

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมและโครงสร้างประชากรของเชื้อ *Xanthomonas oryzae*  
*pv. oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย  
Draft Genome Sequence and Population Structure of *Xanthomonas oryzae* *pv.*  
*oryzae* Causing Bacterial Blight Disease on Rice in Thailand

ธิติมา จินตกานนท์<sup>1,2</sup> จุฑาทาเทพ วัชรไชยคุปต์<sup>1,2</sup> ภัสสร วรณพินิจ<sup>3</sup>  
ภูมิพัฒน์ ทองอยู่<sup>1,2</sup> สุจินต์ ภัทรภูวดล<sup>4</sup>  
Thitima Chintaganon<sup>1,2</sup> Jutatape Watcharachaiyakup<sup>1,2</sup> Passorn Wonnapijitj<sup>3</sup>  
Pumipat Tongyoo<sup>1,2</sup> Sujin Patarapuwadol<sup>4</sup>

Received 31 Aug. 2021/Revised 30 Nov. 2021 /Accepted 21 Dec. 2021

## ABSTRACT

Bacterial blight disease (BB) caused by *Xanthomonas oryzae* *pv. oryzae* (Xoo) is one of the most serious diseases of rice production worldwide. The virulence of disease can cause severe yield losses as high as 50 percent. Xoo is genetically diverse and some strains can destroy more than 10 rice resistance genes. Xoo genome analysis can provide comparative information on genetic relationships and population structure. In this study, fifty strains of Xoo collected from 14 provinces in Thailand during 2008 to 2018 were subjected to whole-genome sequencing by using Illumina HiSeq platform. The obtained sequence reads were assembled, mapped, and compared to the genomes of Xoo reference strains including KACC10331, ITCCBB0002, PXO99A and SK2-3 strains from Korea, India, Philippines and Thailand, respectively. The draft genomes of the 50 strains of Xoo in Thailand contained 4,219,315–4,366,829 basepairs which consisted of 3,787–3,945 coding regions of gene (CDS). We identified 30,140 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 3,156 insertion-deletion (indels). The analysis of Xoo population structure and genetic correlations using the 21,181 SNP positions based on principal component analysis and neighbor-joining clustering revealed that most of Thai Xoo populations were genetically distinct from reference strains. However, *xa5*-breaking strains from Sukhothai province and 12 strains from Chiang Rai were

<sup>1/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>1/</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

<sup>2/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

<sup>2/</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG–BIO/MHESI), Bangkok 10900

<sup>3/</sup> ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10903

<sup>3/</sup> Department of Genetics, Faculty of Science, Bangkok 10903

<sup>4/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>4/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

\* Corresponding author: [agrsujp@ku.ac.th](mailto:agrsujp@ku.ac.th)

genetically related to the Indian strain (ITC-CBB0002). Furthermore, the highly genetic diversity within the Thai Xoo population was found. Thai Xoo strains in this study were divided into 8 subgroups, in relation to the geography for 5 subgroups, and 39 percent of all Thai strains were in subgroup 1. Based on population genomics, we found that there was a general correspondence between the areas of Xoo isolated and genomic structure. This suggests that the geographical factors as affected by climate, soil types, may influence on the diversity of Xoo.

**Keywords:** bacterial blight disease, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, genome analysis

### บทคัดย่อ

โรคขอบใบแห้งของข้าว (bacterial blight of rice) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) เป็นโรคสำคัญที่พบระบาดในแหล่งปลูกข้าวทั่วโลก เชื้อ Xoo มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยบางสายพันธุ์เข้าทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิดมากกว่า 10 ยีน การวิเคราะห์จีโนมเชื้อ Xoo ทำให้ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อ งานวิจัยนี้จึงได้วิเคราะห์ข้อมูลจีโนมและศึกษาโครงสร้างประชากรเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกข้าว 14 จังหวัดในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ถึง พ.ศ. 2561 นำมาวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมด้วย Illumina HiSeq platform จัดสร้างแผนที่จีโนมโดยเปรียบเทียบข้อมูลจีโนมเชื้อ Xoo ที่เคยมีรายงานไว้บนฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ สายพันธุ์ KACC10331 ITCBB0002 PXO99A และ SK2-3 จากประเทศเกาหลี อินเดีย ฟิlipินส์

และประเทศไทย ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์ของไทย มีขนาดจีโนมอยู่ระหว่าง 4,219,315-4,366,829 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่น่าจะเป็นยีน จำนวน 3,787-3,945 ตำแหน่ง มีตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNP) จำนวน 30,140 ตำแหน่ง และ insertion deletion (Indel) จำนวน 3,156 ตำแหน่ง ผลวิเคราะห์โครงสร้างประชากรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ จากตำแหน่ง SNP จำนวน 21,181 ตำแหน่ง ด้วยวิธี principal component analysis และ neighbor-joining clustering พบว่า ประชากรเชื้อ Xoo ของไทยส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์เชื้ออ้างอิงจากต่างประเทศอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม พบว่า สายพันธุ์เชื้อที่เข้าทำลายถิ่นกำเนิดทางโรค *xa5* จาก จ. สุโขทัย และเชื้อ 12 สายพันธุ์จาก จ. เชียงราย มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ ITCBB0002 จากอินเดีย นอกจากนี้ ยังพบว่า ประชากรเชื้อของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งเชื้อได้ 8 กลุ่มย่อย โดยเชื้อจำนวน 5 กลุ่มย่อย มีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ ซึ่งประชากรเชื้อส่วนใหญ่ 39% จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1 จากการศึกษาข้อมูลจีโนมของเชื้อเพื่อจัดทำโครงสร้างประชากร พบว่า ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบนิเวศที่แตกต่างกันของพื้นที่การเพาะปลูกไม่ว่าจะเป็นสภาพอากาศ ชนิดของดิน ล้วนมีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของเชื้อ Xoo ของไทย

**คำสำคัญ:** โรคขอบใบแห้ง, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, การวิเคราะห์จีโนม

### บทนำ

โรคขอบใบแห้งของข้าว (bacterial blight of rice) มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) เป็นโรคที่

สร้างความเสี่ยงหายต่อผลผลิตข้าวในหลายประเทศ เชื้อ Xoo สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยเข้าทางบาดแผลหรือช่องเปิดทางธรรมชาติ (Ou, 1985) ปัจจุบันมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (resistance gene) มากกว่า 40 ยีน (Vikal and Bhatia, 2017) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า เชื้อ Xoo มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถปรับตัวให้เข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานต่าง ๆ ได้ ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) การรวมกันของยีนและการเกิดการแทรกหรือขาดไปของนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่ง (insertion-deletion) (Leach et al., 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาข้อมูลจีโนมของเชื้อ Xoo กว่า 100 สายพันธุ์ในประเทศอินเดียที่พบว่า เชื้อสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่เกิดขึ้น จะมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น โดยเชื้อบางสายพันธุ์สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานมากกว่า 10 ยีน เนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวและมีการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและความรุนแรง การเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของเชื้อที่รวดเร็วส่วนหนึ่งอาจมาจากการเลือกใช้พันธุ์ข้าวอ่อนแอหลายพันธุ์ซ้ำกันในพื้นที่เดิม (Midha et al., 2017)

