหตุ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร Wakimoto's และ YDC ตามลำดับ

ตารางที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>				
UE067	ส้มโอ	ประจวบคีรีขันธ์	2523	1
UE 108	มะนาว	หนองคาย	2523	1
118	ส้มโอ	สุพรรณบุรี	2525	1
120	มะนาว	สกล.พืชไร่อุทุมทอง	2525	1
200	ส้มโอ	ราชบุรี	2527	1
250	มะกรูด	ชุมพร	2527	1
251	มะนาว	ชุมพร	2527	1
356	ส้มโอ	เชียงราย	2528	1
694	ส้มโอ	ปทุมธานี	2530	1
726	ส้มโอ	เชียงราย	2530	1
727	ส้มโอ	เชียงราย	2530	1
777	มะนาว	นครราชสีมา	2531	1
805	ส้มโอ	บางเขน	2532	1
819	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
834	ส้มโอ	นครพนม	2532	1
840	ส้มโอ	นครพนม	2532	1
841	ส้มโอ	นครพนม	2532	1
844	ส้มโอ	น่าน	2532	1
855	ส้มโอ	ปทุมธานี	2532	1
856	มะกรูด	ปทุมธานี	2532	1
869	ส้มโอ	ปทุมธานี	2532	1
873	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
874	ส้มโอ	ปทุมธานี	2532	1
880	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
881	ส้มตรา	พิจิตร	2532	1
884	ส้มโอ	พิจิตร	2532	1
895	ส้มโอ	สุโขทัย	2532	1
896	ส้มโอ	สุโขทัย	2532	1
900	ส้มโอ	เชียงราย	2532	1

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>				
902	ส้มโอ	เชิงราย	2532	1
920	มะนาวไทย	จันทบุรี	2532	1
929	มะนาว	ปทุมธานี	2532	1
931	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
939	ส้มโอ	ปทุมธานี	2532	1
944	มะนาวตาอิดิ	น่าน	2532	1
950	ส้มฟริมองต์	เชียงใหม่	2532	1
956	มะนาวไข่	มุกดาหาร	2532	1
967	มะกรูด	ชลบุรี	2532	1
970	มะนาวแป้น	นครนายก	2532	1
982	ส้มโอ	ปทุมธานี	2532	1
987	ส้มโอ	พิจิตร	2533	1
992	ส้มโอ	พิจิตร	2533	1
1010	ส้มโอ	นครศรีธรรมราช	2533	1
1012	มะนาว	ปทุมธานี	2533	1
1014	มะนาว	ขอนแก่น	2533	1
1017	ส้มโอ	เชิงราย	2533	1
1023	ส้มโอ	จันทบุรี	2533	1
1027	ส้มโอ	จันทบุรี	2533	1
1040	มะกรูด	นนทบุรี	2533	1
1046	ส้มฟริมองต์	กรุงเทพมหานคร	2533	1
1047	ส้มโอ	ปทุมธานี	2533	1
1049	มะนาว	นนทบุรี	2533	1
1055	มะกรูด	นนทบุรี	2533	1
1095	ส้มโอ	เชิงราย	2534	1
1110	ส้มโอ	พัทลุง	2534	1
1123	ส้มโอ	นครพนม	2534	1
1189	ส้มโอ	พิจิตร	2535	1
1199	ส้มโอ	ชัยนาท	2535	1

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>				
1200	ส้มโอ	ชัยนาท	2535	1
1202	ส้มโอ	ชัยนาท	2535	1
1223	ส้มโอ	สงขลา	2536	1
1530	ส้มโอ	พิจิตร	2542	1
1531	ส้มโอ	พิจิตร	2542	1
1536	ส้มโอ	พิจิตร	2542	1
1537	ส้มโอ	พิจิตร	2542	1
1539	ส้มโอ	สมุทรสงคราม	2542	1
1549	ส้มโอ	พิจิตร	2542	1
1576	ส้มโอ	เชียงราย	2544	1
1581	ส้มโอ	พิษณุโลก	2544	1
1582	ส้มโอ	เชียงราย	2544	1
1584	ส้มโอ	พิษณุโลก	2544	1
1588	ส้มโอ	ชลบุรี	2545	1
1619	ส้มเขียวหวาน	จันทบุรี	2545	1
1623	มะนาว	ปทุมธานี	2545	1
1627	ส้มโอ	พิจิตร	2546	5
1628	ส้ม	ชุมพร	2546	5
1629	มะนาว	ตาก	2546	5
1632	ส้มโอ	กำแพงเพชร	2546	5
1633	ส้มโอ	เชียงราย	2546	5
1636	ส้มโอ	เชียงราย	2546	5
1676	ส้มเขียวหวาน	พระนครศรีอยุธยา	2546	5
1677	ส้มเขียวหวาน	พระนครศรีอยุธยา	2548	5
1693	ส้มเขียวหวาน	แพร่	2546	5
1694	ส้มโอ	แพร่	2546	5
1695	ส้ม	เพชรบูรณ์	2546	5
1717	ส้ม	เชียงราย	2547	5

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>				
1720	ส้มตรา	เชียงราย	2547	5
1754	ส้มโอ	สกลนคร	2547	5
1767	ส้มโอ	ตราด	2547	5
1782	ส้มโอ	เชียงราย	2547	5
1783	ส้มโอ	เชียงราย	2547	5
1784	ส้มโอ	เชียงราย	2547	5
1788	ส้มโอ	เชียงราย	2547	5
1791	ส้มโอ	เชียงราย	2547	5
1805	ส้มโอ	ปัตตานี	2547	5
1814	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1816	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1819	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1823	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1825	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1826	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1830	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1831	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1832	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1833	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1834	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	5
1841	ส้มโอ	เชียงราย	2548	5
1843	ส้มโอ	เชียงราย	2548	5
1855	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	5
1856	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	5
1880	ส้มโอ	เชียงราย	2548	5
1886	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	5
1887	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	5
NCPPB409	citrus	Japan	ND	2

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>				
1358	<i>Citrus</i> sp.	ชาอุดิอาราเบีย	ND	3
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>				
1416	<i>Citrus limon</i>	อูรุกวัย	1981	4
1419	<i>C. aurantifolia</i>	บราซิล	1982	4
1460	<i>C. aurantifolia</i>	บราซิล	2000	4
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>				
1237	<i>Citrus</i> sp.	สหรัฐอเมริกา	1985	3
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>				
584	ฝ้าย	สุโขทัย	2529	1
1035	ฝ้าย	นครสวรรค์	2533	1
1037	ฝ้าย	ลพบุรี	2533	1
1051	ฝ้าย	เลย	2533	1
1232	ฝ้าย	ปราจีนบุรี	2536	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>				
241	ถั่วเหลือง	พินูโลก	2525	1
553	ถั่วเหลือง	อุดรดิตถ์	2529	1
728	ถั่วเหลือง	เชียงใหม่	2530	1
1204	ถั่วเหลือง	สงขลา	2535	1
1330	ถั่วเหลือง	สุโขทัย	2537	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>				
1710	มะเขือเทศ	หนองคาย	2546	1
1726	พริก	ลำปาง	2547	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>differenbachiae</i>				
1058	หนั้วว	กรุงเทพฯ	2534	1
1063-1	หนั้วว	เชียงราย	2534	1
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>				
1104	ผักกาดเขียว	สงขลา	2534	1
1869	กระหล่ำ	เพชรบูรณ์	2548	1

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>				
0015	ข้าว	ร้อยเอ็ด	2543	1
TB0003	ข้าว	นครพนม	2543	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>				
1679	มันสำปะหลัง	ระยอง	2546	1
1682	มันสำปะหลัง	ระยอง	2546	1
Saprophytic bacteria				
Sa 1	ใบส้มโอ	เชียงราย	2005	5
Sa 2	ใบส้มโอ	เชียงราย	2005	5
Sa 3	ผลส้มโอ	เชียงราย	2005	5
Sa 4	ผลส้มโอ	เชียงราย	2005	5
Sa 5	ผลส้มโอ	เชียงราย	2005	5
Sa 6	ใบมะนาว	กรุงเทพฯ	2005	5
Sa 7	ผลมะนาว	กรุงเทพฯ	2005	5
Sa 8	ใบ	ปทุมธานี	2005	5
Sa 9	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2005	5
	ผล			
Sa 10	ส้มเขียวหวาน	กรุงเทพฯ	2005	5
	ใบมะกรูด			

1/ หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร

2/ NCPPB, National Collection Plant Pathogenic Bacteria, York, England

3/ D.W. Gabriel, Plant Pathology Department, University of Florida, FL, USA.

4/ IBSBF, Phytobacteria Culture Collection of Instituto Biológico, Campinas, Brazil

5/ งานวิจัยครั้งนี้

ND, not detailed

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีระหว่างสายพันธุ์ของแองเกอร์จากประเทศไทย สายพันธุ์ของแองเกอร์ A จากญี่ปุ่นและสายพันธุ์ของแองเกอร์ B จากอาร์เจนตินา

Characteristics	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Thailand)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ^{1/} (canker A)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> ^{1/} (canker B)
Gram stain	negative	negative	negative
Spore formation	-	-	-
Flagellation (l Polar)	+	+	+
O/F test	0	0	0
Hydrolysis of starch	+	+	+
Hydrolysis of Tween 80	+	+	+
Hydrolysis of casein	+	+	+
Liquefaction of gelatin	+	+	+
Hydrolysis of Arginine	-	-	-
Production of lecithinase	+	+	+
Hydrolysis of aesculin	+	+	+
Gluconate test	-	-	-
Reduction of nitrate	-	-	-
Production of tyrosinase	+	+	v
Production of urease	-	-	-
Production of hydrogen sulphide	+	+	+
Methyl red test	-	-	-
Production of acetoin	-	-	-
Litmus milk reaction	P	P	P
Tolerance to NaCl 3%	+	+	+
5%	+	-	-
7%	+	-	-
Growth at 36 ⁰ C	+	+	-

1/ ข้อมูลจาก Goto *et al.*, 1980

Symbol F = Fermentation , O = Oxidation V = Strain variable

B = Alkali

P = Peptonization

+ = positive, - = negative

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้น้ำตาลระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรค
แคงเกอร์จากประเทศไทย สายพันธุ์ของแคงเกอร์ A จากญี่ปุ่นและสายพันธุ์ของแคง
เกอร์ B จากอาร์เจนตินา

Characteristics	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Thailand)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ^{1/} (canker A)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> ^{1/} (canker B)
Utilization of Arabinose	+	+	+
Rhamnose	v	-	-
Xylose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Maltose	+	+	-
Lactose	+	+	-
Trehalose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Raffinose	-	-	-
L-methyl-D-glucoside	-	-	-
Salicin	v	-	-
Sorbitol	v	-	-
Inositol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Glycerol	+	+	+
Mannitol	+	v	+
Inulin	-	-	-
Glycogen	+	+	+
Dextrin	+	+	+
Starch	+	+	+
Gluconete	-	-	-
Oxalate	-	-	-
Acetrate	-	-	-
Tartrate	-	-	-
Malonate	+	+	v
Citrate	+	+	+
Succinate	+	+	+
Malate	+	+	+

1/ ข้อมูลจาก Gato *et al.*, 1980 , + = positive, - = negative และ V = Variable

และ tartrate และมีความผันแปรในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ rhamnose sorbitol และ salicin (ตารางที่ 6)

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนพืชตระกูลส้ม 5 ชนิด ได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน เกรฟฟรุ๊ต เลมอน ส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวแตงกวา พันธุ์ขาวใหญ่ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ท่าข่อย พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ ทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 7) โดยสามารถทำให้พืชทดสอบแสดงอาการของโรคได้ภายใน 5 วัน (ภาพที่ 2)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการทำปฏิกิริยา rep PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX และ ERIC ให้ผลผลิตดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A* 1358 จากประเทศ ซาอุดีอาระเบีย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B 1416 จากประเทศอูรักวัย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker C 1419 จากประเทศบราซิล เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker D 1460 จากประเทศบราซิล และ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ canker E 1237 จากประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 23 และ 35 แถบ ตามลำดับ ประกอบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 17 และ 11 แบบ จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่นำมาวิเคราะห์ dendrogram คือ 20 และ 30 แถบ คิดเป็น 87 และ 85.7 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของแต่ละไพรเมอร์ตามลำดับ มีขนาดตั้งแต่ 100 คู่เบส ถึง 4000 คู่เบส (ภาพที่ 3, 6) โดยไพรเมอร์ BOX พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800, 900, 1200 และ 2000 คู่เบส ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทย (ภาพที่ 3) และไพรเมอร์ ERIC พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1550 คู่เบส ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค แคนเกอร์ทั้ง canker A, A*, B และ C ยกเว้น canker D และ E พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 900, 1200, 1400, 1550, 2300 และ 4800 คู่เบส ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทย (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการทดสอบการเกิดโรคนบนพืชอาศัยตระกูลส้ม 5 ชนิด ด้วยเชื้อสาเหตุ
โรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย

เชื้อสาเหตุโรคแคง เกอร์	มะนาว	ส้มเขียว หวาน	เลมอน	เกรฟ ฟรุ๊ต	ส้มโอ พันธุ์ ทองดี	ส้มโอ พันธุ์ขาว แดงกวาง	ส้มโอ พันธุ์ ขาวใหญ่	ส้มโอ พันธุ์ขาว น้ำผึ้ง	ส้มโอ พันธุ์ท่า ข่อย
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (canker A)	++++	+++	+++	++++	ND	ND	ND	ND	ND
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (canker A*)	++++	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (canker B)	++++	+	+++	++++	ND	ND	ND	ND	ND
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (canker C)	++++	HR	HR	HR	ND	ND	ND	ND	ND
เชื้อแบคทีเรียสาเหตุ โรคแคงเกอร์ที่พบ ในประเทศไทย	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++

+ หมายถึง การเกิดโรคนบนพืชอาศัยเล็กน้อย (weak canker)

++++ หมายถึง การเกิดโรครุนแรงบนพืชอาศัย (strong canker)

- หมายถึง ไม่มีอาการโรคแคงเกอร์

HR หมายถึง Hypersensitive response

ND หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้งสองชนิด ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS version 2.1 เพื่อสร้าง dendrogram แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อกับพืชอาศัย แหล่งที่มา และช่วงเวลาที่แยกเชื้อได้ โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดกลุ่มจะพิจารณาจากค่า similarity ที่สามารถจัดกลุ่มได้ดีที่สุด ได้ผลดังนี้

Dendrogram จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ BOX

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ BOX มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 และสร้าง dendrogram (ภาพที่ 4) พบว่า ที่ค่า similarity 0.73 สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A ได้แก่ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A จากประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A* 1358 จากประเทศซาอุดีอาระเบีย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B 1416 จากประเทศอูรูกวัย ซึ่งทั้งสองเชื้อแยกมาจากมะนาวและเป็นเชื้อที่เกิดโรคกับพืชตระกูลส้มเฉพาะ มะนาวเท่านั้น

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ canker E 1237 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker D 1460 จากประเทศบราซิล

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker C 1419 จากประเทศบราซิล

เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มที่ค่า similarity 0.8 สามารถจัดได้ 7 กลุ่ม โดยมีรายละเอียดความสัมพันธ์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 106 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย จำนวน 105 สายพันธุ์ และ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย เป็นเชื้อที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มที่แตกต่างกัน ได้แก่ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มตรา ส้มปรี่มองต์ มะนาว และมะกรูด จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2523 ถึง ปี 2548 เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด คิดเป็น 93 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย จำนวน 4 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ส้มโอ จากภาคกลาง เฉพาะจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อในปี 2547 เท่านั้น คิดเป็น 3.5 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย จำนวน 4 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ส้มโอ มะนาว และ ส้มเขียวหวาน จากภาคกลาง และภาคใต้ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อในปี 2532, 2546 และ 2547 เท่านั้น คิดเป็น 3.5 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A* 1358 จากประเทศ ซาอุดีอาระเบีย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B 1416 จากประเทศอูรูกวัย ซึ่งทั้งสองเชื้อแยกมาจากมะนาวและเป็นเชื้อที่ก่อโรครากับพืชตระกูลส้มชนิด มะนาวเท่านั้น

กลุ่มที่ 5 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ canker E 1237 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

กลุ่มที่ 6 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker D 1460 จากประเทศบราซิล

กลุ่มที่ 7 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker C 1419 จากประเทศบราซิล

เมื่อนำเฉพาะผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ของประเทศไทยที่แยกได้จากส้มโอ ด้วยไพรเมอร์ BOX มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 และสร้าง dendrogram (ภาพที่ 5) สามารถแบ่งกลุ่มที่ค่า similarity 0.85 ได้ 3 กลุ่ม โดยมีรายละเอียดความสัมพันธ์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 70 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2523 ถึง ปี 2548 เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด คิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากภาคกลาง เฉพาะจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อในปี 2547 เท่านั้น คิดเป็น 5.2 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2532 และ ปี 2547 คิดเป็น 3.8 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

Dendrogram จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ ERIC

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ERIC มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 และสร้าง dendrogram (ภาพที่ 7) พบว่า ที่ค่า similarity 0.73 สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A ได้แก่ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A จากประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A* 1358 จากประเทศซาอุดีอาระเบีย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B 1416 จากประเทศอูรูกวัย ซึ่งทั้งสองเชื้อแยกมาจากมะนาวและเป็นเชื้อที่ก่อโรคกับพืชตระกูลส้มชนิด มะนาวเท่านั้น

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ canker E 1237 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker C 1419 จากประเทศบราซิล

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker D 1460 จากประเทศบราซิล

เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มที่ค่า similarity 0.8 สามารถจัดได้ 7 กลุ่ม โดยมีรายละเอียดความสัมพันธ์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 87 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 86 สายพันธุ์ และ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย เป็นเชื้อที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มที่แตกต่างกัน ได้แก่ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มตรา ส้มฟริมองต์ มะนาว และมะกรูด จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2523 ถึง ปี 2548 เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด คิดเป็น 76 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 23 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยทั้งหมด เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มฟริมองต์ และมะนาว จากภาคกลาง ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2528 ถึง ปี 2547 คิดเป็น 20.5 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ของประเทศไทยที่แยกได้จากส้มโอ จากภาคกลาง เฉพาะจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อในปี 2547 เท่านั้น คิดเป็น 3.5 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A* 1358 จากประเทศ ซาอุดีอาระเบีย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B 1416 จากประเทศอูรูกวัย ซึ่งทั้งสองเชื้อแยกมาจากมะนาวและเป็นเชื้อที่ก่อโรครากับพืชตระกูลส้มชนิด มะนาวเท่านั้น

กลุ่มที่ 5 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ canker E 1237 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

กลุ่มที่ 6 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker D 1460 จากประเทศบราซิล

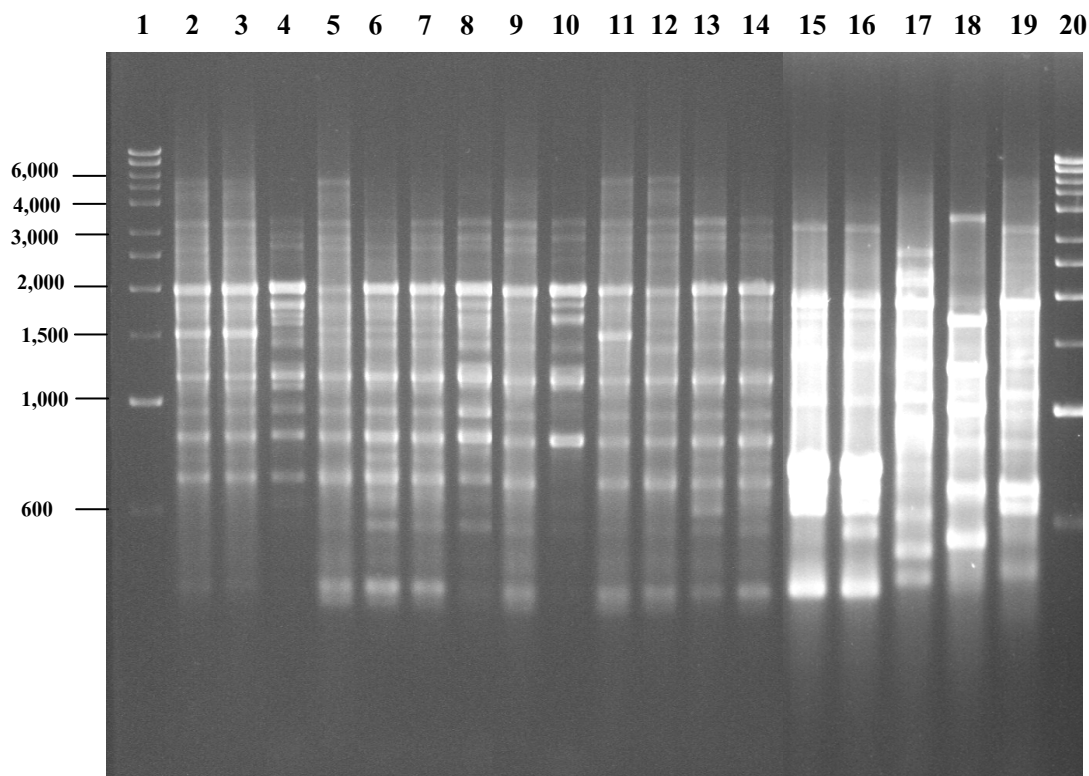
กลุ่มที่ 7 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker C 1419 จากประเทศบราซิล

เมื่อนำเฉพาะผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ของประเทศไทยที่แยกได้จากส้มโอ ด้วยไพรเมอร์ ERIC มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 และสร้าง dendrogram (ภาพที่ 8) สามารถแบ่งกลุ่มที่ค่า similarity 0.8 ได้ 3 กลุ่ม โดยมีรายละเอียดความสัมพันธ์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากแหล่งปลูกภาคเหนือและภาคกลาง โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2528 ถึงปี 2547 คิดเป็น 16.9 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

