



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*  
ในประเทศไทย

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

นามผู้วิจัย รินนภา สมสนุก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวดล, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์วิชัย โหมสิทธิ์ตัน, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์, ปร.ด. )

ประธานสาขาวิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*  
ในประเทศไทย

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

โดย

นางสาวรินนภา สมสนุก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายนาม สมสนุก 2556: การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวณ, Ph.D. 89 หน้า

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว จำนวน 31 ไอโซเลต เก็บจากพื้นที่ปลูกข้าว 21 จังหวัด ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2551-2553 นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเชื้อด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความเหมือนด้วย Dice's coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าเทคนิค AFLP, Rep-PCR ไพรเมอร์ REP และ ERIC แบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 9, 5 และ 9 กลุ่ม ซึ่งมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95180, 0.95928 และ 0.85325 ตามลำดับ โดยผลการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย โดยพบว่าประชากรเชื้อในภาคเหนือและภาคกลางตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปลูกพันธุ์ข้าวที่หลากหลายและระบบนิเวศเกษตรที่แตกต่างกัน

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Rinnapa Somsanook 2013: Assessment of Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Thailand. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Miss Sujin Patarapuwadol, Ph.D. 89 pages.

Thirty-one isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, were collected from 21 rice-growing provinces in Thailand during the year 2008 to 2010. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) techniques were employed for the genetic diversity assessment among *X. oryzae* pv. *oryzae* isolates. The polymorphic bands were recorded and comparative analyzed. Similarity coefficients were calculated by using Dice's coefficient and the cluster analysis was calculated by using unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA). Based on AFLP analysis, *X. oryzae* pv. *oryzae* were grouped into 9 clusters, whereas 5 and 9 clusters were identified by REP primer and ERIC primer analysis. The fitness of dendrograms was determined by cophenetic correlation ( $r$ ). The matrix revealed high reliable values of these techniques at  $r = 0.95180$ ,  $0.95928$  and  $0.85325$  respectively. Our results show that populations of *X. oryzae* pv. *oryzae* in Thailand are highly diverse, especially strains from the Northern and Upper Central regions of Thailand. Cultivar-specific effects and geographical conditions may have influence on this pathogen variation.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุจินต์ ภัทรภูวคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โหมสิทธิ์ตัน และอาจารย์ ดร.จุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์ อาจารย์ที่  
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยและคำแนะนำในด้าน  
ต่างๆ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์และขอกราบขอบพระคุณ  
รองศาสตราจารย์ ศศิธร วุฒินิชย์ ประธานการสอบ และ ดร. ปารีชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้  
ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร  
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ  
อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผู้สนับสนุนงบประมาณ ตลอดจนสถานที่ อุปกรณ์และ  
เครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ที่สนับสนุนเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*  
สำหรับใช้วิจัยในครั้งนี้และขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสนที่ได้สนับสนุน โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมและให้ความรู้อันเป็นประโยชน์แก่  
ข้าพเจ้า และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการศึกษาความสัมพันธ์ด้านพืชและ  
จุลินทรีย์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ให้  
ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ ทุกคน ที่เป็นกำลังใจและให้ทุน  
สนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

รินนภา สมสนุก

มีนาคม 2556

## สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	31
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	77
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	89

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 อะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	26
2 แสดงข้อมูลการเก็บตัวอย่างข้าวประกอบด้วยจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง ปีที่เก็บ จำนวนตัวอย่างที่เก็บและจำนวน ไอโซเลทเชื้อที่แยกได้	35
3 ไอโซเลทเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบทางสัณฐานวิทยาชีวเคมี ผลการตรวจ เชื้อด้วยพีซีอาร์และการทดสอบการเกิดโรค	39
4 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค <i>In Silico</i> AFLP-PCR โดยอาศัยฐานข้อมูลจีโนมเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สายพันธุ์ KACC10331 กับการ วิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จำนวน 6 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค AFLP	50
5 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จำนวน 31 ไอโซเลท	51
6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC	57
<b>ตารางผนวกที่</b>	
1 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 200 แถบ เมื่อทดสอบในโปรแกรม <i>In Silico</i>	78
2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>MseI</i> จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	79
3 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>TaqI</i> จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	79
4 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> และ <i>MseI</i> จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	80

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
5 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Pst</i> I และ <i>Taq</i> I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	80
6 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III และ <i>Mse</i> I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	81
7 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III และ <i>Taq</i> I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	81
8 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Apa</i> I และ <i>Mse</i> I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	82
9 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X.oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Apa</i> I และ <i>Taq</i> I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม <i>In Silico</i> AFLP-PCR amplification	82
10 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค AFLP	83
11 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากไพรมอร์ REP	85
12 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากไพรมอร์ ERIC	87

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย	18
2 ลักษณะอาการของโรค (ก) โรคขอบใบแห้งในแปลงนา (ข) อาการข้าวฉ่ำน้ำ (Water Soak) (ค) อาการขอบใบแห้ง (leaf blight) (ง) Bacterial ooze บนใบ	31
3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ	36
4 แสดงผลการทดสอบการเกิดโรค	37
5 แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แอปติเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S-23S spacer ขนาด 470 คู่เบส	38
6 เคน โครแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่ได้จากเทคนิค AFLP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ	53
7 แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค AFLP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp ของ NTSYS version 2.01d ได้ค่าผลคำนวณ Cophenetic correlations (r) เท่ากับ 0.95180	54
8 แสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA ของเทคนิค AFLP ด้วยโปรแกรมย่อย Eigen จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d	56
9 เคน โครแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จากเทคนิค rep-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ REP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's Coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ	60
10 แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จาก โปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95928	61
11 แสดงการกระจายข้อมูลแบบ PCA ด้วยเทคนิค rep-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ REP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย Eigen ในโปรแกรม NTSYS version 2.01d	61

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12	63
<p>เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> จากเทคนิค rep-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ERIC วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's Coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ</p>	
13	64
<p>แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จากโปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.85325</p>	
14	65
<p>แสดงการกระจายข้อมูลแบบ PCA ด้วยเทคนิค rep-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ ERIC จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย Eigen ในโปรแกรม NTSYS version 2.01d</p>	

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	Percent
%T	=	Percent Transmittance
µm.	=	Micrometer
A	=	Adenosine base
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	=	Ammonium persulfate
ATP	=	Adenosine triphosphate
<i>avr</i>	=	Avirulence gene
BOX	=	Interspersed repetitive BOX element
BSA	=	Bovine serum albumin
C	=	Cytosine base
CaCl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Calcium hypochloride
Coph	=	Cophenetic
CTAB	=	Hexadecyltrimethylammonium bromide
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	=	Cupric nitrate
dNTPs	=	Deoxy ribonucleotidetriphosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	=	Extracellular polysaccharide
ERIC	=	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
G	=	Guanosine base
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hydrogen peroxide
H <sub>2</sub> S	=	Hydrogen sulfide
IS-PCR	=	Insertion Sequence –PCR
KOH	=	Potassium hydroxide
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesium chloride
NA	=	Nutrient agar
NaCl	=	Sodium chloride

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

NB	=	Nutrient broth
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
NIL	=	Near Isogenic Line
NO <sub>2</sub>	=	Nitrite
NO <sub>3</sub>	=	Nitrate
NTSYS	=	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
O.D.	=	Optical density
PCA	=	Principal Components Analysis
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pH	=	Potential of Hydrogen ion
REP	=	Repetitive extragenic palindromic sequence
rep-PCR	=	Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SHAN	=	Sequential Agglomerative Hierarchical Nestedcluster Method
SimQual	=	Similarity for qualitative data
T	=	Thymine base
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
TE	=	Tris-EDTA
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TSI agar	=	Triple Sugar Iron
TTC	=	Tatrazolium chloride
UPGMA	=	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	=	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
YDC	=	Yeast extract dextrose calcium carbonate

# การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย

## Assessment of Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Thailand

### คำนำ

โรคขอบใบแห้งของข้าวมีเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค โดยเชื้อนี้เข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญของข้าว อาการของโรคมี 2 ลักษณะอาการคือ อาการใบไหม้และอาการต้นแห้งตาย โดยโรคนี้ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงตั้งแต่ 20-30% ในบางพื้นที่อาจเสียหายถึง 80% และเมล็ดข้าวมีคุณภาพต่ำ (Lee *et al.*, 2003; IRRI, 2004) การควบคุมโรคนี้นอกจากการใช้สารเคมีและการเกษตรกรรม การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค สะดวกและปลอดภัยต่อการนำไปใช้ของเกษตรกร อย่างไรก็ตามพบว่ายีนต้านทานโรคของข้าว (*R*; Resistance gene) จะต้านทานต่อกลุ่มประชากรใดประชากรหนึ่ง (Subpopulations) ของเชื้อสาเหตุเท่านั้น (Ochiai *et al.*, 2000) เนื่องจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ภายในประชากรของเชื้อ ซึ่งเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น การกลายพันธุ์ (Mutation) การรวมกันของยีน (Recombination) และการเคลื่อนย้าย (Migration) ของเชื้อ โดยมีผลมาจากสภาพแวดล้อมและพันธุ์ข้าว (Leach *et al.*, 1995)

สำหรับประเทศไทยจากรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ตามที่รายงานโดย Kosawang *et al.* (2006) ใช้เทคนิค AFLP ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อในเขตภาคเหนือของไทย สามารถแบ่งเชื้อได้ 6 กลุ่ม (Lineages) โดยเชื้อจากจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดแพร่กระจายอยู่ในหลายกลุ่ม ซึ่งการกระจายของเชื้อในเขตภาคเหนืออาจเนื่องจากการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์จากสถานีวิจัยข้าวและแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ ทำให้เชื้อแพร่กระจายจากสถานีไปสู่แปลงเกษตรกร ต่อมา แสงชัย (2552) ได้จัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 90 สายพันธุ์ โดยประเมินจากความรุนแรงในการก่อโรคบนพันธุ์ข้าว Near isogenic lines (NILs) ที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง คือ *Xa3*, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa8*, *Xa10*, *xa13*, *Xa14* และ *Xa21* พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อตามปฏิกริยาระหว่างยีนต้านทานโรคในพืชกับยีนก่อโรคของเชื้อได้ 25 กลุ่ม โดยพบว่ายีนต้านทาน *xa5* สามารถต้านทานต่อเชื้อที่พบในประเทศไทยได้ดี ซึ่ง pathotype ที่มี

ความรุนแรงมากที่สุด คือ pathotype ที่ 19 สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต่างๆ ได้ ยกเว้นข้าวที่มียีนต้านทาน *xa5* ส่วน pathotype ที่ 9 มีความรุนแรงสูงเช่นกันสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต่างๆ ได้ ยกเว้นข้าวที่มียีนต้านทาน *Xa4* และ *xa5* pathotype ที่ 13 มีความรุนแรงในการเข้าทำลายระดับปานกลาง สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต่างๆ ได้ ยกเว้นข้าวที่มียีนต้านทาน *Xa4*, *xa5*, *Xa7* และ *Xa21* ขณะที่ pathotype ที่ 2 ไม่ก่อความรุนแรง โดยไม่สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานได้

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการขอบใบแห้งเพื่อเป็นตัวแทนจากทุกภาคของประเทศไทย นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และจำแนกเชื้อด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี และทดสอบการเกิดโรคกับพืชอาศัย ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และเทคนิค Rep-PCR นำผลที่ได้สร้างแผนผังโครโมแกรมวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค

## วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)



## การตรวจเอกสาร

### 1. เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

#### 1.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว (Bacterial Leaf Blight) (Mew, 1987) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อน ขนาด 0.7-2.0  $\mu\text{m}$ . x 0.4-0.7  $\mu\text{m}$ . เคลื่อนที่โดยใช้ flagella 1 เส้น ชนิด polar flagella การเจริญของโคโลนิบนอาหารแข็งที่มีกลูโคสมีลักษณะกลม โค้งนูน มั่นเยิ้ม มีสีเหลืองจากสาร Xanthomonadins ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อที่อยู่ในจีนัส *Xanthomonas* sp. นอกจากนี้ยังมีการสร้าง Extracellular polysaccharide (EPS) มาล้อมรอบเซลล์ของแบคทีเรีย (Capsule) ซึ่ง EPS มีความสำคัญในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย (Nino-Liu *et al.*, 2006) เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (Obligate aerobic bacteria) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ไม่เกิดปฏิกิริยา Oxidase แต่สร้างเอนไซม์ Catalase ได้ ไม่ใช่ไนเตรด (Nitrate reduction) แต่สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จาก L-cysteine ไม่สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's B ไม่ย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร SX อาหารที่เติม 0.1% Triphenyl-Tetrazolium Chloride (TTC) และอาหารที่มี L-alanine เป็นแหล่งคาร์บอนแต่ต้านทานต่อ Cupric nitrate ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) (Ou, 1985; Van Den Mooter and Swing, 1990; EPPO, 2007)

#### 1.2 การเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคและลักษณะอาการ

เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกช่วงระยะการเจริญ โดยเข้าทางบาดแผลหรือทางช่องเปิดตามธรรมชาติ เช่น รุกคายน้ำ และปากใบ โดยเซลล์แบคทีเรียเข้าไปเพิ่มปริมาณในส่วนของช่องว่างระหว่างเซลล์ และเคลื่อนย้ายไปที่ท่อลำเลียงน้ำ ซึ่งจะไปขัดขวางการลำเลียงน้ำ ลดการคายน้ำและลดอัตราการสังเคราะห์แสง (Elings *et al.*, 1997; EPPO, 2007) โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายทางบาดแผลได้มากกว่าทางช่องเปิดตามธรรมชาติ และการเข้าทำลายยังมีความสัมพันธ์กับบาดแผลของต้นข้าว เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคเข้าทางบาดแผลหรือทาง

ช่องเปิดตามธรรมชาติ อาการของโรคจึงเกิดขึ้นที่ขอบใบข้าว โดยมีอาการ 2 ลักษณะอาการ คือ อาการใบแห้ง (Bacterial leaf blight) และอาการต้นแห้งตาย (Kressek) (Ou, 1985)

### 1.3 การแพร่ระบาดและการป้องกันกำจัด

เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถแพร่ระบาดจากต้นข้าวที่เป็นโรคหรือจากพืชอาศัยอื่นๆ ไปยังแปลงข้าวที่ไม่เป็นโรคโดยลม ฝน หรือคองข้าวที่เหลือจากการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะ เป็นแหล่งแพร่ระบาดของโรคในฤดูปลูกถัดไป นอกจากนี้อาจมีการแพร่ระบาดจากระบบชลประทาน ติดไปกับมนุษย์ แมลง นก หรือติดไปกับเมล็ดพันธุ์ (Seed-borne) (Ou, 1985; Nino-Liu *et al.*, 2006) เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* มีพืชอาศัยหลากหลายทั้งข้าวในจีนัส *Oryzae* sp. และวัชพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด (Graminae) ที่อยู่ในเขตอบอุ่นและเขตร้อน โดยในฤดูหนาวของพื้นที่เขตอบอุ่น พบว่าเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะอยู่รอดได้ในเขตอิทธิพลราก (Rhizosphere) ของวัชพืชหลายชนิดในจีนัส *Leersia* sp. และพบว่าเชื้อสาเหตุโรคสามารถอยู่ในดินได้นาน 1-3 เดือน ขึ้นอยู่กับความชื้นในดิน จุลินทรีย์และความเป็นกรดต่างในดิน (Nino-Liu *et al.*, 2006) ในประเทศไทย สมหญิง (2526) รายงานการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถอาศัยอยู่ในพืชตระกูลหญ้าได้หลายชนิด ซึ่งหญ้าไทร (*Leersia hexandra*) แสดงอาการโรคขอบใบแห้งรุนแรงที่สุดหลังจากปลูกเชื้อ

การควบคุมโรคขอบใบแห้งมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่และการเกิดโรค ประกอบด้วย การเกษตรกรรม การใช้สารเคมี การควบคุมโดยชีววิธีและการใช้พันธุ์ต้านทาน ซึ่งการใช้พันธุ์ต้านทานนับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค นอกจากนี้อาจลดอุณหภูมิด้วยสารเคมีและควรมีการตรวจสอบต้นกล้าก่อนการย้ายปลูก เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดโรคและการแพร่ระบาดหลังจากย้ายปลูก ไม่ควรระบายน้ำจากแปลงที่เป็นโรคไปสู่แปลงอื่นๆ และไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากในดินที่อุดมสมบูรณ์ (กรมการข้าว, 2552)

## 2. ความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและพืชอาศัยต่างมีวิวัฒนาการร่วมกัน (Co-evolution) ซึ่งเป็นการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดได้ในธรรมชาติ (Chisholm *et al.*, 2006) ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในโครงสร้างประชากรของเชื้อสาเหตุโรค มีผลให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดความ

หลากหลายทางพันธุกรรม โดยที่การกลายพันธุ์ การเคลื่อนย้ายและการเกิด Recombinant ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนภายในประชากร นอกจากนี้การปรับปรุงข้าวพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของเชื้อสาเหตุโรค (Leung *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1995)

ในระยะแรกมีการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวและเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวเพียง 2 ประเทศ คือ ประเทศญี่ปุ่นและฟิลิปปินส์ ซึ่งพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานในประเทศญี่ปุ่นจะต้านทานต่อเชื้อที่มีอยู่ในประเทศญี่ปุ่น เช่นเดียวกับพันธุ์ข้าวในประเทศฟิลิปปินส์จะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคในประเทศฟิลิปปินส์ การใช้พันธุ์ต้านทานและเชื้อสาเหตุโรคในประเทศต่างๆ ก็มีความแตกต่างกันออกไป ทำให้การเปรียบเทียบพันธุ์ต้านทานเหล่านี้เป็นไปได้ยาก จึงทำให้เกิดการพัฒนาพันธุ์ข้าว Near isogenic line (NIL) สำหรับการประเมินโรคขอบใบแห้งของข้าว ซึ่งสายพันธุ์ NIL เป็นสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมเหมือนกันกับพันธุ์อ่อนแอ แต่จะรวมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเข้ามาไว้ด้วย โดยแต่ละพันธุ์จะมียีนต้านทานต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เพียงหนึ่งยีน (กาญจนา, 2544)

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในทวีปเอเชียด้วยเทคโนโลยีดีเอ็นเอ มีดังต่อไปนี้ Adhikari *et al.* (1995) รายงานการใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคจากประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลี มาเลเซีย เนปาล และฟิลิปปินส์ จำนวน 308 สายพันธุ์ (Strains) สามารถจัดแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 5 กลุ่ม (Clusters) โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วยเชื้อจากประเทศจีนและอินโดนีเซีย ในขณะที่เชื้อจากประเทศฟิลิปปินส์จัดอยู่ในกลุ่ม 2 และกลุ่ม 4 ซึ่งเชื้อจากอินโดนีเซียและมาเลเซียจัดอยู่ในกลุ่ม 3 ขณะที่กลุ่ม 5 มีเชื้อจากหลายประเทศ ได้แก่ เนปาล อินเดีย เกาหลี ฟิลิปปินส์ จีน อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ซึ่งในกลุ่ม 5 มีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อที่มาจากหลายประเทศ ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคมีการเคลื่อนย้ายหรืออาจติดไปกับเมล็ดพันธุ์เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืช

Adhikari *et al.* (1999) รายงานความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเก็บเชื้อจาก 8 พื้นที่ในประเทศเนปาล จำนวน 171 สายพันธุ์ (Strains) โดยใช้เทคนิค Repetitive sequence-based-Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ ERIC (ERIC1R/ERIC2R) และ Insertion sequence-PCR (IS-PCR) พบว่าประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศเนปาลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถจัดแบ่งเชื้อได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่ม

ประกอบด้วยจำนวนเชื้อและจำนวน haplotype ดังนี้ กลุ่ม 1 มี 35 สายพันธุ์ 7 haplotype กลุ่ม 2 มีเชื้อจำนวน 80 สายพันธุ์ 11 haplotype กลุ่ม 3 มีเชื้อจำนวน 9 สายพันธุ์ 5 haplotype กลุ่ม 4 มีเชื้อจำนวน 39 สายพันธุ์ 5 haplotype และกลุ่ม 5 มีเชื้อจำนวน 8 สายพันธุ์ 3 haplotype ซึ่งเชื้อจากหลายพื้นที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆ มากกว่าหนึ่งกลุ่ม แต่ในกลุ่มหนึ่งๆ ไม่ได้มีเชื้อมาจากทุกพื้นที่ และเมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อที่เก็บจากพันธุ์ข้าวดั้งเดิมและข้าวปรับปรุงพันธุ์ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมคล้ายกันซึ่งเห็นว่าความหลากหลายของพืชอาศัยไม่มีผลต่อความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรค

Kosawang *et al.* (2006) ใช้เทคนิค AFLP ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 30 ไอโซเลต (Isolate) จากพื้นที่ปลูกข้าว 9 จังหวัด จากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 19 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในประชากรเชื้อมากที่สุด คือ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI+A/MseI+C*, *EcoRI+T/MseI+A*, *EcoRI+T/MseI+T*, *EcoRI+G/MseI+G* และ *EcoRI+C/MseI+T* โดยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI+T/MseI+T* ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากที่สุด เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากทั้ง 5 คู่ไพรเมอร์ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่ม (Lineages) เชื้อสาเหตุโรคได้ 6 กลุ่มใหญ่ (A, B, C, D, E และ F) โดยกลุ่ม A เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อจากจังหวัดพิษณุโลกและชัยนาท กลุ่ม B เป็นเชื้อจากจังหวัดสุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร พะเยา และแพร่ กลุ่ม C แบ่งได้ 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อย C1 เชื้อสาเหตุโรคจากจังหวัดแพร่และสุโขทัย และกลุ่มย่อย C2 เชื้อสาเหตุโรคจากจังหวัดแพร่ กลุ่ม D เชื้อจากจังหวัดแพร่ เชียงใหม่ และเชียงราย กลุ่ม E ประกอบด้วยเชื้อจากจังหวัดสุโขทัยและจังหวัดพิษณุโลก และกลุ่ม F ประกอบด้วยเชื้อจากจังหวัดลำปาง จะเห็นว่าเชื้อจากทางภาคเหนือของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะเชื้อที่เก็บจากจังหวัดพิษณุโลก แพร่ และสุโขทัย ซึ่งมาจากสถานีวิจัยข้าว พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อที่เก็บจากแปลงเกษตรกร อาจเนื่องจากในสถานีวิจัยข้าวมีความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าวมากกว่าในแปลงเกษตรกรที่มีการปลูกข้าวเพียง 1-2 พันธุ์ นอกจากนี้เชื้ออาจติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถอยู่รอดได้ในเมล็ดพันธุ์ที่ติดเชื้อนานถึง 8 เดือน

Jyufuku *et al.* (2009) รายงานความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเอเชีย ประกอบด้วยเชื้อจากประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย ไต้หวัน และฟิลิปปินส์ โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ PCR-RFLP ในการจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรค จำนวน 44 สายพันธุ์ (Strains) โดยมีเชื้อจาก

ประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 13 สายพันธุ์ จัดอยู่ร่วมกับเชื้อจากประเทศฟิลิปปินส์ ขณะที่อีก 8 สายพันธุ์จัดอยู่ร่วมกับสายพันธุ์เชื้อที่มาจากประเทศอื่นๆ คือ อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และได้หวัน

สุธิดา และคณะ (2553) ศึกษา ยีน *avr* (avirulence gene) เพื่อจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 80 ไอโซเลต จากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 12 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดหนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น สกลนคร นครพนม ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ โยธาธร สุรินทร์ อำนาจเจริญ มุกดาหาร และอุบลราชธานี พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อที่ระดับความเหมือน  $\geq 0.50$  ได้ 19 กลุ่ม ซึ่งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยกลุ่ม 1 เป็นกลุ่มใหญ่ มีจำนวนไอโซเลต คิดเป็น 25% (22) ของไอโซเลตทั้งหมด กลุ่มใหญ่รองลงมามีจำนวนประชากร 11 ไอโซเลต และมีกลุ่มย่อยอีก 17 กลุ่ม ซึ่งเชื้อที่ทำการศึกษามีการกระจายตัวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งตอนบน ตอนกลาง และตอนล่าง การกระจายตัวของเชื้อสาเหตุโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออาจมีผลจากธรรมชาติของเชื้อที่สามารถแฝงอยู่ในเมล็ดพันธุ์ได้ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแพร่กระจายได้ง่ายและรวดเร็วไปตามน้ำ ดังนั้นเมื่อเกิดน้ำท่วมหรือฝนตกหนักจะทำให้เชื้อกระจายในวงกว้างได้

### 3. โครงสร้างประชากรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร (Population structure) ประกอบด้วย ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรที่มีลักษณะเฉพาะตัว โดยที่ความแปรปรวนดังกล่าวจะเกิดตามเงื่อนไขของเวลาและสถานที่ (Time and space) รวมถึงการเกิดวิวัฒนาการ ซึ่งกระบวนการกลายพันธุ์ (Mutation) การเคลื่อนย้าย (Migration) และการรวมกันของยีน (Recombination) ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ ทำให้เกิดความแปรปรวนภายในประชากร (Leach *et al.*, 1995) นอกจากนี้โครงสร้างประชากรของพืชอาศัยมีอิทธิพลต่อโครงสร้างและความหลากหลายของประชากรเชื้อสาเหตุโรค (Marshall, 1977) การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยการใช้ยีนต้านทานเพียงหนึ่งยีน สามารถควบคุมโรคนี้ได้เพียงในระยะแรกๆ เท่านั้น ในระยะต่อมาเมื่อมีการใช้พันธุ์ข้าวกันอย่างแพร่หลายและต่อเนื่อง อาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคมีการปรับตัวและเกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 1970 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Xa4* ให้ต้านทานต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศฟิลิปปินส์ แต่พบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Xa4* อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคนี้นภายในระยะเวลา 5 ปี (Mew *et al.*, 1992)

ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มีการใช้ ลักษณะความแปรปรวนทางฟีโนไทป์ (Phenotypic) และเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) และความรุนแรงต่อพืชอาศัยที่มีถิ่นกำเนิด (Leach *et al.*, 1995) โดยมีการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศจีน เกาหลี อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย และเนปาล ด้วยเทคนิค RFLP พบว่าเชื้อสาเหตุโรคและพืชอาศัยเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ จากการเคลื่อนย้ายและการแพร่กระจาย เพราะในแต่ละประเทศหรือในแต่ละพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวพันธุ์ที่แตกต่างกัน และมีสภาพทางภูมิศาสตร์เป็นตัวขวางกั้นในการแพร่กระจายเชื้อสาเหตุโรค อย่างไรก็ตามเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะเคลื่อนย้ายไปสู่ประเทศต่างๆ ได้ โดยการติดไปกับเมล็ดพันธุ์ เมื่อมีการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ข้าวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ (George *et al.*, 1996)

การศึกษาโครงสร้างประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทยโดยประเมินจากปฏิกิริยาระหว่างพืชกับเชื้อ Eamchit (1982) เปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากประเทศไทยกับเชื้อจากประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าเชื้อจากทั้งสองประเทศมีความแตกต่างกันในการก่อความรุนแรงกับข้าวพันธุ์ทดสอบ และแสงชัย (2552) ได้ประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อจำนวน 90 สายพันธุ์ จากภาคกลางเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยข้าวพันธุ์ทดสอบ NILs จำนวน 9 สายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดโรคขอบใบแห้ง ได้แก่ *Xa3*, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa8*, *Xa10*, *xa13*, *Xa14* และ *Xa21* พบว่าเชื้อในประเทศไทยสามารถจัดกลุ่มเชื้อตามปฏิกิริยาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อสาเหตุโรคได้ 25 กลุ่ม (Pathotype) ซึ่งพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดด้านทานกับเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และพบว่า Pathotype ที่ 19 มีความรุนแรงสูงสุด โดยสามารถเข้าทำลายข้าวที่มีถิ่นต่างๆ แต่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิดด้านทาน *xa5*

Chen *et al.* (2012) รายงานการประเมินโครงสร้างประชากรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 218 ไอโซเลต ในพื้นที่ระหว่างทางใต้และตะวันตกของประเทศจีนด้วยการทดสอบการก่อโรคนข้าวพันธุ์ทดสอบรวมกับการใช้เทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC และเทคนิค IS-PCR ด้วยไพรเมอร์ J3 เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อที่มาจากความสูงของพื้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 150-1,200 เมตร, 1,200-1,800 เมตร และ 1,800-2,600 เมตร จากการประเมินความรุนแรงจากการก่อโรคนข้าวพันธุ์ทดสอบ จำนวน 6 พันธุ์มีถิ่นกำเนิดด้านทาน ได้แก่ *Xa2*, *Xa3*, *xa5*, *xa13*, *Xa14* และ *Xa18* พบว่าการจำแนกเชื้อด้วยข้าวทดสอบสามารถจัดกลุ่มได้ 18 Pathotypes โดย Pathotype ที่ 9 เป็นกลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรครุนแรงกับข้าวทุก

พันธุ์ที่ทดสอบ ส่วน Pathotype ที่ 2 เป็นเชื้อที่เก็บมาจากความสูงระดับ 1,800-2,600 เมตร เกิดโรครุนแรงกับข้าวพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดใน Xa18 เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทาง Pathotype และความรุนแรงในการก่อโรคกับพืชทดสอบ ระหว่างเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่สูงกับพื้นที่ต่ำ พบว่าเชื้อจากพื้นที่สูงมีความหลากหลายทาง Pathotype มาก แต่ความรุนแรงน้อย ขณะที่เชื้อเก็บจากพื้นที่ต่ำมีความหลากหลายทาง Pathotype น้อย แต่มีความรุนแรงมากกว่าเชื้อจากพื้นที่สูง ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจมีผลมาจากปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากสายพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้ คือ Japonica และ Indica พบว่าเชื้อที่แยกจากข้าว Japonica มีความหลากหลายทาง Pathotype สูง แต่ความรุนแรงน้อยกว่า ขณะที่เชื้อแยกจากข้าว Indica มีความหลากหลายทาง Pathotype น้อย แต่มีความรุนแรงมากกว่าเชื้อที่แยกจากข้าว Japonica ส่วนการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep-PCR และ IS-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC และ J3 ตามลำดับ พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 4 กลุ่ม (Lineages) โดยเชื้อที่แยกจากพื้นที่ต่ำจนถึงระดับปานกลาง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อที่มาจากพื้นที่สูง และความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวสายพันธุ์ Indica ยังมากกว่า Japonica

#### 4. เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเทคนิค AFLP คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยาพีซีอาร์ เทคนิค AFLP พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos และได้จดสิทธิบัตรในปี 1993 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจาก การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์ (adapter) เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งที่ตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดยอะแดปเตอร์เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียว (sticky end) เหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้ โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับบริเวณของอะแดปเตอร์ร่วมกับบริเวณของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมาก ไม่สามารถแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีต่างๆ ไป เช่น การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกลงไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือก

จับกับซันดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนซันดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ในทางปฏิบัติ ต้องการให้มีจำนวนซันดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสใน denaturing polyacrylamide gel (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิต เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร การศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และยังมีนำไปใช้ทำแผนที่จีโนม โดยข้อดีของเทคนิคนี้คือ ไม่ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย ในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (Multi-locus) ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมาก สามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ และเทคนิคนี้ยังสามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ (สุรินทร์, 2545)

## 5. โปรแกรมจำลองการทดลอง AFLP (*In Silico* AFLP analysis) ของจีโนมจุลินทรีย์

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค *In Silico* analysis มาใช้ทำการทดลองเสมือนจริงและการคาดคะเนผลการทดลอง โดยอาศัยคอมพิวเตอร์กับฐานข้อมูลลำดับเบสจีโนมของสิ่งมีชีวิตและเชื้อจุลินทรีย์ โดยโปรแกรม *In Silico* AFLP พัฒนาขึ้นโดย Bikandi *et al.* (2004) ซึ่งเป็นโปรแกรมจำลองการทดลองด้วยเทคนิค AFLP ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียที่เก็บอยู่ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผู้ใช้สามารถเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะและกำหนดเบสคัดเลือกในส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองได้ ซึ่งโปรแกรมจะแสดงผลเป็นข้อมูลจำนวนซันดีเอ็นเอ ขนาด และลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอพร้อมทั้งภาพเสมือนจริงของอะครีลาไมด์เจล ช่วยในการวางแผนก่อนการทดลองจริงได้ ซึ่งช่วยประหยัดทั้งเวลาและทรัพยากร

## 6. เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction หรือ rep-PCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยไพรเมอร์เป็นส่วนของ Repetitive sequence ซึ่งในจีโนม

ของเชื้อแบคทีเรียมีชุดลำดับเบสที่ซ้ำๆ (Repetitive DNA sequence) กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีลักษณะอนุรักษ์สูง เช่น Repetitive extragenic palindromic sequence (REP) และ Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) โดยมีลำดับเบสขนาด 35-40 คู่เบส และ 124-127 คู่เบส มีโครงสร้างเป็น Stem-loop (Louws *et al.*, 1994)

REP จากรายงานโดย Versalovic *et al.* (1991) พบ REP ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ eubacteria ซึ่งออกแบบจากดีเอ็นเอตัวตรวจ REPALL โดยใช้ลำดับเบสทางปลายแต่ละข้างของ palindromic sequence ของดีเอ็นเอตัวตรวจจากการศึกษากับแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อ *E. coli* พบว่าไพรเมอร์ REP ของเชื้อ *E. coli* ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะ (strain-specific) ในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ส่วนไพรเมอร์ ERIC หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Intergenic repeat unit (IRUs) พบใน *E. coli* และ *S. typhimurium* เช่นเดียวกับ REP ซึ่ง ERIC มีการแพร่กระจายทั่วไปในบริเวณที่มีการถอดรหัส (transcribed region) (Wilson and Sharp, 2006) โดยไพรเมอร์ ERIC ออกแบบจากส่วนนิวคลีโอไทด์ ERICALL ซึ่งอยู่ในส่วนกลางของลำดับเบสซ้ำๆ ที่มีการอนุรักษ์ (core inverted repeat) ไพรเมอร์ ERIC (ERIC1R และ ERIC2) ออกแบบมาจากลำดับเบสแต่ละข้างของ Core inverted repeat (Versalovic *et al.*, 1991)

หลักการของ rep-PCR คือ การสังเคราะห์ oligonucleotide primer ที่เข้าคู่กันกับ repetitive element (rep-element) ในแบคทีเรีย เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับการใช้ปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP, ERIC และ BOX เท่านั้น (ตำแหน่งต่างๆ ของ repetitive elements ซึ่งกระจายรอบจีโนมของแบคทีเรียจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์) ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า REP-PCR, ERIC-PCR และ BOX-PCR ตามลำดับ โดยเรียกรวมกันว่า rep-PCR และผลที่ได้จากปฏิกิริยานี้คือผลผลิตที่จำเพาะดีเอ็นเอ (PCR products หรือ amplification products) ที่มีขนาดของชิ้นส่วน โมเลกุลดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนจีโนมที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ เมื่อนำผลผลิตที่จำเพาะดีเอ็นเอมาแยกขนาดของโมเลกุลผ่านอะกาโรสเจล โดยใช้ปฏิกิริยา electrophoresis จะได้ rep-PCR genomic fingerprinting patterns คล้ายกับบาร์โค้ด (barcode) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์เฉพาะตัวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นันทิยา, 2551)

จากคุณสมบัติของไพรเมอร์ REP (REP1R และ REP2) กับไพรเมอร์ ERIC (ERIC2 และ ERIC1R) (Versalovic *et al.*, 1991) ได้มีการนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสายพันธุ์ และ pathovar ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Xanthomonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ด้วยไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้ในระดับ Pathovar และสายพันธุ์ (Strain) เช่นเดียวกับเทคนิคโมเลกุลอื่นๆ (Louws *et al.*, 1994) จากรายงานของ Vera Cruz *et al.* (1996) ได้ศึกษาความผันแปรของ Haplotype ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 155 สายพันธุ์ ในประเทศฟิลิปปินส์ ด้วยเทคนิค rep-PCR และเทคนิค RFLP โดยเทคนิค rep-PCR ใช้ไพรเมอร์ REP และ ERIC พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 2 กลุ่ม และการจัดกลุ่มจากทั้งสองเทคนิคได้ผลที่สอดคล้องกัน ในขณะที่ rep-PCR มีข้อดีเหนือกว่าเทคนิค RFLP ในการศึกษาเชื้อจำนวนมากๆ เนื่องจากความสะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย

วารภรณ์ (2554) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย จำนวน 231 สายพันธุ์ จากพื้นที่ 9 จังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดอ่างทอง สุพรรณบุรี นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา สระบุรี ชัยนาท สมุทรปราการ และนครศรีธรรมราช โดยใช้เทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX, ERIC และ REP จัดแบ่งเชื้อที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.54, 0.64 และ 0.63 ตามลำดับ แต่ละไพรเมอร์จัดแบ่งเชื้อได้ 2 กลุ่ม โดยไพรเมอร์ BOX ในประชากรเชื้อกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 61 สายพันธุ์ คิดเป็น 26.41% ของประชากรเชื้อทั้งหมด ประกอบด้วยเชื้อจากจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช ปทุมธานี นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา และชัยนาท กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 170 สายพันธุ์ คิดเป็น 73.59% ของประชากรเชื้อทั้งหมด ในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 2A, 2B, 2C, 2D และ 2E ซึ่งในกลุ่มย่อย 2C มีจำนวนประชากรมากที่สุด 82 สายพันธุ์ คิดเป็น 48.28% ของประชากรเชื้อในกลุ่ม 2 โดยกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อจากทุกจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง ในกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ไพรเมอร์ ERIC แบ่งเชื้อได้ 2 กลุ่ม เชื้อในกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 70 สายพันธุ์ คิดเป็น 30.30% ของประชากรเชื้อทั้งหมด และกลุ่มที่ 2 มีเชื้อจำนวน 161 สายพันธุ์ คิดเป็น 69.70% ของจำนวนประชากรเชื้อทั้งหมด แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้แก่ 2A, 2B, 2C, 2D, 2E และ 2F ในกลุ่มย่อย 2A และ 2F มีเชื้อจำนวน 28 และ 46 สายพันธุ์ ตามลำดับ และไพรเมอร์ REP แบ่งเชื้อได้ 2 กลุ่ม ในกลุ่ม 1 มีเชื้อจำนวน 30 สายพันธุ์ คิดเป็น 12.98% ของประชากรเชื้อทั้งหมด ซึ่งเป็นเชื้อมาจากจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี ชัยนาท อ่างทอง สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา และจากกรมวิชาการเกษตร 1 สายพันธุ์ กลุ่ม 2 มีเชื้อ

จำนวน 201 สายพันธุ์ คิดเป็น 87.02% ของประชากรเชื้อทั้งหมด ในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 7 กลุ่มย่อย คือ 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F และ 2G ในกลุ่มย่อยเหล่านี้เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม 2D และ 2G ในกลุ่ม 2D มีจำนวน 61 สายพันธุ์ คิดเป็น 30.35% ของประชากรเชื้อในกลุ่ม 2 ซึ่งเป็นเชื้อที่มาจากจังหวัด ปทุมธานี อ่างทอง สุพรรณบุรี ชัยนาท สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา นนทบุรี และ นครศรีธรรมราช กลุ่ม 2G มีเชื้อจำนวน 43 สายพันธุ์ คิดเป็น 22.39% ของเชื้อทั้งหมดในกลุ่ม 2 ผลการใช้ไพรเมอร์ REP พบว่าสายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลายและมีความใกล้เคียงของเชื้อในกลุ่มค่อนข้างสูง

## 7. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์จัดกลุ่มข้อมูล และตัวอย่าง (Cluster analysis) เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกแบ่งข้อมูล หรือ ตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อยตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป กลุ่มที่แบ่งออกจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลหรือ ตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะที่คล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กันมาก ขณะที่ข้อมูลหรือ ตัวอย่างที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่ต่างกันหรือมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กัน ข้อมูลที่เป็นการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษา ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP สามารถนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธีการต่าง ดังนี้ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ [สวทช], 2544)

### 7.1 การจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่าง

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มมี 3 วิธี ได้แก่ Distance function, Maximum likelihood และ Maximum parsimony โดย Distance function หรือวิธี UPGMA เป็นการคำนวณหาระยะห่างจากตัวอย่างที่ต้องการจัดกลุ่ม ไปยังค่ากลางของกลุ่ม ถ้าระยะห่างของตัวอย่งนั้นห่างจากค่ากลางของกลุ่มใดต่ำที่สุดสามารถจัดตัวอย่งนั้นให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (สวทช, 2544)

วิธีการทั้ง 3 นี้ นำไปใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลแตกต่างกัน โดยการจัดกลุ่ม และแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาเป็นการประเมิน (Estimate) ความสัมพันธ์หรือประวัติวิวัฒนาการ (Evolutionary relationship) แสดงในรูปแบบไฟโลจีนติกทรี