ประเทศไทยพบการระบาดของโรคขอบใบแห้งครั้งแรกที่ จ.ปทุมธานี ในปี พ.ศ. 2506 (Eamchit and Mew, 1982) และพบระบาดต่อเนื่องในพื้นที่เพาะปลูกข้าวในภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ การเข้าทำลายของเชื้อทำให้ผลผลิตข้าวพันธุ์อ่อนแอลดลง 10-30% (พยอม และธีรดา, 2560) ประเทศไทยเป็นหนึ่งในศูนย์กลางความหลากหลายของพันธุกรรมข้าว และทำให้เกิดความหลากหลายของประชากรเชื้อ Xoo จากการศึกษาความหลากหลายของประชากรด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ

repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) พบว่า ประชากรเชื้อ Xoo ในภาคเหนือ และภาคกลางตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนั้น ยังมีรายงานว่าพบเชื้อ pathotype ใหม่ ๆ ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน (ปริศนา และคณะ, 2558) ด้วยเทคโนโลยีการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกลงอย่างมากเมื่อเทียบกับเทคโนโลยีอื่น ๆ ดังนั้น การศึกษาพันธุกรรมของ Xoo ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาจีโนมของเชื้อ Xoo สายพันธุ์ต่าง ๆ ในหลายประเทศ เช่น เกาหลี (Lee et al., 2005) ฟิลิปปินส์ (Salzberg et al., 2008) สหรัฐอเมริกา (Triplett et al., 2011) แอฟริกา (Huguet-Tapia et al., 2016) และอินเดีย (Mondal et al., 2020) แต่ในประเทศไทยข้อมูลจีโนมของเชื้อ Xoo มีเพียงในรายงานของ Carpenter et al. (2020) ที่ศึกษาจีโนมเชื้อ Xoo สายพันธุ์ SK2-3 จาก จ. สุโขทัยของประเทศไทย และจีโนมเชื้อ Xoo สายพันธุ์ IX-280 จากประเทศอินเดียด้วยเทคนิค single-molecular real-time; SMRT เทียบกับเชื้อ Xoo 100 สายพันธุ์พบว่า เชื้อ SK2-3 และ IX-280 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อ Xoo ทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเข้าทำลายยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* และมีโปรตีนก่อโรค *pthXo1* ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับยีน *OsSWEET11* ของข้าว ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งน้ำตาลซูโครสไปยังท่อลำเลียงน้ำซึ่งช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อ Xoo และนำไปสู่การพัฒนาอาการของโรค นอกจากนั้น เชื้อ Xoo สายพันธุ์ SK2-3 อาจมีต้นกำเนิดมาจากเชื้อ Xoo ในประเทศอินเดีย การศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์จีโนมประชากรเชื้อ Xoo ที่พบระบาดในประเทศไทย โดยข้อมูลนี้สามารถนำไปเปรียบเทียบกับจีโนมของเชื้อ Xoo ที่พบในต่างประเทศ และนำมาศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรกับพันธุกรรมของเชื้อ นิเวศการปลูกพันธุ์ข้าว และการจัดจำแนก race

## อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งที่มาของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ใช้ในการศึกษา

รวบรวมเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ และมีการจัดจำแนก race โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดโรคในข้าวพันธุ์ด้านทานที่มีถิ่นกำเนิดในไทยที่เคยมีการศึกษามาก่อนในช่วงปี พ.ศ. 2551 ถึง พ.ศ. 2561 (ปริศนา และคณะ, 2558; จารูวี และคณะ, 2562; ไพเราะ และคณะ, 2562) จากพื้นที่ปลูกข้าว จำนวน 14 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ อุทัยธานี นครนายก สุพรรณบุรี ชัยนาท ราชบุรี นนทบุรี ปราจีนบุรี และนครศรีธรรมราช นำเชื้อ Xoo ทั้ง 50 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -80 °C มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ป่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม.

## การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

นำเชื้อ Xoo ที่บริสุทธิ์ จำนวน 50 สายพันธุ์ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto Mini gDNA Bacteria Kit (Gneaid, Taiwan) ตามวิธีการของบริษัท ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค spectrophotometer ด้วยเครื่อง nanodrop8000 (thermo scientific, USA) และเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 20 นาที ส่งดีเอ็นเอของเชื้อ Xoo ไปที่บริษัท Vishuo Biomedical (Thailand) Ltd. และบริษัท Novogene Leading Edge Genomic Service & Solution (ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วยแพลตฟอร์มของ Illumina HiSeq platform

## การประกอบจีโนมและการสร้างแผนที่จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

ตรวจสอบคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อ่านขนาดประมาณ 150-200 เบส (sequence reads) ที่ได้มาด้วยโปรแกรม FastQC 0.11.5 (Schmieder and Edwards, 2011) จากนั้นคัดกรองข้อมูลดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Trimmomatic 0.39 (Bolger *et al.*, 2014) เลือกใช้ข้อมูลของสายดีเอ็นเอที่มีค่า quality score ไม่น้อยกว่า 30 (มีความแม่นยำ 99.9%) มาต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายยาวที่มีคุณภาพดีด้วยวิธี De novo assembly ด้วยโปรแกรม Unicycler 0.4.8-beta (Wick *et al.*, 2017) ประเมินคุณภาพข้อมูลจีโนมด้วยโปรแกรม assemblathon2 (Bradnam *et al.*, 2013) ระบุยีน (annotation) ด้วยโปรแกรม Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014)

สร้างแผนที่จีโนม (mapping genome) ของเชื้อ Xoo ในประเทศไทยที่นำมาศึกษา โดยใช้แผนที่จีโนมของเชื้อ Xoo สายพันธุ์ SK2-3 (GenBank accession NZ\_CP019515) จากไทย (Carpenter *et al.*, 2020) เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ด้วยโปรแกรม Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) (Li and Durbin, 2009) และจัดทำ alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ Xoo ทั้ง 50 สายพันธุ์กับจีโนมของเชื้อ Xoo สายพันธุ์ SK2-3 จากไทย (Carpenter *et al.*, 2020) KACC10331 จากเกาหลี (Lee *et al.*, 2005) ITCCBB0002 จากอินเดีย (Mondal *et al.*, 2020) และ PXO99A จากฟิลิปปินส์ (Salzberg *et al.*, 2008)

## การวิเคราะห์ตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms (SNP) และ Insertion-deletion (Indel)

วิเคราะห์หาตำแหน่ง SNP และ Indel ด้วยโปรแกรม Genome Analysis Toolkit (GATK) 4.1.2.0 กำหนดค่าพารามิเตอร์ตามค่าเริ่มต้น (default parameter) (McKenna *et al.*, 2010)