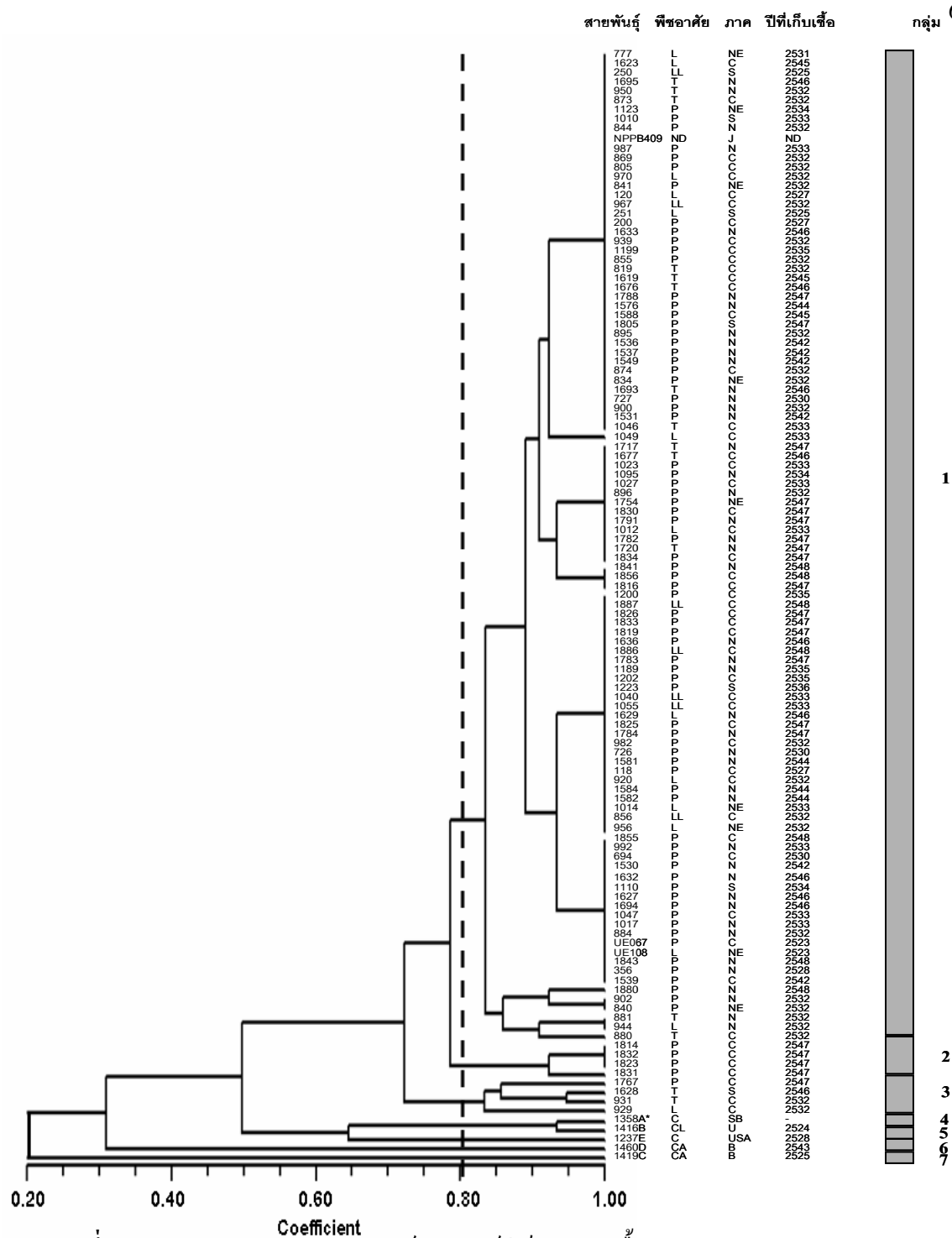
กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากภาคกลาง เฉพาะจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อในปี 2547 เท่านั้น คิดเป็น 5.2 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 60 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ จากแหล่งปลูกทั่วประเทศทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยมีช่วงเวลาการแยกพบเชื้อตั้งแต่ปี 2523 ถึง ปี 2548 เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด คิดเป็น 77.9 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากส้มโอ

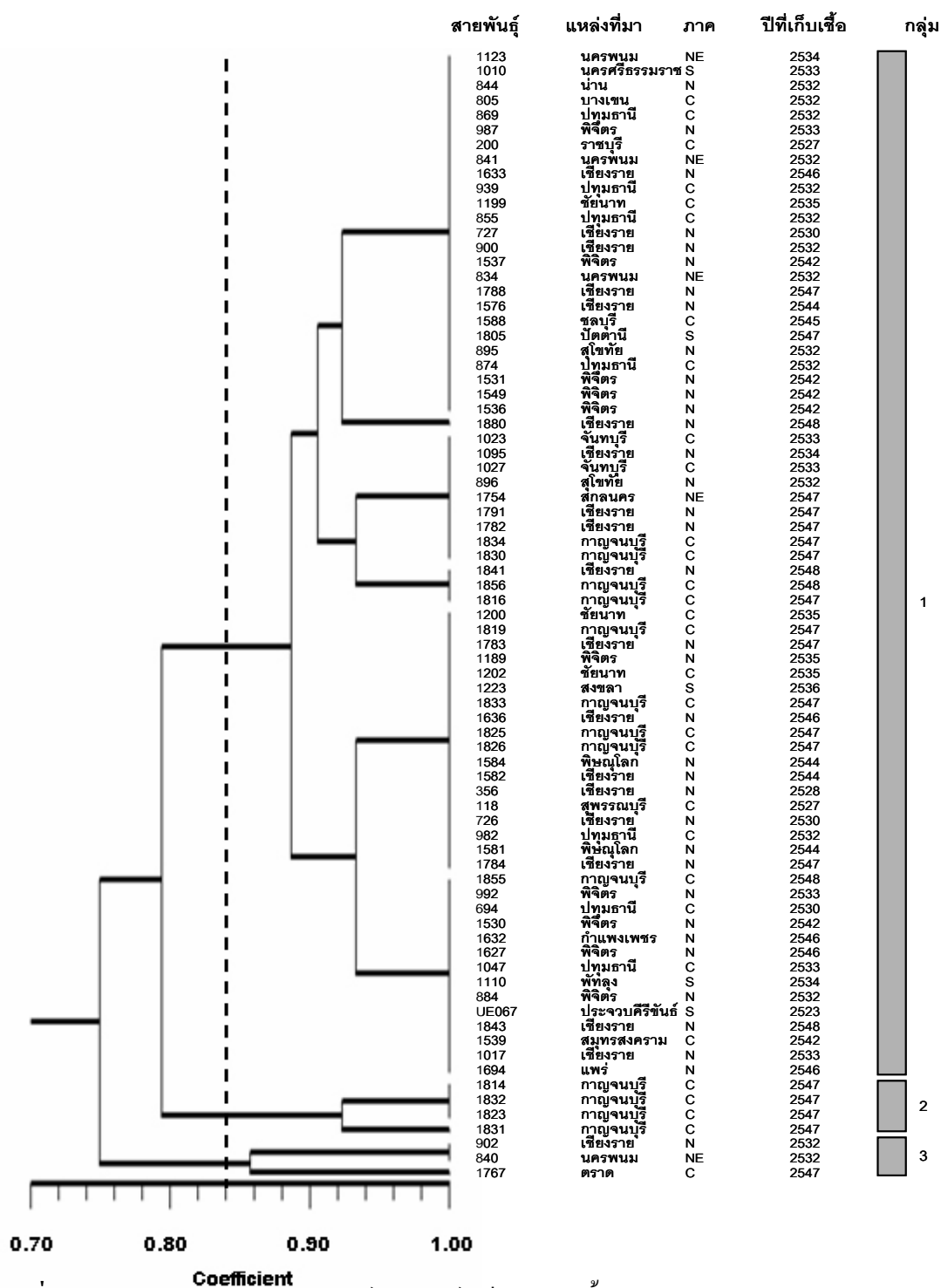


ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX

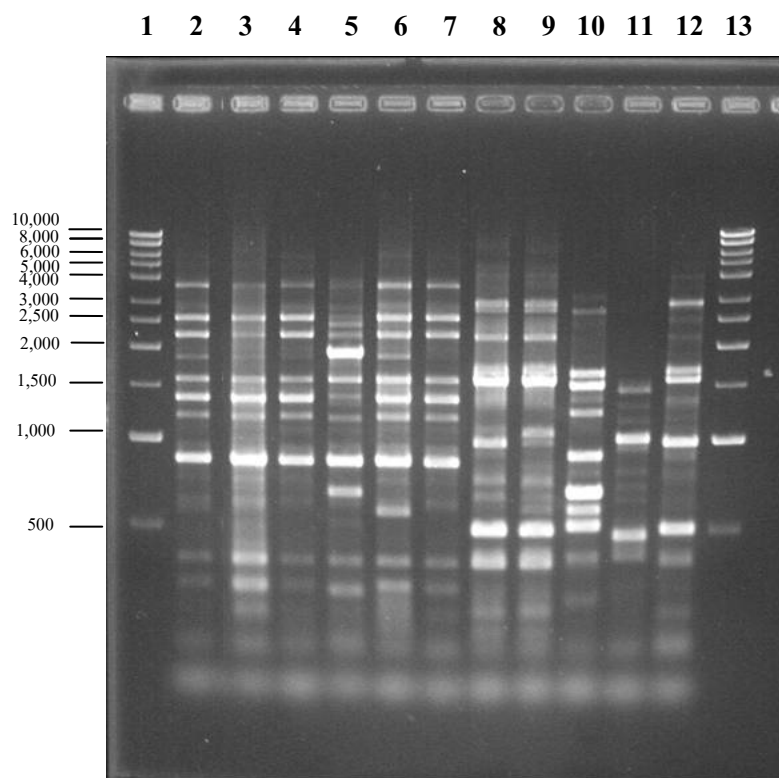
Lane ที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb) , Lane ที่ 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1782, Lane ที่ 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1834, Lane ที่ 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1628, Lane ที่ 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1862, Lane ที่ 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 120, Lane ที่ 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 200, Lane ที่ 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 913, Lane ที่ 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 967, Lane ที่ 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 929, Lane ที่ 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1720, Lane ที่ 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1629, Lane ที่ 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1886, Lane ที่ 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ NCPPB409 canker A, Lane ที่ 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1396 canker A*, Lane ที่ 16 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 cankerB, Lane ที่ 17 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1419 canker C, Lane ที่ 18 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1360 cankerD, Lane ที่ 19 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 cankerE ,Lane ที่ 20 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)



ภาพที่ 4 Dendrogram จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ BOX แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (C *Citrus* sp.; CA *C. aurantifolii*; CL lemon; L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; B บราซิล; J ญี่ปุ่น; SB ซาอุดีอาระเบีย; U อูรุกวัย; USA สหรัฐอเมริกา; ND no detailed)

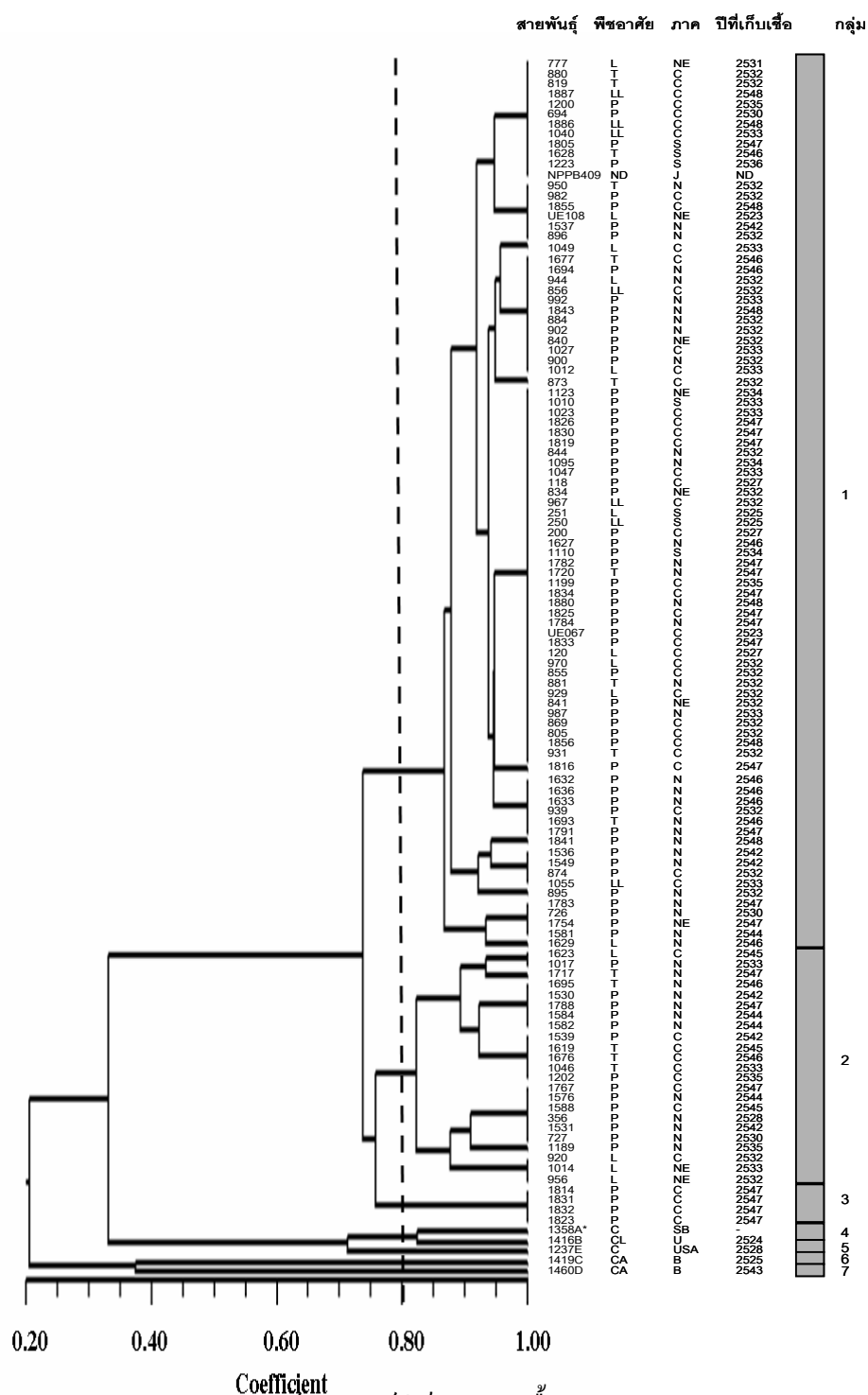


ภาพที่ 5 Dendrogram จากการวิเคราะห์หลายพหุมิติเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ที่แยกจากส้มโอในประเทศไทย สังเคราะห์จากโปรแกรม BOX แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากส้มโอ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

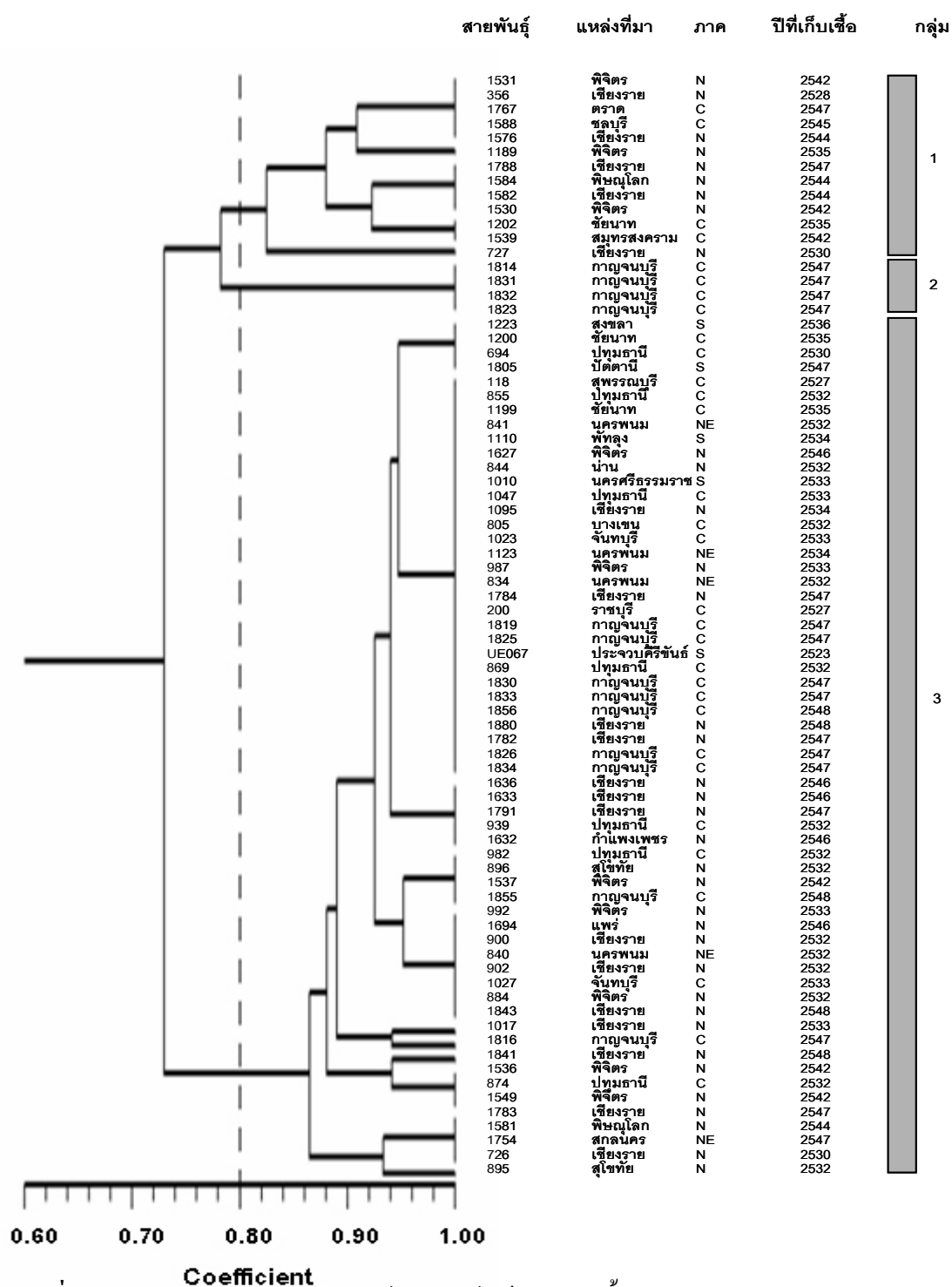


ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC

Lane ที่ 1	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)
Lane ที่ 2	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1095
Lane ที่ 3	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1855
Lane ที่ 4	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 819
Lane ที่ 5	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1049
Lane ที่ 6	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 856
Lane ที่ 7	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ NCPPB409 canker A
Lane ที่ 8	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1396 canker A*
Lane ที่ 9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1416 cankerB
Lane ที่ 10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1419 cankerC
Lane ที่ 11	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1360 cankerD
Lane ที่ 12	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> สายพันธุ์ 1267 cankerE
Lane ที่ 13	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)



ภาพที่ 7 Dendrogram จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (C *Citrus* sp.; CA *C. aurantifolii*; CL lemon; L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; B บราซิล; J ญี่ปุ่น; SB ชาอูดีอาราเบีย; U อูรุกวัย; USA สหรัฐอเมริกา; ND no detailed)



ภาพที่ 8 Dendrogram จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. citri สายพันธุ์ที่แยกในประเทศไทย สัมเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC แสดงสหสัมพันธ์

ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากส้มโอ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Polymerase chain reaction

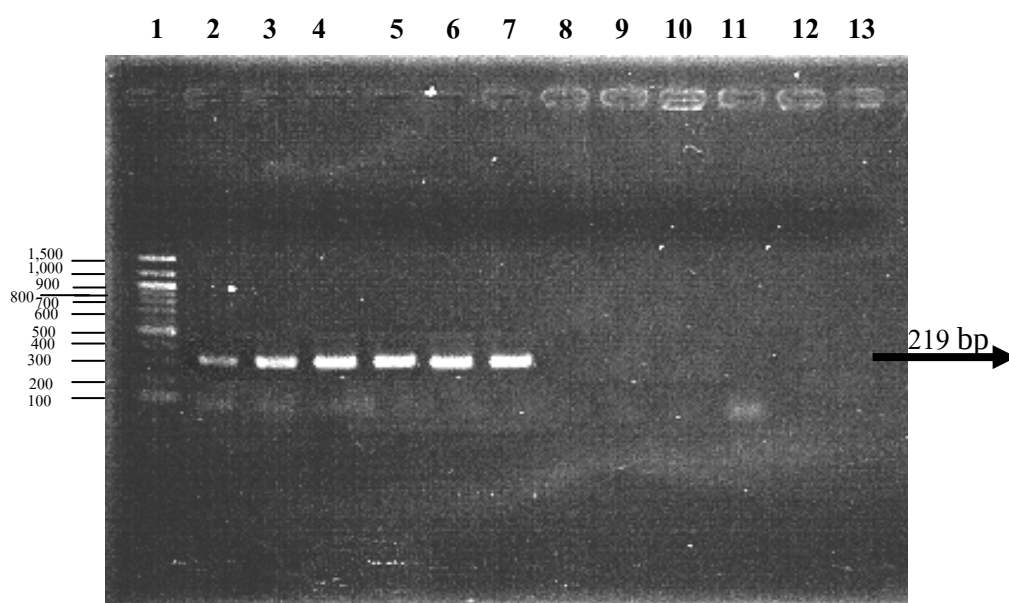
การทดสอบไพรเมอร์

การทดสอบปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ D1 มีค่า T_m 60 °C และ D2 มีค่า T_m 59 °C เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่ 59 °C พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยได้ดีเอ็นเอ ขนาด 219 bp (ภาพที่ 9) ในขณะที่ไพรเมอร์ 2/3 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยได้ดีเอ็นเอขนาด 222 bp ซึ่งเป็นไปตามที่ Hartung *et al.* (1993) ได้รายงานไว้

ทดสอบความไว (sensitivity) และทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ D1/D2 ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของคู่ไพรเมอร์ D1/D2 พบว่าไพรเมอร์ D1/D2 สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกิริยา (ตารางที่ 8) และความเข้มข้นของสารละลายเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ 81 CFU/ปฏิกิริยา (ตารางที่ 9)