(Phylogenetic tree) หรือไฟโลแกรมแบบต่างๆ โดยมี 2 แนวทางในการศึกษา ได้แก่ Cladistic และ Similarity โดย Cladistic เป็นการศึกษาเน้นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างอิงถึงบรรพบุรุษร่วม (ancestor) ภาพที่ใช้ในการแสดงนั้นเรียก Cladogram ขณะที่ไฟโลแกรมที่ใช้แนวทาง Similarity หรือ Distance เป็นการประเมินความสัมพันธ์กันของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาโดยอาศัยความสัมพันธ์ (Correlation) และความน่าจะเป็น (Probability) ในการจัดกลุ่ม โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Distance function ที่จะคำนวณความเหมือน (Similarity) หรือความต่าง (Distance) ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่มีค่าความเหมือนกันมากที่สุดหรือมีค่าความต่างน้อยที่สุดจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่ตัวอย่างที่มีค่าความเหมือนกันน้อยหรือมีค่าความต่างกันมากจะจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน วิธีการ Similarity หรือ Distance สามารถบอกได้ว่าสิ่งมีชีวิตที่ศึกษามีความเหมือนหรือแตกต่างกันมากหรือน้อย แต่ไม่สามารถอ้างอิงเป็นวิวัฒนาการได้ เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกนั้นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นลักษณะที่มีการถ่ายทอดจากบรรพบุรุษร่วม (Homologous) หรือเป็นลักษณะวิวัฒนาการที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับบรรพบุรุษร่วม (Homoplasy) ภาพที่ใช้แสดงความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มแบบนี้เรียก Dendrogram ข้อมูลที่ใช้ในการจัดกลุ่มแบบนี้ เช่น ผลผลิตต่อพื้นที่ จำนวนรวงต่อพื้นที่ ความสูงต้น ลักษณะต้านทานต่อโรคหรือแมลง และข้อมูลลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากเทคนิคต่างๆ เช่น RAPD, AFLP หรือ RFLP เป็นต้น (สวทช, 2544)

## 7.2 การตรวจสอบความถูกต้องของเดนโดแกรม (Dendrogram)

วิธีการที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของเดนโดแกรมที่สร้างได้ ได้แก่

7.2.1 Cophenetic Correlation หรือค่า  $r$  เป็นค่าที่บอกถึงการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใด ซึ่งดูได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวณค่า  $r$  ถ้าหากมีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก ถ้าค่า  $r$  มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ดี ส่วนค่า  $r$  มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง แต่ถ้าหากค่า  $r$  น้อยกว่า 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ไม่ดี (สวทช, 2544)

7.2.2 Bootstrap เป็นค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดได้ว่ามีมากน้อยเท่าไร โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิม เมื่อมีการสุ่มตัวแปร (Variable) ใดตัวแปร

หนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า Bootstrap มากแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า Bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดียวไม่สามารถคำนวณเป็นค่า Bootstrap ได้ (สวทช, 2544)

### 7.3 วิธีการสำหรับใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี Principal Components Analysis (PCA)

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis) เป็นวิธีการทางสถิติ วิธีการหนึ่งใช้วิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร (Multivariate data) ซึ่งทำให้เห็นว่าข้อมูลอยู่ในรูปหลายมิติ (Dimension) การจะอธิบายข้อมูลโดยรวมทำได้ยาก การลดมิติของข้อมูลให้สามารถอธิบายได้โดยจำนวนน้อยมิติจึงเป็นสิ่งจำเป็น แต่การลดมิตินั้นจะต้องสามารถคงรายละเอียดของข้อมูลโดยส่วนใหญ่ไว้ได้หรือมีข้อมูลหายไปพร้อมกับการลดมิติน้อย ดังนั้น PCA จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนตัวแปร โดยยังคงรักษาความแปรปรวนของข้อมูล และนำตัวแปรมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และอธิบายการกระจายของข้อมูล และโครงสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดยใช้องค์ประกอบหลักที่อยู่ในรูป Linear combination ของตัวแปรเดิม หากจำนวนแกนองค์ประกอบหลักที่คำนวณได้มีน้อยกว่าจำนวนตัวแปรเดิม แต่สามารถอธิบายความผันแปรของข้อมูลส่วนใหญ่ไว้ได้เกือบเท่ากับตัวแปรเดิมทั้งหมด อาจใช้องค์ประกอบหลักจำนวนน้อยแกนนั้นแทนตัวแปรเดิมได้ โดยจำนวนมิติข้อมูลจะลดลงเหลือเท่ากับจำนวนแกนองค์ประกอบหลักนั้นๆ นอกจากนี้ PCA ยังช่วยให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรได้ดีขึ้น (อนุชา, 2551)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

#### 1.1 การเก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งของข้าว

เก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้ง ดังนี้ ใบข้าวเกิดจุดดำน้ำ สีเทาหรือสีเขียวที่บริเวณปลายใบและขอบใบ ใบข้าวมีสีเหลืองแก้มขอบใบหัก แผลขยายทั้งด้านกว้างและยาวของใบข้าว เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกข้าวในประเทศไทยจำนวน 28 จังหวัด (ภาพที่ 1) ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม นครนายก กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ราชบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว อุตรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ และพัทลุง ทำการบันทึกข้อมูลพันธุ์ข้าว และสถานที่เก็บ ปีที่เก็บ

#### 1.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

นำใบข้าวที่แสดงอาการของโรคล้างผ่านน้ำไหล นำมาตัดเป็นชิ้นขนาด 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย 5% แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (Calcium hypochlorite;  $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไหลออกจากแผลบนใบข้าว จากนั้นใช้รูปและน้ำแช่ใบข้าว นำมา Cross streak บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน (วิชัย, 2549) คัดเลือกโคโคโคนีที่มีลักษณะมันเยิ้ม ขอบเรียบ กลมมน สีเหลืองฟางข้าวหรือสีเหลืองน้ำผึ้ง ใส่ในหลอดที่มีน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้โคโคโคนีเชื้อแบคทีเรียกระจายเป็นสารแขวนลอย จึงนำมา Cross streak บนอาหาร NA ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในสารละลาย 20% glycerol เก็บที่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อในการทดสอบต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย

## 2. การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

2.1 การจำแนกเชื้อ โดยการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ ตามวิธีการของ วิชัย (2549)

### 2.1.1 การทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม (Gram's stain Reaction)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เชื้อเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง นำมากระจายลงบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่น 1-2 หยด ทิ้งให้แห้ง แล้วตรึงเซลล์แบคทีเรียให้ติดกับสไลด์ด้วยความร้อน โดยผ่านสไลด์ผ่านบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง อย่างช้าๆ หยดสารละลาย Crystal violet แช่ไว้ 1 นาที ล้างสีอย่างเบาๆ ด้วยน้ำไหล หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมและทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ชับให้แห้ง แล้วล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นล้างออกด้วยน้ำสะอาด ชับให้แห้ง ย้อมทับด้วย Safanin-O เป็นเวลา 30 วินาที ล้างผ่านน้ำไหลปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 2.1.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase Production)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เมื่อเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนสไลด์ 1-2 หยด จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ กระจายบนสารละลายสังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผล ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ catalase จะเกิดฟองอากาศในสารละลายที่ทดสอบ

### 2.1.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase Production)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เมื่อเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ทดสอบด้วยกระดาษทดสอบ Microbiology Bactident<sup>®</sup> Oxidase (Merck, Darmstadt, Germany) โดยแตะเชื้อเพียงเล็กน้อยลงบนกระดาษทดสอบ บันทึกผล หากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ oxidase จะเกิดสีม่วงบนกระดาษทดสอบภายใน 10 วินาที ถ้าหากมีการสร้างเอนไซม์เพียงเล็กน้อย การเกิดสีจะช้า (เกิดภายใน 1 นาที) หากไม่มีสีหรือใช้เวลานานกว่า 1 นาที ในการเกิดสี ถือว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์นี้

#### 2.1.4 การทดสอบการสร้างไนไตรท์ (Nitrite Production)

นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง ย้ายเชื้อ 1 หลูป ลงในอาหาร Nitrite semi-solid หลอมที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วใช้ฝามือหมุนหลอดผสมเชื้อกับอาหารให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมสารทดสอบ Sulfanilic acid และ Dimethyl alpha naphthylamine อย่างละ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้สารเข้ากับอาหารจนเป็นเนื้อเดียวกัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงการเกิดสีในอาหาร บันทึกรูปผล ถ้าเกิดสีแดงอิฐ แสดงว่ามีการเปลี่ยนไนเตรท (Nitrate;  $\text{NO}_3$ ) เป็นไนไตรท์ (Nitrite;  $\text{NO}_2$ ) ถ้าไม่เกิดสีให้เติม Zinc powder ลงไปเพียงเล็กน้อย ถ้ามีสีแดงอิฐเกิดขึ้นแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ หากไม่มีสีเกิดขึ้นแสดงว่าเกิดการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์

#### 2.1.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch Hydrolysis)

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง จดลงบนอาหาร Starch agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับ Gram's Iodine โดยเทให้ท่วมอาหารในจาน สังเกตการเกิดบริเวณใส ถ้าเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบรอยที่เชื้อเจริญ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียใช้แป้งได้ ถ้าไม่มีบริเวณใส แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งได้

#### 2.1.6 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จาก L-Cysteine (Hydrogen sulfide Production)

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเหลว Cysteine medium ในหลอดทดสอบฝาเกลียว ที่มีแถบกระดาษกรองที่มีสาร 5% Lead acetate วางที่ปากหลอดแล้วจึงปิดฝา ปล่อยให้แถบกระดาษกรองสัมผัสกับอาหาร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีบนกระดาษกรอง บันทึกรูปผล ถ้ามีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide;  $\text{H}_2\text{S}$ ) จะทำให้กระดาษกรองสีขาวเปลี่ยนเป็นสีดำของ Lead sulfide การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จากสารประกอบอินทรีย์ของกำมะถัน โดยแบคทีเรีย

### 2.1.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (Lipolytic Activity)

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา Streak บนอาหาร Tween-80 agar ปุ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารบริเวณรอบๆ รอยที่เชื้อเจริญ ถ้าเกิดผลึกสีขาวทึบแสงกระจายตามรอยที่เชื้อเจริญ แสดงว่าเชื้อมีกิจกรรมของ Lipolytic activity เปลี่ยน Tween-80 เป็นผลึกสีขาวของสบู่ (Soap bubble)

### 2.1.8 การทดสอบความสามารถในการย่อย Esculin (Esculin Hydrolysis)

นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหาร Yeast salt broth (YS) ไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกผล ถ้าเชื้อสามารถไฮโดรไลส Esculin ได้ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และจะไม่เรืองแสงเมื่อนำไปส่องดูใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

### 2.1.9 การทดสอบการเจริญภายใต้สภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Oxygen Relationship)

นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง นำมา Stab inoculate ในอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) หลอมเหลวที่ 45 องศาเซลเซียส หลอดละหนึ่งเชื้อ เขย่าให้เชื้อผสมกับอาหาร โดยอย่าให้เกิดฟอง เสร็จแล้วนำไปใส่ในอ่างน้ำเย็น เมื่ออาหารแข็งจึงนำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 วัน บันทึกผล การเจริญเติบโตถ้าเชื้อเจริญเฉพาะผิวหน้าอาหารจัดเป็น Aerobe bacteria หากเชื้อเจริญที่ก้นหลอดจัดเป็น Anaerobe bacteria ถ้าเจริญจากผิวหน้าลงมากลางหลอดเป็น Facultative anaerobe bacteria และถ้าเจริญใต้ผิวหน้าอาหารลงมาเล็กน้อยเป็น Microaerophilic

### 2.1.10 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชือบนอาหารชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ทดสอบกับอาหารชนิดต่างๆ ดังนี้ การสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B agar, SX-agar, NA ที่เติม 0.1% Triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) การทดสอบการทนเกลือ (Salt tolerance) บนอาหาร NA ที่เติม 5% NaCl และ

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Yeast extract dextrose calcium carbonate (YDC) และ Wakimoto's medium

## 2.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

### 2.2.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียและพืชทดลอง

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียเจือจางในน้ำกลั่นหนึ่งมาเจือจนเป็นสารแขวนลอย วัดค่าการส่องผ่านแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic<sup>®</sup>, Instruments Inc., USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรปรับให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 เพื่อใช้ปลูกเชื้อต่อไป

เตรียมต้นข้าวสำหรับปลูกทดสอบเชื้อ โดยนำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง แช่น้ำข้ามคืน แล้วนำไปเพาะในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษทิชชูชุ่มน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ย้ายต้นกล้าปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 15 x 40 เซนติเมตร โดยปลูก 2 แถวๆ ละ 20 ต้น รดน้ำให้ชุ่ม เป็นเวลา 7 วันหลังจากปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ปลูกเชื้อหลังจากย้ายกล้าข้าว 1 เดือน

### 2.2.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในเรือนทดลอง

นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย (O.D. เท่ากับ 0.2) ปลูกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Clipping method (Kauffmam *et al.*, 1973) โดยใช้กรรไกรที่เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วฉีดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่หนึ่งมาเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรจุ่มในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียตัดที่ปลายใบข้าวทุกใบทำเช่นเดียวกันในทุกไอโซเลท โดยให้เชื้อแบคทีเรียหนึ่งไอโซเลทต่อข้าวหนึ่งกระถาง ในชุดควบคุมลบใช้น้ำหนึ่งมาเชื้อแทนสารแขวนลอยเชื้อและชุดควบคุมบวกใช้สารแขวนลอยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* บันทึกผลการเกิดโรค 14 วันหลังจากปลูกเชื้อ

### 3. การตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย ใส่ในหลอดทดลอง ขนาดเล็กที่มีน้ำปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เชื้อแบคทีเรียกระจายในน้ำ นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใช้สารแขวนลอยเชื้อที่ต้ม 2 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร รวม 20 ไมโครลิตร โดยมีองค์ประกอบอื่นๆ ดังนี้ 1X PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรมเมอร์ XOR-F (5'-GCATGACGTCATCGTCCTGT-3') และ XOR-R2 (5'-CTCGGAGCTATATGCCGTGC-3') (Naoto and Takashi, 2000) ชนิดละ 0.24 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase<sup>®</sup> (Promega, Madison, USA) 0.1 ยูนิต นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Biometra<sup>®</sup>, Göttingen, Germany) โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึงขั้นตอน Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ด้วย agarose 1.0% ใน 0.5X TBE buffer เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (FastRuler<sup>™</sup> DNA Ladder, Middle Range, Fermentas) 200 นาโนกรัม ใช้ความต่างศักย์ คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำ Agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV-Transilluminator (Vilber Lourmat<sup>®</sup>, Germany)

### 4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

#### 4.1. การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วย *In Silico* AFLP-PCR

นำข้อมูลลำดับเบสของจีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR (<http://inSilico.ehu.es>) เลือกกำหนดคู่เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 คู่เบส จำนวน 10 คู่เอนไซม์ ดังนี้ *EcoRI/MseI*, *EcoRI/TaqI*, *BgIII/MseI*, *BgIII/TaqI*, *ApaI/MseI*, *ApaI/TaqI*, *HindIII/MseI*, *HindIII/TaqI*, *PstI/MseI* และ *PstI/TaqI* โดยคู่ไพรมเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรหัสเบส คือ A, C, G, T และ 0 (ไม่เติมเบสใดๆ) ที่บริเวณปลาย 3' จากนั้นเลือกผลการ

ทดลองที่มีคู่เอนไซม์และคู่อิทธิฤทธิ์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ นำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการต่อไป

#### 4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP

##### 4.2.1 การเตรียมจีโนมดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ CTAB method นำเชื้อแบคทีเรียปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนและเทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นเดิมจำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดปริมาณสาร Polysaccharide ของเชื้อแบคทีเรีย เก็บตะกอนและละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งเป็นหลอดละ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ RNase ชนิดละ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ บ่มในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม NaCl 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำมาเติม CTAB 10% / NaCl 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (PCI; 25:24:1), pH 8.0 เติมในปริมาณที่เท่ากับของเหลวที่ได้ผสมให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,727x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาณที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยง 9,727x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนด้วย Ethanol 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 3 นาที ที่ส่วนที่เป็นของเหลวและตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Ausubel *et al.*, 1999)

##### 4.2.2 การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จำนวน 150 นาโนกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 5 ยูนิต และ *MseI* 1.25 ยูนิต (FastDigest® Fermentas, Maryland, USA) ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นต่อขึ้นดีเอ็นเอด้วย *EcoRI*-adaptor และ *MseI*-adaptor

(ตารางที่ 1) ชนิดละ 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร และ 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ATP 1 มิลลิโมลลาร์ และใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase 1.2 ยูนิต ใน 1X T4 ligase buffer (10x ligase buffer 2 ไมโครลิตร, 0.5M NaCl 2 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 1.0 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้จโนมิกที่ตัดและเชื่อมต่อกับ adapter ปริมาตร 2 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์จากการทดลองในโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR ได้แก่ *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+0/*MseI*+T, *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+C, *EcoRI*+G/*MseI*+G และ *EcoRI*+0/*MseI*+0 โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* ชนิดละ 0.1 ไมโครโมลลาร์ และไพรเมอร์ *MseI* ชนิดละ 0.1 ไมโครโมลลาร์ ทำปฏิกิริยาใน 1X PCR buffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลลาร์  $MgCl_2$  0.75 มิลลิโมลลาร์ และ *Taq* DNA polymerase<sup>®</sup> (Promega) 0.5 ยูนิต ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตรโดยโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Pre denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึง Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.2.3 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining

นำผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis 5% ประกอบด้วย acrylamide 30% (acrylamide: bisacrylamide อัตราส่วน 19:1 ใน ยูเรีย 7.5 โมลลาร์) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, 5X TBE ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, ยูเรีย 18 กรัม, น้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, Ammonium persulfate (APS) 10% ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ประกอบกระฉากเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Life Technologies/Gibco BRL Model S2) ขนาด 33 x 40 ตารางเซนติเมตร เต็มบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบน 400 มิลลิลิตร และด้านล่าง 600 มิลลิลิตร ทำ Prerun ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา

30 นาที หรือจนกว่าอุณหภูมิสูงถึง 55-58 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์หยดดีเอ็นเอตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องเปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีของ Xylene cyanol เคลื่อนที่ลงมา 2 ใน 3 ส่วนของเจล ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า คูบ์เฟอ์ร้อออกและแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน

ตารางที่ 1 อะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ	ลำดับเบส	ที่มา
<i>EcoRI</i> -adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	Vos <i>et al.</i> , 1999
<i>MseI</i> -adaptor	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'	Vos <i>et al.</i> , 1999
<i>EcoRI</i> +0	5'-GACTGCGTACC-3'	Vos <i>et al.</i> , 1999
<i>MseI</i> +0	5'-GATGAGTCCTGAG-3'	Vos <i>et al.</i> , 1999
<i>EcoRI</i> +A	5'-GACTGCGTACCA <sup>1</sup> -3'	งานวิจัยนี้
<i>EcoRI</i> +C	5'-GACTGCGTACCC-3'	งานวิจัยนี้
<i>EcoRI</i> +G	5'-GACTGCGTACCG-3'	งานวิจัยนี้
<i>MseI</i> +A	5'-GATGAGTCCTGAGA-3'	งานวิจัยนี้
<i>MseI</i> +C	5'-GATGAGTCCTGAGC-3'	งานวิจัยนี้
<i>MseI</i> +T	5'-GATGAGTCCTGAGT-3'	งานวิจัยนี้
<i>MseI</i> +G	5'-GATGAGTCCTGAGG-3'	งานวิจัยนี้

หมายเหตุ <sup>1</sup> ชนิดเบสคัดเลือกรที่เพิ่มบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์

ข้อมกระจกด้วยวิธี Silver staining นำกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย Fixative เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างด้วยน้ำ Deionization (DI) 2 ครั้ง ครั้งแรกเป็นเวลา 30 นาที และครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ DI อย่างรวดเร็ว เพื่อล้างซิลเวอร์ที่มากเกินไป แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย Developer เขย่าเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10% Acetic acid ล้างด้วยน้ำกลั่นและตากให้แห้งเพื่อ

นำไปวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจากสุรินทร์, 2545) นำคู่ไพรเมอร์และคู่เอนไซม์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphysm) มากที่สุด นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ต่อไป

#### 4.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค rep-PCR

ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction หรือ rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ REP คือ REP1R-I; 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' และ REP2R-I; 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' (Louws *et al.*, 1994) และไพรเมอร์ ERIC ได้แก่ ERIC1R; 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATT CAC-3' และ ERIC2R; 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (Versalovic *et al.*, 1991)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1X PCR buffer, dNTP 625 ไมโครโมลลาร์, MgCl<sub>2</sub> 1 มิลลิโมลลาร์, Taq DNA polymerase® (Promega) 2 ยูนิต, ไพรเมอร์ REP (REP1R-I และ REP2R-I) ชนิดละ 2 ไมโครโมลลาร์ และดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาใน 1 รอบ ดังนี้ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing สำหรับไพรเมอร์ REP เป็น 45 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ ERIC เป็น 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึง Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Vera Cruze *et al.*, 1996) ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เบื้องต้นด้วย 1.1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE โดยนำดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งด้วย 5% Acrylamide gel โดยนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ Sequencing dey แยกขนาดบน 5% Acrylamide gel และตรวจสอบด้วยแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver stain ตามข้อ 4.2.3