**การศึกษาโครงสร้างประชากรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae***

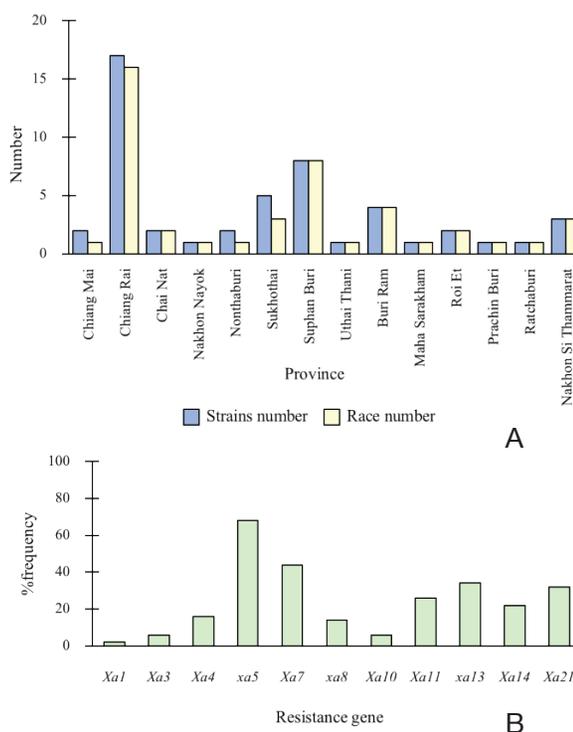
คัดเลือก SNP ในจีโนมเชื้อ Xoo ที่ไม่มี missing data ด้วยโปรแกรม VCF tools (Danecek *et al.*, 2011) เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อ Xoo ด้วยการวิเคราะห์แบบ neighbor joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) ประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม STRUCTURE 2.3.4 กำหนดจำนวนกลุ่มประชากรที่เป็นไปได้ ในช่วง 1-10 กำหนดค่า Markov Chain Monte Carlo (MCMC) และ length of burn-in period ที่ 10,000 รอบ โดยใช้ admixture model (Pritchard *et al.*, 2000) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า K ที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 (Earl, 2012) สร้างกราฟด้วยโปรแกรม StructuRly 0.1.0 (Criscuolo and Angelini, 2020) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร (principal component analysis; PCA) ด้วยโปรแกรม R studio โดยใช้แพ็คเกจ ggplot2 กำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นตามแพ็คเกจ (Wickham, 2011)

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

**แหล่งที่มาของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ใช้ในการศึกษา**

แหล่งที่มาของเชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อ จำนวน 33 race โดยจัดจำแนกจากรูปแบบปฏิบัติการเกิดโรคบนชุดข้าวพันธุ์ต้านทานที่คัดเลือกมาศึกษาครั้งนี้ มาจากจ.เชียงรายมากที่สุด จำนวน 16 race เนื่องจากเชื้อใน จ.เชียงราย ที่นำมาศึกษาแยกได้จากข้าวหลายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105, กข6, กข10, กข15, สันป่าตอง, ปทุมธานี, IRBB5 และ PYBB36 และปลูกนิเวศที่แตกต่างกัน ทำให้มี

ความหลากหลายของประชากรเชื้อสูง รองลงมาคือ จ.สุพรรณบุรี จำนวน 8 race และจ.บุรีรัมย์ จำนวน 4 race และประสิทธิภาพของยีนต้าน xa5 เป็นยีนที่มีความต้านทานแบบกว้างต่อกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาคิดเป็น 68% รองลงมา ได้แก่ Xa7 (44%) xa13 (34%) และ Xa21 (32%) โดยข้าวที่มียีนต้านทาน Xa1 เป็นข้าวที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ Xoo เกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น 61XOSPSJ1-7 (Figure 1)



**Figure 1** Information of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 50 strains using for whole-genome sequence. (A) Number of Xoo strains and number of races found in each province. (B) Effectiveness of Xa genes against Xoo strains

## การประกอบจีโนมและการสร้างแผนที่จีโนมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

จากการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่า เชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์ ที่ทำการศึกษากีโนมด้วย Illumina HiSeq platform เปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อ Xoo จากประเทศอินเดีย (ITCCBB0002) เกาหลี (KACC10331) ฟิลิปปินส์ (PXO99A) และไทย (SK2-3) ที่ศึกษาด้วย PacBio platform พบว่า เชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์ของไทยมีค่า GC-content เฉลี่ยอยู่ที่ 63.98% ใกล้เคียงกับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ต่างประเทศทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่มี GC-content เฉลี่ย 63.71% นอกจากนี้ยังพบว่า จีโนมเชื้อ Xoo ของไทย มีขนาดของจีโนมอยู่ในช่วง 4,219,315-4,366,829 คู่เบส การทำนายและการค้นหาอินซอนของเชื้อทั้ง 50 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนอินซอนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 3,787-3,945 อินซอน ในจำนวนนี้ พบว่า มีอินซอนที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนอยู่ระหว่าง 3,734-3,890 อินซอน (Table 1) ในขณะที่เชื้อ Xoo สายพันธุ์ ITCCBB0002 KACC10331 PXO99A และ SK2-3 มีขนาดจีโนม 4,731,568, 4,941,439, 5,240,075 และ 4,934,446 คู่เบส มีจำนวนอินซอน 4,505, 4,300, 5,048 และ 4,926 อินซอนตามลำดับ (Table 1) และดังตัวอย่างที่แสดงแผนที่จีโนมของเชื้อ Xoo สายพันธุ์ 6XOCR-PA27-8 (Figure 2)

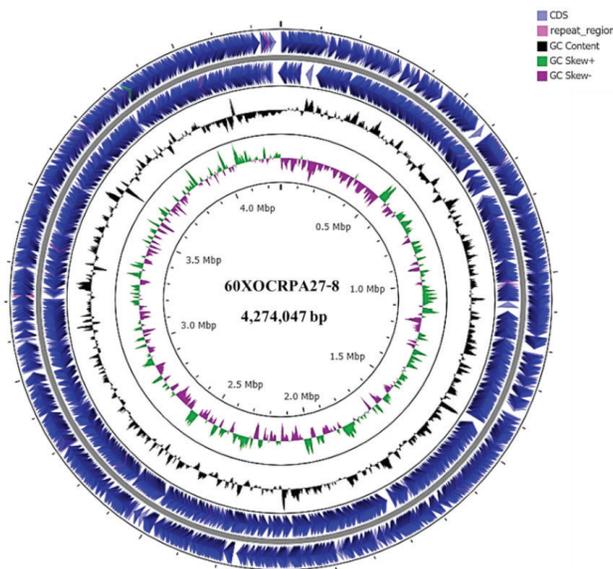
ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมเชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์กับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ ITCCBB0002 KACC10331 PXO99A และ SK2-3 พบว่า เชื้อทั้ง 50 สายพันธุ์และเชื้อ Xoo สายพันธุ์ต่างประเทศมีค่า mapping อยู่ระหว่าง 93.57% ถึง 99.92% ในขณะที่เชื้อ Xoo จากเกาหลี อินเดีย และฟิลิปปินส์ มีค่า mapping อยู่ที่ 97.89%, 98.18% และ 97.26% ตามลำดับ ข้อมูลจากการสร้างแผนที่จีโนมจะถูกนำไปหาตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms และ insertion-deletion เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรและจัดกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ใน

ประเทศไทยต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ SK2-3M SK2-3F และ SK2-3R ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกับ SK2-3 (NZ\_CP019515) ที่ได้จากการคัดเลือกโคลนเดี่ยว ๆ แยกเก็บรักษาหลายชั่วมาวิเคราะห์ด้วย Illumina platform เพื่อใช้ศึกษาความผันแปรภายในสายพันธุ์เชื้อ SK2-3 โดยเก็บรักษาแบบต่าง ๆ ในช่วง 10 ปี พบว่าค่า map rate ของเชื้อทั้ง 3 โคลน อยู่ที่ 99.91%, 99.90% และ 99.92% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table 1) จะเห็นได้ว่าโคลนต่าง ๆ ของ SK2-3 แม้เก็บรักษาเกิน 10 ปี ก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

## การวิเคราะห์ตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms และ Insertion-deletion ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

