

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP เพื่อตรวจประชากรเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv.
oryzae สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยด้วยเทคนิค MassARRAY
Development of SNP Molecular Markers for Detection of *Xanthomonas*
oryzae pv. *oryzae* Population Causing Bacterial Blight Disease of Rice
in Thailand Using MassARRAY Technique

ลูกศร ทุมอะริยะ^{1/} ธิติมา จินตกานนท์^{1/} วินิตชาญ รื่นใจชน^{2/} สุจินต์ ภัทรภูวadol^{3/*}
Luksorn Tumariya^{1/} Thitima Chintaganon^{1/} Vinitchan Ruanjaichon^{2/}
Sujin Patarapuwadol^{3/*}

Received 27 Mar. 2024/Revised 20 May 2024/Accepted 20 May 2024

ABSTRACT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo), the causal organism of bacterial blight, exhibits genetic diversity and adapts continuously to overcome rice varieties with inherent resistance to this disease. To effectively manage bacterial blight, rapid and high-throughput diagnostic tools are essential for monitoring changes in Xoo populations across different regions. In this study, we aimed to develop molecular SNP markers using data from housekeeping gene clusters in Xoo. We analyzed 50 Xoo strains collected during 2008 - 2018 from rice cultivation areas in 14 provinces of Thailand. We designed Xoo-SNPs (single nucleotide polymorphisms) to enable high-throughput multiplex detection based on MassARRAY technology. Our research successfully developed 9 SNP positions derived from eight housekeeping genes (*DnaK*, *gluS*, *leuA*, *pyk*, *pyrH*, *RecA*, *rpoB*, and *tpiA*). These markers effectively tracked Xoo populations, representing 33 races prevalent in Thailand, within a remarkable turnaround time of 2 days, excluding the sample preparation step. Furthermore, our approach allowed the simultaneous examination of up to 45 samples per day. Notably, the developed Xoo-SNPs MassARRAY-based markers not only differentiated Xoo strains

^{1/} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/} Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{2/} ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จ.ปทุมธานี 12120

^{2/} National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathum Thani 12120, Thailand

^{3/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{3/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

based on their pathogenicity toward rice varieties carrying the *xa5* resistance gene but also identified markers specific to the geographical origin of the strains in provinces such as Nakhon Si Thammarat, Buriram, Roi Et, Sukhothai, and Chiang Rai. However, no significant correlation was observed between the SNP markers designed from housekeeping genes and the race-specific or disease severity characteristics.

Keywords: bacterial blight disease; housekeeping genes; MassARRAY; SNP marker; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

บทคัดย่อ

โรคขอบใบแห้งในข้าวเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และสามารถปรับตัวให้เข้าทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิดต่อโรคนี้ได้อย่างต่อเนื่อง การพัฒนาเครื่องมือตรวจวินิจฉัยเชื้อ Xoo แบบ high-throughput multiplex detection ทำให้ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อในแต่ละพื้นที่ และช่วยให้สามารถวางแผนพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP จากข้อมูลกลุ่มยีน housekeeping genes จากเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ที่สำรวจในช่วงปี พ.ศ. 2551 ถึงปี พ.ศ. 2561 จากพื้นที่ปลูกข้าว 14 จังหวัดของประเทศไทย เพื่อตรวจติดตามประชากรเชื้อ Xoo ด้วยเทคโนโลยีของ MassARRAY งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล Xoo-SNPs MassARRAY based จำนวน 9 ตำแหน่ง

ที่ออกแบบจาก housekeeping genes จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *DnaK gluS leuA pyk pyrH RecA rpoB* และ *tpiA* ที่สามารถตรวจประชากรเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ 33 races ที่พบระบาดในประเทศไทยได้สำเร็จ ภายใน 2 วัน โดยไม่นับรวมขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อ อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบได้มากถึง 45 ตัวอย่าง/วัน นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล Xoo-SNPs MassARRAY based ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจแยกกลุ่มเชื้อที่ทำลายหรือไม่ทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิด *xa5* และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของเชื้อใน จ.นครศรีธรรมราช บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด สุโขทัย และเชียงราย อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล Xoo-SNPs MassARRAY based ที่ออกแบบจาก housekeeping genes กับชนิดของ race หรือลักษณะความรุนแรงของโรค