### 5. การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

#### 5.1 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS

รวบรวมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP และข้อมูลจากไพรเมอร์ REP และ ERIC จากเทคนิค rep-PCR โดยให้ข้อมูลเป็นแบบ Binary data คือ มีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้คะแนนเป็น “1” หากไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนนเป็น “0” แล้วจึงนำผลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) version 2.01d (Serial number, EY2489QP, Applied Biostatistics, Inc.) (Rohlf, 1998)

### 5.1.1 การเตรียมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์

เตรียมข้อมูลที่ได้จากการประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอในโปรแกรม Excel ในแนวสดมภ์ (Column) โดยช่อง A1 ใส่ตัวเลข 1 เพื่อบอกลักษณะของข้อมูล (Type of matrix) ซึ่งหมายเลข 1 คือข้อมูลจัดรูปแบบเป็น Rectangular data matrix ส่วนช่อง B1 ระบุจำนวนตัวอย่างในแถว (Rows) ช่อง C1 ให้ระบุจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายในแนวสดมภ์และช่อง D1 เป็นช่องที่ระบุว่าข้อมูลสูญหายหรือไม่ ซึ่งหมายเลข 0 คือ ไม่มีข้อมูลสูญหายและหมายเลข 1 คือ มีข้อมูลสูญหายเว้นหนึ่งแถวในแนวนอน เริ่มป้อนข้อมูลชื่อไอโซเลทชื่อในแนวสดมภ์ เริ่มตั้งแต่ช่อง A3 ของไอโซเลทแรก ช่อง A4 เป็นไอโซเลทที่สอง ช่อง A5 เป็นไอโซเลทที่สาม จนครบทุกไอโซเลท และป้อนข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายของไอโซเลทแรกในแนวนอน เริ่มตั้งแต่ช่อง B3, C3, D3.... เป็นต้นไป ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายของไอโซเลทที่สอง เริ่มตั้งแต่ช่อง B4, C4, D4.... เป็นต้นไปจนครบทุกไอโซเลท จากนั้นบันทึกไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์ในนามสกุล .xls

### 5.1.2 การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS version 2.01d คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของเชื้อสาเหตุโรคแล้วนำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบไฟโลจีนติกทรีด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Averages) การสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบไฟโลจี-เนติกทรีโดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Distance function ที่จะคำนวณความต่าง (Distance) ของตัวอย่าง

ย้ายข้อมูลในโปรแกรม Excel ที่มีนามสกุล .xls ตามวิธีการเตรียมข้อมูลในข้อ

5.1.1 เมื่อเข้าสู่โปรแกรม NTSYS version 2.01d โดยเข้าโปรแกรมย่อย NT edit เลือก File/Import Excel จากนั้นเลือกไฟล์ที่ต้องการ บันทึกข้อมูล file/save file as ซึ่งไฟล์ที่ได้จะมีนามสกุลเป็น .nts นำไฟล์ข้อมูลที่ได้จาก NT edit สร้างแผนโคโรแกรมโดยเข้าโปรแกรมย่อย Similarity วิเคราะห์หาค่า Similarity โดยเลือกโปรแกรม NTSYS version 2.01d และเข้าโปรแกรมย่อย SimQual (similarity for qualitative data) ใช้ในการคำนวณหาค่า Similarity ของข้อมูลที่เป็นลักษณะคุณภาพหรือเป็นมาตรวัดแบบ Nominal scale เช่น ข้อมูลที่เป็นการปรากฏของแถบสีเอ็นเอบนเจล หากมีแถบสีเอ็นเออ่านค่าเป็น 1 ถ้าไม่มีแถบสีเอ็นเออ่านค่าเป็น 0 ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้สัมประสิทธิ์ Dice's coefficient บันทึกไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่า Similarity โดยมีสมการดังนี้ (สวทช, 2544)

$$\text{Dice's coefficient: } \frac{2a}{(2a+b+c)}$$

โดยที่  $a, b$  และ  $c$  คือ ค่าเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่างที่  $i$  และ  $j$

จากนั้นเลือกวิธีการจัดกลุ่มโดยเลือกโปรแกรมย่อย Clustering เข้าโปรแกรมย่อย SHAN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nestedcluster Method) นำไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่า Similarity มาใช้วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยเลือกวิธีการจัดกลุ่ม UPGMA จากนั้นดูผลการจัดกลุ่ม โดยเลือกดู tree ได้ที่ tree plot

### 5.1.3 การวิเคราะห์ Cophenetic Correlation

การคำนวณหาค่า Cophenetic correlation ( $r$ ) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการตรวจสอบแผนโคโรแกรม วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d โดยใช้ข้อมูลจากไฟล์ที่ใช้ในการสร้างแผนโคโรแกรม คือไฟล์ที่ได้จากการคำนวณ Similarity (SimQ) และ Clustering (SHAN) โดยเข้าที่ Clustering เลือกโปรแกรมย่อย Coph เลือกไฟล์ที่ได้จาก SHAN บันทึกไฟล์ที่ได้จากการคำนวณ จากนั้นไปที่ Graphics เลือก MaxCoph นำไฟล์ที่ได้จากการคำนวณค่า Similarity (SimQ) และไฟล์ที่ได้จาก Coph เพื่อคำนวณหา Cophenetic correlation การอ่านค่า Cophenetic correlation ที่ได้ โดยค่า  $r$  มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มใช้ได้

หากมีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ดีปานกลาง และหากค่า  $r$  มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี

#### 5.1.4 การคำนวณค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot

การวิเคราะห์ค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม WinBoot (Yap and Nelson, 1996) การเตรียมข้อมูลในไฟล์ Excel จะแตกต่างจากการเตรียมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ในโปรแกรม NTSYS เล็กน้อย โดยการเตรียมข้อมูลใน Excel ช่อง A1 ระบุจำนวนแถวของข้อมูล เว้น 2 แถว ระบุจำนวนสดมภ์ของข้อมูล การป้อนข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์เริ่มตั้งแต่ช่อง B2 เป็นต้นไป จากนั้นบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .prn (Space delimited) นำเข้าโปรแกรม Winboot เลือกไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีนามสกุล .prn และตั้งชื่อไฟล์สำหรับบันทึก ซึ่งไฟล์จะมีนามสกุล .txt จากนั้นกำหนดค่าสัมประสิทธิ์เลือก Dice's coefficient เช่นเดียวกับที่กำหนดในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม NTSYS เลือกจำนวนครั้งที่ต้องการวิเคราะห์ในช่อง Samples จำนวน 1,000 เพื่อให้โปรแกรมคำนวณค่า Bootstrap

#### 5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) ด้วยโปรแกรม NTSYS

นำข้อมูล Binary data ที่เตรียมใน Excel ตามข้อ 5.1.1 โดย Import ไฟล์ Excel เข้าโปรแกรม NTedit ที่เป็นโปรแกรมย่อยใน NTSYS แปลงไฟล์เป็นนามสกุล .nts หรือจะเลือกใช้ไฟล์ NTedit จากวิธี UPGMA มาวิเคราะห์ก็ได้ จากนั้นเลือกฟังก์ชัน general เข้าโปรแกรมย่อย stand และ Input file ที่ได้จาก NTedit ทำการวิเคราะห์ เพื่อคำนวณค่า Standard บันทึกไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ stand ขึ้นตอนต่อมาเลือกฟังก์ชัน similarity เข้าโปรแกรมย่อย simint และ Input file ที่ได้จาก stand โดยเลือกสัมประสิทธิ์ (coefficient) CORR วิเคราะห์และบันทึกไฟล์ที่ได้จาก simint จากนั้นเลือกฟังก์ชัน Ordination เข้าโปรแกรมย่อย Eigen และ Input file ที่ได้จากการวิเคราะห์ simint วิเคราะห์และบันทึกไฟล์ที่ได้จาก Eigen โดยขั้นตอนนี้ การวิเคราะห์จะคำนวณค่า eigenvector และ eigenvalue บันทึกไฟล์ที่ได้ในนามสกุล .txt และ โปรแกรมจะแสดงภาพ 3 มิติ หมุนแกนภาพ 3 มิติ ตามความเหมาะสม

## ผลและวิจารณ์

### 1. การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

#### 1.1 การเก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งของข้าว

จากการเก็บตัวอย่างโรคขอบใบแห้งของข้าวในระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 จากแหล่งปลูกข้าวจำนวน 28 จังหวัด (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม นครนายก กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ราชบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว อุดรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ และพัทลุง จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ 220 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) จากการเก็บตัวอย่างโรค พบการระบาดของโรคโดยทั่วไป โดยเฉพาะในนาภาคกลางเขตชลประทาน ซึ่งมีการปลูกพันธุ์ข้าวอ่อนแอ กันมาก เช่น พิษณุโลก 2 (ภาพที่ 2ก) อาการโรคที่สังเกตได้สอดคล้องกับรายงานของ Ou (1985) และ Nino-Liu *et al.* (2006) ได้แก่ อาการช้ำน้ำ (water soak) แผลบนใบข้าวมีสีเทาและมีแผลช้ำน้ำ (ภาพที่ 2ข) อาการใบไหม้ (leaf blight) โดยขอบใบข้าวแสดงอาการไหม้ ขอบใบไม่เรียบ แผลขยายทั้งด้านกว้างและด้านยาวของใบข้าว (ภาพที่ 2ค) นอกจากนี้ยังสามารถพบ Bacterial ooze ที่ติดอยู่บนใบข้าว (ภาพที่ 2ง)



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรค (ก) โรคขอบใบแห้งในแปลงนา (ข) อาการช้ำน้ำ (water soak) (ค) อาการขอบใบแห้ง (leaf blight) (ง) Bacterial ooze บนใบ

## 1.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 28 จังหวัด เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหาร NA เป็นเวลา 2-3 วัน คัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีกลมมน สีเหลืองฟางข้าว ผิวหน้าและขอบเรียบ มันวาว เป็นลักษณะของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ou, 1985) ได้จำนวน 105 ไอโซเลท จากแปลงข้าว 50 แปลง ในพื้นที่ 25 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร ชัยนาท นครสวรรค์ อุทัยธานี อ่างทอง สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา นนทบุรี นครปฐม นครนายก กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา อุตรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ และพัทลุง ส่วนอีก 3 จังหวัด ที่ไม่พบเชื้อ คือจังหวัดปทุมธานี ราชบุรี และสระแก้ว เนื่องจากอาการใบไหม้สีแสด เกิดเฉพาะที่ปลายใบข้าว เมื่อแยกเชื้อพบว่าไม่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งต่างจากอาการใบไหม้ที่แยกเชื้อได้ เป็นอาการไหม้จากขอบใบ แผลไหม้เป็นสีฟางข้าว นอกจากนี้ในบางตัวอย่าง ข้าวแสดงอาการขอบใบแห้ง แต่เนื่องจากเกษตรกรได้ฉีดพ่นยากำจัดแบคทีเรีย จึงไม่สามารถแยกเชื้อได้ ส่วนตัวอย่างที่แยกเชื้อได้ สามารถคัดเลือกโคโลนีเชื้อได้จำนวน 105 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) จากพันธุ์ข้าวจำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ พิษณุโลก 2, หอมปทุม, หลวงประทาน, กข6, ขาวดอกมะลิ 105, สุพรรณบุรี 3, กข15, อีโต้, ปิ่นเกษตร, OC6, สุพรรณบุรี, สังข์หยด และข้าวเล็บนก โดยพบโรคในข้าวที่ไม่ทราบพันธุ์ด้วย การให้หมายเลขไอโซเลท ประกอบด้วยตัวอักษร 2 ตัวแรก คือ ชื่อจังหวัด อักษรตัว L (Location) ตามด้วยหมายเลข คือ สถานที่เก็บตัวอย่างตัวเลข คือหมายเลขไอโซเลทเชื้อที่แยกได้ เช่น ไอโซเลท ATL2-1 เป็นเชื้อจากจังหวัดอ่างทอง Location ที่ 2 คือ ตำบลไผดำ อำเภอวิเศษชัยชาญ ไอโซเลทที่ 1 และไอโซเลท ATL4-1 เป็นเชื้อจากจังหวัดอ่างทอง Location ที่ 4 คือ ต.บางจักร อ.วิเศษชัยชาญ ไอโซเลทที่ 1 เป็นต้น (ตารางที่ 3)

## 2. การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

### 2.1 การจำแนกเชื้อโดยการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

จากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกจำนวน 105 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) พบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาด  $1-2 \times 0.8-1 \mu\text{m}$  (ภาพที่ 3ก) และพบว่าเชื้อจำนวน 64 ไอโซเลท ให้ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีทุกลักษณะการทดสอบเหมือนกับสายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo-0019) ที่ได้รับความ

อนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ การทดสอบการติดสีแบบแกรม (Gram's stain) พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ, สร้างเอนไซม์คาตาเลส ในการทดสอบ Catalase test (ภาพที่ 3ข), ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เมื่อทดสอบ Oxidase test (ภาพที่ 3ค), สามารถย่อย Esculin ได้ จากการทดสอบ Esculin hydrolysis (ภาพที่ 3ง), สามารถเจริญได้ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจน ในการทดสอบ Oxygen relationship (ภาพที่ 3จ), ไม่สร้างไนไตรท์จากไนเตรต เมื่อทดสอบ Nitrite production (ภาพที่ 3ฉ), ไม่สามารถย่อยแป้งได้ จากการทดสอบ Starch hydrolysis, สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จาก L-cystein ในการทดสอบ H<sub>2</sub>S production (ภาพที่ 3ช), ย่อยไขมัน Tween-80 จากการทดสอบ Lipolytic activity, ไม่เรืองแสงบนอาหาร King's B medium, SX agar (ภาพที่ 3ซ), ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี NA+0.1% TTC และ NA+5% NaCl แต่สามารถเจริญบนอาหาร YDC และ Wakimoto's medium ได้ ซึ่งลักษณะที่กล่าวมาแล้ว เป็นคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่สอดคล้องกับรายงานของ Ou (1985); Nino-Liu *et al.* (2006) และ EPPO (2007)

ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบจำนวน 41 ไอโซเลท ให้ผลการทดสอบบางลักษณะต่างจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ้างอิง แบ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ จำนวน 23 ไอโซเลท กลุ่มเชื้อที่ไม่สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จาก L-cystein ได้ จำนวน 13 ไอโซเลท และกลุ่มเชื้อที่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส แต่ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จำนวน 3 ไอโซเลท และอีก 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CML4-4 สร้างเอนไซม์ออกซิเดส, ย่อยแป้ง และ Esculin ได้ เจริญบนอาหาร SX แต่ให้โคโลนีสีขาวบนอาหาร YDC และไอโซเลท CHL8-2 มีเพียงการทดสอบ Starch hydrolysis ซึ่งเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ ซึ่งลักษณะความผันแปรของประชากรของเชื้อในการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นนั้น สอดคล้องกับผลการทดสอบของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ตามรายงานของ EPPO (2007) และ Van Den Mooter and Swing (1990)

ส่วนลักษณะของเชื้อที่ทดสอบบนอาหาร YDC และ Wakimoto's medium พบโคโลนีของเชื้อจำนวน 104 ไอโซเลท มีโคโลนีขอบเรียบ กลมมนูน เข้ม สีเหลืองน้ำผึ้ง ซึ่งเชื้อในจินัส *Xanthomonas* sp. จะมีลักษณะโคโลนีดังกล่าวบนอาหาร YDC ในขณะที่เชื้อไอโซเลท CML4-4 ให้ผลต่างจากไอโซเลทเชื้ออื่นๆ เนื่องจากลักษณะโคโลนีบนอาหารมีสีขาว ซึ่งอาจไม่ใช่เชื้อในจินัส *Xanthomonas* sp. ส่วนการเจริญบนอาหาร Wakimoto's medium พบว่าเชื้อทั้ง 104 ไอโซเลท มีโคโลนีขอบเรียบค่อนข้างกลม สีเหลืองนวล และลักษณะเข้มมาก สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อที่รายงานไว้โดย Van Den Mooter and Swing (1990)

## 2.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (Pathogeneticity test)

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 105 ไอโซเลท โดยปลูกเชื้อบนข้าวพันธุ์ KDML105 ด้วยวิธี Clipping method ตามวิธีการ Kauffman *et al.* (1973) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 97 ไอโซเลท ทำให้ต้นข้าวแสดงอาการใบไหม้ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน และเหลืองแห้งตายในที่สุดหลังจากปลูกเชื้อได้ 14 วัน (ภาพที่ 4) และพบว่ามีเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CM L4-4, NW L1-1, NW L1-2, PRL2-1, PRL4-1, CH L8-2, BR L1-1 และ PG L1-1 ไม่ก่อโรครกับข้าวทดสอบ (ตารางที่ 3)

## 2.3 ผลการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

ผลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ การทดสอบความสามารถในการก่อโรครกับพันธุ์ข้าว สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ที่แยกได้ทั้งสิ้น 97 ไอโซเลท โดยมีเชื้อเพียง 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CML4-4, CHL8-2, NWL1-1, NWL1-2, PRL2-1, PRL4-1, BRL1-1 และ PGL1-1 ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีบางประการเท่านั้นที่เหมือนกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ้างอิง แต่เชื้อไอโซเลทเหล่านี้ไม่ก่อโรครบนพันธุ์ข้าวทดสอบ ดังนั้นเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท จึงไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง ซึ่งรวมถึงเชื้อไอโซเลท CHL8-2 ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ OC6 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลการเก็บตัวอย่างข้าวประกอบด้วยจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง ปีที่เก็บ  
จำนวนตัวอย่างที่เก็บและจำนวนไอโซเลทเชื้อที่แยกเชื้อได้

จังหวัด	ปีที่เก็บ	ตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท
1. เชียงราย	2552	14	10
2. เชียงใหม่	2552	23	8
3. ลำปาง	2552	1	1
4. อุตรดิตถ์	2552	1	1
5. สุโขทัย	2551	16	5
6. พิษณุโลก	2551	10	4
7. กำแพงเพชร	2552	4	4
8. พิจิตร	2552	4	2
9. นครสวรรค์	2552	7	4
10. อุทัยธานี	2552	5	4
11. ชัยนาท	2551/ 2552	5	5
12. อ่างทอง	2552	6	4
13. สุพรรณบุรี	2551	3	2
14. พระนครศรีอยุธยา	2552	5	2
15. ปทุมธานี	2552	2	0
16. นนทบุรี	2552	28	6
17. นครนายก	2552	3	1
18. นครปฐม	2552	17	11
19. กรุงเทพมหานคร	2552	1	1
20. กาญจนบุรี	2552	8	2
21. ราชบุรี	2551/ 2552	13	0
22. ปราจีนบุรี	2552	6	4
23. ฉะเชิงเทรา	2552	18	7
24. สระแก้ว	2552	1	0
25. อุครธานี	2552	6	6
26. มหาสารคาม	2552	4	4
27. บุรีรัมย์	2552	6	4
28. พัทลุง	2553	3	3
รวม	-	220	105



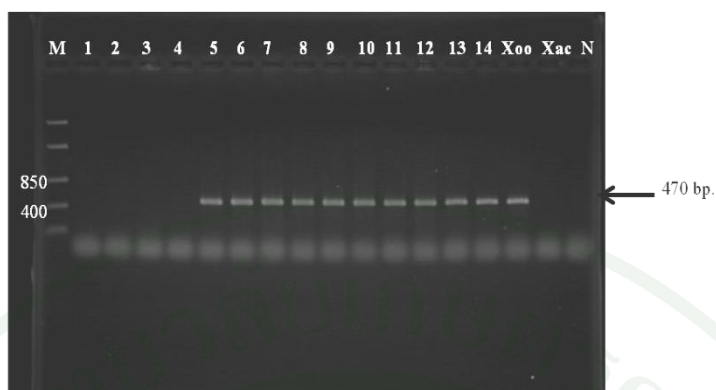
**ภาพที่ 3** การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ (ก) การติดสีแกรม (ข) การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (ค) การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (ง) การย่อย Esculin (จ) การเจริญภายใต้สภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (ฉ) การสร้างไนไตรท์ (ช) การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ซ) การเจริญบน SX-agar (ฌ) การย่อยแป้ง และ (ญ) การเจริญบน Wakimoto's medium



ภาพที่ 4 แสดงผลการทดสอบการเกิดโรค (ก) การปลูกเชื้อด้วยวิธี Clipping method (ข) อาการหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ค) อาการหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน และ (ง) ชุดควบคุมลบ คือ ต้นข้าวปกติที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