ผลการวิเคราะห์ตำแหน่ง SNP และ Indel ของประชากรเชื้อ Xoo ของไทย จำนวน 47 สายพันธุ์ (ไม่รวมเชื้อ SK2-3M SK2-3F และ SK2-3R) และเชื้อ Xoo สายพันธุ์ต่างประเทศ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ITCCBB0002 KACC10331 และ PXO99A เปรียบเทียบกับเชื้อ SK2-3 (NZ\_CP019515) พบตำแหน่ง SNP ทั้งหมด 30,140 ตำแหน่ง และ Indel ทั้งหมด 3,156 ตำแหน่ง โดยแต่ละสายพันธุ์มีตำแหน่ง SNP อยู่ระหว่าง 3,660 ถึง 14,903 ตำแหน่ง และ Indel อยู่ระหว่าง 292 ถึง 1,086 ตำแหน่ง จากการศึกษาตำแหน่ง SNP และ Indel ครั้งนี้ พบว่า เชื้อ ITCCBB0002 KACC10331 และ PXO99A มีตำแหน่ง SNP และ Indel ของประชากรแตกต่างกันจำนวน 8,135 ตำแหน่ง 8,151 ตำแหน่ง และ 8,047 ตำแหน่งตามลำดับ (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง SNP และ Indel ของประชากรเชื้อ Xoo ของไทย จำนวน 47 สายพันธุ์กับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ SK2-3 (NZ\_CP019515) พบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงสุดในเชื้อ XONS5-1 (Race 50) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากข้าวเล็บนกใน จ.นครศรีธรรมราช พบจำนวน SNP 14,903



**Figure 2** Circular representation of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* genome strain 60XOCRPA27-8 generated by the CGView server. From outside to inside: rings 1 and 2 demonstrate coding DNA sequence (CDS) on both forward and reverse strand (Blue), ring 3 represents the GC content plot (Black), and ring 4 represents both positive and negative GC skew (Green and purple)

ตำแหน่ง และ Indel จำนวน 1,053 ตำแหน่ง ในขณะที่เชื้อ Xoo จาก จ. เชียงราย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 59XOCRMS9-4 60XOCRPA3-6 และ 59XOCRMSO3-1-1 ที่เข้าทำลายยีน *xa5* ได้เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์ SK2-3 (NZ\_CP019515) จาก จ. สุโขทัย พบตำแหน่ง SNP และ Indel น้อยที่สุด อยู่ที่ประมาณ 4,000 ตำแหน่ง ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับการศึกษาของปริศนา (2558) ที่ทำการศึกษาคความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ Xoo ที่พบในระดับภูมิภาคด้วยการเปรียบเทียบค่า  $\phi$  PT (genetic differentiation) และค่า LinfPT (linearized genetic differentiation among population) พบว่าประชากรเชื้อ Xoo จากภาคใต้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้อในภูมิภาคอื่น ๆ สูงสุด

เมื่อศึกษาคความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อภายใน จ. เชียงราย จำนวน 17 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นเชื้อที่เข้าทำลายข้าวที่มียีน *xa5* และไม่ทำลายข้าวที่มียีน *xa5* พบว่า เชื้อ Xoo สายพันธุ์ 60XOCRMSKDML1 60XOCRCSL5-2 60XOCRMSRD6-1 60XOCRMSY-1 และ 59XOCRMS1-9 ใน จ. เชียงรายที่ไม่เข้าทำลายยีน

*xa5* มี SNP และ Indel อยู่ระหว่าง 4,018 ถึง 15,595 ตำแหน่ง และเชื้อ Xoo สายพันธุ์ 60XOCRPA3-6 60XOCRCSL4R1R5-4 60XOCRPA19-9 59XOCRCS7-3 59XOCRMSO3-1-1 59XOCRMS9-4 59XOCRPA20-10 60XOCRPA15-5 60XOCRPA25-9 59XOCRPA22-1 และ 60XOCRPA27-8 ที่เข้าทำลายยีน *xa5* มี SNP และ Indel อยู่ที่ 3,960 ถึง 4,227 ตำแหน่ง ยกเว้นเชื้อ 59XOCRPA20-10 ที่เข้าทำลายข้าวมียีน *xa5* มี SNP และ Indel รวม 15,035 ตำแหน่ง จะเห็นได้ว่า ประชากรเชื้อ Xoo ใน จ. เชียงรายมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพบตำแหน่ง SNP และ Indel ในช่วงกว้างตั้งแต่ 3,960 ถึง 15,595 ตำแหน่ง ในขณะที่เชื้อจากภาคกลางอีสานและภาคตะวันออก มีตำแหน่ง SNP ใกล้เคียงกันอยู่ที่ประมาณ 14,000 ตำแหน่ง และ Indel ประมาณ 900 ถึง 1,000 ตำแหน่ง (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของรินนาภา (2556) ที่วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเชื้อ Xoo 31 สายพันธุ์ ในพื้นที่ปลูกข้าว 21 จังหวัด ด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC

พบว่า ประชากรเชื้อในภาคเหนือและภาคกลางตอนบน มีความหลากหลายสูง ซึ่งความหลากหลายและการกระจายตัวที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการปรับตัวให้เข้ากับพืชอาศัยและระบบนิเวศเกษตรที่แตกต่างกัน (Quibod *et al.*, 2016)

### โครงสร้างประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

โครงสร้างประชากรเชื้อ Xoo ทั้ง 50 สายพันธุ์ จากตำแหน่ง SNP จำนวน 21,181 ตำแหน่งที่ไม่มี missing data ร่วมกับเชื้อที่รายงานจากต่างประเทศ โดยการพิจารณาค่า Delta K ที่สูงสุด (Figure 3A) ร่วมกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ต่ำสุดของการจำลอง (mean of probabilities lnP(K)) (Figure 3B) ให้ค่า K=2 พบว่า โครงสร้างประชากรของเชื้อ Xoo แบ่งได้เป็น 2 Cluster ซึ่ง Cluster 1 (สีน้ำเงิน) ประกอบไปด้วยเชื้อ Xoo 17 สายพันธุ์ที่แยกได้จากภาคเหนือใน จ. เชียงราย จำนวน 13 สายพันธุ์ ภาคกลางตอนบนใน จ. สุโขทัย จำนวน 4 สายพันธุ์ และจัดอยู่ใน Cluster เดียวกับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ ITCCBB0002 จากอินเดีย และเชื้อ Xoo สายพันธุ์ PXO99A จากฟิลิปปินส์ ซึ่งสอดคล้องกับ Carpenter *et al.* (2020) ที่ศึกษาจีโนมเชื้อสายพันธุ์ SK2-3 ที่เข้าทำลายข้าวที่มี ยีน xa5 ของไทยกับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ IX-280 ของอินเดีย พบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ อาจมีบรรพบุรุษร่วมกัน ส่วน Cluster 2 (สีเขียว) ที่ประกอบด้วยเชื้อ Xoo ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อ Xoo จากภาคกลางมากที่สุด 17 สายพันธุ์ ได้แก่ จ. สุพรรณบุรี นนทบุรี ชัยนาท สุโขทัย นครนายก อุทัยธานี และราชบุรี จำนวน 8, 2, 2, 2, 1, 1 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ รองลงมา คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ จ. บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด และมหาสารคาม จำนวน 4, 2 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ ภาคเหนือ จำนวน 6 สายพันธุ์ จ. เชียงราย 3 สายพันธุ์ และเชียงใหม่ 3 สายพันธุ์ ภาคใต้จาก จ. นครศรีธรรมราช จำนวน 3 สายพันธุ์