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ D1/D2 สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกเชื้อในประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ และ สายพันธุ์ NCPPB409 canker A จากประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสารละลายเชื้อ *X. axonopodis malvacearum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 5 สายพันธุ์ และ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบและสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1358 canker A* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 Canker B, สายพันธุ์ 1419 Canker C สายพันธุ์ 1460 canker D เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 canker E, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 2 สายพันธุ์ *X. oryzae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และเชื้อซาโปรอฟต์ ที่แยกได้จากใบและผล



ภาพที่ 9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1 และ D2 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียง เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลต์

Lane 1	100 bp DNA ladder
Lane 2	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1123
Lane 3	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 884
Lane 4	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 873
Lane 5	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 950
Lane 6	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 777
Lane 7	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ N1601 canker A
Lane 8	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1396 canker A*
Lane 9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1416 cankerB
Lane 10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1419 cankerC
Lane 11	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1360 cankerD
Lane 12	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> สายพันธุ์ 1267 cankerE
Lane 13	น้ำ

ตารางที่ 8 ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/D2

Bacterial DNA / ปฏิกริยา ^{1/}	ผลการตรวจ PCR ^{2/}
250 ng	+
25 ng	+
2.5 ng	+
250 pg	+
25 pg	+
2.5 pg	-
250 fg	-

1/ ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ที่ปรับความเข้มข้นให้ได้ 50 ng / μ l และนำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 50 ng / μ l ถึง 0.05 pg / μ l

2/ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ D1/D2 ที่ทำปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 3 โดย

+ = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

- = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ตารางที่ 9 ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเซลล์ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ D1/D2

Sample Bacterial Cell ^{1/}	CFU / ปฏิกริยา ^{2/}	ผลการตรวจ PCR ^{3/}
O.D. 0.1 _{600 nm.}	8.1×10^6	+
10^{-1}	8.1×10^5	+
10^{-2}	8.1×10^4	+
10^{-3}	8.1×10^3	+
10^{-4}	8.1×10^2	+
10^{-5}	81	-
10^{-6}	8	-

1/ สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ที่ปรับให้มีความขุ่นให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.1 และมาทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

2/ แต่ละ dilution นำไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium

3/ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ D1/D2 ที่ทำปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 3 โดย

+ = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

- = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

พืชตระกูลส้มทั้ง 10 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10) ในขณะที่ไพรเมอร์ 2/3 สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ และ สายพันธุ์ NCPPB409 Canker A ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสารละลายเชื้อ *X. campestris malvacearum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบและสารละลายเซลล์แบคทีเรียของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1358 canker A* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 Canker B, สายพันธุ์ 1419 Canker C สายพันธุ์ 1460 Canker D เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 Canker E เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. oryzae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และเชื้อซาโปรไฟต์ที่แยกได้จากใบและผลพืชตระกูลส้มทั้ง 10 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10)

การตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี one tube nested PCR

การทดสอบไพรเมอร์

การทดสอบปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์ ไพรเมอร์คู่แรกที่ย่อแบบไว้คือ Ptha3F มีค่า Tm 72.58 °C และ Ptha3R มีค่า Tm 72.09 °C ไพรเมอร์คู่ที่สอง คือ D3 มีค่า Tm 59.96 °C และ D4 มีค่า Tm 59.69 °C เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์คู่แรกกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่ 72 °C และไพรเมอร์คู่ที่สอง ที่ 56 °C ตามสภาพที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จากดีเอ็นเอแม่แบบจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทั้ง 113 สายพันธุ์ ได้ดีเอ็นเอ ขนาด 136 คู่เบส (ภาพที่ 10)

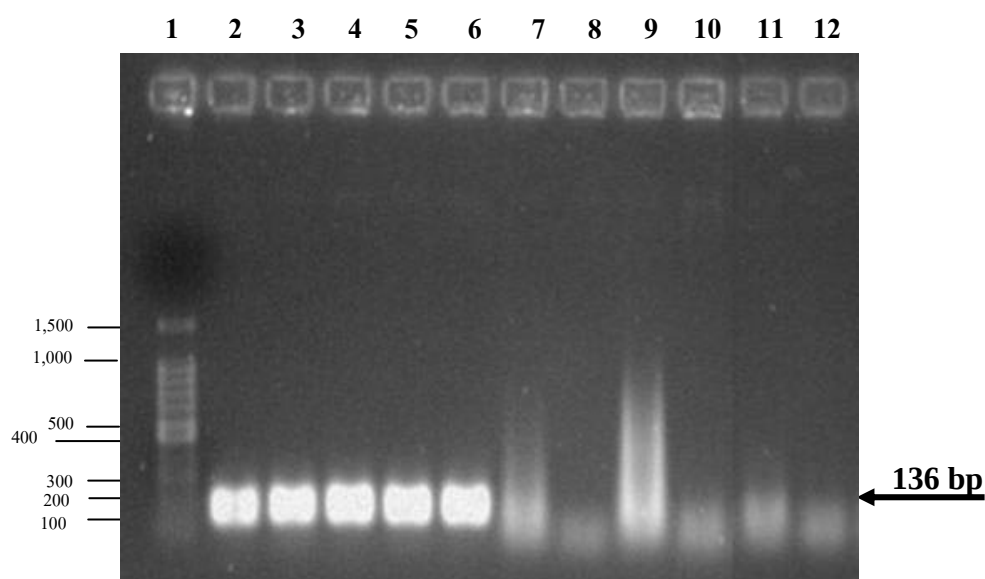
ทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของ Primer Pth3R/ Pth3F และ D3/D4

ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด สามารถตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอ

0.5 pg/ปฏิกิริยา (ตารางที่ 11) และความเข้มข้นของสารละลายเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดที่สามารถตรวจได้คือ 9.4 CFU/ปฏิกิริยา (ตารางที่ 12)

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ Primer Pth3R/ Pth3F และ D3/D4 ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 136 คู่เบส จากดีเอ็นเอแม่แบบและสารละลายเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น และยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบและสารละลายเซลล์แบคทีเรียของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1358 canker A* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 Canker B, สายพันธุ์ 1419 Canker C สายพันธุ์ 1460 Canker D เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 Canker E เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. oryzae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และ saprophyte ที่แยกได้จากใบและผลพืชตระกูลส้มทั้ง 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/ Pth3F และ D3/D4 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์

Lane 1	100 bp DNA ladder
Lane 2	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1123
Lane 3	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 884
Lane 4	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 950
Lane 5	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 777
Lane 6	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ N1601 canker A
Lane 7	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ 1396 canker A*
Lane 8	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1416 canker B
Lane 9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1419 canker C
Lane 10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> สายพันธุ์ 1360 canker D
Lane 11	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> สายพันธุ์ 1267 canker E
Lane 12	น้ำ

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ D1/D2 และไพรเมอร์ 2/3 วิธี one tube nested PCR ด้วยไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 และ วิธี IMS ร่วมกับ nested PCR

รายชื่อเชื้อ	ผลการตรวจเชื้อด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ^{2/}			
	PCR D1/D2	PCR 2/3	nested PCR Pth3R/Pth3F และ D3/D4	IMS-nested PCR
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (113) ^{1/}	113	113	113	113
<i>X. fuacans</i> pv. <i>aurantifolii</i> (3)	0	0	0	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> (1)	0	0	0	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (5)	5	5	5	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (5)	5	0	0	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (2)	2	0	0	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>differebachiae</i> (2)	0	0	0	0
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (2)	0	0	0	0
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (2)	0	0	0	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (2)	0	0	0	0
Saprophytic bacteria (10)	0	0	0	0

1/ ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบความเฉพาะเจาะจง

2/ จำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ไพรเมอร์สามารถตรวจสอบได้

ตารางที่ 11 ความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4

Bacterial DNA / ปฏิกริยา ^{1/}	ผลการตรวจ one tube nested PCR ^{2/}
50 ng	+
5 ng	+
0.5 ng	+
50 pg	+
5 pg	+
0.5 pg	+
50 fg	-

1/ ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ที่ปรับความเข้มข้นให้ได้ 50 ng / μ l และนำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 50 ng / μ l ถึง 0.05 fg / μ l

2/ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ D1/D2 ที่ทำปฏิกริยา one tube nested PCR ตามตารางที่ 3 โดย

- + = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*
- = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ตารางที่ 12 ความไวในการตรวจสอบเซลล์ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 โดยไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4

Sample Bacterial Cell ^{1/}	CFU / ปฏิกริยา ^{2/}	ผลการตรวจ PCR ^{3/}
O.D. 0.1 _{600 nm.}	9.4 x10 ⁴	+
10 ⁻¹	9.4x10 ³	+
10 ⁻²	9.4x10 ²	+
10 ⁻³	9.4x10	+
10 ⁻⁴	9.4	+
10 ⁻⁵	-	-
10 ⁻⁶	-	-

1/ สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ที่ปรับให้มีความขุ่นให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.1 และมาทำ serial dilution ตั้งแต่ 10⁻¹ ถึง 10⁻⁶

2/ แต่ละ dilution นำไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium

3/ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ D1/D2 ที่ทำปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 6 โดย

+ = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

- = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับสารละลายเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ผลของน้ำบดใบส้มโอต่อปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR

ผลการทดสอบน้ำบดใบส้มโอต่อปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR โดย การเติมน้ำบดใบส้มโอ ที่มีเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ความเข้มข้นในระดับต่างๆ จำนวน 10 µl และ 1 µl ลงไปในการทำปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR ปริมาณรวมของปฏิกิริยา 25 µl เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่า น้ำบดใบส้มมีผลต่อปฏิกิริยา PCR โดยการเติมน้ำบดใบส้มจำนวน 10 µl และ 1 µl ลงไปในปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ D1/D2 และ ไพรเมอร์ 2/3 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *pthA* ได้ ทำให้ไม่ได้ขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเลยทั้ง 10 ซ้ำที่ทดสอบ (ตารางที่ 13) ในขณะที่น้ำบดใบส้มจำนวน 10 µl และ 1 µl ที่เติมลงไปในปฏิกิริยา one tube nested PCR ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา one tube nested PCR โดย ไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *pthA* ได้ขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 136 คู่เบสทั้ง 10 ซ้ำที่ทดสอบ (ตารางที่ 13)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

จากการทดสอบการเตรียมตัวอย่างโรคแคงเกอร์ 2 วิธี เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี PCR และ one tube nested PCR พบว่า การเตรียมตัวอย่างแบบที่ 1 โดยการบดตัวอย่างแผลใน 0.85% NaCl ด้วย plastic disposable pestle นั้นโดยวิธี PCR ไม่สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี one tube nested PCR สามารถตรวจสอบเชื้อได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 14) แสดงให้เห็นว่า การบดตัวอย่างทำให้พืชปลดปล่อยสารบางชนิดไปมีผลต่อปฏิกิริยา PCR การเตรียมตัวอย่างที่ 2 เป็นการล้างผิวใบพืชเพื่อล้างเอาแบคทีเรียที่อยู่ผิวใบมาตรวจด้วยวิธี PCR และ one tube nested PCR พบว่า ทั้งวิธี PCR และ one tube nested PCR สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 7 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี one tube nested PCR ตรวจพบเชื้อทั้ง 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 14) และทุกตัวอย่างตรวจพบโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* แต่ไม่สามารถนับโคโลนีได้เนื่องจากมีปริมาณมาก (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ผลของน้ำบดใบส้มโอต่อปฏิกิริยา PCR และ one tube nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

น้ำบดใบส้ม ^{1/}	ปริมาณเชื้อ <i>X</i> ^{2/} . <i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i> CFU/ml	PCR ไพรเมอร์ D1/D2		PCR ไพรเมอร์ 2/3		one tube nested PCR	
		1 µl	10 µl	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
10 ⁻¹	9.4 x 10 ⁶	0 ^{3/} /10 ^{4/}	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10
10 ⁻²	9.4 x 10 ⁵	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10
10 ⁻³	9.4 x 10 ⁴	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10
10 ⁻⁴	9.4 x 10 ³	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10

- 1/ น้ำบดใบส้มที่เตรียมจากใบส้มบดใน 0.85% NaCl จำนวน 50 ml นำจำนวน 9 ml เติมด้วย 1 ml ของสารละลายเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939 ที่ปรับความขุ่นให้ได้ O.D. เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำมาทำให้เจือจาง โดยวิธี serial dilution ตั้งแต่ 10⁻¹ ถึง 10⁻⁴ ด้วยน้ำบดใบส้มที่เตรียมไว้
- 2/ ปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้จากแต่ละ dilution ของน้ำบดใบส้ม
- 3/ จำนวนซ้ำที่ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้
- 4/ จำนวนซ้ำทั้งหมดที่ทดสอบปฏิกิริยา

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างจากใบพืชตระกูลส้ม ในการตรวจหาเชื้อ

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* ด้วยเทคนิค PCR, one tube nested PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะ

การเตรียมตัวอย่าง	PCR ^{3/} D1/D2	one tube nested PCR	ตรวจบนอาหาร SX ^{4/}
แบบที่ 1 โดยนำใบตัวอย่าง ^{1/}			
ตัวอย่างที่ 1	-	+	+
ตัวอย่างที่ 2	-	+	+
ตัวอย่างที่ 3	-	+	+
ตัวอย่างที่ 4	-	+	+
ตัวอย่างที่ 5	-	+	+
ตัวอย่างที่ 6	-	+	+
ตัวอย่างที่ 7	-	+	+
ตัวอย่างที่ 8	-	+	+
ตัวอย่างที่ 9	-	+	+
ตัวอย่างที่ 10	-	+	+
แบบที่ 2 โดยนำลำตัวอย่าง ^{2/}			
ตัวอย่างที่ 1	+	+	+
ตัวอย่างที่ 2	-	+	+
ตัวอย่างที่ 3	+	+	+
ตัวอย่างที่ 4	+	+	+
ตัวอย่างที่ 5	-	+	+
ตัวอย่างที่ 6	+	+	+
ตัวอย่างที่ 7	+	+	+
ตัวอย่างที่ 8	-	+	+
ตัวอย่างที่ 9	+	+	+
ตัวอย่างที่ 10	+	+	+

1/ การเตรียมตัวอย่างแบบที่ 1 นำตัวอย่างโรคน้ำส้ม 1 จุดแผล เดิมด้วย 100 µl ของ 0.85% NaCl บดด้วย plastic disposable pestles

ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที

2/ การเตรียมตัวอย่างแบบที่ 2 นำตัวอย่างโรคน้ำส้ม 1 จุดแผล เดิมด้วย 100 µl ของ 0.85% NaCl นำไปเข้าบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง

3/ ผลการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคน้ำส้มโดย

- + = ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่าง
- = ตรวจไม่พบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่าง

4/ ผลการตรวจโคลนนิ่งของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium โดย

- + = ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่าง
- = ตรวจไม่พบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่าง

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี IMS - nested PCR

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี IMS ร่วมกับปฏิกิริยา nested PCR

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 136 คู่เบส จากสารละลายเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของประเทศไทยทั้ง 113 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์สารละลายเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ทั้ง 5 สายพันธุ์, เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1358 canker A* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 Canker B, สายพันธุ์ 1419 Canker C สายพันธุ์ 1460 Canker D เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 Canker E เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *difffenbachiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ *X. oryzae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และ saprophyte ที่แยกได้จากใบและผลพืชตระกูลส้มทั้ง 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 10)

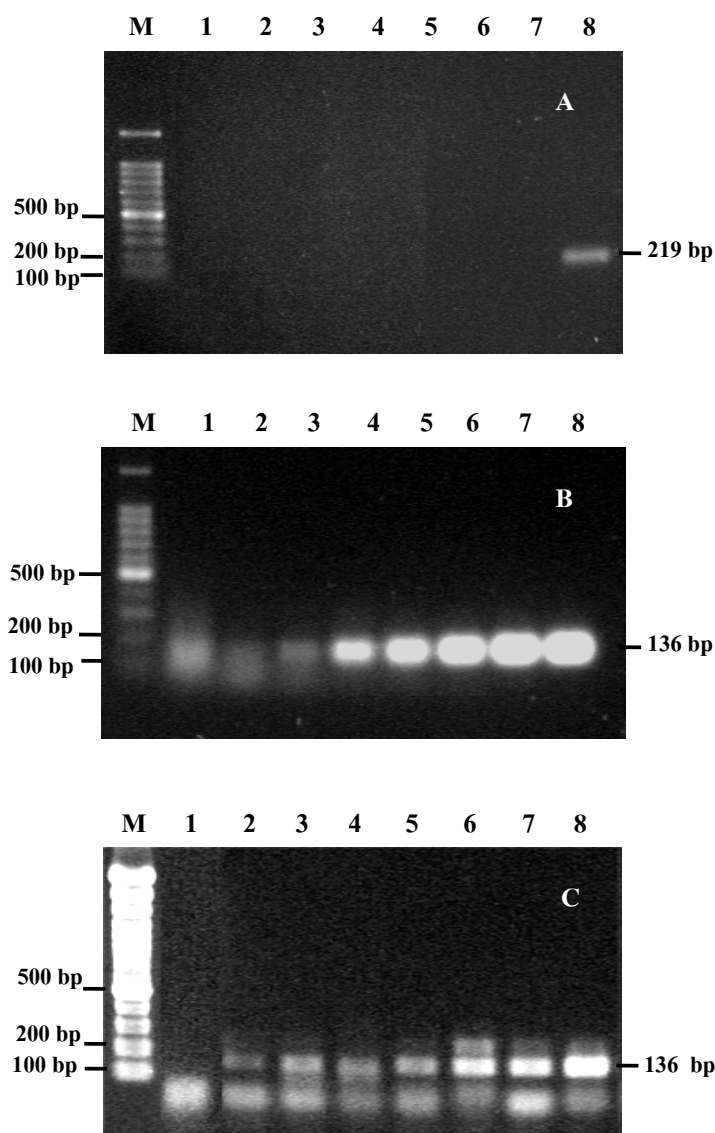
ทดสอบความไวการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้มโดยวิธี IMS - nested PCR

จากการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้ม พบว่าวิธี IMS-nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5.8 cells/ปฏิกิริยา (ภาพที่ 11; ตารางที่ 15) ในขณะที่วิธี nested PCR อย่างเดียวตรวจได้ความเข้มข้นต่ำสุด 5.8x10 cells/ปฏิกิริยา และวิธี standard PCR สามารถตรวจได้ความเข้มข้น 5.8 x10⁶ cells/ปฏิกิริยา จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้วิธี IMS-nested PCR สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้ม โดยมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี nested PCR อย่างเดียว 10 เท่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี standard PCR ถึงล้านเท่า เนื่องจากสารที่ถูกปล่อยมาจากใบส้มไปยับยั้งปฏิกิริยาของ standard PCR ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ แต่ไม่ส่งผลต่อการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้มโดยวิธี IMS-nested PCR

และวิธี nested PCR ผลการทดลองนี้พบว่าวิธี IMS-nested PCR มีประสิทธิภาพดีกว่าทั้งวิธี nested PCR และวิธี standard PCR

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูก โดยวิธี IMS -nested PCR

จากการเก็บตัวอย่างโรคของพืชตระกูลส้ม จากแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์ ในจังหวัดเชียงราย พิจิตร ปทุมธานี กรุงเทพมหานคร สระบุรี และ เพชรบุรี จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ จำนวน 24 ตัวอย่างและตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการจำนวน 26 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าโดยวิธี IMS-nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบทั้งหมด 44 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% ในขณะที่ วิธี nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 38 ตัวอย่าง คิดเป็น 76% และวิธี standard PCR ตรวจพบเชื้อเพียง 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 30% โดยจะตรวจพบในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ชัดเจน แต่วิธี IMS-nested PCR และวิธี nested PCR สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการจากตัวอย่างจำนวน 26 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อ 20 ตัวอย่างและ 14 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ในขณะที่วิธี standard PCR ไม่สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการเลย เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้ 38 ตัวอย่าง (ตารางที่ 16) โดยพบว่า ตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี IMS-nested PCR ไม่พบก็ตรวจไม่พบโดยวิธีอื่นๆ และไม่สามารถแยกเชื้อบนอาหาร SX media ได้เช่นกัน



ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) ในน้ำใบส้มด้วยวิธี standard PCR (A), วิธี one tube nested PCR (B) และวิธี IMS-nested PCR (C)

M: GeneRuler 100 bp plus DNA ladder, Lane1: H₂O,

Lane2: Xac 5.8 Cells/ปฏิกิริยา, Lane3: Xac 5.8 x10 Cells/ปฏิกิริยา,

Lane4: Xac 5.8x10² Cells/ปฏิกิริยา, Lane5: Xac 5.8x10³ Cells/ปฏิกิริยา,

Lane6: Xac 5.8x10⁴ Cells/ปฏิกิริยา, Lane7 : Xac 5.8x10⁵ Cells/ปฏิกิริยา,

Lane 8 : Xac 5.8x10⁶ Cells/ปฏิกิริยา

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ในน้ำใบส้มด้วยวิธี IMS-nested PCR กับวิธี standard PCR และ วิธี one tube nested PCR

Dilution	Cells/ปฏิกิริยา ^{1/}	IMS - nested PCR ^{2/}	nested PCR ^{3/}	Standard PCR ^{4/}
10 ⁻¹	5.8 x10 ⁶	+ ^{5/}	+	-
10 ⁻²	5.8 x10 ⁵	+	+	-
10 ⁻³	5.8 x10 ⁴	+	+	-
10 ⁻⁴	5.8 x10 ³	+	+	-
10 ⁻⁵	5.8 x10 ²	+	+	-
10 ⁻⁶	5.8 x10	+	+	-
10 ⁻⁷	5.8	+	-	-

1/ แต่ละ dilution นำไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เชื้อโดยตรงจาก haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2/ การตรวจด้วยวิธี IMS-nested PCR จากการวิจัยในครั้งนี้

3/ การตรวจด้วยวิธี one tube nested PCR จากการวิจัยในครั้งนี้

4/ การตรวจด้วยวิธี standard PCR จากการวิจัยในครั้งนี้

5/ ผลการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดย

+ = ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

- = ตรวจไม่พบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ของตัวอย่าง
จากแปลงปลูก