### 3. การตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

จากการตรวจเชื้อจำนวน 105 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ XOR-F และ XOR-R2 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 470 คู่เบส ของบริเวณ 16S-23S rDNA spacer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Naoto and Takashi, 2000) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่เรียกคัดเลือกจำนวน 97 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 470 คู่เบส (ภาพที่ 5) เช่นเดียวกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*-0019 ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ในขณะที่มีเชื้อ 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CM L4-4, NW L1-1, NW L1-2, PRL2-1, PRL4-1, CH L8-2, BR L1-1 และ PG L1-1 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 470 คู่เบส



ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แอปติเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S-23S spacer ขนาด 470 คู่เบส (ลูกศรชี้) ช่องที่ 1-14 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าว, Xoo.: *X. oryzae* pv. *oryzae*, Xac.: *X. axonopodis* pv. *citri*, M: Middle range DNA marker (Fermentas, Ontario, Canada), N: น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ





ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	จังหวัด	พันธุ์ข้าว	การเจริญอาหาร															
				Gram's stain <sup>1/</sup>	Catalase test <sup>2/</sup>	Oxidase test <sup>2/</sup>	Nitrite production <sup>2/</sup>	Starch hydrolysis <sup>2/</sup>	H <sub>2</sub> S production <sup>2/</sup>	Lipolytic activity <sup>2/</sup>	Esculin hydrolysis <sup>2/</sup>	Oxygen relationship <sup>2/</sup>	King's B <sup>3/</sup>	SX agar <sup>4/</sup>	NA+ 0.1% TTC <sup>4/</sup>	NA+ 5% NaCl <sup>4/</sup>	YDC <sup>5/</sup>	Wakimoto's <sup>5/</sup>	PCR <sup>6/</sup>
26.	PL L1-3	พิษณุโลก	พิษณุโลก 2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27.	PL L1-4	พิษณุโลก	พิษณุโลก 2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28.	PL L1-5	พิษณุโลก	พิษณุโลก 2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29.	PL L2-1	พิษณุโลก	พิษณุโลก 2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.	KP L1-1	กำแพงเพชร	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31.	KP L1-2	กำแพงเพชร	พิษณุโลก 2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32.	KP L2-1	กำแพงเพชร	พิษณุโลก 2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33.	KP L2-2	กำแพงเพชร	พิษณุโลก 2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34.	PJ L2-1	พิจิตร	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35.	PJ L2-2	พิจิตร	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36.	NW L1-1	นครสวรรค์	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37.	NW L1-2	นครสวรรค์	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38.	NW L3-1	นครสวรรค์	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+







ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	จังหวัด	พันธุ์ข้าว	การเจริญบนอาหาร															
				Gram's stain <sup>1/</sup>	Catalase test <sup>2/</sup>	Oxidase test <sup>2/</sup>	Nitrite production <sup>2/</sup>	Starch hydrolysis <sup>2/</sup>	H <sub>2</sub> S production <sup>2/</sup>	Lipolytic activity <sup>2/</sup>	Esculin hydrolysis <sup>2/</sup>	Oxygen relationship <sup>2/</sup>	King's B <sup>3/</sup>	SX agar <sup>4/</sup>	NA+ 0.1% TTC <sup>4/</sup>	NA+ 5% NaCl <sup>4/</sup>	YDC <sup>5/</sup>	Wakimoto's <sup>5/</sup>	PCR <sup>6/</sup>
78.	PR L1-1	ปราจีนบุรี	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
79.	PR L2-1	ปราจีนบุรี	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80.	PR L4-1	ปราจีนบุรี	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
81.	PR L5-1	ปราจีนบุรี	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
82.	CH L1-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
83.	CH L2-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84.	CH L5-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85.	CH L7-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86.	CH L8-2	ฉะเชิงเทรา	OC6	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87.	CH L9-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88.	CH L11-1	ฉะเชิงเทรา	ไม่ทราบพันธุ์	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89.	UN L1-1	อุดรธานี	กข6	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90.	UN L2-1	อุดรธานี	KDML105	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+





#### 4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

##### 4.1 การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR

จากการวิเคราะห์เอนไซม์และคู่ไพรเมอร์ (ตารางผนวกที่ 1) ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR (Bikandi *et al.*, 2004) โดยอาศัยข้อมูลจีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ KACC10331 จากฐานข้อมูล NCBI และข้อมูลของเอนไซม์ตัดจำเพาะจาก Roberts *et al.* (2003) การทดสอบนี้พบว่าเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* โดยมีไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสคัดเลือกว่าบริเวณปลาย 3' จำนวน 6 คู่ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0, *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+G/*MseI*+G และ *EcoRI*+0/*MseI*+T แต่ละคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 131, 198, 136, 182, 111 และ 183 แถบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่สุด 2,987 bp. จากคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0 และขนาดเล็กสุด 12 bp. จากคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+C จึงนำข้อมูลทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์ที่ได้มาทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีคู่เอนไซม์และคู่ไพรเมอร์อื่นๆ ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งมีจำนวนและขนาดที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนอะครีลาไมด์เจล ดังแสดงในตารางผนวกที่ 2-9 การวิเคราะห์นี้สรุปได้ว่าจำนวนและชนิดของเบสคัดเลือกว่าที่เพิ่มเข้าไปบริเวณปลาย 3' ของคู่ไพรเมอร์ มีผลต่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ สอดคล้องกับการทดสอบของวัฒนิก (2550) ที่ใช้โปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR ในการทดสอบกับแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*

##### 4.2 การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เพื่อหาเอนไซม์และคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยเทคนิค AFLP

นำข้อมูลคู่ไพรเมอร์ที่ได้จาก *In Silico* AFLP-PCR จำนวน 6 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0, *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+G/*MseI*+G และ *EcoRI*+0/*MseI*+T ร่วมกับอีก 2 คู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G โดยนำมาทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 6 ไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งคู่ไพรเมอร์ออกเป็นสามกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรก คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total band) จำนวนมาก ไม่สามารถประเมินได้ด้วยสายตา ได้แก่ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G กลุ่มสอง เป็นกลุ่มคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่สามารถประเมินได้ด้วยสายตา แต่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism band)

น้อย ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+0/*MseI*+T มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 105 แถบ, 105 แถบ และ 102 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเท่ากับ 11 แถบ, 8 แถบ และ 10 แถบ ตามลำดับ และกลุ่มสาม เป็นกลุ่มคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดสามารถประเมินได้ด้วยสายตา และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากที่สุดจากไพรเมอร์ที่ทดสอบ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0 และ *EcoRI*+G/*MseI*+G ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 81 แถบ, 82 แถบ และ 94 แถบ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 18 แถบ 16 แถบ และ 13 แถบ ตามลำดับ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เท่ากับ 22.22%, 19.51% และ 13.82% ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 6 ไอโซเลท ในห้องปฏิบัติการด้วย คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR คือให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า 200 แถบ ซึ่งไม่สามารถประเมินบนอะครีลาไมด์เจลได้ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+G/*MseI*+G สอดคล้องกับรายงานของ Kosawang *et al.* (2006) ที่ใช้คู่ไพรเมอร์นี้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าหนึ่งเบส (+1/+1) เหมาะสมในการใช้ศึกษากับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ในการศึกษารั้งนี้เพิ่มเบสคัดเลือกว่าหนึ่งเบสเพียงหนึ่งข้างของไพรเมอร์แต่ละชนิด (+1/0 หรือ 0/+1) จึงทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้ยังมีจำนวนมาก หากเลือกคู่ไพรเมอร์จากการทดลองในโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR ที่ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 50-100 แถบ อาจช่วยลดจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบจริงบนอะครีลาไมด์

จากการใช้เทคนิค *In Silico* AFLP-PCR ช่วยในการวิเคราะห์หาคู่เอนไซม์และคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ด้วยการจำลองการทดลองในเวปไซด์ <http://insilico.ehu.es/AFLP/> สามารถช่วยให้การทดลองประหยัดทั้งเวลา ค่าใช้จ่ายเอนไซม์และไพรเมอร์ (วัณนิกร, 2550) เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR กับเทคนิค AFLP พบว่าการทดลองด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าการทดสอบ AFLP ในห้องปฏิบัติการบนอะครีลาไมด์เจล เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR จากเวปไซด์สามารถวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 20 bp. และนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีลำดับเบสต่างกันเข้าไปด้วย ดังนั้นผลการวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงใน *In Silico* AFLP-PCR analysis จึงมากกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้อะครีลาไมด์เจลในการตรวจ

แยกแถบดีเอ็นเอ โดยที่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กอาจเคลื่อนออกนอกแผ่นเจลไป หรือแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่ลำดับเบสที่แตกต่างกันก็ไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้จากเจล

จากข้อมูลการทดสอบเบื้องต้นนี้จึงได้นำทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI+A/MseI+0*, *EcoRI+C/MseI+0* และ *EcoRI+G/MseI+G* ทดสอบกับเชื้อจำนวน 31 ไอโซเลท เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย

**ตารางที่ 4** เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR โดยอาศัยฐานข้อมูลจีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ KACC10331 กับการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 6 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค AFLP

ไพรเมอร์	<i>In Silico</i> AFLP-PCR	AFLP gel		
		แถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่ แตกต่าง	% ความ แตกต่าง
<i>EcoRI+0/MseI+0</i>	734	-	-	-
<i>EcoRI+0/MseI+G</i>	235	-	-	-
<i>EcoRI+0/MseI+A</i>	136	105	11	10.47
<i>EcoRI+0/MseI+C</i>	182	105	8	7.61
<i>EcoRI+0/MseI+T</i>	183	102	10	9.08
<i>EcoRI+A/MseI+0</i>	131	81	18	22.22
<i>EcoRI+C/MseI+0</i>	198	82	16	19.51
<i>EcoRI+G/MseI+G</i>	111	94	13	13.82

หมายเหตุ - ไม่สามารถประเมินแถบดีเอ็นเอได้

#### 4.3 วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP

วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มาทดสอบกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+*G* พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเท่ากับ 17 แถบ 24 แถบ และ 20 แถบ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) รวมจำนวนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 61 แถบ และให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเฉลี่ยเท่ากับ 24.69% โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+*C/MseI*+0 ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสูงสุดคือที่ 30.76%

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 31 ไอโซเลท

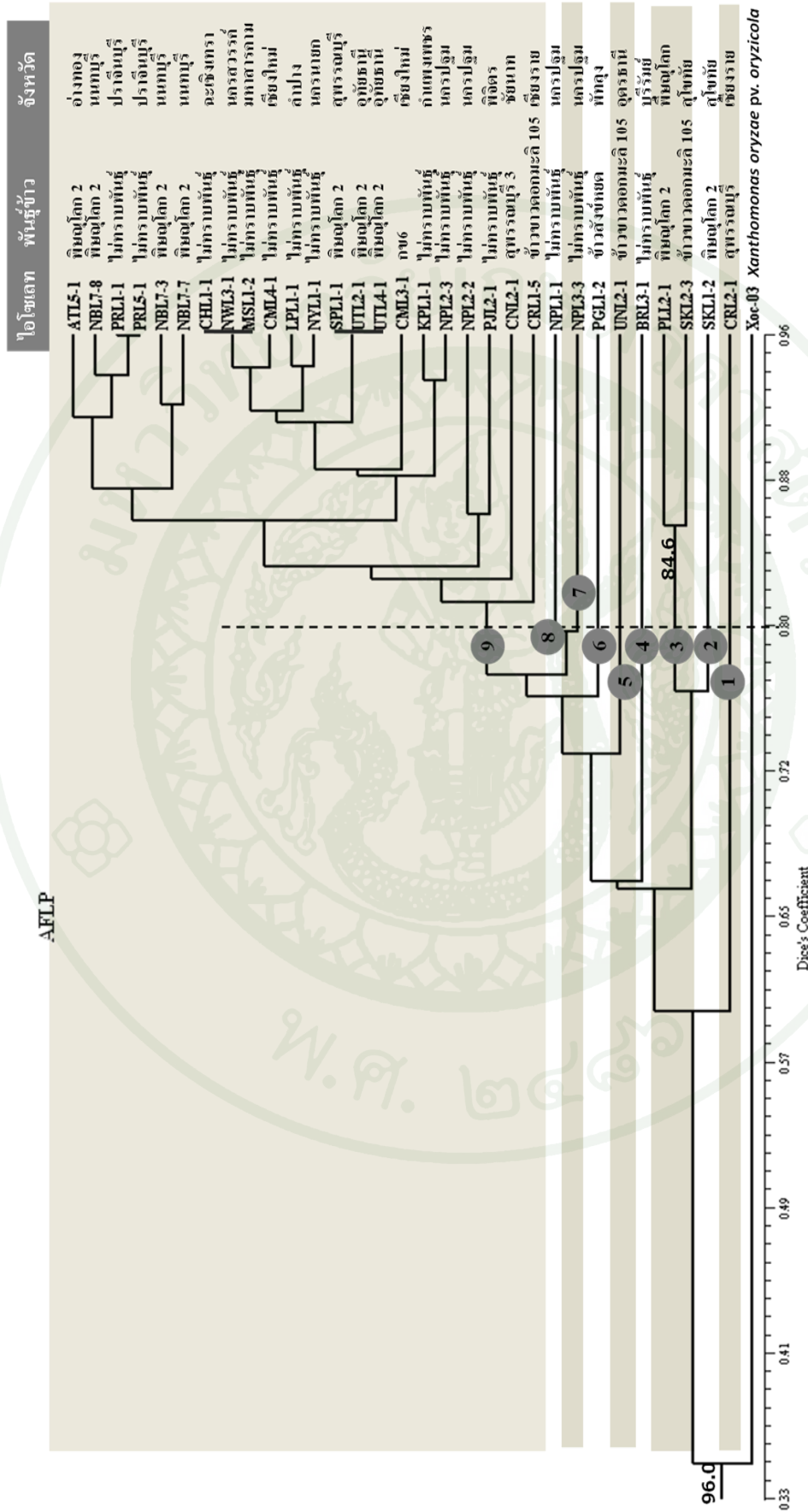
ไพรเมอร์	AFLP gel		
	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	%ความแตกต่าง
<i>EcoRI</i> + <i>A/MseI</i> +0	80	17	21.25
<i>EcoRI</i> + <i>C/MseI</i> +0	78	24	30.76
<i>EcoRI</i> + <i>G/MseI</i> + <i>G</i>	89	20	22.47
รวม	247	61	24.69

##### 4.3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากเทคนิค AFLP ด้วยวิธี UPGMA

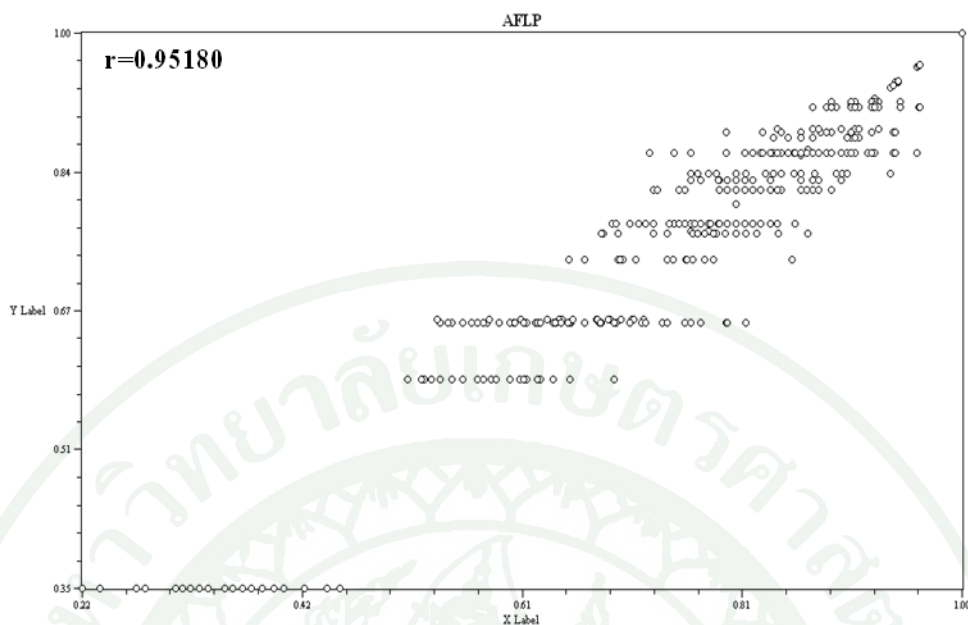
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+*G* และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d (Applied Biostatistics, Inc) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วย Dice's coefficient โดยใช้เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นเชื้อ out-group พบว่าสามารถแยกเชื้อทั้งสองได้ที่ค่าความเหมือน (similarity) เท่ากับ 0.35 และพบว่าประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยสามารถแบ่งกลุ่มที่ค่าความเหมือนเท่ากับ 0.80 ได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม (ภาพที่ 6) และมีค่า goodness of fit ของการจัดกลุ่มโดยคำนวณได้จาก cophenetic correlation (r) ได้ค่าเท่ากับ 0.95180 (ภาพที่ 7)

หากค่า  $r$  มีค่ามากกว่า 0.9 แสดงถึงกลุ่มที่จัดได้อยู่ในระดับที่ตีความและมีความน่าเชื่อถือ (สวทช, 2544)

จากภาพที่ 6 เคนโตรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากเทคนิค AFLP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่ากลุ่ม 1 เป็นเชื้อจากจังหวัดเชียงราย ไอโซเลท CRL2-1 มีความเหมือนกับเชื้ออื่นๆ น้อยที่สุด โดยมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 0.60 ขณะที่กลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นเชื้อจากภาคเหนือตอนล่างมีพื้นที่ติดกัน โดยกลุ่ม 2 มีเชื้อหนึ่งไอโซเลท (SKL1-2) จากจังหวัดสุโขทัย ส่วนกลุ่ม 3 ประกอบด้วยเชื้อจำนวนสองไอโซเลท จากจังหวัดสุโขทัย (SKL2-3) และจังหวัดพิษณุโลก (PLL2-1) กลุ่ม 4 เป็นเชื้อจากจังหวัดบุรีรัมย์หนึ่งไอโซเลท คือ BRL3-1 ส่วนกลุ่ม 5 เป็นเชื้อจากจังหวัดอุดรธานีจำนวนหนึ่งไอโซเลท คือ UNL2-1 กลุ่ม 6 เป็นเชื้อจากทางภาคใต้หนึ่งไอโซเลท คือ PGL1-2 จากจังหวัดพัทลุง กลุ่ม 7 และกลุ่ม 8 เป็นเชื้อจากจังหวัดนครปฐมกลุ่มละหนึ่งไอโซเลท ทั้งสองกลุ่มมีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน โดยแยกจากกันที่ค่าความเหมือน 0.79 และกลุ่ม 9 เป็นกลุ่มที่มีประชากรเชื้อมากที่สุด จำนวน 22 ไอโซเลท คิดเป็น 70.97% ของประชากรเชื้อทั้งหมด ในกลุ่มนี้เป็นเชื้อแยกได้จากพื้นที่ปลูกข้าว 16 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอ่างทอง นนทบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครสวรรค์ มหาสารคาม เชียงใหม่ ลำปาง นครนายก สุพรรณบุรี อุทัยธานี พิจิตร กำแพงเพชร นครปฐม ชัยนาท และเชียงราย ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ที่มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของพื้นที่ปลูกพันธุ์ข้าวและวิเขตกรรมที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 6 เตน โตรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากเทคนิค AFLP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)



ภาพที่ 7 แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp ของโปรแกรม NTSYS version 2.01d ผลคำนวณได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95180

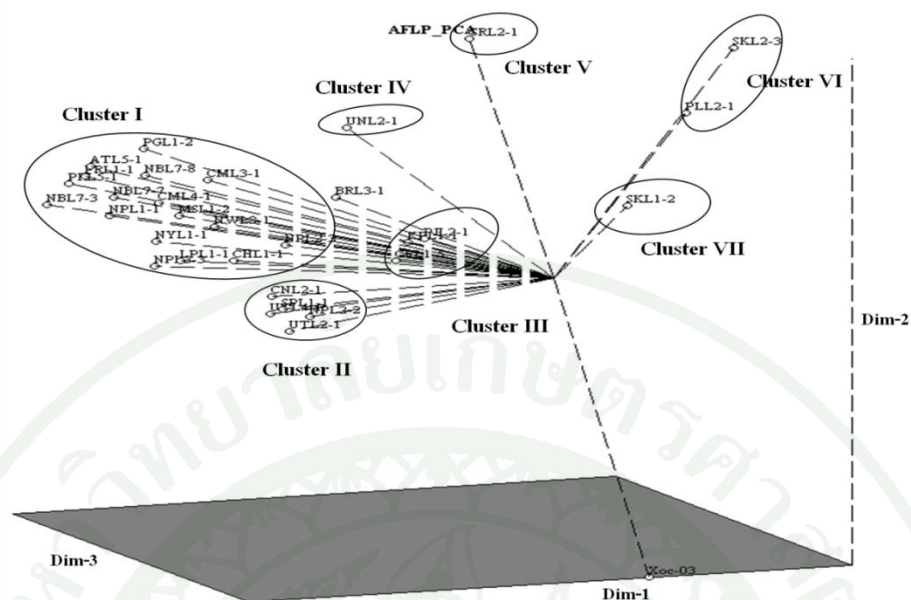
#### 4.3.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากเทคนิค AFLP ด้วยวิธี PCA

ผลการวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยวิธีทางสถิติแบบ PCA ตามวิธีการของ Rohlf (1998) ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d โดยแสดงเป็นภาพสามมิติ (ภาพที่ 8) จากการใช้ข้อมูล binary data ที่ได้จากเทคนิค AFLP พบว่ามีเพียง 4 ตัวแปรหลัก (ไอโซเลทหรือกลุ่มเชื้อ) ที่ให้ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปรหรือตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (Eigenvalues) มากกว่า 1 ได้แก่ ตัวแปรที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่มีค่า Eigenvalue เท่ากับ 20.53, 1.99, 1.44 และ 1.09 ตามลำดับ โดยให้เปอร์เซ็นต์ที่สามารถอธิบายความผัน-แปรของตัวอย่างทั้ง 31 ไอโซเลทได้ที่ 64.17%, 6.24%, 4.50% และ 3.41% ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 10)

จากการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA พบว่าสามารถแยกกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้อย่างชัดเจนในทั้งสามมิติ สำหรับการจัดกลุ่มในประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าการจัดกลุ่มแบบ PCA สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 7 กลุ่ม (Clusters) ดังนั้นกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 17 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ อ่างทอง

นนทบุรี นครปฐม นครนายก ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี มหาสารคาม และพัทลุง กลุ่ม 2 มีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท จากจังหวัดชัยนาท (CNL2-1) อุทัยธานี (UTL4-1, UTL2-1) สุพรรณบุรี (SPL1-1) และ นครปฐม (NPL2-2) กลุ่ม 3 เป็นเชื้อจากจังหวัดเชียงราย (CRL1-5) กำแพงเพชร (KPL1-1) และพิจิตร (PJL2-1) ในขณะที่กลุ่ม 4, 5 และ 7 มีกลุ่มละหนึ่งไอโซเลทจากจังหวัดอุดรธานี (UNL2-1) จังหวัด เชียงราย (CLRL2-1) และจังหวัดสุโขทัย (SKL1-2) ตามลำดับ กลุ่ม 6 จังหวัดสุโขทัย (SKL2-3) และ พิษณุโลก (PLL2-1) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจากจังหวัดบุรีรัมย์ ไอโซเลท BRL3-1 จัดอยู่ระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 3

เมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA โดยแสดงภาพในรูปแบบเดน-โดแกรมเป็นภาพสองมิติและวิธี PCA ซึ่งแสดงภาพในแบบสามมิติ พบว่าการจัดกลุ่มแบบ UPGMA และ PCA มีจำนวนกลุ่มและสมาชิกในกลุ่มแตกต่างกัน โดย UPGMA แบ่งกลุ่มได้ 9 กลุ่ม ส่วนวิธี PCA จัดแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่ม ซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการจัดกลุ่มด้วยหลักคิดทางคณิตศาสตร์และ สถิติที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม 70% ของประชากรเชื้อมีผลการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกันและผลการ จัดกลุ่มทั้งสองวิธีชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย โดยภาพสามมิติที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCA สามารถแสดงให้เห็นถึงการ รวมกลุ่มและการกระจายตัวของเชื้อแต่ละ ไอโซเลทได้ชัดเจนกว่า dendrogram ที่ได้จากวิธี UPGMA ซึ่งแสดงผลการจัดกลุ่มในรูปแบบภาพสองมิติ



ภาพที่ 8 แสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA ของเทคนิค AFLP ด้วยโปรแกรมย่อย Eigen จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d

#### 4.3.3 การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP พบว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพันธุ์ข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ดังเห็นได้จากเชื้อไอโซเลต SKL2-1 และ SKL2-2 ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และ KDML105 ตามลำดับ โดยแปลงนาที่เก็บเชื้อได้อยู่ใกล้กันในจังหวัดสุโขทัยแต่ปลูกข้าวคนละพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้งสองถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ต่างกันคือกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ที่ค่า similarity ประมาณ 0.78 (ภาพที่ 6)

นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ปลูกที่มีระบบนิเวศเกษตรต่างกันมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อดังแสดงได้จาก เชื้อที่แยกจากพันธุ์ข้าวชนิดเดียวกันแต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน เชื้อเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่นเชื้อแยกได้จากพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จังหวัดสุโขทัย อุดรธานี และเชียงราย จัดอยู่ในกลุ่ม 2, 5 และ 9 บ่งชี้ว่าสภาพทางภูมิศาสตร์มีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรเชื้อในภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยเชื้อในกลุ่มที่ 5 จำนวน 4 ไอ-

โซเลท แยกเป็นกลุ่มย่อยที่ต่างจากกันได้ชัดเจนและยังมีเชื้อจากจังหวัดเชียงรายที่แตกต่างจากเชื้อทั้งหมด โดยแยกตัวเป็นกลุ่มที่ 1 ที่ค่า similarity ประมาณ 0.6 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคเหนือของ Kosawang *et al.* (2006) ที่พบว่าเชื้อในภาคนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและพันธุ์ข้าวมีผลต่อการความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อและสอดคล้องกับการศึกษาของ Ardales *et al.* (1995) ที่ได้วิเคราะห์ความผันแปรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกันในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าระบบนิเวศเกษตรมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ

#### 4.4 การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค rep-PCR

จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ REP ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 36 แถบ โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 23 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง เท่ากับ 63.9% ขณะที่ไพรเมอร์ ERIC ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 30 แถบ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 14 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 46.7% (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC

ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	% ความแตกต่าง
REP	36	23	63.9
ERIC	30	14	46.7
รวม	76	37	48.68

#### 4.5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากไพรเมอร์ REP

##### 4.5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากไพรเมอร์ REP ด้วยวิธี UPGMA

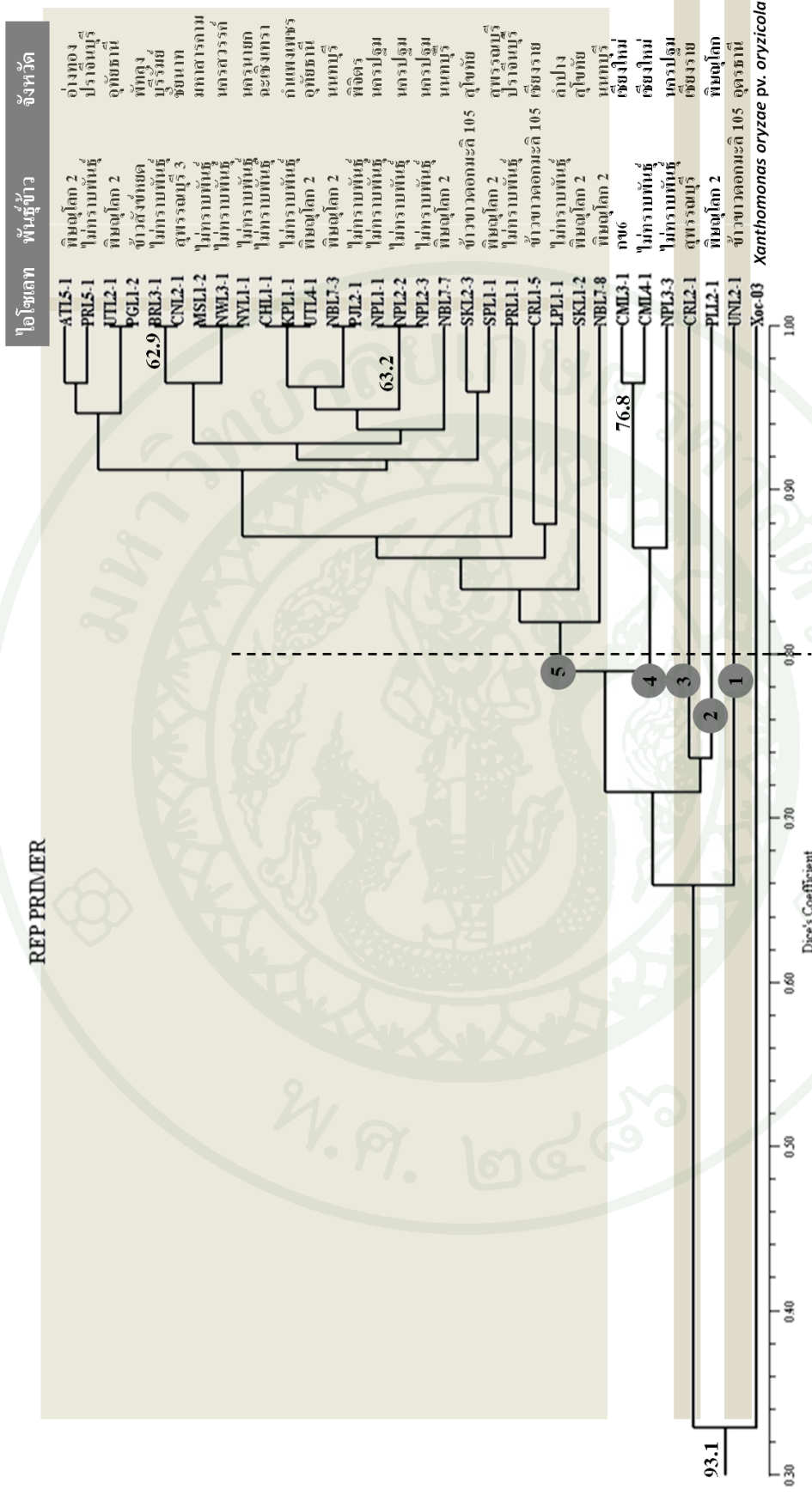
จากเดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากไพรเมอร์ REP (ภาพที่ 9) วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's Coefficient พบว่าสามารถแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* และเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ค่า similarity 0.33 ได้ชัดเจน ในขณะที่การจัดกลุ่มประชากรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าเมื่อแบ่งกลุ่มที่ค่า similarity 0.80 สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม (ภาพที่ 9) โดยมีผลการจัดกลุ่มดังนี้ กลุ่ม 1 ถูกแยกกลุ่มที่ค่า similarity 0.66 ได้แก่ ไอโซเลท UNL2-1 จากจังหวัดอุดรธานี ซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้อไอโซเลทอื่นๆ มากที่สุด กลุ่ม 2 ไอโซเลท PLL2-1 จากจังหวัดพิษณุโลก กลุ่ม 3 ไอโซเลท CRL2-1 จากจังหวัดเชียงราย กลุ่ม 4 ประกอบด้วยเชื้อจำนวนสามไอโซเลท ได้แก่ เชื้อไอโซเลท NPL1-1 จากจังหวัดนครปฐม, ไอโซเลท CML4-1 และ CML3-1 จากจังหวัดเชียงใหม่ และกลุ่ม 5 มีจำนวนประชากรเชื้อมากที่สุด จำนวน 25 ไอโซเลท คิดเป็น 80.65% ของประชากรเชื้อทั้งหมด โดยเป็นเชื้อจากจังหวัดอ่างทอง ปราชินบุรี อุทัยธานี พัทลุง บุรีรัมย์ ชัยนาท มหาสารคาม นครสวรรค์ นครนายก ฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร นนทบุรี พิจิตร นครปฐม สุโขทัย สุพรรณบุรี เชียงรายและลำปาง เมื่อคำนวณค่า cophenetic correlation ได้เท่ากับ 0.95928 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP (ภาพที่ 8 และ 10)

##### 4.5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากไพรเมอร์ REP ด้วยวิธี PCA

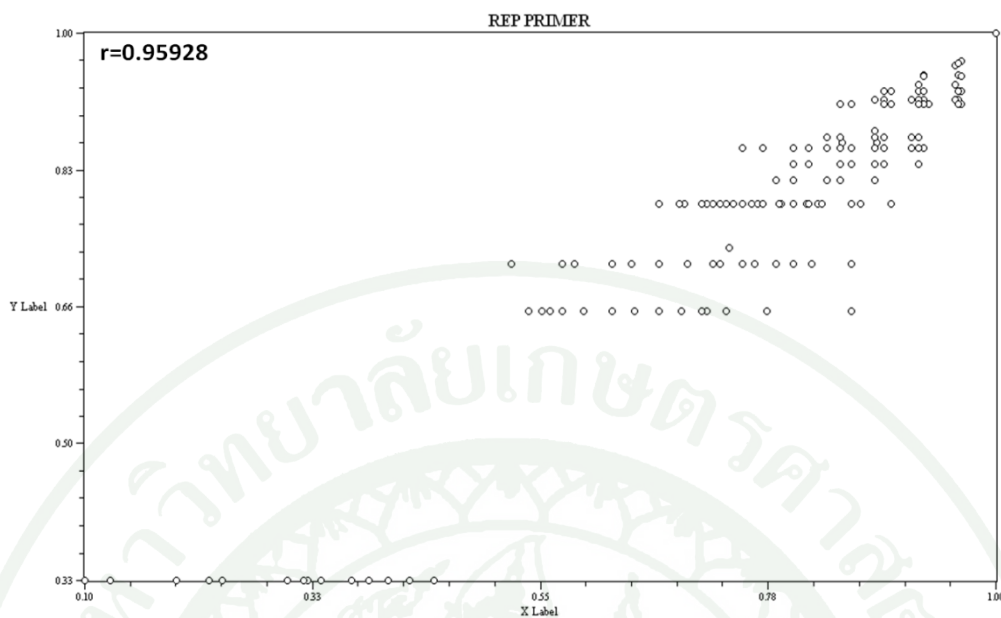
การจัดกลุ่มแบบสามมิติด้วยวิธี PCA พบว่ามี 5 ตัวแปรที่ให้ค่า Eigenvalues มากกว่า 1 ได้แก่ ตัวแปรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยมีค่า Eigenvalue เท่ากับ 21.19, 2.58, 1.89, 1.48 และ 1.15 และให้เปอร์เซ็นต์อธิบายความผันแปรได้ (% of Variance) 66.23%, 8.07%, 5.89%, 4.64% และ 3.61 ตามลำดับ โดยตัวแปรทั้งห้าอธิบายค่าความแปรปรวนทั้ง 32 ตัวอย่างได้ เท่ากับ 88.43% (ตารางผนวกที่ 11) จากการจัดกลุ่มแบ่งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ซึ่งใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ (out group) แยกจากกลุ่มประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในทั้งสามมิติ (ภาพที่ 11) สำหรับการจัดกลุ่มภายในกลุ่มประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าสามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีกลุ่มละหนึ่งไอโซเลท คือ ไอโซเลท UNL2-1 จากจังหวัดอุดรธานี และไอโซเลท NPL3-3 จากจังหวัด

นครปฐม ตามลำดับ กลุ่ม 3 ได้แก่ ไอโซเลท CRL2-1 จากจังหวัดเชียงราย และไอโซเลท PLL2-1 จากจังหวัดพิษณุโลก กลุ่ม 4 ประกอบด้วยไอโซเลท LPL1-1 จากจังหวัดลำปาง ไอโซเลท SKL1-2 จากจังหวัดสุโขทัย และไอโซเลท NBL7-8 จากจังหวัดนนทบุรี กลุ่ม 5 และกลุ่ม 6 มีจำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 62.52% ของประชากรเชื้อที่ทดสอบ และกลุ่ม 7 เชื้อจากจังหวัดเชียงใหม่สองไอโซเลท คือ CML3-1 และ CML4-1 เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มจากวิธี UPGMA พบว่าไม่สอดคล้องกับวิธี PCA โดยวิธี UPGMA จัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ในขณะที่การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA จัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม เนื่องจากประชากรเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 ที่มีจำนวนเชื้อคิดเป็น 80.65% ของประชากรเชื้อทั้งหมด จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค UPGMA สามารถแบ่งจำนวนกลุ่มย่อยๆ เพิ่มขึ้นด้วยวิธี PCA ทำให้เห็นการกระจายตัวของเชื้อได้ดีกว่าด้วย

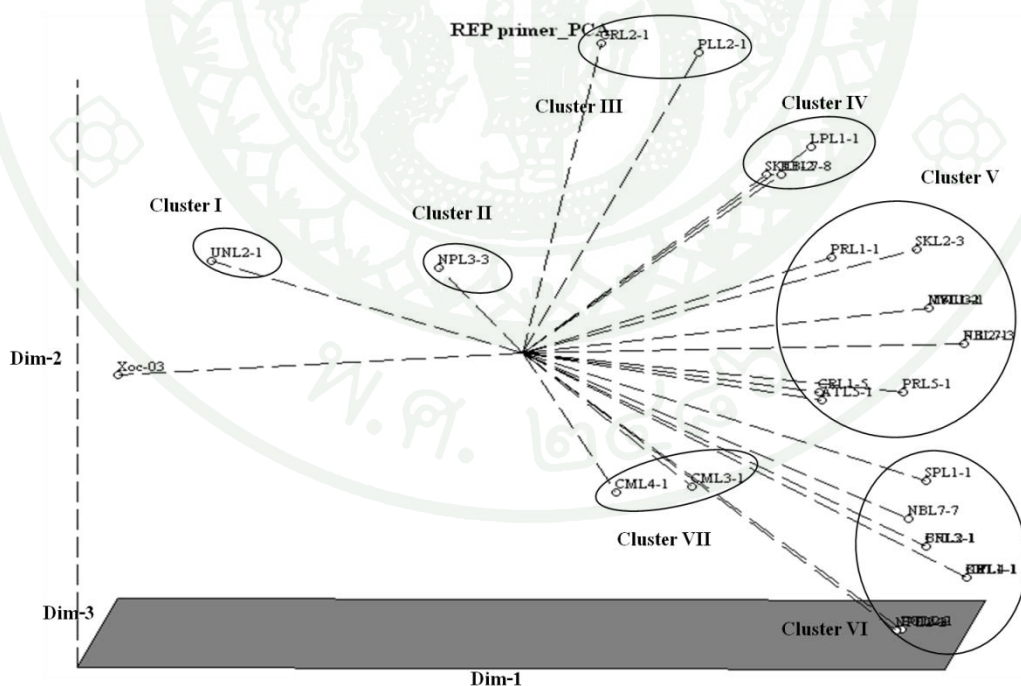
จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ REP พบว่าไพรเมอร์ REP แยก *pathovar oryzae* และ *oryzicola* ได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ Louws *et al.* (1994) ที่พบว่าไพรเมอร์ REP สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อในระดับ *pathovar* และ *strain* ได้ชัดเจน



**ภาพที่ 9** เคนโนแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากเทคนิค Rep-PCR ที่ได้จากเฟรมเวิร์ก REP วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's Coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <math>< 50</math> ไม่แสดง)



ภาพที่ 10 แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จากโปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95928