และภาคตะวันออกจาก จ. ปราจีนบุรี จำนวน 1 สายพันธุ์ และจัดอยู่ใน cluster เดียวกับเชื้อ Xoo สายพันธุ์ KACC10331 จากเกาหลี (Figure 3C)

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

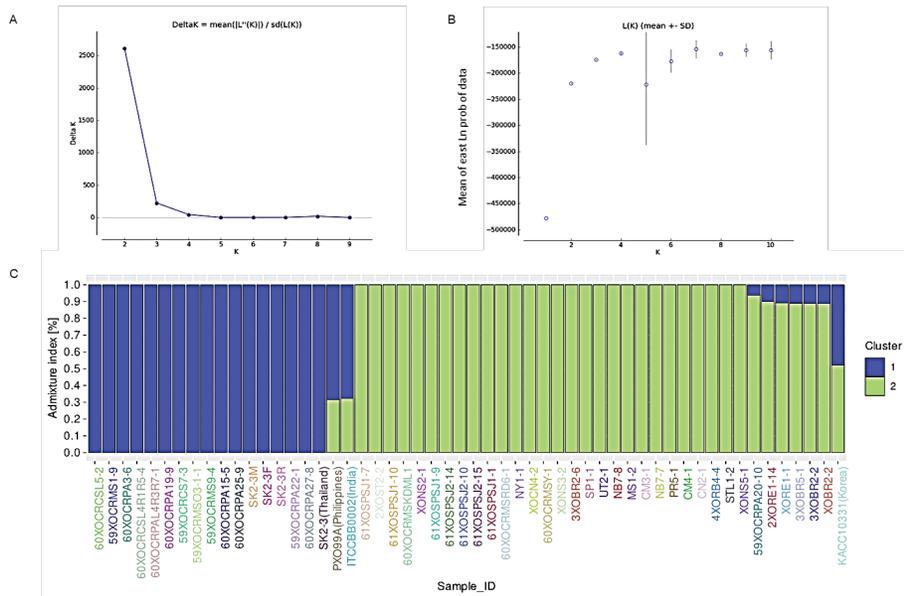
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อโดยใช้ SNP 21,181 ตำแหน่ง พบว่า แบ่งเชื้อ Xoo ออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ (Cluster) และ 10 กลุ่มย่อย (Clade) คือ Cluster 1 ประกอบด้วย กลุ่มย่อย 1-6 ที่มาจากไทย และ Cluster 2 ประกอบด้วย กลุ่มย่อยที่ 7-8 ซึ่งเป็นเชื้อจากเกาหลี อินเดีย และฟิลิปปินส์ และกลุ่มย่อยที่ 9 เป็นเชื้อ Xoo จาก จ. สุโขทัย (SK2-3 ทุกโคลน) และกลุ่มย่อยที่ 10 เป็นเชื้อ Xoo จาก จ. เชียงราย (Figure 4A) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย PCA ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อ Xoo ได้เป็น 2 Cluster 10 Clade เช่นเดียวกัน โดย Cluster 1 ประกอบด้วย กลุ่มย่อย 1-6 และ Cluster 2 ประกอบด้วยกลุ่มย่อย 7-10 (Figure 4B) ข้อมูลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี neighbor joining และ PCA แต่การวิเคราะห์ด้วย PCA จะเห็นได้ชัดเจนว่าเชื้อ Xoo จากต่างประเทศทุกสายพันธุ์แยกออกห่างจากกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ของไทยอย่างชัดเจน

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายในประชากรเชื้อ Xoo ของไทยที่เก็บได้จาก 14 จังหวัด พบว่า ประชากรเชื้อ Xoo มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากการวิเคราะห์ SNP จำนวน 21,181 ตำแหน่ง สามารถแบ่งเชื้อ Xoo ของไทยได้ถึง 8 กลุ่มย่อย และเชื้อที่เก็บได้จากจังหวัดเดียวกันมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งเห็นได้จากเชื้อในกลุ่มย่อยที่ 2 กลุ่มย่อยที่ 5 กลุ่มย่อยที่ 6 กลุ่มย่อยที่ 9 และกลุ่มย่อยที่ 10 ซึ่งแบ่งตามเชื้อที่มีแหล่งที่มาจาก จ. นครศรีธรรมราช ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ สุโขทัย และเชียงราย ตามลำดับ ขณะที่ใน จ. เชียงรายเชื้อมีความผันแปรทาง

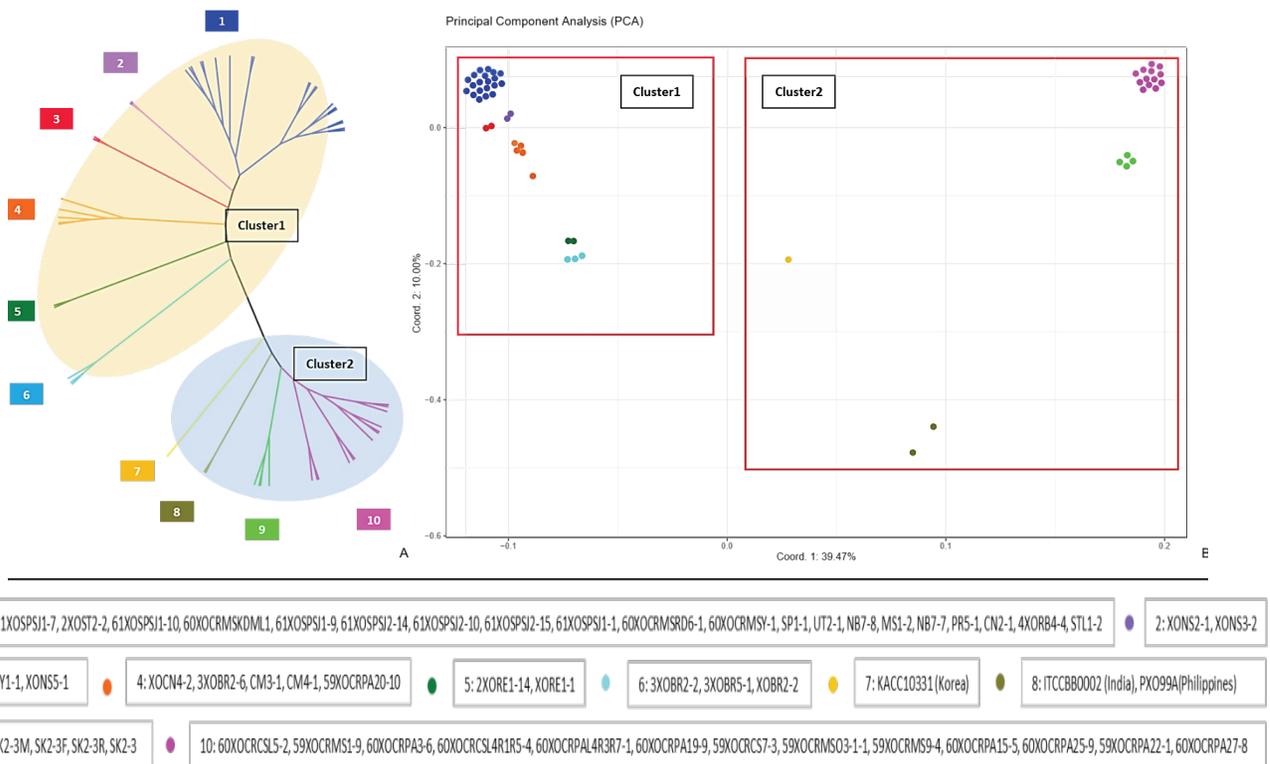
**Table 1** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) strain isolation origin genome sequencing information and population structure