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด	IMS - nested PCR ^{1/}	nested PCR ^{2/}	Standard PCR ^{3/}	Isolation ^{4/}
1. ตัวอย่างที่แสดงอาการ ของโรคแคงเกอร์	24 ^{5/}	24 ^{6/}	24	15	24
2. ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ ของโรคแคงเกอร์	26	20	14	0	14
รวม	50	44	38	15	38

1/ การตรวจด้วยวิธี IMS-nested PCR จากการวิจัยในครั้งนี้อยู่

2/ การตรวจด้วยวิธี one tube nested PCR จากการวิจัยในครั้งนี้อยู่

3/ การตรวจด้วยวิธี standard PCR จากการวิจัยในครั้งนี้อยู่

4/ การตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium

5/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ

6/ จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่ได้จาก ไพรมเมอร์ D1/D2 และ จาก one tube nested PCR

เมื่อเชื่อมต่อผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์จากยีน *pthA* ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยกระบวนการ PCR ที่ใช้ไพรมเมอร์ D1/D2 และ จาก one tube nested PCR เข้ากับพลาสมิด pGEM-TEasy คัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสอดแทรก โดยจะมีโคโลนีสีขาวมาทำการคัดเลือกโดยกระบวนการ PCR ที่ใช้ไพรมเมอร์ D1/D2 และ วิธีการ one tube nested PCR โดยใช้ไพรมเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 ตรวจพบโคลนที่มีดีเอ็นเอขนาด 219 เบสและ 136 คู่เบสสอดแทรกอยู่ ตรวจสอบอีกครั้งสกัดพลาสมิดสายผสม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดบริเวณ multiple cloning site พบโคลนที่มีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 219 คู่เบสและ 136 คู่เบส นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยคัดเลือกพลาสมิดสายผสมโคลน ที่มีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 219 คู่เบสและ 136 คู่เบส สอดแทรกไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำมาเทียบความเหมือนกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-N พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สอดแทรกอยู่ในโคลน มีการจัดเรียงตัวเหมือนกับยีน *pthA* ของ *X. axonopodis* pv. *citri* (accession: U28802) คิดเป็น 100% identities โดย ผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรมเมอร์ D1/D2 อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2788-3005 (ภาพที่ 12) และ ผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรมเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 ใน one tube nested PCR อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 121-241 (ภาพที่ 13)

gi|899438|gb|U28802.1 Xanthomonas citri PthA (pthA) gene, complete cds
Length=4275

Score = 434 bits (219), Expect = 5e-119
Identities = 219/219 (100%), Gaps = 0/219 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT 60
            |||
Sbjct 2788   CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT 2847

Query 61     GCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGC 120
            |||
Sbjct 2848   GCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGC 2907

Query 121    CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGT 180
            |||
Sbjct 2908   CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGT 2967

Query 181    GCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTCGT 219
            |||
Sbjct 2968   GCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTCGT 3006

```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบความเหมือนของการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์D1และD2 ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* กับยีน *pthA* โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST N จาก เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

gi|899438|gb|U28802.1 Xanthomonas citri PthA (pthA) gene, complete cds

Length=4275

Score = 270 bits (136), Expect = 1e-69
Identities = 136/136 (100%), Gaps = 0/136 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 12  ATCGATAGCTTCACCCGATCTATCCCTTGCCTGGAGCGGGATACGGCAGAAATGCCCAA 71
          |||
Sbjct 121  ATCGATAGCTTCACCCGATCTATCCCTTGCCTGGAGCGGGATACGGCAGAAATGCCCAA 180

Query 72  GAGCCTACCGAGTAGTGAATACCGAAAGCGCTCCAGCGATGGGGCGCTTTCTTTTATAG 131
          |||
Sbjct 181  GAGCCTACCGAGTAGTGAATACCGAAAGCGCTCCAGCGATGGGGCGCTTTCTTTTATAG 240

Query 132  GGCAATGGTCTGTTCG 147
          |||
Sbjct 241  GGCAATGGTCTGTTCG 256

```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบความเหมือนของการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ Pth3R/Pth3F และ D3/D4 ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* กับยีน *pthA* โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST N จากเว็บไซต์ [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

วิจารณ์

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ เป็นเชื้อที่มีความสำคัญของพืชตระกูลส้ม และเป็นเชื้อกักกันพืชร้ายแรง (international phytosanitary quarantine pest) ในประเทศที่เป็นแหล่งผลิตส้มที่สำคัญของโลก ประเทศไทยก็เป็นแหล่งผลิตส้มที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลก พบการระบาดของโรคอย่างแพร่หลายทุกพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้ม การป้องกันกำจัดโรคนี้จำเป็นต้องทราบลักษณะต่างๆ ของเชื้อที่ถูกต้องและวิธีการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว เพื่อการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง และหาวิธีการป้องกันกำจัดอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาลักษณะต่างๆ ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยโดยนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ตามหลายๆ แหล่งในประเทศไทย ทั้ง 113 สายพันธุ์ นำไปศึกษาปฏิกิริยาชีวเคมีและสรีรวิทยา พบว่าเชื้อทั้ง 113 สายพันธุ์ สามารถย่อยแป้ง, ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย casein ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite, สร้างก๊าซไข่เน่า (hydrogen sulphide), สามารถใช้ aesculin, สร้าง acetoin ไม่สามารถใช้ arginine และ gluconate ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease สามารถสร้างเอนไซม์ lecithinase พบในบางเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ tyrosinase เป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยไม่สามารถสร้างเอนไซม์ tyrosinase เกิด proteolysis ใน litmus milk สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 36°C ทนทานต่อเกลือ NaCl ในระดับความเข้มข้นถึง 7%

จากการศึกษาของ Goto *et al.* (1980) พบว่าในเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นและ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จากอาร์เจนตินา มีปฏิกิริยาเหมือนกันยกเว้นการใช้น้ำตาลบางชนิด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ได้จากประเทศไทย ก็พบว่ามีปฏิกิริยาเหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นและอาร์เจนตินา โดยมีความแตกต่างกันเพียงความทนทานต่อเกลือ NaCl เท่านั้น โดยพบว่าเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นและอาร์เจนตินาสามารถทนทานต่อเกลือ NaCl เพียง 3% เท่านั้น ในขณะที่เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยสามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ถึง 7%

จากการศึกษาการใช้น้ำตาลของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทั้ง 113 สายพันธุ์ พบว่าสามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose maltose, lactose, trehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate ไม่สามารถใช้ L-methyl-d-glucoside, raffinose, inositol, inulin, ducitol, gluconate, oxalate,

acetate และ tartrate และพบความผันแปรในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ rhamnose sorbitol และ salicin เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากญี่ปุ่นและอาร์เจนตินา (Goto *et al.*, 1980) พบว่าปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นคล้ายกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน *X. axonopodis* pv. *citri* (ตารางที่ 3) ซึ่งจากการศึกษาของ Goto *et al.*, (1980) พบว่า *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นกับ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จากประเทศอาร์เจนตินามีความแตกต่างกันในน้ำตาล maltose และ lactose และมีการแตกต่างเล็กน้อยใน mannitol และ malonate โดยเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นสามารถใช้น้ำตาล maltose และ lactose ส่วนเชื้อในประเทศอาร์เจนตินาไม่สามารถใช้ได้ และพบว่าบางสายพันธุ์ของเชื้อจากญี่ปุ่นสามารถใช้ mannitol ได้ แต่บางสายพันธุ์ไม่ใช่ ส่วนเชื้อจากอาร์เจนตินาใช้ mannitol และบางสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จากอาร์เจนตินาใช้น้ำตาล malonate บางสายพันธุ์ไม่ใช่ malonate แต่เชื้อจากญี่ปุ่นสามารถใช้ malonate ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทย พบว่า *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยมีปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลเหมือนกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นมากกว่าเชื้อจากอาร์เจนตินา โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยสามารถใช้น้ำตาล maltose และ lactose เช่นเดียวกับเชื้อจากญี่ปุ่น มีความแตกต่างกันเพียงน้ำตาล arabinose โดยเชื้อจากประเทศไทยใช้น้ำตาล arabinose แต่เชื้อจากญี่ปุ่นและอาร์เจนตินาไม่ใช่ นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันในน้ำตาล rhamnose, sorbitol และ salicin โดยพบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของญี่ปุ่นและอาร์เจนตินาไม่ใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด แต่เชื้อจากประเทศไทยบางเชื้อมีการใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด

การทดสอบความรุนแรงบนพืชทดสอบพืช 5 ชนิด คือ มะนาว ส้มโอ ส้มเขียวหวาน เลมอน และเกรฟฟรุต เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ตามแหล่งในประเทศไทย ทั้ง 113 สายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด มีความรุนแรงของโรคมากทั้งหมด โดยสามารถทำให้พืชทดสอบเกิดโรคได้ภายใน 5 วัน จากรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) ได้รายงานการเกิดโรคของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ กลุ่มสายพันธุ์ต่างๆกับพืชตระกูลส้ม 4 ชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน, เกรฟฟรุต, เลมอน และ มะนาว โดยพบว่า กลุ่มสายพันธุ์ canker A สามารถเกิดโรครุนแรงกับพืชตระกูลส้มทั้งสี่ชนิด ส่วน canker B เกิดโรครุนแรงเฉพาะใน เลมอน และมะนาว สามารถเกิดโรคเล็กน้อยใน ส้มเขียวหวาน และ เกรฟฟรุต ในขณะที่ canker C เกิดโรครุนแรงเฉพาะใน มะนาว และไม่เกิดกับ ส้มเขียวหวาน, เกรฟฟรุต และ เลมอน เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในประเทศไทยสามารถเกิดโรครุนแรงกับส้มเขียวหวาน เกรฟฟรุต เลมอนและ มะนาว เมื่อ

เปรียบเทียบกับรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) แล้ว เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม canker A

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี rep PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX และ ERIC การจัดกลุ่มเชื้อที่ค่า similarity 0.73 สามารถแยกกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ได้ 5 กลุ่มตามการจัดกลุ่มตามการเกิดโรคบนพืชอาศัยและแหล่งการระบาดตามภูมิประเทศ สอดคล้องกับงานทดลองของ Cubero and Graham (2002) ที่ได้นำเทคนิค rep PCR มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์และศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในฟลอริดา กับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากแหล่งปลูกส้มทั่วโลก พบว่าเทคนิค rep-PCR สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนเป็น 2 กลุ่ม ตามการเกิดโรคของพืชอาศัยและแหล่งการระบาดตามภูมิประเทศ ได้แก่ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B ซึ่งจากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ cankerA NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น

เมื่อจัดกลุ่มเชื้อที่ค่า similarity 0.8 สามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม โดยกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A จากประเทศไทย แยกเป็นกลุ่มย่อยออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ของประเทศไทย 76 -90 เปอร์เซ็นต์จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น มีเพียง 3.5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์อยู่ในกลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 จะเห็นได้ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยมีความผันแปรไม่มาก โดยส่วนใหญ่มีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ประชากรเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย เป็นเชื้อที่แพร่ระบาดอยู่ภายในประเทศ การขยายพันธุ์และการขยายพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้มในประเทศไทย จะใช้กิ่งพันธุ์ในการขยายพันธุ์ ทำให้มีการแพร่กระจายของโรคแคงเกอร์ จากต้นแม่พันธุ์จากแหล่งเดิมไปยังแหล่งใหม่ด้วยกิ่งพันธุ์นั่นเอง ทำให้พบความผันแปรของเชื้อไม่สูงมาก โดยพบว่าลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เก็บจากแหล่งปลูกดั้งเดิมและแหล่งปลูกใหม่ไม่มีความแตกต่างกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ได้จากปฏิกิริยา rep PCR ของเชื้อที่แยกได้เมื่อ 20 ปีที่แล้ว (ตั้งแต่ปี 2528-2548) กับเชื้อที่แยกได้ในปัจจุบันไม่มีความ

แตกต่างกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกจากส้มโอ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากส้มโอที่ปลูกใน จ.กาญจนบุรี ซึ่งพบในช่วงปี 2547 ซึ่งมีลักษณะสายพันธุ์ดีเอ็นเอแตกต่างจากกลุ่มอื่น ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาพประเทศของจังหวัดกาญจนบุรีที่ประกอบไปด้วยทิวเขา หุบเขา และที่ราบลุ่ม บางที่มีลักษณะเป็นป่าไม้ และภูเขา บางที่เป็นที่ราบแห้งแล้ง บางแห่งเป็นที่ราบอุดมสมบูรณ์ และเป็นจังหวัดชายแดนติดกับประเทศเมียนมาร์ นอกจากนี้ลักษณะสภาพภูมิอากาศของจังหวัดกาญจนบุรีมีความแตกต่างกันออกไป เนื่องจากเป็นจังหวัดที่ใหญ่มีพื้นที่กว้าง ขวางมาก บริเวณที่ราบจะมีสภาพภูมิอากาศคล้ายคลึงกับจังหวัดในภาคกลาง ส่วนบริเวณที่เป็นป่าและภูเขาจะแตกต่างไปคือ ในฤดูร้อนจะร้อนจัด ในฤดูหนาวจะหนาวจัด และปริมาณน้ำฝนของจังหวัดกาญจนบุรีเฉลี่ยทั้งปีอยู่ในเกณฑ์น้อย เนื่องจากมีภูเขาปิดกั้นกระแสลมจากมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ทำให้บางบริเวณของจังหวัดกาญจนบุรีเกิดสภาพอัสนัยโดยมีฝนตกน้อย ทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพอัสนัย นอกจากนี้จังหวัดกาญจนบุรีมีชายแดนติดกับประเทศเมียนมาร์อาจมีการเข้ามาของกิ่งพันธุ์จากประเทศเมียนมาร์ ทำให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างออกไป

การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในพืชตระกูลส้ม เพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็วและมีความไวสูง จึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการพัฒนาการตรวจสอบ เทคนิค PCR ป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีประโยชน์ มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอย่างแพร่หลาย ในการศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์จากยีน *pth A* เนื่องจากยีน *pth A* พบเฉพาะในเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการชักนำให้เกิดโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม (Swarup et al., 1991) โดยยีนนี้จะทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Duan et al. 1999) ลำดับเบสของยีน *pth A* ถูกอนุรักษ์ไว้ให้เหมือนกันและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไป การเลือกออกแบบไพรเมอร์จากยีน *pth A* จะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์กับพืชตระกูลส้ม

จากผลการทดสอบความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์ D1/D2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 113 สายพันธุ์ โดยมีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุด 25 pg/ปฏิกิริยา และตรวจสอบปริมาณเชื้อ

ต่ำสุดที่ตรวจสอบได้คือ 8.1×10^2 CFU/ปฏิกิริยา ผลการตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงไพรเมอร์ D1/D2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ NCPPB409 สายพันธุ์ canker A จากประเทศญี่ปุ่น เช่นกัน แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ B, C, D และ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (canker สายพันธุ์ E) แสดงว่าไพรเมอร์ D1/D2 เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ canker A แต่พบว่าไพรเมอร์ D1/D2 สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ได้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีน *pth A* ซึ่งอยู่ภายใต้กลุ่มยีน *avirulenc/pathogenicity* (Gabriel, 1999) ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีอยู่ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* สมาชิกของกลุ่มยีนนี้ ได้แก่ ยีน *avr Bs3*, *avr Bs3-2* จากเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*, ยีน *avrb6*, *avrb7*, *avr B101*, *avrB106* จาก *X. axonopodis* pv. *malvacearum* และ *avrXa* จากเชื้อ *X. oryzae* และ *pthA*, *pthB*, *pthC* จาก *X. axonopodis* pv. *citri* สมาชิกของกลุ่มยีนนี้จะเป็นยีนที่เป็นยีนอนุรักษ์สูง (high conserved) มีลำดับเบสคล้ายกันมาก และมี encode protein ของกรดอะมิโนเหมือนกัน 90-97% ทำให้สามารถตรวจเชื้อหา *X. axonopodis* pv. *malvacearum* และเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ได้ (Cubero and Graham, 2002; Mavrodieva *et al.*, 2004) และจากข้อมูลของลำดับเบสของยีน *pthA* มีความเหมือนกับยีน *avrb6* และ ยีน *avrBs3* ถึง 97% (Gabriel, 1999) ทำให้ไพรเมอร์ D1/D2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ได้ แต่เนื่องจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ไม่สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลส้มได้เพราะพืชตระกูลส้มไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อเหล่านี้ ทำให้ไม่เกิดปัญหาเมื่อใช้ไพรเมอร์ D1/D2 ตรวจสอบโรคแคงเกอร์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้เช่นเดียวกับที่ Hartung *et al.* (1993) ได้รายงานการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์โดยใช้ไพรเมอร์ 2/3 ที่ออกแบบมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีน *pthA* พบว่าไพรเมอร์ 2/3 มีความเฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ canker A แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ได้แก่ *X. campestris* pv. *vignicola* และเชื้อ *X. campestris* pv. *bilvae* ได้ และ Cubero and Graham (2002) ได้รายงานการตรวจสอบเชื้อโรคแคงเกอร์โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ที่ออกแบบจากยีน *pthA* ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จำนวน 58 สายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ canker A บางสายพันธุ์ของ canker B และ C แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ได้เช่นกัน และไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 แสดงผลความไวต่ำในการตรวจหาเชื้อโดยตรงกับพืช นอกจากนี้ยังมีการออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบโรคแคงเกอร์จากยีนอื่นๆ ได้แก่ ไพรเมอร์ J-RXg/ J-RXc2 ออกมาแบบจาก internally transcriber spacer (ITS) ระหว่างยีน

16S และ 23S rDNA ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าไพรเมอร์ J-RXg/ J-RXc2 สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เฉพาะสายพันธุ์ canker A ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสายพันธุ์ canker B และ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* แต่ไพรเมอร์นี้ยังคงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ได้ และไพรเมอร์ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจสอบในพืชตระกูลส้ม เพราะมีโอกาสเป็นไปได้ที่ไพรเมอร์ไปจับคู่กับยีน 16rDNA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นทำให้เกิดการตรวจสอบที่ผิดพลาดได้ (Cubero and Graham, 2002) และ Lertsuchatavanich (2006) ได้รายงานไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 306 ที่ section no. 259 จาก 496 section ของ complete genome ซึ่งได้จากการทำ subtractive hybridization แล้วเลือกตำแหน่งที่ 4411 ถึง 5228 มาออกแบบไพรเมอร์ ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ 354 R/F มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* canker A ไม่สามารถเพิ่มปริมาณกับเชื้อ สายพันธุ์ canker B, C, D และ E และไม่เพิ่มปริมาณของเชื้อกลุ่ม *Xanthomonas* กลุ่มอื่นๆ แต่การทดลองยังไม่ได้มีการนำไพรเมอร์นี้ไปใช้ตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่างของพืชตระกูลส้ม จึงไม่ทราบว่าจะมีปัญหาหรือไม่เมื่อนำไปใช้ในการตรวจกับตัวอย่างพืช

จากผลการทดสอบการนำไพรเมอร์ D1/D2 ไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อในตัวอย่างจากใบ สัมพบว่าไพรเมอร์ D1/D2 ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำใบบดบดได้เลย แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างจากใบส้มมีการปลดปล่อยสารออกมายับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) ดังที่ Henson and French (1993) และ Schaad *et al.* (1995) ได้รายงานไว้ว่า เมล็ดพืชบางชนิด ใบพืช ผลิตภัณฑ์อาหารและดิน มีสารที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ไม่สามารถกำจัดออกไปได้ด้วยการสกัดดีเอ็นเอ จากผลการทดลองสอดคล้องกับที่ Hartung *et al.* (1996) ได้รายงานการนำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกพืชตระกูลส้มมักประสบปัญหาจากสารยับยั้งที่ปลดปล่อยออกจากพืช และไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR จึงมีการพัฒนาวิธีการ nested PCR เพื่อแก้ปัญหาสารยับยั้งที่ปลดปล่อยออกจากพืช พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณต่ำที่ระดับ 10 cells/ μ l แต่วิธี nested PCR มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียภายนอก เมื่อต้องมีการดูดย้ายผลผลิต PCR จากรอบแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในรอบที่สอง จึงมีการพัฒนาวิธี nested PCR ในหลอดเดียว (one tube nested PCR) เพื่อลดการปนเปื้อนและประหยัดเวลา โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุดที่มีอุณหภูมิในการจับเข้ากับดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกัน โดยทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน ซึ่งในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่นี้ ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของยีน *pthA* กับยีนอื่นๆ ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม *Xanthomonas avirulence-pathogenicity* เลือกเอาส่วนที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดมาออกแบบไพรเมอร์ และใช้อุณหภูมิในการจับคู่กับดีเอ็นเอ

ต้นแบบของทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันคือไพรเมอร์คู่แรก Pth3F/Pth3R อุณหภูมิการจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบคือ 72 °C ในขณะที่ไพรเมอร์คู่ที่สอง D3/D4 มีอุณหภูมิในการจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบคือ 56 °C ซึ่งวิธีการนี้ไพรเมอร์คู่แรกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อเป็นต้นแบบให้ไพรเมอร์คู่ที่สอง ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในปฏิกิริยา one tube nested PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 113 สายพันธุ์ โดยมีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุด 0.5 pg/ปฏิกิริยา และตรวจสอบปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจสอบได้คือ 9.4 CFU/ปฏิกิริยา

เมื่อนำวิธี one tube nested PCR ไปทดสอบในการตรวจหาเชื้อในน้ำคใบพืช พบว่าน้ำคใบส้มไม่มีผลต่อปฏิกิริยา one tube nested PCR โดยสามารถตรวจสอบเชื้อจากน้ำคใบพืชได้ เนื่องจากวิธีการนี้เป็นการใช้ไพรเมอร์ 2 คู่เบสซึ่งไพรเมอร์คู่แรกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อจากน้ำคใบพืชโดยตรงและไพรเมอร์คู่ที่สองจะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากผลผลิตของไพรเมอร์คู่แรกเหมือนเป็นเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยา และนอกจากนี้ในการทำปฏิกิริยา one tube nested PCR ใช้ตรวจจากน้ำคใบส้มจำนวนเพียง 1 µl ซึ่งเป็นอัตราส่วนเพียง 1 ต่อ 25 ส่วนเมื่อเทียบกับการปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ถึง 5 µl เป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 5 ส่วน ซึ่งวิธี one tube nested PCR จึงเป็นการเจือจางสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) นั้นเอง

ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ NCPPB 409 canker A เช่นกัน แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากต้นแบบของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ B, C, D และ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (canker สายพันธุ์ E) แสดงว่าไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในปฏิกิริยา one tube nested PCR เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ canker A เช่นเดียวกัน แต่ไพรเมอร์ Pth3F/Pth3R และ D3/D4 ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ยังคงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ได้เนื่องจาก ยีน *Avrb6* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* มีลำดับเบสเหมือนกับยีน *pthA* ถึง 97% (Gabriel, 1999)

การทดสอบการเตรียมตัวอย่างพืชที่เป็นโรคแคงเกอร์เพื่อให้สามารถตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดการเกิดสารยับยั้งพบว่าการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2 เป็นการล้างเชื้อจากผิวใบพืชสามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่าการเตรียมตัวอย่างพืชในวิธีที่ 1 ซึ่งเป็นการ

บดตัวอย่างพืชทำให้เกิดสารยับยั้ง การใช้วิธีล้างผิวใบพืชสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เพราะเชื้อนี้เป็นเชื้อที่สามารถอยู่บนใบพืชได้และการเข้าทำลายพืชจะเกาะที่ใบก่อนแล้วเข้าไปในพืชโดยเข้าทางปากใบและบาดแผลนั้นเอง ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเชื้อจะเป็นพวก epiphyte เกาะอยู่บนใบเพื่อรอเวลาที่เหมาะสมเข้าทำลายพืชต่อไป

จากผลการทดลองวิธี one tube nested PCR สามารถแก้ปัญหาที่เกิดจากสารยับยั้งที่มาจากพืชได้ แต่ก็ยังมีปัญหาของไพรเมอร์ที่สามารถตรวจจับกับดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ได้ ดังนั้นจึงได้นำวิธี immunomagnetic separation (IMS) ซึ่งเป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยามาใช้ร่วมกับวิธี one tube nested PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า IMS-nested PCR โดยการใช้ immunomagnetic beads ที่ติดด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไปยึดจับกับเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ออกจากเซลล์แบคทีเรียอื่นๆ และสารยับยั้งที่มาจากพืช และนำมาตรวจเชื้อที่ถูกจับยึดด้วยวิธี one tube nested PCR ส่งผลให้เทคนิค IMS-nested PCR มีความเฉพาะเจาะจงและความไวในการตรวจเชื้อที่ดีขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า วิธี IMS-nested PCR ให้ความเฉพาะเจาะจงสูงขึ้นในการตรวจโดยสามารถให้ผลบวกเฉพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้เท่านั้น จากการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำใบส้ม พบว่า วิธี IMS-nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5.8 cells/ปฏิกิริยา ในขณะที่วิธี one tube nested PCR อย่างเดียวตรวจได้ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5.8×10^6 cells/ปฏิกิริยา และวิธี standard PCR สามารถตรวจได้ที่มีความเข้มข้น 5.8×10^6 cells/ปฏิกิริยา เท่านั้น จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้วิธี IMS-nested PCR สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำใบส้ม โดยเพิ่มขึ้นจากการใช้วิธี one tube nested PCR อย่างเดียว 10 เท่าและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี standard PCR ถึงล้านเท่า เนื่องจากสารที่ถูกปล่อยมาจากใบส้มไปยับยั้งปฏิกิริยาของ standard PCR ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ แต่ไม่ส่งผลต่อการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำใบส้มโดยวิธี IMS-nested PCR และวิธี nested PCR ผลการทดลองนี้พบว่าวิธี IMS-nested PCR มีประสิทธิภาพดีกว่าทั้งวิธี one tube nested PCR และวิธี standard PCR เช่นเดียวกับการทดลองของ Hartung *et al.* (1996) แต่เมื่อนำ วิธี nested PCR ไปทดสอบกับตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อลดลงกว่าการตรวจด้วยเชื้อโดยตรงลง 10 เท่า และพบปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ในกลุ่มสารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีผลต่อการปฏิกิริยา nested PCR จึงได้มีการนำวิธี immunomagnetic separation

(IMS) มาช่วยในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูกส้ม พบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ nested PCR อย่างเดียวถึง 100 เท่า

จากการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของตัวอย่างจากแปลงปลูก จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าวิธี IMS-nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบทั้งหมด 44 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% ในขณะที่ วิธี nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 38 ตัวอย่าง คิดเป็น 76% และวิธี standard PCR ตรวจพบเชื้อเพียง 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 15% โดยการตรวจด้วยวิธี standard PCR จะตรวจพบในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ชัดเจนเท่านั้น แต่วิธี IMS-nested PCR และวิธี nested PCR สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการได้ โดยจากตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการจำนวน 26 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อ 20 ตัวอย่างและ 14 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้ 38 ตัวอย่าง โดยพบว่า ตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี IMS-nested PCR ไม่พบก็ตรวจไม่พบโดยวิธีอื่นๆ และไม่สามารถแยกเชื้อบนอาหาร SX media ได้เช่นกัน แต่จากผลทดลองพบว่าการแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกได้น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อโดยวิธี IMS-nested เนื่องจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ (selective medium) มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่ลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้แยกเชื้อได้น้อยกว่า โดยพบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium (plating efficiency) อยู่ที่ 54.4 % เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหาร nutrient agar (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่ไม่สามารถใช้อาหาร NA ในการแยกนับเชื้อได้เนื่องจากเชื้อแซปโพรไฟท์ชนิดอื่นๆ ที่มีปะปนอยู่จะเจริญได้เร็วกว่าและขึ้นคลุมทับก่อนที่เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จะเจริญ นอกจากนี้การที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (viable but nonculturable state (VBNC)) ซึ่งได้มีรายงานในแบคทีเรียหลายชนิด (Oliver, 2005) Oliver (2000) ได้รายงานระยะ VBNC ของแบคทีเรียที่ทำให้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นประจำ แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิต และสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ได้ เซลล์ในระยะนี้มีระดับการเจริญเติบโตต่ำ แต่สามารถฟื้นฟูให้เจริญเติบโตบนอาหารได้อีกครั้ง ได้มีรายงานการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีซในกลุ่มสารประกอบทองแดง ไปกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะ VBNC เพื่อความอยู่รอด เช่น *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi et al., 1999), *Erwinia amylovora* (Ordax et al., 2006) เป็นต้น ซึ่งในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย มีการใช้สารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ออกซิ

คลอไรด์ ในการป้องกันกำจัดซึ่งอาจไปกระตุ้นให้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไปอยู่ในระยะ VBNC ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ แต่วิธี PCR นั้นมีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ของเชื้อ สามารถตรวจเซลล์ที่อยู่ในระยะ VBNC และเซลล์ที่ตายได้ (Wolf *et al.*, 2000) จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า การใช้วิธี IMS-nested PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจง ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สูง สามารถแก้ปัญหาสารยับยั้งที่ปล่อยออกมาจากพืช ได้และมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ ดังนั้นวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการ ตรวจสอบหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง เพื่อการ ตรวจรับรองแปลงปลอดโรคแคงเกอร์ในอนาคตได้

สรุป

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทยมีคุณลักษณะ เป็นท่อนตรง ขนาด 0.5 x 1.7 μm แกรมลบ ไม่สร้าง spore มีหาง (flagellation) หางเดี่ยว ต้องการ oxygen (oxydation) สามารถย่อยแป้ง (starch) ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย casein สร้างเอนไซม์ lecithinase ได้ ไม่ใช้ arginine และ gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ urease เกิดก๊าซ hydrogen sulphide (H_2S) สร้างสาร acetoin เกิด proteolysis ใน litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36°C สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ tyrosinase

เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยสามารถใช้น้ำตาลพวก arabinose xylose glucose fructose galactose mannose maltose lactose trehalose sucrose glycerol mannitol glycogen dextrin starch malonate citrate succinate และ ไม่สามารถใช้น้ำตาลพวก L-methyl D-glucoside raffinose inositol inulin dulcitol gluconate oxalate acetate และ tartate มีความผันแปรใน 3 น้ำตาลได้แก่ rhamnose sorbitol และ salicin

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค rep PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX และ ERIC พบว่า ที่ค่า similarity 0.73 สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 5 กลุ่มตามการจัดกลุ่มของการเกิดโรคบนพืชอาศัยและแหล่งระบาดของโรค โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ประเทศไทยทั้งหมดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อสายพันธุ์ canker A จากประเทศญี่ปุ่น และที่ค่า similarity 0.8 สามารถแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่ม โดยสายพันธุ์ของประเทศไทยสามารถแยกกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากส้มโอ จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2547 ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆได้

primer D1 (GGCCTTGA TCAAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ถูกออกแบบมาจาก *pthA* gene ของ complete genome ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ Gene Bank accession No. V28802 เพื่อให้เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 3 mM MgCl_2 , 0.5 μM primer, 0.2 mM dNTP และมีปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณประกอบด้วย 93°C เป็นเวลา 30 วินาที, 58 °C เป็นเวลา 30 วินาทีและ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ทำ

ปฏิกิริยาซ้ำ 40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ 1 แอ็บ ขนาด 219 คู่เบส การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ D1/D2 พบว่า ไพรเมอร์ D1/D2 สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และสายพันธุ์ที่แยกได้จากสายพันธุ์ประเทศไทยได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B, C, D และ E ได้ โดยมีความไวในการตรวจหาที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 25 pg/ปฏิกิริยา และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยเท่ากับ 81 CFU/ปฏิกิริยา

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ด้วยเทคนิค one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ไพรเมอร์ชุดแรก Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/pth3R (GGTGAGGGGGCAGGG GGAGA) และไพรเมอร์ชุดที่สอง D3 (GGTGT GGTGCCTCGATAGAT)/D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT) ที่มี annealing temperature ที่แตกต่างกันและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 136 คู่เบส (bp) ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสของยีน *pthA* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.5 pg/ปฏิกิริยา และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยที่ตรวจได้คือ 9.4 CFU/ปฏิกิริยา

จากการนำวิธี immunomagnetic separation (IMS) มาใช้ร่วมกับวิธี one tube nested PCR (IMS-nested PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของตัวอย่างจากแปลงปลูกที่มีการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ พบว่า ให้ความเฉพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ 5.8 cells/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี nested PCR 10 เท่า และเมื่อนำวิธี IMS-nested PCR ไปทดสอบในการตรวจหาเชื้อจาก 50 ตัวอย่างจากแปลงปลูก พบว่าวิธี IMS-Nested PCR ให้ประสิทธิภาพในการตรวจดีกว่าวิธีอื่นๆ สามารถตรวจหาเชื้อได้ทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคและไม่แสดงอาการ โดยตรวจพบเชื้อถึง 88% ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ในขณะที่วิธี nested PCR และ PCR ตรวจได้ 76% และ 30% ตามลำดับ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2547. รายงานสภาพการเพาะปลูกไม้ผลและไม้ยืนต้นประจำปี 2547. (โรเนียว)

ไชยา อัยสุนเนิน. 2531. การปลูกส้มเขียวหวาน. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน กรุงเทพฯ.

วิเชียร กำจายภัย. 2519. โรคแคงเกอร์และโรคสแค้นของส้ม. กสิกร 49(2) : 121-125.

วิวัฒน์ แดงสุภา. 2510. การศึกษาเบื้องต้นโรคแคงเกอร์ของส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภธนา คล้ายมงคล. 2543. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในประเทศไทยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Rep-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อำไพวรรณ ภราดรวิวัฒน์. 2527. โรคส้มในฤดูฝน. วารสารพืชสวน 19(2) : 129-135.

_____, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2527. โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. ฟีนิกซ์ปับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 126 น.

Alvarez, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42:339-366.

_____, A.A. Benedict, C.Y. Mizumoto, L.W. Pollard and E.L. Civerolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. campestris* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. **Phytopathology** 81: 857-865

- Bertolini, E., R. Penyalver, A. Garcia, A. Olmos, J.M. Quesada, M. Cambra and M.M. Lopez. 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested PCR in a single closed tube. **J. Microbiol. Methods** 52:261-266.
- Bouzar, M., J.B. Jones, R.E. Stall, F.J. Louws, M. Schneider, J.L.W. Rademaker, F.J. deBruijn and L.E. Jackson. 1999. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology** 89 : 328-335.
- Brunings, A.M. and D.W. Gabriel. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Mol. Plant Pathol.** 4, 141–157.
- Civerolo, E.L. 1994. Citrus bacterial canker disease in tropical regions, pp. 45-50. In M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph, and J.G. Swings, eds. **Proceedings of the 8th Internatinal Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Paris.
- _____. 1984. Bacterial canker disease of citrus. **J. Rio Grande Valley Hort. Assoc.** 37: 127-146.
- _____ and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme linked immunosorbant assay. **Plant Dis.** 66: 231-236
- Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 1257-1264.

- Dye, D.W., J.F. Bradbury, M. Goto, A.C. Hayward, R.A. Lelliott and M.N. Schroth. 1980. International standard for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype Strain. **Rev. Plant Pathol.** 19:153 – 168.
- Duan, Y.P., A.L. Castaneda, G. Zhao, and D.W. Gabriel. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. **Mol. Plant Microbe Interact.** 12: 556-560.
- EPPO/CABI. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* In : **Quarantine Pests for Europe. 2nd edition.** (Ed. By Smith, I. M., McNamara, D.G., Scott, P.R., and M. Holderness. CABI International, Wallingford, UK.
- Fawcett, N.S. 1936. **Citrus Disease and Their Control.** 2d ed., McGraw – Hill Book Co., Inc. New York. 656 p.
- Gabriel, D.W. 1999. The *Xanthomonas avr/pth* gene family, pp. 39-55. In G. Stacey and N.T. Keen, eds. **Molecular. Plant Microbe Interaction.** St. Paul, Minnesota, APS Press.
- _____, Kingsley, M.T., Hunter, J.E. and Gottwald, T.R. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39, 14-22.
- Ghezzi, J.I. and T.R. Steck. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiol. Ecol.** 30 : 203-208.

- Goto, M. 1992. Citrus Canker, pp. 170-208. In J. Kumar, H.S. Chaube. U.S. Singh, and A.N. Mukhopadhyay, eds. **Plant diseases of International Importance, Vol. III**. Englewood Cliffs, Prentice Hall.
- _____, T. Takahashi, and M.A. Massina. 1980. Comparative study to the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and canker B in Argentina. **Phytopath. Soc Japan** 46 ; 329 – 338.
- _____ 1969. Studies on citrus canker in Japan. **Proc. First Int. Citrus Symp**, 3: 1251-1252.
- Hartung, J. S., O. P. Pruvost, I. Villemot and A. Alvarez. 1996. Rapid and colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* p.v. *citri* by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. **Phytopathology** 86:95-101.
- _____, Daniel, J. F. and Pruvost, O. P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:1143-8
- Henson, J. M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annu. Rev. Phytopathol.** 31: 81–109
- Hugh, R. and N. Loifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram – negative bacteria. **J. Bacteriol** 66 : 24 – 26.
- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequence : a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other eubacteria. **Mol. Microbiol.** 59 : 925-934.

- Koizumi, M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation of detached citrus leaves. **Bull. Hortic. Res. Stn. (Minist. Agric. For.) Ser. B (Okitsu)** 11: 167-183.
- Laguerre, G., P.V. Berkum and N. Amarger. 1997. Genetic diversity of Rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 : 4748-4758.
- Leach, C.E. and White, F.F. 1996. Bacterial avirulence genes. **Annu. Rev. Phytopathol.** 34: 153-179.
- Lelliott R.A. and D. E. Stead. 1987. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Lertsuchatavanich, U. 2006. **Detection, Identification and control of *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* in *Citrus* spp. In Thailand**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University
- Llop, P., A. Bonaterra, J. Penalver and M.M. Lopez. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single close tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 2071-2078.
- Louws, F.J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J. de Bruij. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology** 85 : 528-536.
- _____, _____, _____ and _____ 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 60 : 2286-2295.

- Martin, B.O., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D.A. Morrison, G.J. Boulnois and J.P. Claverys. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*, **Nucleic Acid Res.** 20 : 3479-3483.
- Maltheson, V.G., J. Munakata-Marr, G.D. Hopkins, P. McCarty, J.M. Tiedje and L.J. Forney. 1997. A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 : 2863-2869.
- Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. **Phytopathology** 94:61-68.
- Mc Clung , L.S. , and R. Toabe. 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium saporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups. **J. Bacteriol.** 53 : 139 – 147.
- McManus, P.S. and A.L. Jones. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR dot-blot reverse blot hybridizations. **Phytopathology** 85 : 1547-1553.
- Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. **J. Microbiol.** 43 : 93-100.
- _____ 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. In R.R. Colwell and D.J.Grimes (eds.), **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. American Society for Microbiology Press, Washington,D.C.
- Ordax, M.E., Marco-Noales, M.M. Lopez and E.G. Biosca. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against Copper : Induction of the Viable-but-Non culturable state. **Appl. Environ. Microbiol.** 76 : 3482-3488.

- Picher, D. G., N. A. Saunders, and R. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol.** 8: 151-156.
- Rademaker, J. L. W., and de Bruijn, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis, pp. 151-171 In B. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff, eds. **DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews**. John Wiley & Sons, New York.
- Rohlf, F.J. 1993. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariation System Version 1.8**. Applied Biostatistic Inc, New York.
- Pooler, M.R., I.S. Myung, J. Bentz, J. Sherald and J.S.Hartung. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Appl. Microbiol.** 25:123-126.
- Poussier, S., J.J.Cheron, A. Couteau and J. Luisetti. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. **J. Microbiol. Methods** 51: 349-359.
- Sadowsky, M.J., L.L.Kinkel, J.H. Bower and J.L.Schottel. 1996. Use of repetitive intergenic DNA sequence to classify pathogenic and disease – suppressive *Streptomyces* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:3489-3493.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3rd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- _____, E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. . **Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schaad, N.W., E. Postnikova, G. Lacy, A. Sechler, I. Agakova, P.E. Stromberg, V.K. Stromberg and A.K. Vidaver. 2006. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. **Syst. Appl. Microbiol.** 29: 690-695.

_____, J.B. Jones, and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**, 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN 373pp.

_____, S.S. Cheong, S. Tamaki, E. Hatziloukas and N.J. Panopoulos. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology** 85: 243-248.

_____ 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Schoulties, C.L., E.L. Civerolo, J.W. Miller, R.E. Stall, C.J. Krass, S.R. Poc, and E.P. Ducharme. 1987. Citrus canker in Florida. **Plant Dis.** 71: 388-395.

Schubert, T.S., S. A. Rizvi, X. Sun, T. R. Gottwald, J. H. Graham, and W. N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. **Plant Dis.** 85: 340-356.

_____ and J.W. Miller. 1999. **Bacterial Citrus Canker**. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

_____, _____ and D.W. Gabriel. 1996. Another outbreak of bacterial canker on citrus in Florida. **Plant Dis.** 80: 1208.

- Selenska-Pobell, S., L. Gigova and N. Petrova. 1995. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primer. **J. Appl. Bacteriol.** 79 : 425-431.
- _____, E. Evguenieva-Hackenberg, G. Radeva and A. Squartini. 1996. Characterization of *Rhizobium* 'hedysari' by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. **J. Appl. Bacteriol.** 80 : 517-528.
- Shiotani, H., K. Ozaki, and S. Tsuyumu. 2000. Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of pummelo (*Citrus grandis*). **Phytopathology.** 90: 1383-1398.
- Smibert, R.M., and N.R. Krieg. 1981. General characterization. pp. 409 – 443. In E.W. Nester (ed.). **Manual of Method for General Bacteriology**. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 524 pp.
- Stall, R.E. and E.L. Civerolo. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: Cause of Citrus Canker, pp. 48-51. In J.G. Swings and E.L. Civerolo, eds. **Xanthomonas**. Chapman & Hall, London.
- _____ and _____ 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annu. Rev. Phytopathol.** 29: 339-420.
- _____ and C.P. Seymour. 1983. Canker, a threat to citrus in gulf coast states. **Plant Dis.** 67: 581-585.

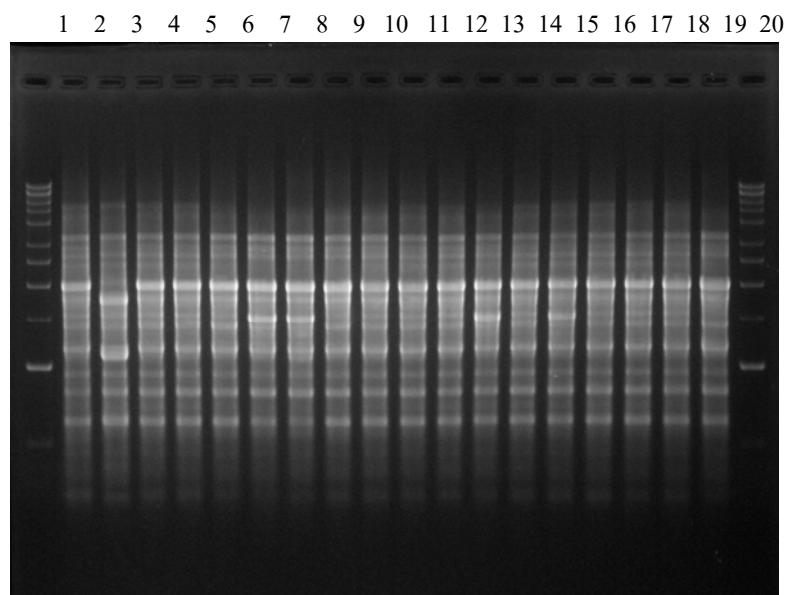
- Sun, X., R.E. Stall, J. Cubero, T.R. Gottwald, J.H. Graham, W.H. Dixon, T.S. Schuber, M.E. Peacock, E.R. Dickstein, and P.H. Chaloux. 2000. Detection of a unique is citrus canker bacterium from Key lime Wellington and Lake Worth, Florida, p. 15. In **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, Ft. Pierce, Florida, Division of Plant industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Available Source: <http://www.doacs.state.fl.us/~pi/abstracts.pde>, March 25, 2002.
- Swarup, S., R. De Feyter, R.H. Bransky, and D.W. Gabriel. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**. 81: 802-809.
- _____, Y. Yang, M.T. Kingsley, and D.W. Gabriel. 1992. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Mol. Plant Microbe Interact.** 5: 204-213.
- Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas. 2002. Type III dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. **Mol. Microbiol.** 46: 13-23.
- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram -Negative bacteria on the basis of arginine metabolism. **J. Appl. Bacteriol.** 23 : 37 – 52.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and J. Swing. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45:472-489
- Vera Cruz, C.M., E.Y. Ardales, D.Z. Skinner, J. Talay, R.J. Nelson, F.J. Louws, H. Leung, T.W. Mew and J.E. Leach. 1996. Measurement of haplotypic variation *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. **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 Res.** 19 : 6823-6831.
- Verniere, C., J.S. Hartung, O.P. Pruvost, E.L. Civerolo, A.M. Alvaez, P. Maestri, and J. Luisetti. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **Euro. J. Plant Pathol.** 104: 477-487.
- Walcott, R.R. and R.D. Gitaitis. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. **Plant Dis.** 84:470-474.
- Wolf, J.M., S.G.C. Vriend, P. Kastelein, E.H. Nijhuis, P.J. van Bekkum and J.W.L. van Vuurde. 2000. Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. **Euro. J. Plant Pathol.** 106: 123–133.
- Yang, Y. and D.W. Gabriel. 1995. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. **Mol. Plant Microbe Interact.** 8: 627-631.
- _____, De Feyter, and D.W. Gabriel. 1994. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacarum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. **Mol. Plant Microbe Interact.** 7: 345-355.
- Yap, I.V. and R.J. Nelson. 1996. Winboot a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. **IRRI discussion paper series 14**. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines.