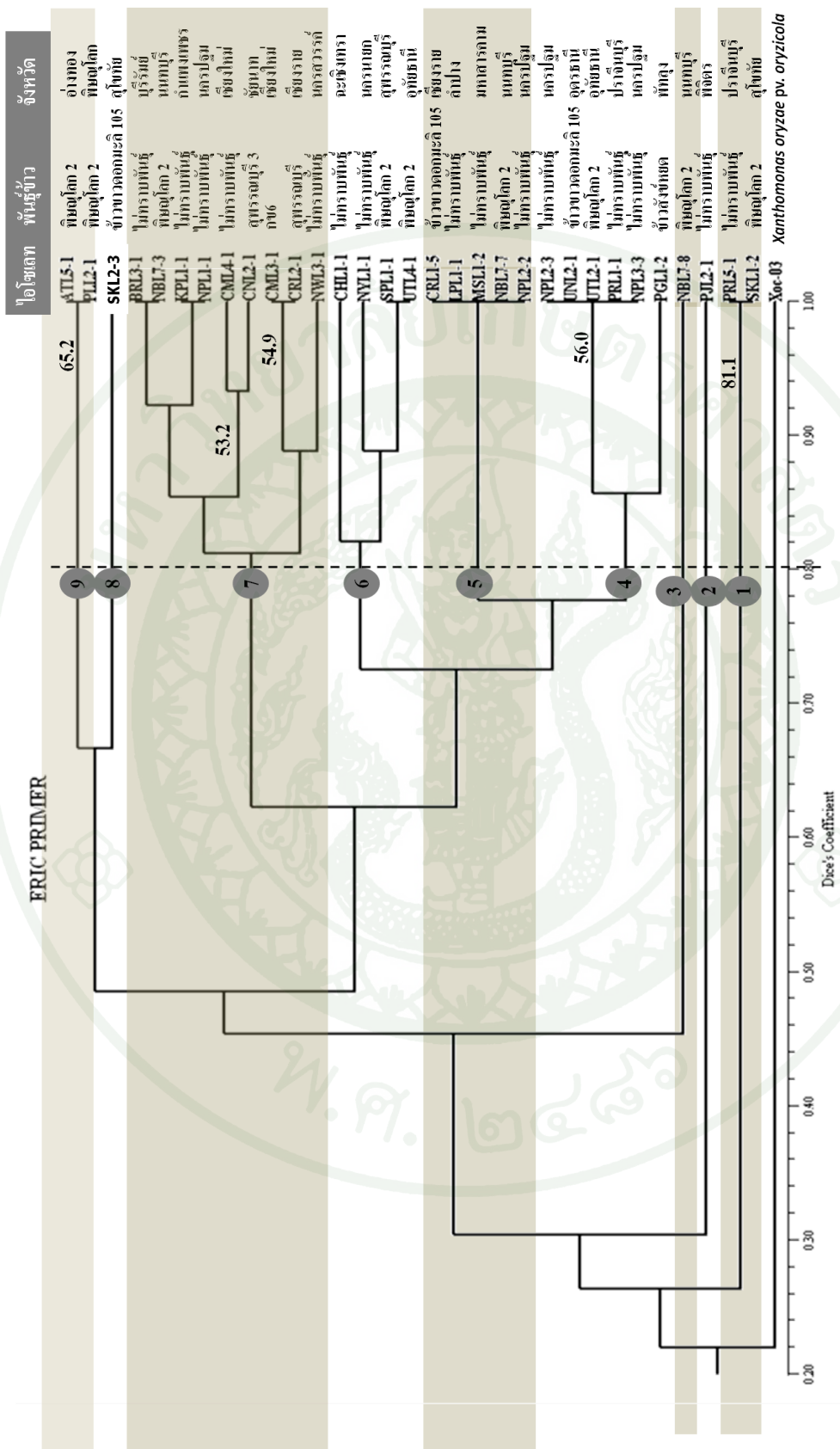


ภาพที่ 11 แสดงการกระจายข้อมูลแบบ PCA ด้วยเทคนิค rep-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ REP จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย Eigen ในโปรแกรม NTSYS version 2.01d

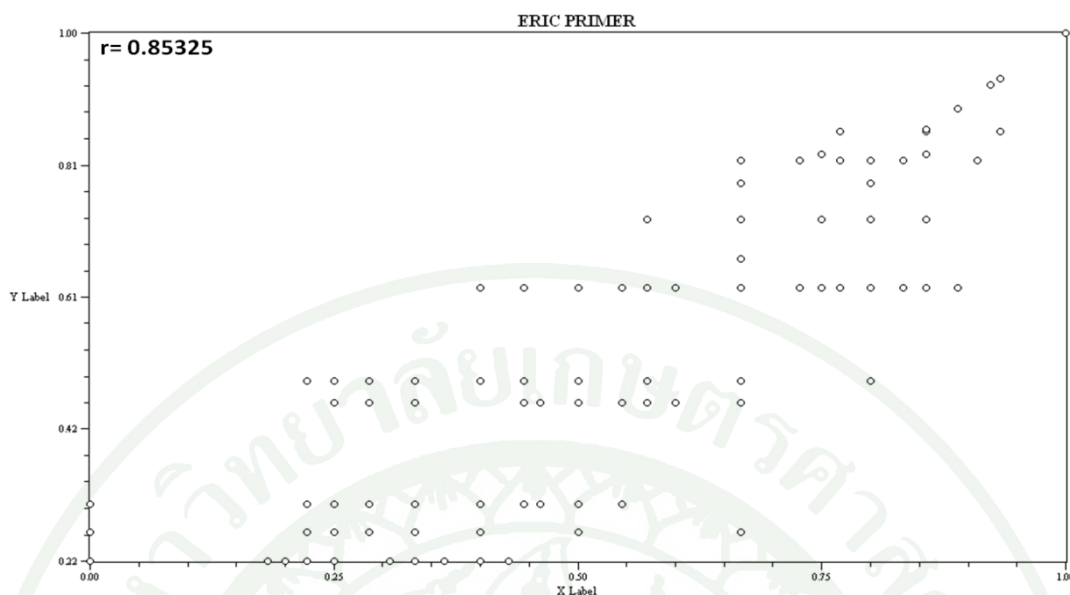
#### 4.6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากไพรเมอร์ ERIC

##### 4.6.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากการใช้ไพรเมอร์ ERIC ด้วยวิธี UPGMA

จากการจัดกลุ่มด้วยไพรเมอร์ ERIC พบว่าสามารถแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ออกจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ค่า similarity 0.22 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับรายงานของ Louws *et al.* (1994); Gonzalez *et al.* (2006) และ วราภรณ์ (2554) เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าแบ่งเชื้อได้ 9 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 มีเชื้อไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SKL1-2 จากปราจีนบุรี และไอโซเลต PRL5-1 สุโขทัย กลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 มีหนึ่งไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PJJ2-1 จากจังหวัดพิจิตร และไอโซเลต NBL7-8 จากจังหวัดนนทบุรี ตามลำดับ กลุ่ม 4 มีเชื้อจำนวนหกไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PGL1-2 จากจังหวัดพัทลุง, ไอโซเลต NPL2-3 และ NPL3-3 จากจังหวัดนครปฐม, ไอโซเลต PRL1-1 จากจังหวัดปราจีนบุรี, ไอโซเลต UTL2-1 จากจังหวัดอุทัยธานี และไอโซเลต UNL2-1 จากจังหวัดอุดรธานี กลุ่ม 5 มีเชื้อจำนวนห้าไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NPL2-2 จากจังหวัดนครปฐม, ไอโซเลต NBL7-7 จากจังหวัดนนทบุรี, ไอโซเลต MSL1-2 จากจังหวัดมหาสารคาม, ไอโซเลต LPL1-1 จากจังหวัดลำปาง และไอโซเลต CRL1-5 จากจังหวัดเชียงราย กลุ่ม 6 มีเชื้อจำนวนสี่ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต UTL1-1 จากจังหวัดอุทัยธานี, ไอโซเลต SPL1-1 จากจังหวัดสุพรรณบุรี, ไอโซเลต NYL1-1 จากจังหวัดนครนายก และไอโซเลต CHL1-1 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา กลุ่ม 7 มีเชื้อจำนวนเก้าไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NL3-1 จากจังหวัดนครสวรรค์, ไอโซเลต CRL2-1 จากจังหวัดเชียงราย, ไอโซเลต CML3-1 และ CML4-1 จากจังหวัดเชียงใหม่, ไอโซเลต CNL2-1 จากจังหวัดชัยนาท, ไอโซเลต NPL2-1 จากจังหวัดนครปฐม, ไอโซเลต KPL1-1 จากจังหวัดกำแพงเพชร, ไอโซเลต NBL7-3 จากจังหวัดนนทบุรี, ไอโซเลต BRL3-1 จากจังหวัดบุรีรัมย์ กลุ่ม 8 มีหนึ่งไอโซเลต คือ SKL2-3 เชื้อจากจังหวัดสุโขทัย และกลุ่ม 9 มีเชื้อสองไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PLL2-1 จากจังหวัดพิษณุโลก และ ATL5-1 จากจังหวัดอ่างทอง (ภาพที่ 12) โดยคำนวณค่า Cophenetic correlation ในการจัดกลุ่มได้เท่ากับ 0.85325 (ภาพที่ 13) ซึ่งน้อยกว่าค่า  $r$  จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP และไพรเมอร์ REP



**ภาพที่ 12** เคนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากเทคนิค Rep-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ERIC วิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วย Dice's Coefficient จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Bootstrap <50 ไม่แสดง)



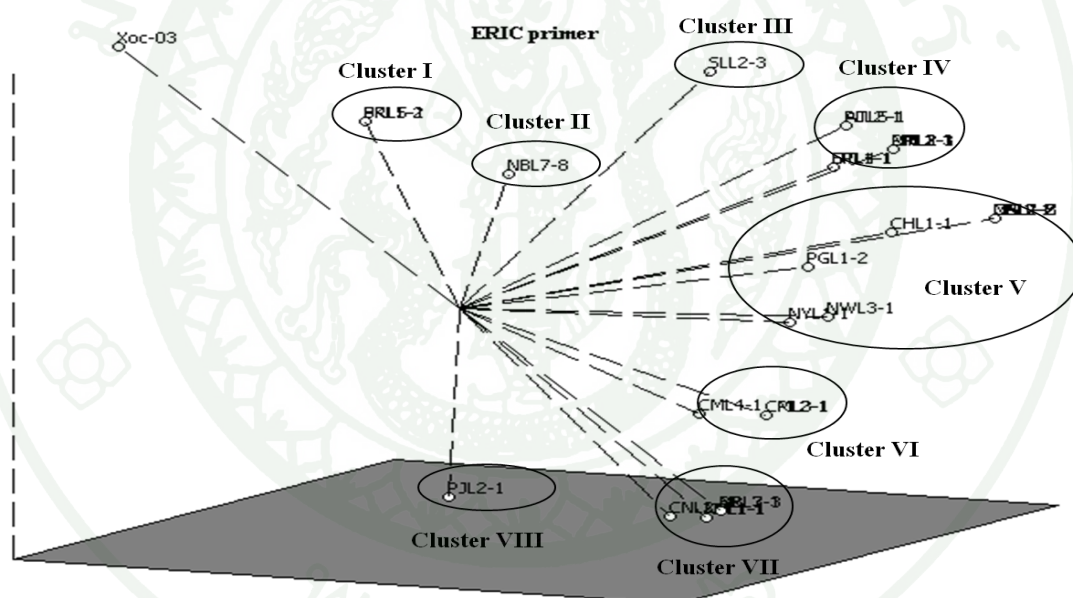
**ภาพที่ 13** แสดงการกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จาก โปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.85325

#### 4.6.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากการ ใช้ไพรเมอร์ ERIC ด้วยวิธี PCA

จากการจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากข้อมูลไพรเมอร์ ERIC ด้วยวิธี PCA พบว่ามี 6 ตัวแปร ที่ให้ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร (Eigenvalues) มากกว่า 1 ได้แก่ ตัวแปรที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ให้ค่า Eigenvalue เท่ากับ 18.09, 4.36, 3.12, 1.99, 1.54 และ 1.20 และให้เปอร์เซ็นต์เพื่ออธิบายความผันแปรได้ (% Variance) ที่ 56.54%, 13.64%, 9.76%, 6.23%, 4.82% และ 3.76% ตามลำดับ โดยตัวแปร ที่ 1-6 อธิบายค่าความแปรปรวนของเชื้อ 32 ไอโซ-เลท ที่ได้เท่ากับ 94.7672% (ตารางผนวกที่ 12) จากการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* แยกจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* อย่างชัดเจน และสามารถแบ่งกลุ่มประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม (ภาพที่ 14) โดยกลุ่ม 1 มีสองไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท PRL5-1 เชื้อจากจังหวัดปราจีนบุรี และไอโซเลท SKL1-2 เชื้อจากจังหวัดสุโขทัย กลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 มีกลุ่มละหนึ่งไอโซเลท ได้แก่ NBL7-8 เชื้อจากจังหวัดนนทบุรี และไอโซเลท SKL2-3 เชื้อจาก จังหวัดสุโขทัย ตามลำดับ กลุ่ม 4, 5 และกลุ่ม 7 มีประชากรเชื้อหลากหลายและมาจากพื้นที่แตกต่างกัน กลุ่ม 6 มีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ CML3-1 และ CML4-1 เป็นเชื้อจากจังหวัดเชียงใหม่ และ

ไอโซเลท CRL2-1 เป็นเชื้อจากจังหวัดเชียงราย และกลุ่ม 8 มีเชื้อหนึ่งไอโซเลท คือ PJL2-1 เชื้อจากจังหวัดพิจิตร

จากการใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ ERIC นำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และวิธี PCA พบว่าเชื้อที่เป็น out-group คือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* แยกกลุ่มออกจากประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* อย่างชัดเจนทั้งสองวิธี สำหรับการจัดกลุ่มภายในประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าจำนวนกลุ่มที่จัดได้และสมาชิกไอโซเลทในแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน โดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม ขณะที่วิธีการ PCA จัดกลุ่มได้ 8 กลุ่ม ถึงแม้จะพบว่าการจัดกลุ่มของเชื้อหลายไอโซเลทให้ผลการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี แต่จำนวนเชื้อที่จัดกลุ่มแล้วให้ผลสอดคล้องกันน้อยกว่าการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP และไพรเมอร์ REP



ภาพที่ 14 แสดงการกระจายข้อมูลแบบ PCA ด้วยเทคนิค rep-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ ERIC จำนวนด้วยโปรแกรมย่อย Eigen ในโปรแกรม NTSYS version 2.01d

#### 4.7 การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากเทคนิค rep-PCR

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep-PCR ด้วย REP ไพรเมอร์ พบว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพันธุ์ข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ดังเห็นได้จากเชื้อ ไอโซเลท CRL2-1 และ CRL1-5 ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี และ KDML105 ตามลำดับ โดยแปลงนาที่เก็บเชื้อได้อยู่ใกล้กันในจังหวัดเชียงรายแต่ปลูกข้าวคนละพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้งสองถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ต่างกันคือกลุ่มที่ 3 และ 5 ตามลำดับ ที่ค่า similarity ประมาณ 0.75 (ภาพที่ 9)

นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ปลูกที่มีระบบนิเวศเกษตรต่างกันมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อดังแสดงได้จากเชื้อที่แยกจากพันธุ์ข้าวชนิดเดียวกัน แต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน ซึ่งเชื้อเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่นเชื้อที่แยกได้จากพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จังหวัดอุดรธานี เชียงราย จัดอยู่ในกลุ่ม 1 และ 5 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าสภาพทางภูมิศาสตร์มีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรเชื้อในภาคเหนือและภาคกลางตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยเชื้อในกลุ่มที่ 5 จำนวน 5 ไอโซเลท แยกเป็นกลุ่มย่อยที่ต่างจากกันได้ชัดเจนและยังมีเชื้อจากจังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายที่แตกต่างจากเชื้อทั้งหมด โดยแยกตัวเป็นกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่ค่า similarity ประมาณ 0.75 และ 0.85 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในภาคเหนือของ Kosawang *et al* (2006) ที่พบว่าเชื้อในภาคนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและพันธุ์ข้าวมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อและสอดคล้องกับการศึกษาของ Ardales *et al.* (1995) ที่ได้วิเคราะห์ความผันแปรของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกันในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าระบบนิเวศเกษตรมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม

#### 5. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเทคนิค AFLP และเทคนิค rep-PCR

เทคนิค AFLP และ rep-PCR เป็นเครื่องมือที่มีการนำมาใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ก่อนหน้านี้ได้มีการใช้เทคนิค AFLP (Kosawang *et*

al., 2006) หรือ rep-PCR (Adhikari *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2012 และวารกรณ์, 2553) เพียงเทคนิคใดเทคนิคหนึ่งเท่านั้นในการศึกษา ในการศึกษารั้งนี้ ได้วิเคราะห์ประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 31 ไอโซเลท ด้วยวิธีการที่มีประสิทธิภาพทั้งสองวิธีทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากมีการสุ่มคัดเลือกลีออนเอในจีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากส่วนที่แตกต่างกันได้มากขึ้น ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่นำมาศึกษาจึงเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งชนิด ขนาดและจำนวนที่แตกต่างกัน

เนื่องจากเทคนิค AFLP และ rep-PCR มีหลักในการสุ่มเลือกและการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่แตกต่างกัน โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก AFLP เป็นการสุ่มเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดและจำนวนเบสคัดเลือกว่าอยู่ที่ปลายไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในขณะที่ rep-PCR จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน โดยอาศัยการเข้าคู่กันระหว่างไพรเมอร์กับ repetitive element (rep-element) ในแบคทีเรีย เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาร่วมกับการใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP, ERIC และ BOX เท่านั้น ตำแหน่งต่างๆ ของ repetitive elements ซึ่งกระจายรอบจีโนมของแบคทีเรียจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์ทำให้ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อในระดับ races หรือ strains ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ขั้นตอนการปฏิบัติงานยังสะดวกกว่าเทคนิค AFLP เนื่องจากใช้เทคนิคพีซีอาร์และการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลได้ ทำให้เหมาะกับการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อจำนวนมากและหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันให้ดีขึ้น สามารถเลือกวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะครีลาไมด์เจลได้เช่นเดียวกับเทคนิค AFLP อย่างไรก็ตาม rep-PCR มีข้อจำกัดคือมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีจำนวนจำกัด ในขณะที่เทคนิค AFLP สามารถสุ่มเลือกจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะศึกษาเพิ่มได้ไม่จำกัด เพียงแค่เปลี่ยนชนิดของเอนไซม์หรือไพรเมอร์

ในการจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย โดยใช้ตัวแทนเชื้อ จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR โดยเทคนิค AFLP ใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+*G* ส่วนเทคนิค rep-PCR ใช้ไพรเมอร์ REP และ ERIC เมื่อแบ่งกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าเทคนิค AFLP แบ่งกลุ่มเชื้อได้ 9 กลุ่ม ขณะที่เทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ REP จัดแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 5 กลุ่ม และไพรเมอร์ ERIC จัดแบ่งได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม โดยมีค่าความน่าเชื่อถือของการจัด

กลุ่มสูง ซึ่งการคำนวณจากค่า  $r$  พบว่าเทคนิค AFLP และ REP ไพรเมอร์ มีค่า  $r$  ใกล้เคียงกันคือ ที่ 0.95 และ 0.96 ในขณะที่ ERIC ไพรเมอร์มีค่า  $r$  เท่ากับ 0.85325 ซึ่งน้อยกว่าวิธีอื่นๆ โดยผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP พบว่ามีเชื้อจำนวน 77.41 % ที่มีผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกันและชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยเหมือนกัน ในขณะที่ผลการจัดกลุ่มด้วยไพรเมอร์ ERIC มีการกระจายตัวของเชื้อเป็นกลุ่มๆ มากกว่าเทคนิคอื่นๆ และผลการจัดกลุ่มพบว่ามีประชากรเชื่อน้อยกว่า 30% ที่ให้ผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับวิธีอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gonzalez *et al.* (2006) ที่ได้ประเมินความแตกต่างของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อัฟริกากับสายพันธุ์เอเชียด้วย AFLP และ rep-PCR พบว่าทั้งสองเทคนิคมีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากร (population) ของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่าผลการจัดกลุ่มของประชากรเชื้อในบางไอโซเลตให้ผลที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ต่างให้ผลสอดคล้องกันคือแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อในประเทศไทย โดยเฉพาะเชื้อจากภาคเหนือและภาคกลางตอนบนและชี้ให้เห็นถึงปัจจัยที่อาจมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งได้แก่ พันธุ์ข้าว วิธีเขตกรรมและระบบนิเวศเกษตรที่แตกต่างกัน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