Strains	Race	IRBB1 (Xa1)	IRBB3 (Xa3)	IRBB4 (Xa4)	IRBB5 (Xa5)	IRBB7 (Xa7)	IRBB8 (Xa8)	IRBB10 (Xa10)	IRBB11 (Xa11)	IRBB13 (Xa13)	IRBB14 (Xa14)	IRBB21 (Xa21)	District	Province	Collection year	Infected Rice varieties	%GC con- tent	Total length (bp)	Genes number	CDSs number	%Mapping	SNP Indel	Total SNP and Indel	Cluster of Population Structure	Clade of PCA and NJ	
61XOSPJSJ1-7	1	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD47	63.98	4,278,866	3,826	3,771	98.15	14,440	1,003	15,443	2	1
2XOST2-2	2	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Ban Dan Lan Ho	Sukhothai	2555	Phitsanulok 2	63.96	4,325,629	3,885	3,830	97.90	14,683	1,014	15,697	2	1
3XOBR2-2	4	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	Mueang	Buri Ram	2555	Khao Dawk Mali 105	63.98	4,309,040	3,872	3,816	97.76	13,613	898	14,511	2	6
61XOSPJSJ1-10	5	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD47	63.98	4,279,994	3,825	3,770	98.06	14,338	998	15,336	2	1
2XORE1-14	6	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Si Prachan	Phra Pradaeng	2555	Khao Dawk Mali 105	63.95	4,291,105	3,864	3,808	98.17	14,135	1,018	15,153	2	5
60XOCRMSKDM1	7	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Mae Sai	Chiang Rai	2560	Khao Dawk Mali 105	63.98	4,283,646	3,832	3,777	98.08	14,182	996	15,178	2	1
60XOCRMSL5-2	8	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Chiang Saen	Chiang Rai	2560	IRBB5	64.01	4,276,370	3,840	3,785	99.41	3,749	304	4,053	1	10
3XON85-1	10	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Huay Rat	Buri Ram	2555	Khao Dawk Mali 105	63.96	4,355,345	3,931	3,875	97.53	14,038	918	14,956	2	6
XON82-1	12	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Tha Sala	Nakhon Si Thammarat	2555	Sang Yod Phatthalung	63.96	4,320,127	3,875	3,820	97.32	14,287	1,007	15,294	2	2
61XOSPJSJ1-9	13	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD47	63.95	4,316,995	3,874	3,819	96.29	14,403	980	15,383	2	1
61XOSPJSJ2-14	14	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD49	63.95	4,321,379	3,866	3,831	97.25	14,363	982	15,345	2	1
61XOSPJSJ2-10	15	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD49	63.95	4,317,312	3,872	3,817	97.93	14,296	985	15,281	2	1
61XOSPJSJ2-15	17	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD49	63.95	4,317,148	3,873	3,818	98.05	14,364	984	15,348	2	1
XOBR2-2	18	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	Mueang	Buri Ram	2554	Khao Dawk Mali 105	63.99	4,306,860	3,871	3,815	98.06	14,158	905	15,063	2	6
61XOSPJSJ1-1	18	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	Si Prachan	Suphan Buri	2561	RD47	63.98	4,280,473	3,822	3,767	98.23	14,440	1,056	15,496	2	1
60XOCRMSRD6-1	19	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mae Sai	Chiang Rai	2560	RD6	63.96	4,331,318	3,899	3,844	97.37	14,466	1,047	15,533	2	1
NY1-1	20	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mueang	Nakhon Nayok	2552	Unknown	63.98	4,300,141	3,865	3,809	97.47	14,311	953	15,264	2	3
XOCN4-2	20	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mueang	Chai Nat	2555	RD31	63.92	4,354,807	3,932	3,876	94.70	14,507	965	15,472	2	4
60XOCRMSY-1	20	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mae Sai	Chiang Rai	2560	RD6	63.98	4,267,520	3,827	3,772	98.53	14,583	1,012	15,595	2	1
XON83-2	21	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Sai Noi	Nakhon Si Thammarat	2555	Lab Nok Pattani	63.97	4,300,272	3,858	3,803	97.45	14,215	998	15,213	2	2
3XOBR2-6	22	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mueang	Buri Ram	2555	Khao Dawk Mali 105	63.96	4,298,879	3,875	3,819	97.36	14,021	932	14,953	2	4
SP1-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Si Prachan	Suphan Buri	2551	Phitsanulok 2	64.01	4,245,577	3,808	3,753	98.50	14,370	984	15,354	2	1
UT2-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Nong Chang	Uthai Thani	2552	Phitsanulok 2	64.00	4,252,542	3,825	3,770	98.55	14,454	1,000	15,454	2	1
NB7-8	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Sai Noi	Nonthaburi	2552	Phitsanulok 2	64.02	4,219,315	3,781	3,734	98.64	14,271	1,025	15,296	2	1
MS1-2	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mueang	Maia Sarakhom	2552	Unknown	63.94	4,345,626	3,934	3,879	96.29	14,395	1,058	15,453	2	1
CM3-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mae Rim	Chiang Mai	2552	RD6	63.96	4,306,448	3,875	3,819	93.57	14,142	977	15,119	2	4
NB7-7	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Sai Noi	Nonthaburi	2552	Phitsanulok 2	63.99	4,256,123	3,813	3,758	98.60	14,282	1,026	15,308	2	1
PP5-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Ban Sang	Prachin Buri	2552	Unknown	64.00	4,269,710	3,832	3,777	98.62	14,287	1,010	15,297	2	1
CM4-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mae Rim	Chiang Mai	2552	Unknown	63.94	4,328,882	3,888	3,832	97.77	14,120	969	15,089	2	4
CM2-1	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Manorom	Chai Nat	2552	Suphan Buri 3	63.94	4,366,829	3,945	3,890	96.38	14,409	979	15,388	2	1
4XORB4-4	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Photharam	Ratchaburi	2555	RD31	63.98	4,283,422	3,849	3,794	98.47	14,821	1,072	15,893	2	1
59XOCRMS1-9	23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Mae Sai	Chiang Rai	2559	San pah tawng	63.97	4,284,078	3,851	3,796	99.02	3,719	299	4,018	1	10
60XOCRA3-6	24	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	RD6	64.01	4,264,908	3,824	3,769	99.51	3,660	314	3,974	1	10
60XOCRCSLRTR6-4	25	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	Chiang Saen	Chiang Rai	2560	WS16-S19-36	64.01	4,273,303	3,833	3,778	99.37	3,737	299	4,036	1	10
60XOCRPALRR7-1	26	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	WS16-S19-36	64.00	4,274,010	3,827	3,772	99.44	3,749	321	4,070	1	10
60XOCRA19-9	27	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	RD6	64.01	4,267,884	3,832	3,777	99.76	3,815	324	4,139	1	10
59XOCRC3-3	28	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	Chiang Saen	Chiang Rai	2559	RD15	64.01	4,274,704	3,829	3,774	99.48	3,733	293	4,026	1	10
59XOCRMSO3-1-1	29	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	Chiang Saen	Chiang Rai	2559	RD6	64.01	4,264,075	3,831	3,776	99.53	3,686	310	3,996	1	10
59XOCRMS9-4	30	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	Mae Sai	Chiang Rai	2559	RD6	63.99	4,233,766	3,796	3,743	98.51	3,666	294	3,960	1	10
59XOCRA20-10	30	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2559	RD6	63.94	4,292,183	3,871	3,815	97.30	14,134	901	15,035	2	4
60XOCRA15-5	31	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	RD10	63.98	4,327,387	3,892	3,837	98.92	3,890	337	4,227	1	10
60XOCRA25-9	32	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	RD6	63.99	4,309,941	3,885	3,830	99.07	3,845	306	4,151	1	10
SK2-3M	32	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2551	Khao Dawk Mali 105	64.00	4,277,565	3,851	3,794	99.91	4	9	13	1	9
SK2-3F	33	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	Sawankhalok	Sukhothai	2551	Khao Dawk Mali 105	64.00	4,275,529	3,846	3,789	99.90	3	8	11	1	9
59XOCRA22-1	33	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	Sawankhalok	Sukhothai	2551	Khao Dawk Mali 105	64.00	4,272,696	3,841	3,784	99.92	4	8	12	1	9
60XOCRA27-8	34	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	Phan	Chiang Rai	2559	RD6	63.97	4,292,738	3,861	3,806	99.54	3,875	292	4,167	1	10
STL1-2	49	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Phan	Chiang Rai	2560	RD6	64.01	4,274,047	3,827	3,772	99.76	3,792	324	4,116	1	10
XONS5-1	50	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	Tha Sala	Nakhon Si Thammarat	2555	Lab Nok Pattani	63.96	4,328,840	3,890	3,835	97.29	14,779	1,086	15,865	2	1
XORE1-1	51	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	Si Prachan	Suphan Buri	2554	Khao Dawk Mali 105	63.97	4,265,097	3,836	3,780	98.46	14,320	1,021	15,341	2	5
ITCBB0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	India	India	2562	Pusa Basmati 1	63.80	4,731,568	4,505	4,299	98.18	7,670	465	8,135	1	-
KACC10331	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Korea	Korea	2548	Unknown	63.69	4,941,439	4,300	4,227	97.89	7,544	607	8,151	2	-
PXO99A	-	S	S	S	S	S	S	R	S	S	MR*	-	Philippines	Philippines	2551	Unknown	63.63	5,240,075	5,048	4,988	97.26	7,684	363	8,047	1	8
SK2-3	33	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Sawankhalok	Sukhothai (Thailand)	2551	Khao Dawk Mali 105	63.71	4,934,446	4,926	4,723	100.00	-	-	-	1	9