- Young, J.M., G.S. Saddler, Y. Takikawa, S.H. Deboer, L. Vauterin, L. Gardan, R.I. Gvozdyak and D.E. Stead. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995, **Rev. Plant. Pathol.** 75: 721-763.
- Zhu, W., B. Yang, J.M. Chittoor, L.B. Johnson, and F.F. White. 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. **Mol. Plant Microbe Interact.** 11: 824-832.

ภาคผนวก

ภาพที่ 1A ภาพถ่ายฟิล์มดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 777

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1049

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1623

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 250

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1695

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1717

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1677

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 950

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 873

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1123

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1010

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1023

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 844

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1095

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 805

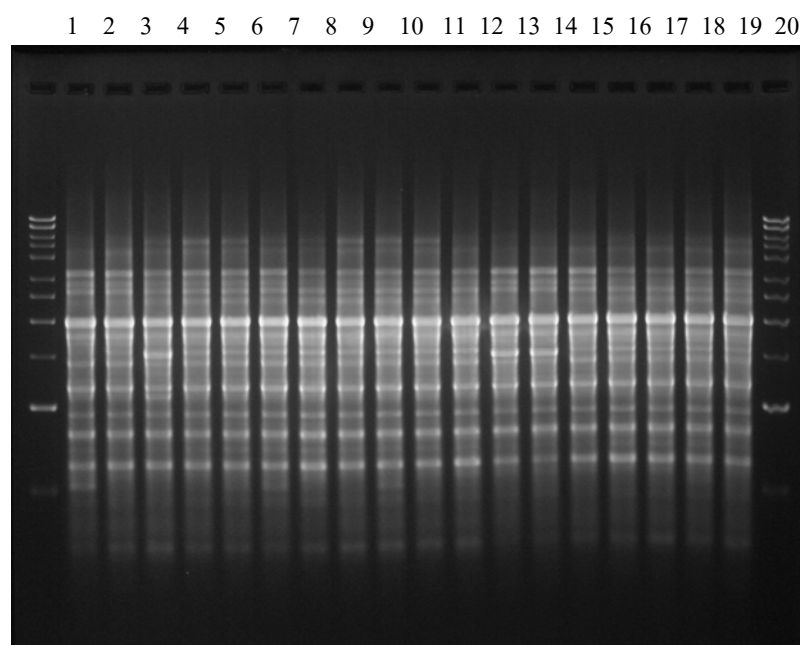
Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 869

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 987

Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 841

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 1A (ต่อ)

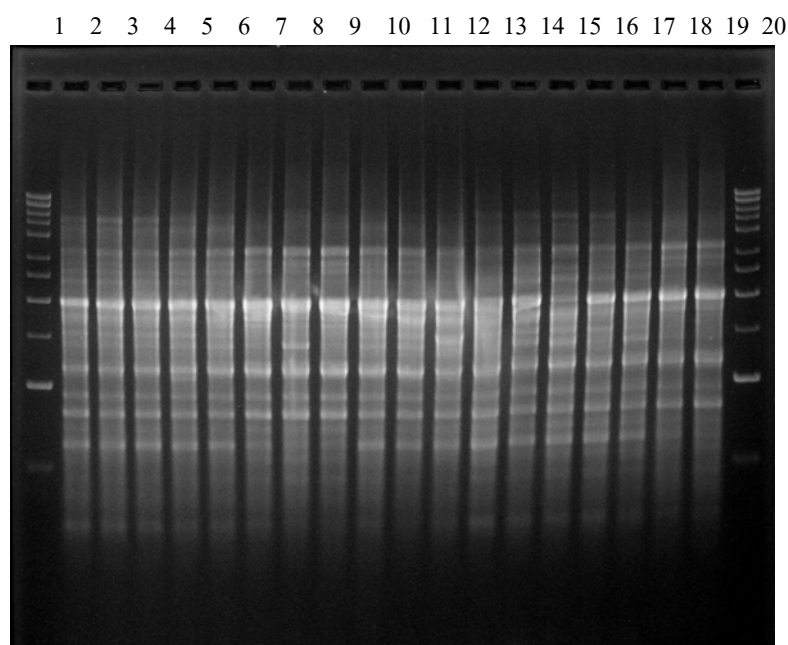


Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์
UE067Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1200Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 884Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 982Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1017Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1855Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1047Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 992Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1694Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 694Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1627Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1530Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1110Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 856Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1539Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1843Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1632Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ UE108

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 1A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1636

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1199

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1880

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 855

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 881

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 880

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 944

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 819

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1619

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1676

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1046

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 920

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1014

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 727

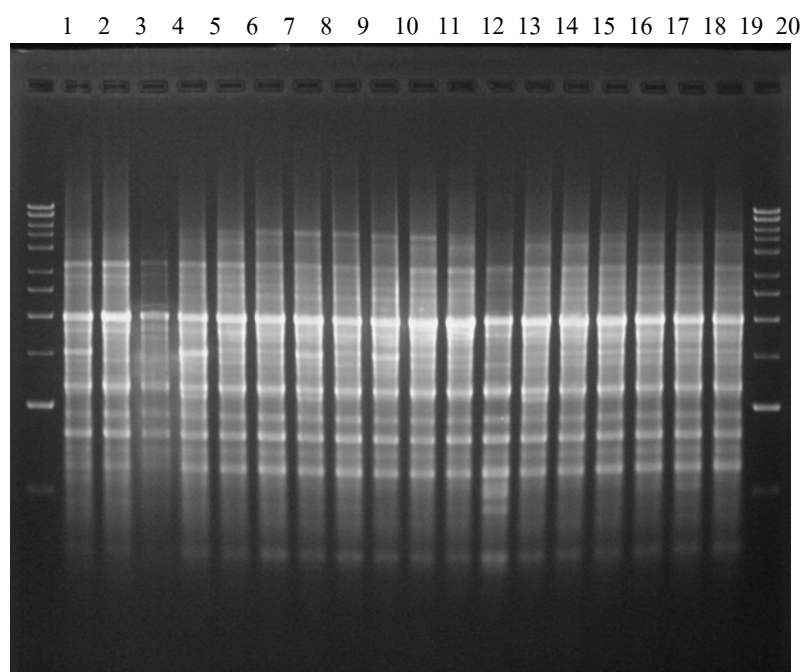
Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 956

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 902

Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 840

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 1A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1027

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 900

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1767

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1841

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1537

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 834

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1816

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1693

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 896

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1536

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 895

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1549

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1805

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 874

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1588

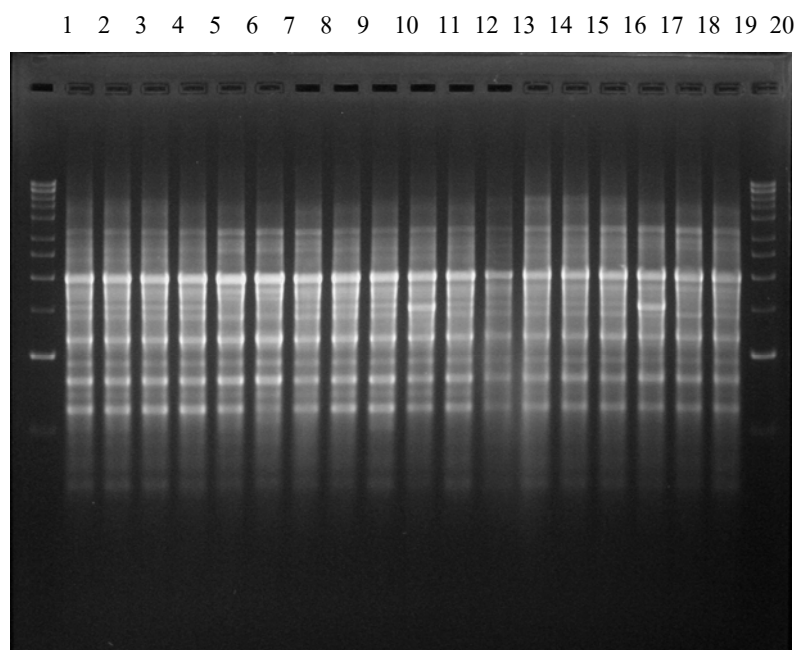
Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1576

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1531

Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1788

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 1A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1584

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1223

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1582

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1202

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 356

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1189

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 118

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1783

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1581

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1754

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 726

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1636

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1784

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1819

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1825

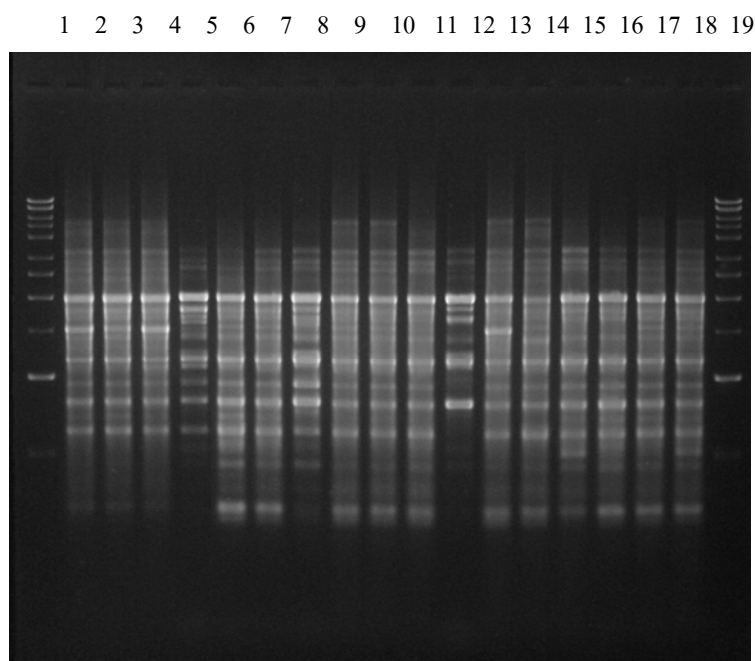
Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1830

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1833

Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1826

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 1A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1012

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1782

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1834

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1628

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 120

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 200

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 931

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 967

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 970

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 251

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 929

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1720

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1629

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1886

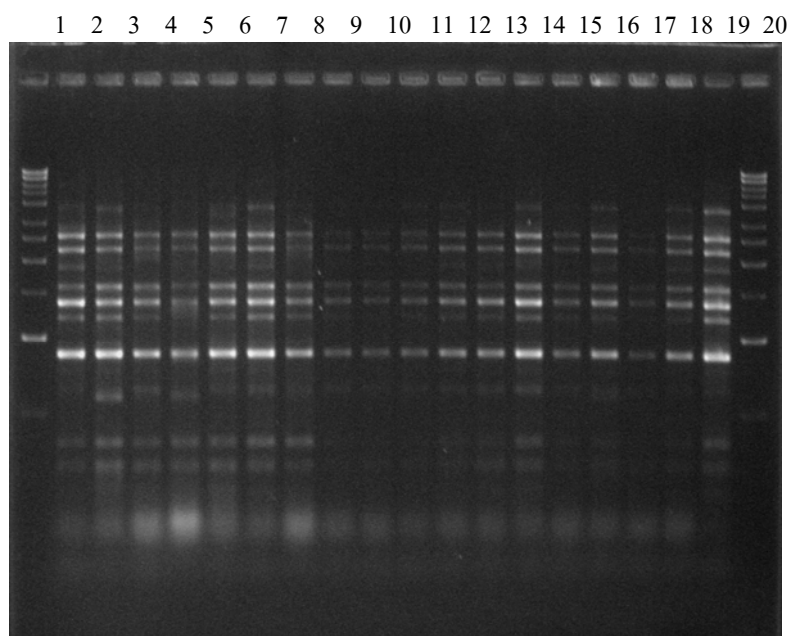
Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1055

Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1040

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1887

Lane 19 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1693

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 896

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1536

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 895

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1549

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1805

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 874

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1588

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1576

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1531

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1788

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1584

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1223

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1582

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1202

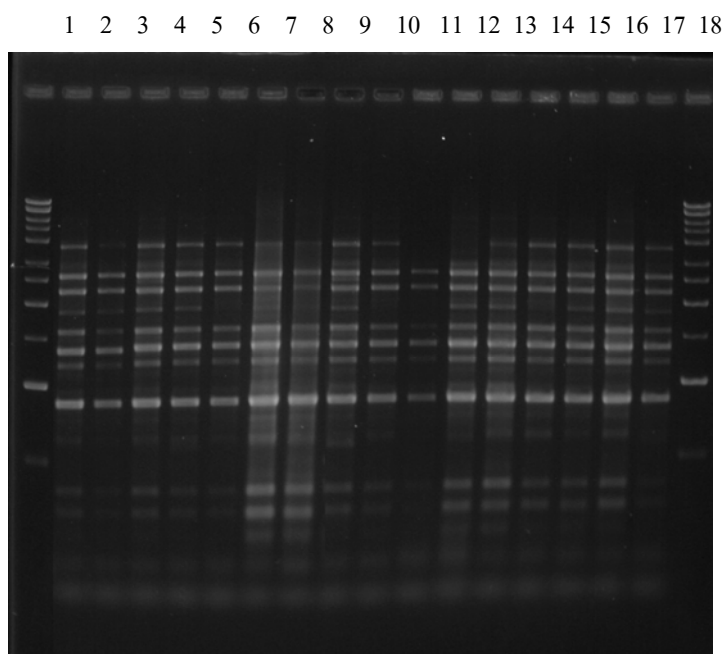
Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 356

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1189

Lane 19 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 118

Lane 20 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 805Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 869Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 987Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 841Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1200Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 982Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1855Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 992Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 694Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1530Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1791Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1843Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์

UE108

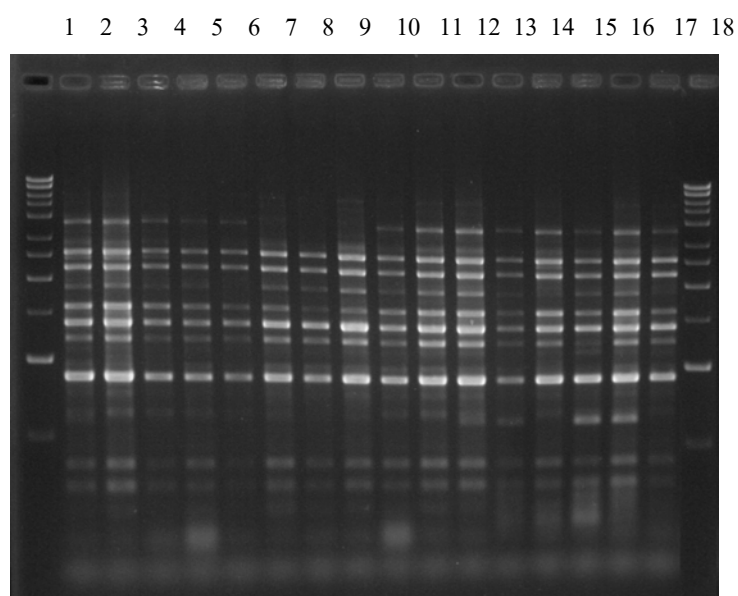
Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์

UE067

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 884Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1017

Lane 18 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1047

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1694

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1627

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1110

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1539

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1632

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1633

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 939

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1199

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1880

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 855

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 881

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 880

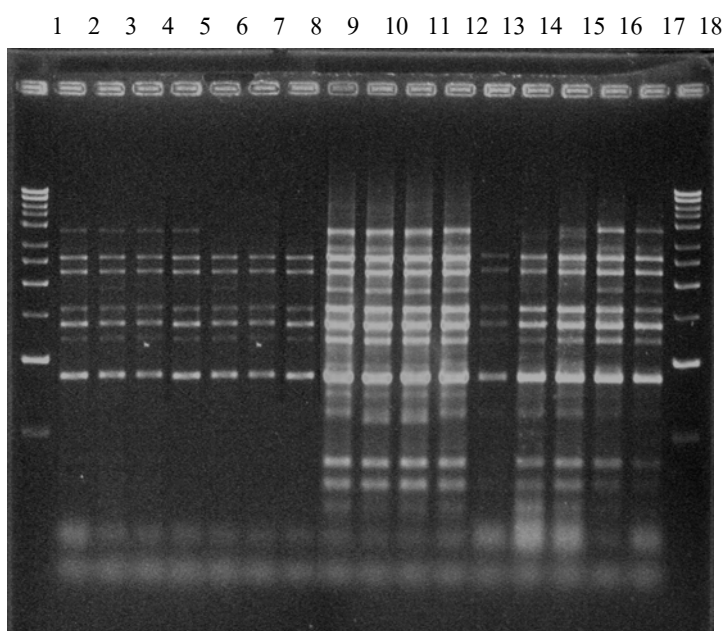
Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 944

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 856

Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 819

Lane 18 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1619

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1676

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1046

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 727

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 920

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1014

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 956

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 902

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 840

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1027

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 900

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1767

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1841

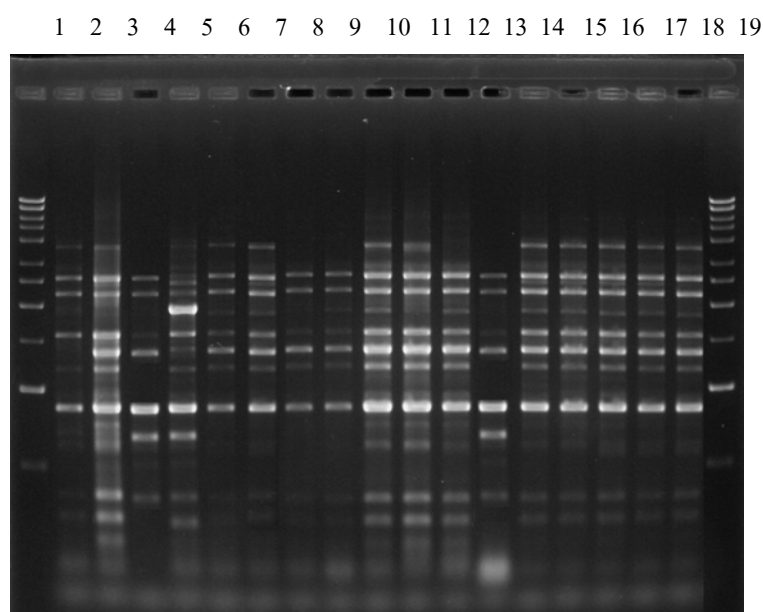
Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1537

Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 834

Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1816

Lane 18 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 251

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 777

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1814

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1049

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1623

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 250

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1695

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1717

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1677

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 950

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 873

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1832

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1123

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1010

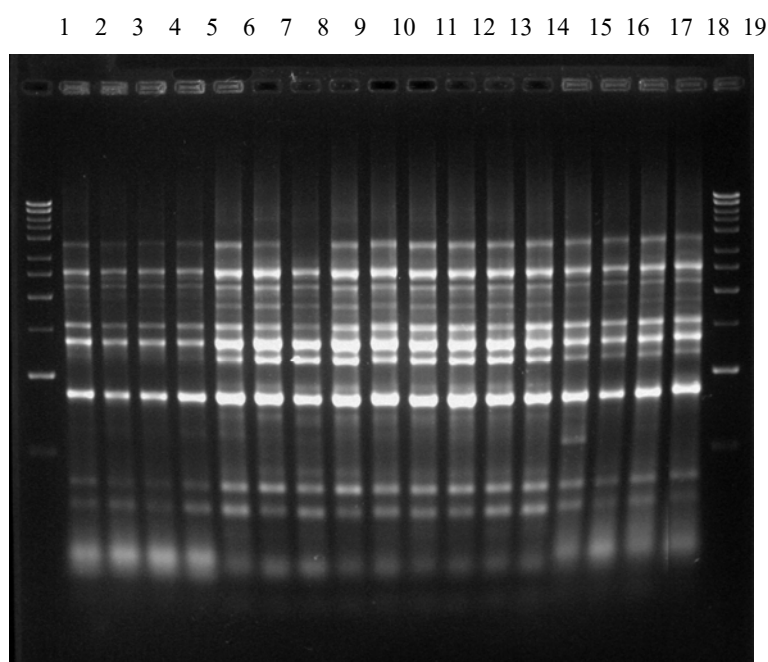
Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1023

Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 844

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1095

Lane 19 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1783

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1581

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1754

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 726

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1693

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 834

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1636

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1784

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1819

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1825

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1830

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1833

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1826

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1012

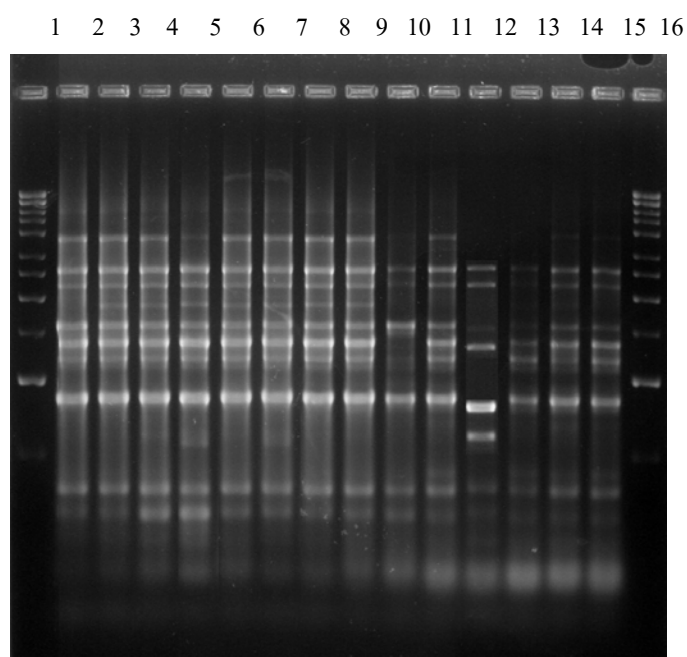
Lane 16 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1782

Lane 17 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1834

Lane 18 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1856

Lane 19 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 2A (ต่อ)



Lane 1 Kilobase DNA marker

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1628

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 120

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 200

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 931

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 967

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 970

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 929

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1720

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1629

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1886

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1823

Lane 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1055

Lane 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1040

Lane 15 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1887

Lane 16 Kilobase DNA marker

ภาพที่ 3A ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avirulence/ pathogenicity gene (*pthA* gene) ของ *Xanthomonas axopodis* pv. *citri* strain 306 and accession number XCU28802

```

1 agcacgggtac ccggcggtcg catgacgggg tttatgcatt cttgcatcgc ccgggcgcaa
61 ccgctattgt gcacatgcac caccgaccgg accctggaga cagggtgtgtt gcctcgatag
121 atcgatagct tcacccgatc tatcccttgc ctggagcggg atacggcaga aatgcccaaa
181 gagcctaccg agtagtgaat accgaaagcg ctccagcgat ggggcgcttt ctttttatag
241 ggcaatggtc tgttcggcca agcgccgccc gtacacagtc tcaaccttgt agagcttccc
301 gcgcgggagt ttatggatgg ttgtcccgtc gacggggtag caggagatga gggtcggcag
361 ggattgggtg aaaaaacagc caaaagttag ctaactcgct gtcagcacag aaatttttca
421 caacctttcg ccgatcctcc atgcgggttcc gtgatcgctt tcatgtctgc gcctcaccct
481 ggtcgctcag ggttgccagg atcacccgaa gtgtgtgtact gccatgcggc ctcggaagct
541 atgtaggaaac cacagaccgc tagtctggag gcgaccatgt aaagaggtat gcctgatgga
601 tcccatctgt tcgcgcacac caagtccctg ccgcgagctt ctgcccggac cccaacccga
661 tgggggttcag ccgactgcag atcgtggggg gtctcccgct gccggcgggc ccctggatgg
721 gttacccgct cgccggacga tgtcccgga cgggctgcca tctcccctgt ccccctcacc
781 tgcgttctcg gcgggcagct tcagtgcact gttacgtcag ttcgatccgt cactttttaa
841 tacatcgctt ttgattcat tgcttccctt cggcgctcac catacagagg ctgccacagg
901 cgagtgggat gaggtgcaat cgggtctgcg ggcagccgac gccccccac ccaccatgct
961 cgtggctgtc actgccgcgc ggcgcgcgcg gcgcaagccg gcgcgcgcag gactgtctgc
1021 gcaaacctcc gacgcttcgc cggccgcgca ggtggatcta cgcacgctcg gctacagcca
1081 gcagcaacag gagaagatca aaccgaaggt tcgttcgaca gtggcgagc accacgaggc
1141 actggtcggc catgggttta cacacgcgca catcgttgcg ctacgccaac accggcgagc
1201 gttagggacc gtcgctgtca agtatcagga catgatcgca gcgttgccag aggcgacaca
1261 cgaagcgatc gttggcgtcg gcaaacagtg gtccggcgca cgcgccttgg aggccttgct
1321 cacggtggcg ggagagtga gaggtccacc gttacagttg gacacaggcc aacttctcaa
1381 gattgcaaaa cgtggcgggc tgaccgcagt ggaggcagtg catgcatggc gcaatgcact
1441 gacgggtgcc cccctgaacc tgaccggga gcaggtgggt gccatcgcca gcaatattgg
1501 tggcaagcag gcgctggaga cgtgcaagcg gctgttgccg gtgctgtgcc agggccatgg
1561 cctgaccccg gagcaggtgg tggccatcgc cagcaatggc ggcaagcagg cgctggagac
1621 ggtgcagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccatggc ctgaccccg agcaggtggt
1681 gggcatcgcc agcaatatg ttggcaagca ggcgctggag acggtgcagc ggtgtgtgcc
1741 ggtgctgtgc caggcccatg cccctgaccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat
1801 tggtggaag caggcgctgg agacggtgca gcggctgtt cgggtgctgt gccaggccca
1861 tggcctgacc ccggcacagg tggtgccat cggcagcaat attgcgggca agcaggcgct
1921 ggagacggtg cagcggctgt tgccggtgct gtgacaggcc catggcctga cccggagca
1981 ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcagcggct
2041 gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct gaccccgagc cagggtggtg ccatcgccag
2101 ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgcgttgcca
2161 gggccatggc ctgacccgcg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca
2221 ggcgctggag acggtgcagc ggcgtgtgct ggtgctgtgc caggcccatg ccctgacccc
2281 ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtgca
2341 gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca tggcctgacc ccggagcagg tggtgcccat
2401 cgccagcaat ggcggttgca agcaggcgct ggagacggtg cagcggtgtg tgcgggtgct
2461 gtgccaggcc catggcctga cccggagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg
2521 caagcaggcg ctggagacgg tgcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct
2581 gaccccgagg cagggtggtg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac
2641 ggtgcagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccatggc ctgaccctgg accaggtcgt
2701 ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagc ggcgtgtgcc
2761 ggtgctgtgc caggcccatg gcctgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatag
2821 cgtgggcaag caggcgctgg agacggtgca gcggctgtt gcggtgctgt gccaggccca
2881 tggcctgacc ccggaccagg ttgtggccat cgccagccac gatggcgga agcaggcgct
2941 ggagacggtg cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc catggcctga cccggagca
3001 ggtcgtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tgcagcggct
3061 gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct gaccccgagg cagggtggtg ccatcgctgt
3121 caatggcggt ggcaagcagg cgttgagac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgcgttgcca
3181 gggccatggc ctgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gcgcgaggcc
3241 ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat ccggcggttg ccgctgtgac
3301 caacgaccac ctgctgcctt tggcctgcct cggcgagcgt cctgcgctgg atgcagtga
3361 aaagggattg ccgcacgcgc cggccttgat caaaagaacc aatcgccgta ttcccgaaac
3421 cacatcccat cgcgttgccg accacgcgca agtgggtcgc gtgctgggtt ttttcagtg
3481 ccaactccac ccagcgcaag catttgatga cgccatgacg cagttcggga tgagcaggca
3541 cgggttggtt cagctctttc gcagagtggt cgtcaccgaa ctcgaaagcc gcagtggaac
3601 gctcccccca gcctgcagc gttgggaccg tatcctccag gcatcaggga tgaaggggc
3661 caaaccgctc cctacttcaa ctcaaacgcc ggaccaggcg tctttgcatg cattcgccga
3721 ttcgctggag cgtgaccttg atgcgcccag cccaacgcac gaggagatgc agaggcgggc

```

ภาพที่ 4A การเทียบความเหมือนของสายนิวคลีโอไทด์ของยีน *avr/pth* และยีน *pthA* ที่สืบค้น
ทั้งหมดด้วยโปรแกรม CLUSTALW version 1.83

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	AGCACGGTACCCGGCGGTCGCATGACGGGGTTTATGCATTCTTGCCATCGCCCGGGCGCAA	60
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----GAATTCTGTCGCGCCCTTGCAATC	24
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	CCGCTATTGTGCACATGCACCACCGACCGACCCTGGAGACAGGTGTGGTGCCTCGATAG	120
avrBs3-2	-----	
Avrb6	GAGCAGCCGGCTTAAAAGACTCCGACCATTCCGAGGGCCGTGTTTCGGGGCGCTCAGCCGC	84
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	ATCGATAGCTTCACCCGATCTATCCCTTGCTGGAGCGGGATACGGCAGAAATGCCAAA	180
avrBs3-2	-----	
Avrb6	TGCGACCCACTGGTAGAGCAGTACCCACATACACAACGGGGCCTAGTGAGCGTGACACGG	144
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GAGCCTACCGAGTAGTGAATACCGAAAGCGCTCCAGCGATGGGGCGCTTTCTTTTATAG	240
avrBs3-2	-----	
Avrb6	TGGAACAACATCCTGGATGGAGGGCGGATATTCGATATGTCGCACCTGGATTCTTCGAC	204
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GGCAATGGTCTGTTCGGCCAAGCGCCGCCGTACACAGTCTCAACCTTGTAGAGCTTCCC	300
avrBs3-2	-----ATGCGGTTTTGCGCCGCCACCA	22
Avrb6	GCATAAGAGCAACTTGATGGGCGGACTATCACAGTGTGCTATTCTGTTTTGGCCGTATACC	264
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GCGCGGGAGTTTATG-GATGGTTGTCCCGTCGACGGGGTAGCAGGAGATGAGGGTCGGCA	359
avrBs3-2	GCACGGCGTTGCAGGCAACCAGCGTGTATCACGCACATAGTTCTGATCGAGGGTCGGCA	82
Avrb6	TTTTCCGATGAAAAGGCCAATGGGTGCGCGCTTGAGCACGGGCGTTATTGAGGGTTGGCA	324
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GGGATTGGTGTAACCAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCGCTGTCAGCACAGAAATTTTC	419
avrBs3-2	GGGATTGGTGTAACCAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCGCTGTCAGCACAGAAATTTTC	142
Avrb6	GGGATTCGTGTAACCAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCGCTGTCATCAAGAAATTTTC	384
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	

ภาพที่ 4A (ต่อ)

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	ACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGTCCGTGATCGCCTTCATGTCTGCGCCTCACCC	479
avrBs3-2	ACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGTCCGTGATCGCCTTCATGTCTGCGCCTCACCC	202
Avrb6	ACAAACTTTCGCCGATCCTCCATGCGGGTCCGGGATCGCCTCCATGTCTGCGCCTCACCC	444
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	TGGTCGTGAGGGTTGCCAGGATCACCCGAAGTTGTGTACTGCCATGCGGCCTCGGAAGC	539
avrBs3-2	TGGTCGTGAGGGTTGCCAGGATCACCCGAAGTTGTGTACTGCCATGCGGCCTCGGAAGC	262
Avrb6	CGGTCGTGAGGGTTGCCAGGATCACCCGAAGTTGTGTACTGCCATGCGGCCTCGGAAGC	504
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	TATGTAGGAACCACAGACCGCTAGTCTGGAGGCGACCATG-----TAAAGAGGTATGCCT	594
avrBs3-2	TATGTAGGAACCACAGACCGCTAGTCTGGAGGCGACCATG-----TAAAGAGGTATGCCT	317
Avrb6	TATGTAGGGACCACAGGCCGTTAGTCTTGAGGCGACCATGGTTTCTGTAGAGGCATGCCT	564
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	-ATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCC GCGAGCTTCTGCCCGGACCCCA	59
pthB	-ATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCCACGAACTTTGGCCGGACCCCA	59
pthA	GATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCC GCGAGCTTCTGCCCGGACCCCA	654
avrBs3-2	GATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCC GCGAGCTTCTGCCCGGACCCCA	377
Avrb6	GATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCC GCGAGCTTCTGCCCGGACCCCA	624
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	ACCCGATGGGGTTCAG-----CCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGG	113
pthB	GCCGGATAGGGTTACGCCGACGACTGCAGATCGTGGGGGGGCTCCGCCTGCTGGCAG	119
pthA	ACCCGATGGGGTTCAG-----CCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGG	708
avrBs3-2	ACCCGATGGGGTTCAG-----CCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGG	431
Avrb6	ACCCGATGGGGTTCAG-----CCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGG	678
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	CCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCC	173
pthB	CCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGACGGACGATGTCCCGAACCCGCTCTCCCGTCTCCCC	179
pthA	CCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCC	768
avrBs3-2	CCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCC	491
Avrb6	CCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCC	738
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	TGCCCCCTCACCTGCGTTCTCGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTGAGTTTCGATCC	233
pthB	TGCCCCCTTGCCCTGCGTTCTCAGCGGGCAGTTTCAGCGATCTGCTGTGTCAGTTTCGATCC	239
pthA	TGCCCCCTCACCTGCGTTCTCGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTGAGTTTCGATCC	828
avrBs3-2	TGCCCCCTCACCTGCGTTCTCGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTGAGTTTCGATCC	551
Avrb6	TGCCCCCTCACCTGCGTTCTCGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTGAGTTTCGATCC	798
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	GCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGG - -CAAACAGTGGTCCGGCGCACGC	708
pthB	GCCGAGGCGACACACGAAGACATCGTTGGCGTCGG - -CAAACAGTGGTCCGGCGCACGC	714
pthA	GCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGG - -CAAACAGTGGTCCGGCGCACGC	1303
avrBs3-2	GCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGG - -CAAACAGTGGTCCGGCGCACGC	1026
Avrb6	GCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGG - -CAAACAGTGGTCCGGCGCACGC	1273
Avr/Pth13	ATC - -GACGTCTGATGAAAAATAGCGGCAGCAGCGGACCATGCCGCGAGCTAGCTT - -C	243
avrXa3	GCCAG - GTCGGCA - GCGATGGGCGTACCAGGATCCGG - GAGGCCGCC - CCCGATCCTGGT	198
	* * * * *	
AvrBs3	GCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC - AGTTGGA	767
pthB	GCCCTGGAAGCATTGCTCACGGTGTGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC - AGTTGGA	773
pthA	GCCCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC - AGTTGGA	1362
avrBs3-2	GCCCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC - AGTTGGA	1085
Avrb6	GCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC - AGTTGGA	1332
Avr/Pth13	GAGCTACAGGCCGTGCCCTCAGCCGGCGCTGCGCCCATCTTCTCCCGATGGGAGAGGGG	303
avrXa3	ACGGGGCGTTTTACCCTCCAGCTGAGGGGCAATGCAAGCGCATCGCGCTGT - -TCGGG	255
	* * * * *	
AvrBs3	CACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG - GCGTGACCGCAGTGGAAGGCAGTGC	826
pthB	CACAGGTCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG - GCGTGACCGCGGTGGAGGCAGTGC	832
pthA	CACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG - GCGTGACCGCAGTGGAAGGCAGTGC	1421
avrBs3-2	CACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG - GCGTGACCGCAGTGGAAGGCAGTGC	1144
Avrb6	CACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG - GCGTGACCGCAGTGGAAGGCAGTGC	1391
Avr/Pth13	CTTGTAGCTTCCCTTACGTGGGCTGGGCGATGCGCACATGCACGCGCAGCAGCTGGCAT	363
avrXa3	AACGCGC - -ACCTCGAAAGATTGCTGTGTGGAGGG - - - -GCCGGTGACAGCACGATCC	307
	* * * * *	
AvrBs3	ATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG	886
pthB	ATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCTCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG	892
pthA	ATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG	1481
avrBs3-2	ATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG	1204
Avrb6	ATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG	1451
Avr/Pth13	GCCGACGTCCCCCGAAGTTGC - -GTACTGCCATG - -CGTACTCGGAAGACATGTAGGGA	419
avrXa3	GATCGGGACCGTTTACGGCTGCTTGGCCGCTGATCTCCCTCGTGCATTGGGCTGGG	367
	* * * * *	
AvrBs3	CCATCGCCAGAAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGG	946
pthB	CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGG	952
pthA	CCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGG	1541
avrBs3-2	CCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGG	1264
Avrb6	CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGG	1511
Avr/Pth13	CCACAGACCGTTAGTGTTGAGGCGACCATGGTTTCTGTAAGAGAGGTATGCTGATG - -GA	477
avrXa3	GCATCAA - GGTACGCTCCAGCGAATCGGCGAATGCATGCAAAG - -ACGCTGAT - CCGG	423
	* * * * *	
AvrBs3	TGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCG	1006
pthB	TGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCG	1012
pthA	TGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCG	1601
avrBs3-2	TGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCG	1324
Avrb6	TGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT - - -	1567
Avr/Pth13	TCCCAT - TCGTCCGCGCAGGCCAAGTCTGCCCGCG - - -AGCTTCTGCCTGGACCC - -	529
avrXa3	TGTTTGAGCTGAAGTAGGGGACGG - TTTGGCCCTTTTCATCCCTGATGCCTGGA - - - -	476
	* * * * *	
AvrBs3	GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATG	1066
pthB	GCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGCAACATG	1072
pthA	- - -GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATG	1658
avrBs3-2	GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATG	1384
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	-----CAA-----CCGATAGGGTTACGC-----	548
avrXa3	-----GGATACGGTCCCAAC-----	491

AvrBs3	GCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG	1126
pthB	GCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG	1132
pthA	GCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGG	1718
avrBs3-2	GCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGG	1444
Avrb6	-----ATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGG	1589
Avr/Pth13	---CGACTGCAGATCGGGGGGGGCT-----CCGCTGCTGGC-GGCCCCCT	591
avrXa3	----GCTGCGAGGCTGGGGGGAG-----CGTTCCGACGGGGCTTCGA	530
	* ** ***	
AvrBs3	AGACGGTG-CAGCGGCTGT-TGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-CATGGCTGACCCCGGCAC	1183
pthB	AGACGGTG-CAGCGGCTGT-TGCCGGTGCTGTGCGAGCAA-CATGGCTGACCCCGGC	1189
pthA	AGACGGTG-CAGCGGCTGT-TGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-CATGGCTGACCCCGGAGC	1775
avrBs3-2	AGACGGTG-CAGCGGCTGT-TGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-CATGGCTGACCCCGGAGC	1501
Avrb6	AGACGGTG-CAGCGGCTGT-TGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-CATGGCTGACCCCGGAGC	1646
Avr/Pth13	GGATGGT-TGCCCGCT-C-GCGGAGCGGTGTCCCAGACC-C--GGCTGCCATCTCCCC	644
avrXa3	ATTGGTGACGCCCACTGTGCGAAAGAGCTGTACCAACCGTGCTGCTCATCCGA	590
	** * * *** *	
AvrBs3	AGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAG--GCGCTGGAGACGGTGCAGCG	1241
pthB	AGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAG--GCGCTGGAGACGGTGCAGCA	1247
pthA	AGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAG--GCGCTGGAGACGGTGCAGCG	1833
avrBs3-2	AGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAG--GCGCTGGAGACGGTGCAGCG	1559
Avrb6	AGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAG--GCGCTGGAGACGGTGCAGCG	1704
Avr/Pth13	CTGC---GCCCTCGCTGCTTCTCGCGGGCAGCTT--CAGC--GATCTGCTCCGTCC	696
avrXa3	GCGTATGCGTCATCGAATGCTTGCCTGGGTGGAGTGGCAATGGAAAACTCCAGCA	650
	* ** * * ** *	
AvrBs3	GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGC	1301
pthB	GCTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGCTGACCCCGGACCAGGTGGTGCCATCGC	1307
pthA	GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCTGACCCCGGACAGGTGGTGCCATCGC	1893
avrBs3-2	GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGC	1619
Avrb6	GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGC	1764
Avr/Pth13	GTTCCATCGCTCGCTT--CCTGATACATCACTT---TTTGATTGATGCGCGTCCGTCG	750
avrXa3	CGGAACCACTTGC--GCGTAGTCGGCAACGCGA--TGGACGTGCGTTCCGAATAC	704
	* ** * * *	
AvrBs3	CAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG	1361
pthB	CAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG	1367
pthA	CAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG	1953
avrBs3-2	CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG	1679
Avrb6	CAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG	1824
Avr/Pth13	CA-CGCGCATACAGCG-GCTGCCCCAGCAGA-GTGGGATGAGATGCAATCGGCTCTGCG	807
avrXa3	GGCGATTGACTCTTCTGATCAATTCCGCGCGGTGCGGCAATCCCTTTTTTC---ACTGCA	760
	* * * * * *	
AvrBs3	CCAGGCCCATGGCCTGAC-CCCGGCACAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA	1420
pthB	CGAGCAACATGGCCTGAC-CCCGGCACAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCA	1426
pthA	CCAGGCCCATGGCCTGAC-CCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA	2012
avrBs3-2	CCAGGCCCATGGCCTGAC-CCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA	1738
Avrb6	CCAGGCCCATGGCCTGAC-CCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGC-----	1870
Avr/Pth13	TGCAGCCGATGACCGGTACCCACCGTACGTG-TCGCTGTCACTGCC-----	853
avrXa3	TCCAGGGCAGGAC--GTCCGCCGAGGCAAGGCCGACGA-----	800
	* * * * * * * *	
AvrBs3	AGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGA	1480
pthB	AGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG-----	1473
pthA	AGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-----	2062
avrBs3-2	AGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC-----	1788
Avrb6	--CA-----	1872
Avr/Pth13	-----GCGCGGACGCCG-----	866
avrXa3	-----GGTGGTCGTTG-----	811