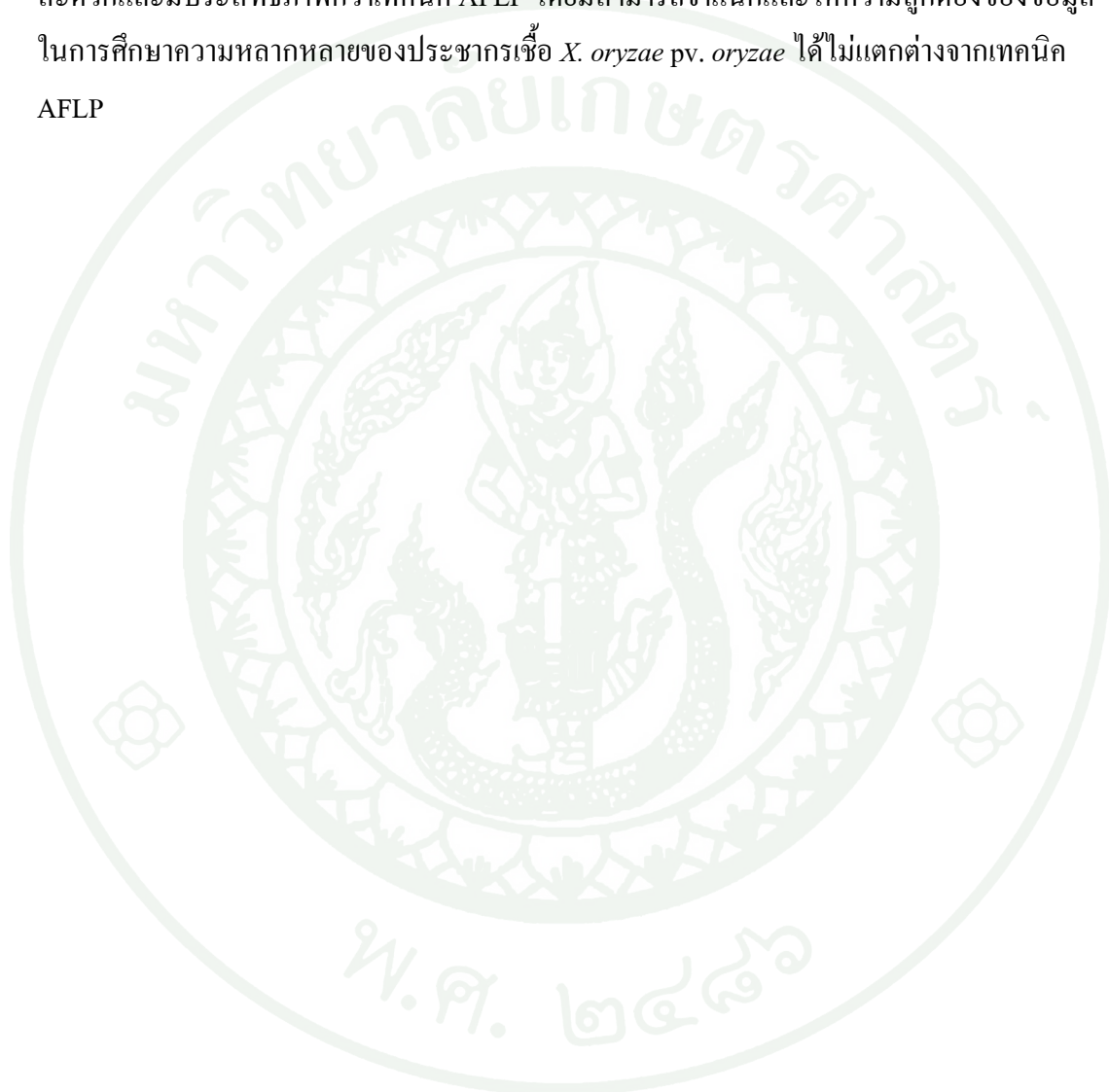
จากการเก็บตัวอย่างโรคขอบใบแห้งของข้าว (Bacterial Leaf Blight) ที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2553 เมื่อนำมาตรวจเชื้อด้วยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเทคนิคพีซีอาร์และทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) พบว่าสามารถจำแนกเป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้จำนวน 97 ไอโซเลท จาก 25 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา นนทบุรี นครปฐม นครนายก กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา อุตรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ และพัทลุง

เมื่อจัดกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย โดยใช้ตัวแทนเชื้อ จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR โดยเทคนิค AFLP ใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+G ส่วนเทคนิค rep-PCR ใช้ไพรเมอร์ REP และ ERIC เมื่อแบ่งกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าเทคนิค AFLP แบ่งกลุ่มเชื้อได้ 9 กลุ่ม ขณะที่เทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ REP จัดแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 5 กลุ่ม และไพรเมอร์ ERIC จัดแบ่งได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม โดยทั้งผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ให้ผลสอดคล้องกันคือต่างชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อพิจารณาจากค่า *r* พบว่าทั้งสองเทคนิคมีค่าความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มสูง โดยเทคนิค AFLP และ REP ไพรเมอร์ มีค่า *r* ใกล้เคียงกันคือ ที่ 0.95180 และ 0.95928 ในขณะที่ ERIC ไพรเมอร์มีค่า *r* เท่ากับ 0.85325 ซึ่งน้อยกว่าวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP มีเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลทจาก 31 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 77.41 ของประชากรเชื้อที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ ซึ่งมีผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกันและชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยได้เหมือนกัน ในขณะที่ผลการจัดกลุ่มด้วยไพรเมอร์ ERIC มีการกระจายตัวของเชื้อเป็นกลุ่มๆ มากกว่าเทคนิคอื่นๆ และผลการจัดกลุ่มพบว่า มีประชากรเชื่อน้อยกว่า 30 % ที่ให้ผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับวิธีอื่นๆ

ปัจจัยที่พบว่า มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ข้าว วิถีเขตกรรมและระบบนิเวศเกษตรที่

แตกต่างกัน โดยพบว่าประชากรเชื้อในภาคเหนือและภาคกลางตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

หากต้องการศึกษาประชากรเชื้อจำนวนมากเทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคปฏิบัติงานได้สะดวกและมีประสิทธิภาพกว่าเทคนิค AFLP โดยมีความสามารถจำแนกและให้ความถูกต้องของข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ไม่แตกต่างจากเทคนิค AFLP



## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการข้าว. 2552. องค์ความรู้เรื่องข้าว: โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. แหล่งที่มา:

[http://www.brrd.in.th/rkb/data\\_005/rice\\_xx2-05\\_newDisease009.html](http://www.brrd.in.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_newDisease009.html),

23 สิงหาคม 2552.

กาญจนา กล้าแข็ง. 2544. การตรวจหาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเอเอฟแอลพี (AFLP) ของพันธุ์ Near Isogenic Line. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทิยา เตชะดี. 2551. การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ ภูักคิพันธ์. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัฒน์กร เทพโพธา. 2550. การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าและของผักกับสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขุ่นด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย โหมสิทธิ์ตน. 2549. บทปฏิบัติการแบคทีเรียโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สมหญิง อภิญญาพานิชย์. 2526. การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* ที่ก่อให้เกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวและการป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุริดา เรืองบุญ, พะยอม โคเบลล์ และ ชีรดา หวังสมบูรณ์ดี. 2553. การใช้ยีน *avr* เพื่อจัดกลุ่ม *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย (2) (พิเศษ) : 221-232.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และอาร์เอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- แสงชัย ศรีประโคน. 2552. การจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) และการบ่งชี้ตำแหน่งยีนต้านทานในข้าวพื้นเมืองพันธุ์เขียงรุ่ง (*Oryza sativa* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2544. การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลสำหรับงานวิจัยด้านโรคไหม้ข้าว, 34-120 น. ใน รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความหลากหลายของเชื้อโรคไหม้ในระดับโมเลกุล 3-5 ตุลาคม 2544.
- อนุชา วงศ์ปราณี. 2551. การวิเคราะห์พันธุประวัติเชื้อพันธุกรรมอ้อยไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adhikari, T.B., C.M.V. Cruz, Q. Zhang, R.J. Nelson, D.Z. Skinner, T.W. Mew, and J.E. Leach. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 966–971.
- Adhikari, T.B., T.W. Mew and J.E. Leach. 1999. Genotype and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* in Nepal. **Phytopathology** 89: 687-694.
- Ardales, E.Y., H. Leung, C.M. Vera Cruz, T.M. Mew, J.E. Leach and R.J. Nelson. 1995. Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in the Philippines. **Phytopathology** 86: 241-252.

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1999. **Shortprotocols in Molecular Biology**. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bikandi, J., R.S. Millan, A. Rementeria and J. Garaizar. 2004. *In Silico* analysis of complete bacterial genome: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. **Bioinformatics** 20: 798-799.
- Chen, X.L., L. Yu, L. Gao, T. Liang, Q.Y. Li and Q. Huang. 2012. Elevation variation in diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in south-west China. **Phytopathology** 160: 261-268.
- Chisholm, S.T., G. Coaker, B. Day and B.J. Staskawicz. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell** 124: 803-814.
- Eamchit, S. 1982. Comparative of virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Thailand and the Philippines. **Plant Disease** 66: 556-559.
- Elings, A., P.R. Reddy, T. Marimuthu, W.A.H. Rossing, M.J.W. Jansen and P.S. Teng. 1997. Rice bacterial leaf blight: field experiment, systems analysis and damage coefficients. **Field Crops Research** 51: 113-131.
- EPPO. 2007. *Xanthomonas oryzae*. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin** 37: 543-553.
- George, M.L.C., M. Bustamam, W.T. Cruz, J.E. Leach and R.J. Nelson. 1996. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast asia detected using PCR-base DNA fingerprinting. **Phytopathology** 87: 302-309.

Gonzalez, C., B. Szurek, C. Manceau, T. Mathieu, Y. Sere and V. Verdier. 2006. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa.

**Phytopathology** 20: 534-548.

IRRI. 2004. Bacterial Blight. **Rice Science for a Better World**. Available Source:

<http://www.knowledgebank.irri.org/tropRice>. August 7, 2008.

Jyufuku, S., N. Furuya, T. Goto, K. Tsuchiya and A. Yoshimura. 2009. Pathogenic and genetic diversity in Asian strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University** 54: 19-23.

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

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

Leach, J.E., H. Leung, R.J. Nelson and T.W. Mew. 1995. Population biology of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and approaches to its control. **Current Opinion in Biotechnology** 6: 298-304.

Lee, K.S., S. Rasabandith, E.R. Angeles, and G.S. Khush. 2003. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. **Phytopathology** 93: 147-152.

Leung, H., R.J. Nelson, J.E. Leach. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. **Advances in Plant Pathology** 10: 157-205.

- Louws, F.J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J.D. Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 2286-2295.
- Marshall, D.R. 1977. The advantages and hazards of genetic homogeneity. **Annals New York Academy of Sciences** 287: 1-20.
- Mew, T.W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. **Phytopathology** 25: 359-382.
- Mew, T.W., C.M. Vera cruz and E.S. Medalla. 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars plant in the Philippines. **Plant Disease** 76: 1029-1032.
- Naoto, A. and O. Takashi. 2000. PCR-mediated detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by amplification of the 16S-23S rDNA spacer region sequence. **Journal of General Plant Pathology** 66: 303-309.
- Nino-Liu, D.O., P.C. Ronald and A.J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. **Molecular Plant Pathology** 5: 303-324.
- Ochiai, H., O. Horino, K. Miyajima and H. Kaku. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* strain from Sri Lanka. **Phytopathology** 90: 415-421.
- Ou, S.H. 1985. **Rice Diseases**. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, UK.
- Roberts, R. J., T. Vincze, J. Posfai and D. Macelis. 2003. REBASE restriction enzymes and methyltransferase. **Nucleic Acids Research**. -31: 418-420.

- Rohlf, F.J. 1998. **NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0 user guide**. Department of Ecology and Evolution State University of New York. Setauker, New York.
- Van Den Mooter, M. and J. Swing. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. **International Journal of Systematic Bacteriology** 40: 348-369.
- Vera Cruz, C.M., E.Y. Ardales, D.Z. Skinner, J. Talag, R.J. Nelson, F.J. Louws, H. Leung, T.M. Mew and J.E. Leach. 1996. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP 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 Research** 19: 6823-6831.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research** 23: 4407-4414.
- Wilson, L.A. and P.M. Sharp. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution** 23: 1156-1168.
- 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 dendograms**. IRRI discussion paper series 14. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.



ตารางผนวกที่ 1 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 200 แถบ เมื่อทดสอบในโปรแกรม

*In Silico*

คู่เอ็นไซม์	คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบ	จำนวนคู่ที่ได้
<i>EcoRI/MseI</i>	<i>EcoRI+0/MseI+A, EcoRI+0/MseI+C, EcoRI+0/MseI+T,</i> <i>EcoRI+A/MseI+0, EcoRI+C/MseI+0, EcoRI+G/MseI+G</i>	6
<i>EcoRI/TaqI</i>	<i>EcoRI+A/TaqI+0, EcoRI+C/TaqI+G, EcoRI+G/TaqI+A,</i> <i>EcoRI+G/TaqI+C, EcoRI+G/TaqI+T, EcoRI+T/TaqI+A,</i> <i>EcoRI+G/TaqI+T</i>	7
<i>PstI/MseI</i>	<i>PstI+A/MseI+0, PstI+C/MseI+A, PstI+C/MseI+C,</i> <i>PstI+C/MseI+G, PstI+C/MseI+T, PstI+G/MseI+A,</i> <i>PstI+G/MseI+G, PstI+G/MseI+T</i>	8
<i>PstI/ TaqI</i>	<i>PstI+A/ TaqI+A</i>	1
<i>HindIII/MseI</i>	<i>HindIII+C/MseI+0</i>	1
<i>HindIII/TaqI</i>	<i>HindIII+0/ TaqI+A, HindIII+0/ TaqI+C, HindIII+0/</i> <i>TaqI+T, HindIII+A/ TaqI+0, HindIII+G/ TaqI+0</i>	5
<i>ApaI/MseI</i>	<i>ApaI+0/MseI+A, ApaI+0/MseI+C, ApaI+0/MseI+G,</i> <i>ApaI+A/MseI+0, ApaI+C/MseI+0, ApaI+T/MseI+0,</i>	6
<i>ApaI/TaqI</i>	<i>ApaI+0/TaqI+G, ApaI+C/TaqI+A, ApaI+C/TaqI+C,</i> <i>ApaI+G/TaqI+0</i>	4

**ตารางผนวกที่ 2** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>EcoRI</i> +0	<i>EcoRI</i> +A	<i>EcoRI</i> +C	<i>EcoRI</i> +G	<i>EcoRI</i> +T
<i>MseI</i> +0	734	131	198	331	74
<i>MseI</i> +A	136	30	38	55	13
<i>MseI</i> +C	183	36	53	73	22
<i>MseI</i> +G	235	38	63	111	23
<i>MseI</i> +T	183	27	47	93	16

**ตารางผนวกที่ 3** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *TaqI* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>EcoRI</i> +0	<i>EcoRI</i> +A	<i>EcoRI</i> +C	<i>EcoRI</i> +G	<i>EcoRI</i> +T
<i>TaqI</i> +0	1841	192	800	519	336
<i>TaqI</i> +A	489	52	214	118	103
<i>TaqI</i> +C	568	47	252	170	78
<i>TaqI</i> +G	322	35	146	82	57
<i>TaqI</i> +T	622	58	290	167	105

**ตารางผนวกที่ 4** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Mse*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Pst</i> I+0	<i>Pst</i> I +A	<i>Pst</i> I +C	<i>Pst</i> I +G	<i>Pst</i> I +T
<i>Mse</i> I +0	1613	189	574	649	202
<i>Mse</i> I +A	458	59	193	172	53
<i>Mse</i> I +C	456	59	133	162	64
<i>Mse</i> I +G	364	53	104	162	45
<i>Mse</i> I +T	339	36	146	117	40

**ตารางผนวกที่ 5** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Taq*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Pst</i> I+0	<i>Pst</i> I +A	<i>Pst</i> I +C	<i>Pst</i> I +G	<i>Pst</i> I +T
<i>Taq</i> I+0	7739	944	2493	3212	1084
<i>Taq</i> I +A	1710	164	535	758	238
<i>Taq</i> I +C	2245	269	737	943	269
<i>Taq</i> I +G	1389	212	444	513	205
<i>Taq</i> I +T	2409	290	756	998	347

**ตารางผนวกที่ 6** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วย เอนไซม์ *Hind*III และ *Mse*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Hind</i> III +0	<i>Hind</i> III +A	<i>Hind</i> III +C	<i>Hind</i> III +G	<i>Hind</i> III +T
<i>Mse</i> I+0	295	76	109	93	18
<i>Mse</i> I +A	78	25	29	19	5
<i>Mse</i> I +C	87	16	32	37	3
<i>Mse</i> I +G	76	21	27	21	7
<i>Mse</i> I +T	60	16	24	16	4

**ตารางผนวกที่ 7** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วย เอนไซม์ *Hind*III และ *Taq*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Hind</i> III +0	<i>Hind</i> III +A	<i>Hind</i> III +C	<i>Hind</i> III +G	<i>Hind</i> III +T
<i>Taq</i> I+0	601	151	232	179	37
<i>Taq</i> I +A	145	45	49	38	13
<i>Taq</i> I +C	193	40	78	70	22
<i>Taq</i> I +G	88	25	33	25	10
<i>Taq</i> I +T	175	44	72	49	23

**ตารางผนวกที่ 8** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วย  
เอนไซม์ *ApaI* และ *MseI* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR  
amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>ApaI</i> +0	<i>ApaI</i> +A	<i>ApaI</i> +C	<i>ApaI</i> +G	<i>ApaI</i> +T
<i>MseI</i> +0	446	102	181	49	112
<i>MseI</i> +A	126	32	51	10	34
<i>MseI</i> +C	129	36	48	15	30
<i>MseI</i> +G	105	17	46	18	24
<i>MseI</i> +T	85	18	36	7	24

**ตารางผนวกที่ 9** จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *X.oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ตัดด้วย  
เอนไซม์ *ApaI* และ *TaqI* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR  
amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>ApaI</i> +0	<i>ApaI</i> +A	<i>ApaI</i> +C	<i>ApaI</i> +G	<i>ApaI</i> +T
<i>TaqI</i> +0	1162	237	517	135	273
<i>TaqI</i> +A	276	52	120	41	63
<i>TaqI</i> +C	145	71	134	36	90
<i>TaqI</i> +G	331	40	54	14	37
<i>TaqI</i> +T	410	76	208	44	81

ตารางผนวกที่ 10 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค AFLP

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
1	20.53	64.17	64.17
2	1.99	6.24	70.41
3	1.44	4.49	74.91
4	1.09	3.41	78.33
5	0.94	2.92	81.25
6	0.84	2.62	83.87
7	0.76	2.38	86.25
8	0.72	2.26	88.51
9	0.62	1.93	90.44
10	0.46	1.44	91.88
11	0.41	1.29	93.17
12	0.29	0.94	94.11
13	0.29	0.91	95.02
14	0.28	0.89	95.90
15	0.24	0.75	96.65
16	0.19	0.60	97.25
17	0.16	0.512	97.76
18	0.12	0.38	98.15
19	0.11	0.36	98.50
20	0.09	0.27	98.78
21	0.08	0.26	99.04
22	0.06	0.19	99.24
23	0.06	0.18	99.42
24	0.05	0.17	99.59
25	0.04	0.12	99.71
26	0.04	0.11	99.83
27	0.02	0.06	99.89

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
28	0.02	0.05	99.93
29	0.01	0.03	99.96
30	0.01	0.02	99.99
31	0.003	0.01	99.99
32	0.001	0.004	100.00

หมายเหตุ <sup>1/</sup>Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

<sup>2/</sup>% of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

<sup>3/</sup>Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

ตารางผนวกที่ 11 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากไพรมอร์ REP

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
1	21.19	66.23	66.23
2	2.58	8.07	74.29
3	1.89	5.89	80.19
4	1.48	4.64	84.82
5	1.15	3.61	88.43
6	0.88	2.74	91.17
7	0.69	2.18	93.35
8	0.49	1.53	94.88
9	0.46	1.43	96.32
10	0.39	1.22	97.53
11	0.26	0.81	98.34
12	0.19	0.62	98.96
13	0.16	0.49	99.45
14	0.08	0.26	99.70
15	0.06	0.18	99.89
16	0.04	0.11	> 100%
17	0.00	0.00	> 100%
18	0.00	0.00	> 100%
19	0.00	0.00	> 100%
20	0.00	0.00	> 100%
21	0.00	0.00	> 100%
22	0.00	0.00	> 100%
23	0.00	0.00	> 100%
24	0.00	0.00	> 100%
25	0.00	0.00	> 100%
26	0.00	0.00	> 100%
27	0.00	0.00	> 100%

## ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
28	0.00	0.00	> 100%
29	0.00	0.00	> 100%
30	0.00	0.00	> 100%
31	0.00	0.00	> 100%
32	0.00	0.00	> 100%

หมายเหตุ <sup>1/</sup>Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

<sup>2/</sup>% of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

<sup>3/</sup>Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

ตารางผนวกที่ 12 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากไพรเมอร์ ERIC

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
1	18.09	56.54	56.54
2	4.36	13.64	70.18
3	3.12	9.76	79.94
4	1.99	6.23	86.18
5	1.54	4.83	91.00
6	1.20	3.76	94.77
7	0.71	2.23	97.00
8	0.56	1.75	98.75
9	0.22	0.69	99.45
10	0.18	0.55	> 100%
11	0.00	0.00	> 100%
12	0.00	0.00	> 100%
13	0.00	0.00	> 100%
14	0.00	0.00	> 100%
15	0.00	0.00	> 100%
16	0.00	0.00	> 100%
17	0.00	0.00	> 100%
18	0.00	0.00	> 100%
19	0.00	0.00	> 100%
20	0.00	0.00	> 100%
21	0.00	0.00	> 100%
22	0.00	0.00	> 100%
23	0.00	0.00	> 100%
24	0.00	0.00	> 100%
25	0.00	0.00	> 100%
26	0.00	0.00	> 100%
27	0.00	0.00	> 100%

## ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

Factor	Eigenvalue <sup>1/</sup>	% of variance <sup>2/</sup>	Cumulative % of variance <sup>3/</sup>
28	0.00	0.00	> 100%
29	0.00	0.00	> 100%
30	0.00	0.00	> 100%
31	0.00	0.00	> 100%
32	0.00	0.00	100.00

หมายเหตุ <sup>1/</sup>Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

<sup>2/</sup>% of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

<sup>3/</sup>Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ รินนภา สมสนุก  
เกิดวันที่ 23 มิถุนายน 2528  
ตำแหน่งปัจจุบัน -  
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -  
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -  
ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนการศึกษาและวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (พ.ศ. 2551-2554)