MR = Lesion length > 5-10cm; <sup>2/3</sup>S = Susceptible (<6cm); <sup>3/4</sup>R = Resistance (>6cm) (ttvttvtt, 2552)



**Figure 3** Population structure of 50 Xoo strains compared with Xoo reference strains KACC10331, ITC-CBB0002, PXO99A and SK2-3 based on 21,181 SNPs. (A) Delta K graph determined the maximum value at K = 2. (B) Mean of probabilities lnP (K) and their standard deviation of posterior probability. (C) Q plot clustering of population structure base on K = 2 (sort by Q)



**Figure 4** Cluster analysis of 50 Xoo strains compared with reference Xoo genomes KACC10331, ITC-CBB0002, PXO99A and SK2-3 base on 21,181 SNPs. (A) Neighbor-joining clustering tree. (B) Principal component analysis (PCA)

พันธุกรรมสูง สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยส่วนหนึ่งอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 10 และอีกส่วนหนึ่งอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1 ยกเว้นสายพันธุ์ 59XOCRPA20-10 ที่อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 4 โดยในกลุ่มย่อยที่ 10 เชื้อส่วนใหญ่จะสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียืนต้นทาน xa5 ยกเว้นสายพันธุ์ 60XOCRCSL5-2 และ 59XOCRMS1-9 และในกลุ่มย่อยที่ 1 เป็นเชื้อที่ไม่เข้าทำลายข้าวที่มียืนต้นทาน xa5 ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ไม่ได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อในกลุ่มย่อยที่ 1 กลุ่มย่อยที่ 3 และกลุ่มย่อยที่ 4 ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ Xoo กับปีที่เก็บเชื้อและพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้ (Table 1) ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อ Xoo มีความสัมพันธ์บางส่วนกับแหล่งที่เก็บเชื้อเท่านั้น ดังที่เคยรายงานไว้โดย Zheng *et al.* (2020) ที่พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ Xoo ในเอเชียมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่พบการระบาดและแยกเชื้อ Xoo เนื่องจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ที่ได้รับทั้งสภาพอากาศ ชนิดของดิน และการเลือกใช้พันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันส่งผลให้เชื้อ Xoo เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้

จากการศึกษาพันธุกรรมของประชากรเชื้อ Xoo ส่วนใหญ่พบว่า มีความสัมพันธ์กันกับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อกับพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อได้ หรือปีที่เก็บ ตลอดจนชนิดของ race ที่จำแนกได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของรินนภา (2556) ที่พบว่า พันธุ์ปลูกที่มีระบบนิเวศเกษตรต่างกันมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม เชื้อที่แยกจากพันธุ์ข้าวชนิดเดียวกัน แต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน เมื่อจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA ของเทคนิค AFLP เชื้อเหล่านี้จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ต่างกัน

## สรุปผลการทดลอง

การศึกษาจีโนมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว จำนวน 50 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2561 จากแหล่งปลูกข้าว 14 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ อุทัยธานี นครนายก สุพรรณบุรี ชัยนาท ราชบุรี นนทบุรี ปราจีนบุรี และนครศรีธรรมราช โดยการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วย Illumina HiSeq platform และนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อ Xoo ที่ศึกษาด้วย PacBio platform จากประเทศอินเดีย เกาหลี ฟิลิปปินส์ และไทย ได้แก่ สายพันธุ์ ITCCBB0002 สายพันธุ์ KACC10331 สายพันธุ์ PXO99A และสายพันธุ์ SK2-3 ตามลำดับ พบว่า เชื้อ Xoo ของไทยมีขนาดจีโนมอยู่ระหว่าง 4,219,315-4,366,829 คู่เบส มี GC content อยู่ที่ 63.98% มีจำนวนยีนอยู่ระหว่าง 3,787-3,945 ยีน มีตำแหน่ง SNP อยู่ระหว่าง 3,660 ถึง 14,903 ตำแหน่ง และ Indel อยู่ระหว่าง 292 ถึง 1,086 ตำแหน่ง โดยพบเชื้อสายพันธุ์ XONS5-1 จาก จ. นครศรีธรรมราช มีตำแหน่ง SNP และ Indel รวมกันมากที่สุด เชื้อจาก จ. เชียงรายมีตำแหน่ง SNP และ Indel รวมกันมากที่สุด อยู่ที่ 3,960 ถึง 15,595 ตำแหน่ง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อจากตำแหน่ง SNP จำนวน 21,181 ตำแหน่ง พบว่า ประชากรเชื้อ Xoo ของไทยส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์เชื้อของต่างประเทศอย่างชัดเจน และเมื่อนำข้อมูล SNP มาจัดกลุ่ม พบว่า ประชากรเชื้อ Xoo ของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสามารถแบ่งได้ถึง 8 กลุ่มย่อย โดยพบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อกับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับพันธุ์ข้าวที่พบเชื้อเข้าทำลาย ปีที่สำรวจ และชนิดของ race