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	CCCCGGCACAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG	1540
pthB	-----CAA-----	1476
pthA	-----	
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	TGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGCACAGGTGGTGG	1600
pthB	-----CATGGCCTGACCCCGGACCAAGGTGGTGG	1504
pthA	-----CATGGCCTGACCCCGGACCAAGGTGGTGG	2090
avrBs3-2	-----CATGGCCTGATCCCGCAGCAGGTGGTGG	1816
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	-----	
avrXa3	-----	
AvrBs3	CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG-GAGACGGTGCAGCGGCTGT-TGCC	1658
pthB	CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG-GAGACGGTGCAGCGGCTGT-TGCC	1562
pthA	CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG-GAGACGGTGCAGCGGCTGT-TGCC	2148
avrBs3-2	CCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTG-GAGACGGTGCAGCGGCTGT-TGCC	1874
Avrb6	-----CGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG-GAGACGGTGCAGCGGCTGT-TGCC	1917
Avr/Pth13	-----GCGCCAAGCCGGCCCGCAGCGGCTGCGGCGCAACC-CTCC	907
avrXa3	-----GTCAACGC--GGCCAACGCCGGATCAGGGCGAGATAACTGGGCAAC	855
	* ** * * *	
AvrBs3	GGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAT	1718
pthB	GGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGG	1622
pthA	GGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGG	2208
avrBs3-2	GGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAG	1934
Avrb6	GGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAT	1977
Avr/Pth13	GACGCTTCGCGGGCCGCGCAGGTGGATCT--ACGCACGCT-CGGCTACAGTCAGCA----	960
avrXa3	AATGCTCTCCAGCGCCTGCTTGCCGCGCCATTGCTGGCGATGGCCACGACCTG-----	909
	*** * * ** * *** * *	
AvrBs3	TGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA	1778
pthB	CGGCGGCAAGCAGGCGCTGAAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGCAACA	1682
pthA	CGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA	2268
avrBs3-2	CGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA	1994
Avrb6	TGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA	2037
Avr/Pth13	--GCAGCAAG-AGAAGATCAAACCGAATGTGCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCAG--A	1014
avrXa3	-GTCCGGGGTCAGGCCATGGTCTGGCACAGCACCAGGCAACAGCCGCTGCACCGTCTCCA	968
	* ** * * ** * * *** * *	
AvrBs3	TGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGCGCT	1838
pthB	TGGCCTGACCCCGGACCAAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT	1742
pthA	TGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT	2328
avrBs3-2	TGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCT	2054
Avrb6	TGGCCTGCCCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT	2097
Avr/Pth13	GGCACTGGT---GGGCCATGGGTTACACACGCGCAC-ATCGTTGCGCTCAGCCAACACC	1070
avrXa3	GCGCCTGCTTGCCGCCATCGTGGCTGGCGATGGCCACGACCTGGTCCGGGGTCAGGCCAT	1028
	*** * * * * *	
AvrBs3	GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCA	1898
pthB	GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCA	1802
pthA	GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCA	2388
avrBs3-2	GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCA	2114
Avrb6	GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCA	2157
Avr/Pth13	CGGCAGCGT-TAGGGACCGTTGCTGTGCAC-GTATCAG-CACATAATC--ACGGCGTTGCC	1125
avrXa3	GGTCCTGGCACAGCACCAGGCAACAGCCGCTGCACCGTCTCCAGCGCTGCTTGGCGCCAT	1088
	* * ** * * * * ** *	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT	1958
pthB	GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT	1862
pthA	GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT	2448
avrBs3-2	GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT	2174
Avrb6	GGTCGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT	2217
Avr/Pth13	AGAGGCGACACACGAAGACATCGTTGGCGTCG - GCAAACAGTGGTC - CGGCGCA - CGCGC	1182
avrXa3	CGTGGCTGGCGATGGCCACCACCTGGTCCGGGGTCAGGCCATGGTCCTGGCACAGCACCG	1148
	* * * * *	
AvrBs3	GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG	2018
pthB	GTTGCCGGTGCTGTGCCAG - - - - -	1881
pthA	GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC - - - - -	2470
avrBs3-2	GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGAC - - - - -	2196
Avrb6	GTTGCCGGTGCTGTGCCAG - - - - -	2236
Avr/Pth13	CCTGGAGGCCTTGCTCACGA - - - - -	1202
avrXa3	GCAACAGCCGCTGCACTGT - - - - -	1167
	* ** *	
AvrBs3	CAATGGCGGCGGCAGGCCGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA	2078
pthB	CAA - - - - -	1884
pthA	--C- - - - -	2471
avrBs3-2	- - - - -	
Avrb6	- - - - -	
Avr/Pth13	- - - - -	
avrXa3	- - - - -	
AvrBs3	GGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCA	2138
pthB	---CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCA	1940
pthA	---ATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA	2526
avrBs3-2	---CATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCA	2252
Avrb6	- - - - -	
Avr/Pth13	- - - - -A	1203
avrXa3	- - - - -	
AvrBs3	GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCC	2198
pthB	GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG - - - - -	1983
pthA	GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC - - - - -	2572
avrBs3-2	GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC - - - - -	2298
Avrb6	- - - - -GCC - - - - -	2239
Avr/Pth13	GGCGGGGAGTTGAGAGGTCCGCCGTTACAGTTG - GACACAGGCCA - - - - -	1248
avrXa3	--CTCCAGCGCC - - - - TGCTTGCCGCCGTTATTGCTGGCAATGGCC - - - - -	1207
AvrBs3	GACGACGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGGCGCTGGAGACGGTGCA	2258
pthB	- - - - -CAA - - - - -	1986
pthA	- - - - -	
avrBs3-2	- - - - -	
Avrb6	- - - - -	
Avr/Pth13	- - - - -	
avrXa3	- - - - -	
AvrBs3	GC GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT	2318
pthB	- - - - -CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCAT	2018
pthA	- - - - -CATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT	2604
avrBs3-2	- - - - -CATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCAT	2330
Avrb6	- - - - -	
Avr/Pth13	- - - - -ACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCG - -	1277
avrXa3	- - - - -ACGACCTGGTCCGGGGTCAGGCCATGGTCCT	1238

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	CGC - CAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC	2377
pthB	CGC - CAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC	2077
pthA	CGC - CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC	2663
avrBs3-2	CGC - CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC	2389
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	TGA - CCGCAGTGGAGGCGT - - GCATGCATCGC - - GCAATGCACTGACGGGTGCC - - - -	1327
avrXa3	GGCACAGCACCGGCAACAGCCGCT - - GCACCGTCTCCAGCGC - CTGCTTGCCGCCATTGC	1295
AvrBs3	TGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG	2437
pthB	TGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG	2137
pthA	TGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCTGACCCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTG	2723
avrBs3-2	TGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG	2449
Avrb6	-----CATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGGCCATGGCGGTG	2288
Avr/Pth13	-----CCCCTGAACCTGACCCCGGACAGGTGGTGGCCATCGCCAGC - - - AATGGCG	1376
avrXa3	TG - GCGATGGCCACCACCTGGTCCGGGGTCAGGCCATGGTCTCTGGC - - - - ACAGCACCG	1349
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGC	2496
pthB	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGCAACATGGC	2196
pthA	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGC	2782
avrBs3-2	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGC	2508
Avrb6	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGC	2347
Avr/Pth13	GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGC	1435
avrXa3	GCAA - CAGCCGTTGCACCGTCTCCAGCGCCTGCTTGCCGCCGCCATTGCTGGCG - ATGGC	1407
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	CTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA	2555
pthB	CTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA	2255
pthA	CTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA	2841
avrBs3-2	CTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA	2567
Avrb6	CTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA	2406
Avr/Pth13	CTGACCCCTGGACCAGGTGGTGGCCATCG - CCAGCAATAACGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA	1494
avrXa3	CACCGCCTGCGCCGGGGTCAGGCCATGGTCTTGCCACAGCACCGGCAA - CAGCCGCTGCA	1466
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGG	2614
pthB	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGG	2314
pthA	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGG	2900
avrBs3-2	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGG	2626
Avrb6	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGG	2465
Avr/Pth13	GACGGTGCAGCGGCTG - TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGG	1553
avrXa3	CCGTCTCCAGCGCTGCTTGCCGCCATCGTGGCTGGCG - ATGCCACGACCTGGTCCGGG	1525
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	TGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	2673
pthB	TGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	2373
pthA	TGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	2959
avrBs3-2	TGGTGGCCATCG - CCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	2685
Avrb6	TGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	2524
Avr/Pth13	TGGTGGCCATCG - CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG	1612
avrXa3	GTCAGGCCATGGTCTTGCCACAGCACCGGCAA - CAGCCGCTGCACCGTCTCCAGAGCCTG	1584
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	2731
pthB	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	2431
pthA	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	3017
avrBs3-2	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	2743
Avrb6	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	2582
Avr/Pth13	- TTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGATCCCGGCGCAGGTGGTGGCCATCG - CCA	1670
avrXa3	CTTGCCGCCATCGTGGCTGG - CGATGGCCACCACCTGCGCCGGGGTCAGGCCATGGTCTCT	1643
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	GCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	2790
pthB	GCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	2490
pthA	GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	3076
avrBs3-2	GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	2802
Avrb6	GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	2641
Avr/Pth13	GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTG-TTGCCGGTGCTGTGC	1729
avrXa3	GGCAGACACCGGCAA-CAGCCGCTGCACCGTCTCCAGCGCCTGATTGCCGCCATCGTGG	1702
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	CAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAG	2850
pthB	GAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAG	2550
pthA	CAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCTGCAATGGCGGTGGCAAG	3136
avrBs3-2	CAGGCCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAG	2862
Avrb6	CAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAG	2701
Avr/Pth13	CAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG	1789
avrXa3	CTGG-CGATGGCCACCACCTGTGCCGGG-----GTCAGGTTTCAG-----GGGGGCACCCGT	1752
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	CCGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTG-AC	2909
pthB	CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTG-AC	2609
pthA	CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTG-AC	3195
avrBs3-2	CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTG-AC	2921
Avrb6	CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCATGGCCTG-AC	2760
Avr/Pth13	CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTG-AC	1848
avrXa3	CAG-TGCATTGCGCCATGCATGCACTGCCTTCACTGCGGTCACGCCGCCACGTTTTGCAA	1811
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	CCCGGCACAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCGAGGCCGGCGCTGGAGAGCAT	2969
pthB	CCCGGCAGAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCGAGGCCGGCGCTGGAGAGCAT	2669
pthA	CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCGAGGCCGGCGCTGGAGAGCAT	3255
avrBs3-2	CCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCGAGGCCGGCGCTGGAGAGCAT	2981
Avrb6	CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCGAGGCCGGCGCTGGAGAGCAT	2820
Avr/Pth13	CCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGAGCAT	1908
avrXa3	TCTTGAGAAGTTGGC--CTGTGTCCAACGTAAACGGCGGACCTCTCAACTCCCCCGCCTC	1869
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	TGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	3028
pthB	TTTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCAGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	2728
pthA	TGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	3314
avrBs3-2	TGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	3040
Avrb6	TGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	2879
Avr/Pth13	TGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC-GTTGACCAACGACCACCTCG	1967
avrXa3	CGTGAGCAAGGCCCTCCAGGGCGCGTGCGCCG--GACCACTGTTTGCCGACGCCAACGATG	1927
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCG-----CTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT	3083
pthB	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGCGCTCTGCG-----CTGGAGGCAGTGAAAAAGGGATT	2783
pthA	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCG-----CTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT	3369
avrBs3-2	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCG-----CTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT	3095
Avrb6	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCG-----CTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT	2934
Avr/Pth13	TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCG-----CTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT	2022
avrXa3	TCTTCGTGTGTCGCTCTGGCAACGCCCTGATTATGTCTTGATAC-GTGACAGCAACGGT	1986
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
AvrBs3	GCCGCACGC-GCCGGCC-TTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTATTCCCGAACGCACATCC	3141
pthB	GCCGCACGC-GCCGACC-TTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTATTCCCGAACGCACGTCC	2841
pthA	GCCGCACGC-GCCGGCC-TTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTATTCCCGAACGCACATCC	3427
avrBs3-2	GCCGCACGC-GCCGGCC-TTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTATTCCCGAACGCACATCC	3153
Avrb6	GCCGCACGC-GCCGGCC-TTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTATTCCCGAACGCACATCC	2992
Avr/Pth13	GCCGCACGC-GCCGGA-TTGATCAGAAGAGTCAATAGCCGTATTGGCGAACGCACGTCC	2080
avrXa3	CCCTAACGCTGCCGGGTGTTGGCTGAGCGCAACGATGTGCGCGTGTGTAACCCATGACC	2046
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	CATC---GCGTTGCCG-ACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTT---TTTCCAGTG	3194
pthB	CATC---GCGTTGCCG-ACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTT---TTTCCAGTG	2894
pthA	CATC---GCGTTGCCG-ACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTT---TTTCCAGTG	3480
avrBs3-2	CATC---GCGTTGCCG-ACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTT---TTTCCAGTG	3206
Avrb6	CATC---GCGTTGCCG-ACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTT---TTTCCAGTG	3045
Avr/Pth13	CATC---GCGTTGCCG-ACTACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGAGTT---TTTCCAGAG	2133
avrXa3	CACCAAGTGCCTCGTGGTGCCGCGCCACTGTGCAACGCACCTTCGGTTTGATCTTCTCTTG	2106
	* * * * *	
AvrBs3	CCACTCCCACCCAGCGC-AAGCATTTGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	3253
pthB	CCACTCCCACCCAGCGC-AAGCATTTGATGAAGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	2953
pthA	CCACTCCCACCCAGCGC-AAGCATTTGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	3539
avrBs3-2	CCACTCCCACCCAGCGC-AAGCATTTGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	3265
Avrb6	CCACTCCCACCCAGCGC-AAGCATTTGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	3104
Avr/Pth13	CCACTCCCAGCCAGCGC-AAGCATTCGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGC	2192
avrXa3	CTGCTGCTGACTGTAGCCGAGCGTGCCTAGATCCACCTGCGCGCCGCGCAAGCGTCGGA	2166
	* * * * *	
AvrBs3	ACGGGTTGTTACAGCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGA	3313
pthB	ACGGGTTGTTACAGCTATTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAGGCCCGCGGTGGA	3013
pthA	ACGGGTTGTTACAGCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGA	3599
avrBs3-2	ACGGGTTGTTACAGCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGA	3325
Avrb6	ACGGGTTGTTACAGCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGA	3164
Avr/Pth13	ACGGGTTGTTACAGCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGA	2252
avrXa3	GGGTTGCGCCGCA-CGCCGTGCGGGGCGCGCTTGGC--GC	2222
	* * * * *	
AvrBs3	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	3372
pthB	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	3072
pthA	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	3658
avrBs3-2	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	3384
Avrb6	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	3223
Avr/Pth13	CGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTATCCTCCAG-GCATCAGGGATGAAAAGG	2311
avrXa3	TGACAGCGACA---CGCACGGTGGGTGGCGGGTCAATCGGCTGCACGAGACCCGATTGC	2278
	* * * * *	
AvrBs3	GCCAAACCGTCCCCTACTTCAACTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	3432
pthB	GCCGAACCGTCCGGTGCTTCGGCTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	3132
pthA	GCCAAACCGTCCCCTACTTCAACTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	3718
avrBs3-2	GCCAAACCGTCCCCTACTTCAACTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	3444
Avrb6	GCCAAACCGTCCCCTACTTCAACTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	3283
Avr/Pth13	GCCAAAGCGTCCCCTACTTCAAGTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCATGCATTGCGC	2371
avrXa3	GCCTCATCCATTCTGCTGGGG--CAGCCGCTGTATGCGGCGTGCCGACG-GCAGGCAATC	2335
	* * * * *	
AvrBs3	GATTCGCTGGAGCGTG-ACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCA--GACG	3489
pthB	GATGCGCTGGAGCGTG-AGCTGGATGCGCCAGCCCAATAGACCAAGCAGGCA--GGCG	3189
pthA	GATTCGCTGGAGCGTG-ACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCA--GAGG	3775
avrBs3-2	GATTCGCTGGAGCGTG-ACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCA--GACG	3501
Avrb6	GATTCGCTGGAGCGTG-ACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCA--GACG	3340
Avr/Pth13	GATTCGCTGGAGCGTG-ACCCTGATGCGCCAGCCCAATGCACGAGGGAGATCA--GACG	2428
avrXa3	GAATCAAGAAGCGATGTATCAAGAAGCGACGGATCGAACTGACGGAGCAGATCGCTGAAG	2395
	* * * * *	
AvrBs3	CGGGCAAGCAGC---CGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGTGCTGTCA-CCGGTCCCTCCGC	3545
pthB	CTGGCAAGCAGCAGCCGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGGAGAGTTCTGTCA-CCGGTCCCTCCGC	3248
pthA	CGGGCAAGCAGC---CGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGTGCTGTCA-CCGGTCCCTCCGC	3831
avrBs3-2	CGGGCAAGCAGC---CGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGTGCTGTCA-CCGGTCCCTCCGC	3557
Avrb6	CGGGCAAGCAGC---CGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGTGCTGTCA-CCGGTCCCTCCGC	3396
Avr/Pth13	CGGGCAAGCAGC---CGTAAACGGTCCCAGTCCGATCGTGCTGTCA-CCGGCCCTCCGC	2484
avrXa3	CTGCCGCGCGAGAA-CGCAGGCGAGGGCG--CAGGGGAGATGGCAGCCGGTCCGGGAC	2452
	* * * * *	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	ACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTGCCCC---	3601
pthB	ACAGCAAGCTGTGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTACCCCCC	3307
pthA	ACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTGCCCC---	3887
avrBs3-2	ACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTGCCCC---	3613
Avrb6	ACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTGCCCC---	3452
Avr/Pth13	ACAGCAATCTTTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGA-TGCGCTGCATTTGCCCC---	2540
avrXa3	ATCGTCCGCCGAGCGGGCAAGCCATCCAGGGGGCGGCCAGCAGCGGAGCCCCCCCCGA	2512
	* * * * *	
AvrBs3	TCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	3661
pthB	TCAGCTGGGGTGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	3367
pthA	TCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	3947
avrBs3-2	TCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	3661
Avrb6	TCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	3512
Avr/Pth13	TCAGCTGGAGTGTAAAACGCCCGCTACCAAGTATCGGGGGCGGCCCTCCCGGATCCTGGTA	2600
avrXa3	TCTGCAGTCGGGTGAACCTATCCGGTTGGGGTCCGGGAGAAGCTCGCG-----GGCA	2566
	** * * * *	
AvrBs3	CGCCACGGCTGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGCGGGAACAAGATGAGGAC	3720
pthB	CCCCCATGGACGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGTGGGAACAAGATGCGGAC	3426
pthA	CGCCACGGCTGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGCGGGAACAAGATGAGGAC	4006
avrBs3-2	CGCCACGGCTGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGCGGGAACAAGATGAGGAC	3720
Avrb6	CGCCACGGCTGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGCGGGAACAAGATGAGGAC	3571
Avr/Pth13	CGCCCATGGCTGC-CGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGTGGGAACAAGATGCGGAC	2659
avrXa3	GGACTTGGCGTGC CGGAACGAATGGGATCCATCA--GGCATACT--CTTTACATGGTC	2621
	* * * * *	
AvrBs3	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAGTCGCATGGTTG	3780
pthB	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAGATGGCATGGTTG	3486
pthA	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAGTCGCATGGTTG	4066
avrBs3-2	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAGTCGCATGGTTG	3780
Avrb6	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAGTCGCATGGTTG	3631
Avr/Pth13	CCCTTCGCAGGGGCGAGCGGATGATTTCCCGGCATTCAACGAAGAGGAACTCGCATGGTTG	2719
avrXa3	GCCTCCAGACTAGCGGTCTGTGGTCCCTACATAGCTTCCAGGCCGCAT-----	2670
	** * * * *	
AvrBs3	ATGGAGCTATTGCCTCAGTGA-----	3801
pthB	ATGGAGCTATTTTCTCAGTGA-----	3507
pthA	ATGGAGCTATTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTG-ACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG	4125
avrBs3-2	ATGGAGCTATTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTG-ACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG	3839
Avrb6	ATGGAGCTATTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTG-ACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG	3690
Avr/Pth13	ATGGAGCTATTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGGGACTATCTGAGCGTCGGCAGGGATTG	2779
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCA-CTTTTGGCTGTTTTTACACAAAT	4184
avrBs3-2	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCA-CTTTTGGCTGTTTTTACACAAAT	3898
Avrb6	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCA-CTTTTGGCTGTTTTTACACAAAT	3749
Avr/Pth13	GTGTAAGAAACCTT-ACTGACAGTGAGTTAGCTCAACTTTTGGCTGTGTTTTACACGAAT	2838
avrXa3	-----	
AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	CCCTGCCTCCCCTCACCTGGGCACGCAGTCCCTCGGTGCGCATCAATCGATGCACCGATG	4244
avrBs3-2	CCCTGCCTCCCCTCTAGTTGCGCAAGATGCCCGCGCTTGGTACCAAGAGGCATCGTAGGCC	3958
Avrb6	CCCTGCCTCCCCTCTAGTCTCGAACTCGTGGGCGACGGTCCGGCCGTCTACTAAGGGA	3809
Avr/Pth13	CCCTGCCGACCCTCTAGGGCGGCCGAACCAATGCCGTAGGCCACTGCCACCGACCAACG	2898
avrXa3	-----	

ภาพที่ 4A

(ต่อ)

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	GCGACTGCAACGTCACCAGATCGGTAGATCC-----	4275
avrBs3-2	GTGAGCTTGTTTCAGTGGCGGCAACCGCTTGAAGCCTGCTGCC-----	4000
Avrb6	TTGCGCACTGGCGAACGACGGAACATCACCAACGTATTGACGCTGACA-----	3856
Avr/Pth13	CCTA-TCCACACCCAGGCGATCGGCGAGGACCGCATCTTGCCGCGCGCAGTGGTCAGGAT	2957
avrXa3	-----	

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	-----	
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	GGTGCGTACCGCTGGGATGACGGAAATTTCTGGGGTTCCGGCTTACATCCCCTATAGCGT	3017
avrXa3	-----	

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	-----	
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	GCGCTTGCGGGGTTGCCCTGGCGCTGGAGCTTGACCAACGCCTTCAACGCGGCTTGACG	3077
avrXa3	-----	

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	-----	
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	CCCCGGCGGTAGACCTTGGGCGCCCGCACGTACTTTGGGCGGTGTTTCGTTGTATTGCGG	3137
avrXa3	-----	

AvrBs3	-----	
pthB	-----	
pthA	-----	
avrBs3-2	-----	
Avrb6	-----	
Avr/Pth13	GCGCCAGCGTTCGATCTCGGTGCGCGCATGCAG	3170
avrXa3	-----	

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางณัฐฐิมา โหมยิตเจริญกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 6 มิถุนายน 2508
สถานที่เกิด	เชียงราย
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการโรคพืช 7ว.
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ ทุนการศึกษาที่ได้รับ	