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม โครงการ Real Time deployment of pathogen resistance genes in rice (รหัสโครงการ P-16-50284) และโครงการระบบแนะนำพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในแต่ละพื้นที่และฤดูกาล (รหัสโครงการ P-18-51456) โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

## เอกสารอ้างอิง

- จารุวี อันเซตา คณิงนิจ ศรีวิลัย ธีรยุทธ ตูจันดา และ สุจินต์ ภัทรภูวดล. 2562. การกระจายตัวของ pathotype ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่พบระบาดในจังหวัดสุพรรณบุรี ปี พ.ศ. 2561. หน้า 132. ใน: *การประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 14*. สมาคมอารักขาพืชไทย กรุงเทพฯ.
- ปริตนา วงศ์ล้อม. 2558. การประเมินโครงสร้างประชากรของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 75 หน้า.
- ปริตนา วงศ์ล้อม จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์ สุจินต์ ภัทรภูวดล และ วิชัย โสสิตรัตน. 2558. การประเมินความหลากหลายในการก่อโรคของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย. *ว.วิทย์.เกษตร*. 46: 165-175.
- พยอม โคเบลล์ และ ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี. 2560. โรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย: สถานการณ์การระบาดของโรคปัจจุบัน. *Unisearch J*. 4: 23-27.
- ไพเราะ ขวัญงาม มัชฌิมา สังข์วรรณะ นุจรินทร์ จังชันธุ์ จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์ และ สุจินต์ ภัทรภูวดล. 2562. การสำรวจโรคและการศึกษาการกระจายตัวของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในจังหวัดเชียงรายในปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2561. น.136. ใน: *การประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 14*. สมาคมอารักขาพืชไทย, กรุงเทพฯ.
- รินนภา สมสนุก. 2556. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 89 หน้า.
- แสงชัย ศรีประโคน. 2552. การจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) และการบ่งชี้ตำแหน่งยีนต้านทานในข้าวพื้นเมืองพันธุ์เชียงราย (Oryza sativa L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.
- Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a exible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15): 2114-2120.
- Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 23(19): 2633-2635.
- Bradnam, K.R., J.N. Fass, A. Alexandrov, P. Baranay, M. Bechner, I. Birol, S. Boisvert, J.A. Chapman, G. Chapuis, R. Chikhi and H. Chitsaz. 2013. Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *Gigascience*. 2(1): 2047-2170.
- Carpenter, S.C., P. Mishra, C. Ghoshal, P.K. Dash, L. Wang, S. Midha, G.S. Laha, J.S. Lore, W. Kositratana, N.K. Singh, K. Singh, P.B. Patil, R. Oliva, S. Patarapuwadol, A.J. Bogdanove and R. Rai. 2020. An xa5 resistance gene-breaking Indian strain of the rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is nearly identical to a Thai strain. *Front. microbiol*. 11: 1-8.

- Chien, C.C., M.Y. Chou, C.Y. Chen and M.C. Shih. 2019. Analysis of genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* populations in Taiwan. *Sci. Rep.* 9(1): 1-15.
- Criscuolo, N.G., and C. Angelini. 2020. StructuRly: A novel shiny app to produce comprehensive: detailed and interactive plots for population genetic analysis. *PLoS One.* 15(2): e0229330.
- Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, C.A. Albers, E. Banks, M.A. DePristo, R.E. Handsaker, G. Lunter, G.T. Marth, S.T. Sherry, and G. McVean. 2011. The variant call format and VCF tools. *Bioinformatics.* 27(15): 2156-2158.
- Eamchit, S. and T. W. Mew. 1982. Comparison of virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Thailand and the Philippines. *Plant Dis.* 66: 556-559.
- Earl, D. A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4: 359-361.
- Huguet-Tapia, J.C., Z. Peng, B. Yang, Z. Yin, S. Liu, and F.F. White. 2016. Complete genome sequence of the African strain AXO1947 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Genome Announc.* 4(1): e01730-15.
- Leach, J. E., H. Leung, R. J. Nelson and W. M. Twng-wah. 1995. Population biology of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and approaches to its control. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 298-304.
- Lee, B.M., Y.J. Park, D.S. Park, H.W. Kang, J.G. Kim, E.S. Song, I.C. Park, U.H. Yoon, J.H. Hahn, B.S. Koo, and G.B. Lee. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33(2): 577-586.
- Li, H., and R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25(14): 1754-1760.
- McKenna, A., M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernysky, K.Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly and M.A. DePristo. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20(9): 1297-1303.
- Midha, S., K. Bansal, S. Kumar, A.M. Girija, D. Mishra, K. Brahma, G.S. Laha, R.M. Sundaram, R.V. Sonti, and P.B. Patil. 2017. Population genomic insights into variation and evolution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Sci. Rep.* 7(1): 1-13.
- Mondal, K.K., G. Verma, A. Kulshreshtha, Y. Rajrana, C. Mani, M. Soni, K. Reddy, T. Ghoshal, A. Lakshmi and K. Ns. 2020. Complete genome sequence of Indian race 4 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of bacterial blight of rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33(4): 573-575.
- Ou, S.H. 1985. Rice Disease. 2<sup>nd</sup> (ed.) Commonwealth Agricultural Bureaux, United Kingdom. 380 p
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945-959.
- Quibod, I.L., A. Perez-Quintero, N.J. Booher, G.S. Dossa, G. Grande, B. Szurek, C.V. Cruz, A.J. Bogdanove and R. Oliva. 2016. Effector diversification contributes to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* phenotypic adaptation in a semi-isolated environment. *Sci. Rep.* 6(1): 1-11.

- Salzberg, S.L., D.D. Sommer, M.C. Schatz, A.M. Phillippy, P.D. Rabinowicz, S. Tsuge, A. Furutani, H. Ochiai, A.L. Delcher, D. Kelley and R. Madupu. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 A. *BMC Genom.* 9(1): 1-16.
- Schmieder, R. and R. Edwards. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27(6): 863-864.
- Seemann, T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30(14): 2068-2069.
- Triplett, L.R., J.P. Hamilton, C.R. Buell, N.A. Tisserat, V. Verdier, F. Zink and J.E. Leach. 2011. Genomic analysis of *Xanthomonas oryzae* isolates from rice grown in the United States reveals substantial divergence from known *X. oryzae* pathovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(12): 3930-3937.
- Vikal, Y. and D. Bhatia. 2017. Genetics and genomics of bacterial blight resistance in rice. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/54259>. Accessed: 14 February 2021.
- Wick, R.R., L.M. Judd, C.L. Gorrie and K.E. Holt. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13(6): e1005595.
- Wickham, H. 2011. Ggplot2. *WIREs Comp Stat.* 3(2): 180-185.
- Zheng, J., Z. Song, D. Zheng, H. Hu, H. Liu, Y. Zhao, M. Sun, L. Ruan and F. Liu. 2020. Population genomics and pathotypic evaluation of the bacterial leaf blight pathogen of rice reveals rapid evolutionary dynamics of a plant pathogen. bioRxiv 704221