คำสำคัญ: โรคขอบใบแห้ง; housekeeping genes; MassARRAY; SNP marker; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

บทนำ

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ในข้าวเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและความผันแปรภายในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หรือการปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศการปลูกข้าวในแต่ละพื้นที่ ทำให้เชื้อพัฒนาเข้าทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิดโรคขอบใบแห้งได้อย่างต่อเนื่อง ในประเทศไทยมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อ Xoo ในรูปแบบปฏิกิริยาการเกิดโรค (physiological race) ด้วยปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการเกิดโรคใน

ข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic lines) (แสงชัย, 2552; ปริศนา และคณะ, 2558ก; ไพเราะ และคณะ, 2562; จารูวี และคณะ, 2564) และเครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอหลายชนิด ได้แก่ amplified fragment length polymorphism (AFLP), repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR), RFLP-Tal และ PCR จาก *avr* gene (สุธิตา และคณะ, 2553; ปริศนา และคณะ, 2558ข) ด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยี next generation sequencing (NGS) ช่วยให้การศึกษข้อมูลทางด้านจีโนมมีความรวดเร็วและราคาถูกลง จึงมีการศึกษาจีโนมเชื้อ *Xoo* สายพันธุ์ SK2-3 จาก จ. สุโขทัย ด้วยเทคนิค single-molecular real-time; SMRT (Pac Bioscience; PacBio) (Carpenter et al., 2020) และจีโนมเชื้อ *Xoo* จำนวน 50 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค Illumina HiSeq platform (อติมา และคณะ, 2565) จากการศึกษาดังที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า เชื้อ *Xoo* ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและประชากรมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว วิธีการศึกษาในระดับ physiological race จำเป็นต้องใช้แรงงานและระยะเวลานาน ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลในบางเทคนิคยังต้องอาศัยความชำนาญ ใช้ระยะเวลาดทดสอบค่อนข้างนาน มีค่าใช้จ่ายสูง และตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนจำกัดในคราวเดียวกัน จึงส่งผลให้ยากต่อการติดตามความหลากหลาย หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของเชื้อในแต่ละพื้นที่ได้ทันทั่วถึง และยากต่อการออกแบบโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ให้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อ

Housekeeping genes คือ ยีนของเซลล์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา และเกี่ยวข้องกับการกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ในเชื้อแบคทีเรียนั้น

มีความสำคัญต่อการดำรงชีพ ค่อนข้างมีความอนุรักษ์สูง (Marcelletti et al., 2010) ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่พบใน housekeeping genes จึงส่งผลต่อความหลากหลายและวิวัฒนาการของสายพันธุ์เชื้อได้ (Maiden et al., 1998) เช่น ยีน *RecA* มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการซ่อมแซม การปรับตัวต่อสภาวะเครียด และค่อนข้างมีความอนุรักษ์ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในการเข้าทำลายยีนต้านทานโรคหรือการก่อโรคได้ (Rabibhadana et al., 1993) รวมไปถึงการพบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน *GyrB* ที่มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างประชากรเชื้อ *Xoo* (Hajri et al., 2012) ซึ่ง housekeeping genes เหล่านี้มีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ (Marcelletti et al., 2010) เช่น รายงานของ Sakthivel et al. (2021) ที่ใช้ housekeeping genes ได้แก่ *DnaK FyuA FusA GapA gltA gyrB lepA* และ *rpoD* มาประเมินความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *Xoo* บริเวณหมู่เกาะอันดามันของประเทศอินเดีย และในประเทศไทยพบรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ housekeeping genes ภายในจีโนมเชื้อ *Xoo* จำนวน 50 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลได้ (อติมา และคณะ, 2565)

Single nucleotide polymorphism (SNP) คือ ความแปรผันหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมรูปแบบหนึ่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ซึ่งในจีโนมของสิ่งมีชีวิตพบมีตำแหน่ง SNP เป็นจำนวนมาก โดยในเชื้อ *Xoo* มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP

โดยออกแบบจากกลุ่ม race และ lineage เพื่อใช้ติดตามกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ในฟิลิปปินส์ (Aung, 2017) และรายงานของ ธิติมา และคณะ (2565) นำข้อมูล SNP ทั้งจีโนมจำนวน 21,181 ตำแหน่ง มาจัดกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ในประเทศไทยด้วยวิธี neighbor joining clustering และ principal component analysis (PCA) พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาที่มีตัวอย่างและมี SNP ที่ต้องการศึกษาจำนวนมาก นิยมทำในรูปแบบ PCR-based ส่งผลให้การวิเคราะห์แบบมัลติเพล็กซ์ใช้ระยะเวลามากขึ้น จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาประยุกต์ใช้

การพัฒนาเทคโนโลยี MassARRAY ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ DNA (mass) ของเบสบนสายลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ SNP ได้พร้อมกันถึง 40 ตำแหน่งอย่างรวดเร็วในปฏิกิริยาเดียวกัน (multiplex assays) (Patiya, 2020) ซึ่งเทคโนโลยีนี้ได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการระบุเชื้อแบคทีเรียของงานวิจัยทางด้านคลินิก (Nyasinga et al., 2019) การพัฒนาเครื่องมือตรวจวินิจฉัยที่มีความรวดเร็วและรองรับตัวอย่างจำนวนมากแบบ high-throughput สำหรับใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อ Xoo จะมีผลต่อการวางแผนพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อในแต่ละพื้นที่ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP จากข้อมูลกลุ่มยีน housekeeping genes จากเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ที่สำรวจในช่วงปี พ.ศ. 2551-2561 จากพื้นที่ปลูกข้าว 14 จังหวัดของประเทศไทย เพื่อตรวจติดตามประชากรเชื้อ Xoo ด้วยเทคโนโลยีของ

MassARRAY ให้รองรับตัวอย่างจำนวนมากแบบ high-throughput multiplex detection

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรีย Xoo และข้อมูลจีโนม

คัดเลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ และข้อมูลจีโนมจากการศึกษาของ ธิติมา และคณะ (2565) ซึ่งเป็นตัวแทนของ 33 races ได้แก่ race1 2 4 5 6 7 8 10 12 13 14 15 17 18 19 20 21 22 23, 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 49 50 และ 51 ตามลำดับที่สำรวจระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 จากพื้นที่ปลูกข้าว 14 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ อุทัยธานี นครนายก สุพรรณบุรี ชัยนาท ราชบุรี นนทบุรี ปราจีนบุรี และ นครศรีธรรมราช แบ่งเชื้อเป็น 5 กลุ่มจากรูปแบบปฏิกิริยาการเกิดโรคในข้าวสายพันธุ์คู่แข่ง (NILs) ที่มียืนต้านทานเดี่ยว (*Xa* gene) จำนวน 11 ยีน ได้แก่ *Xa1* *Xa3* *Xa4* *xa5* *Xa7* *xa8* *Xa10* *Xa11* *xa13* *Xa14* และ *Xa21* (ปริศนา และคณะ, 2558ก; ไพเราะ และคณะ, 2562; จารูวี และคณะ, 2564) มาศึกษาหาตำแหน่ง housekeeping genes เพื่อออกแบบและทดสอบพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP

2. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มยีน housekeeping genes

คัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีน housekeeping genes จำนวน 18 ยีน ได้แก่ *clpA* *DnaK* *Efp* *FusA* *Gap* *GlnA* *gluS* *glyA* *GyrB* *leuA* *proC* *pyk* *pyrH* *RecA* *rho* *rpoB* *rpoD* และ *tpiA* จากฐานข้อมูล National Centre for Biotechnology Information (NCBI) Xanthomonas.org และ UniProt จากจีโนมเชื้อ Xoo สายพันธุ์ PXO99A KACC10331 และ SK2-3 จากฟิลิปปินส์

เกาหลี และไทย ตามลำดับ (Salzberg et al., 2008; Lee et al., 2005; Carpenter et al., 2020)

วิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Blastn เพื่อค้นหาตำแหน่งยีนภายในจีโนมของเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง SK2-3 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนออกจากจีโนมด้วยโปรแกรม samtools faidx (<https://www.biostars.org/p/177363>) และทำ reverse complement ด้วยโปรแกรม Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) ตามวิธีการของ ธิติมา และคณะ (2565) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม housekeeping genes และสายพันธุ์อ้างอิง SK2-3 โดยใช้ ClustalW และ MegaX 10.2.6 (Kumar et al., 2018) เพื่อหาความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในแต่ละยีน นำมาออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNP

3. การคัดเลือกตำแหน่ง SNP

คัดเลือกยีนที่พบความแตกต่างภายในลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คัดเลือกมาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) เพื่อจัดกลุ่มเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง SK2-3 ของแต่ละยีน ด้วยวิธี maximum likelihood ตามโมเดลของ Tamura-nei model (Tamura et al., 2011) สร้าง phylogenetic tree ด้วย MegaX 10.2.6 (Kumar et al., 2018) ปรับแต่งด้วย Figtree (Schneider et al., 2000) คัดเลือกยีนที่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ได้ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป และนำข้อมูลตำแหน่ง SNP แต่ละตำแหน่งของแต่ละยีนที่คัดเลือกไว้มาสร้าง phylogenetic tree ต่อไป โดยตำแหน่ง SNP ของยีนที่สามารถแบ่งได้ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป นำมาออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNP

4. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP เพื่อตรวจเชื้อด้วยเทคนิค MassARRAY

นำเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 48 ชม. สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto mini gDNA bacteria kit (Geneaid, Taiwan) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo scientific, USA) จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 10 ng/μl ตรวจสอบความสมบูรณ์ของเส้นดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel ใช้กระแสไฟที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP จากกลุ่ม housekeeping genes ที่คัดเลือกมาออกแบบไพรเมอร์ ประกอบไปด้วย PCR amplification primer และ extension primer ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม MassARRAY Agena Bioscience Assay Design Suite version 2.0 (Agena Bioscience, USA) ตั้งค่าการออกแบบและวิเคราะห์ตามคำแนะนำของบริษัท โดยออกแบบ extension primer ให้จำเพาะต่อบริเวณที่ใกล้เคียงตำแหน่ง SNP ซึ่งจะอยู่ถัดจากเบสสุดท้ายของเส้นไพรเมอร์บริเวณปลาย 3' และอาจเติมเบสที่บริเวณปลาย 5' ของเส้นไพรเมอร์เพื่อปรับน้ำหนักโมเลกุล และส่งส่งเคราะห์กับบริษัทแปซิฟิก ไบโอเทค จำกัด

ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่ออกแบบกับดีเอ็นเอของเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ตามวิธีการของ Gabriel et al. (2009) โดยใช้ชุดน้ำยา PCR accessory set (Agena Bioscience) นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ความเข้มข้น 10 ng/μl เพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง thermal cycler (Eppendorf, USA) ที่อุณหภูมิ 60 °ซ. จำนวน 50 รอบ จากนั้น

กำจัด dNTPs ที่เหลือในผลผลิต PCR ด้วยการทำ shrimp alkaline phosphatase (SAP treatment) นำผลผลิต PCR มาทำปฏิกิริยา single-base extension โดยการเติมน้ำยา iPLEX reagent set (Agena Bioscience) ซึ่งประกอบไปด้วย ddNTPs ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยาหลังจากขยายนิวคลีโอไทด์ไปเพียง 1 เบส (single-base extension termination) ดำเนินการด้วยเครื่อง thermal cycler (Eppendorf, USA) ที่อุณหภูมิ 52 °C. จำนวน 45 รอบ นำ extension product มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 29 µl และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์มวลด้วยเครื่อง MassARRAY โดยการเติม clean resin และอ่านผลบน SpectroCHIP Array เพื่อวัดขนาดมวลของไพรเมอร์ที่บรรจุตำแหน่ง SNP บันทึกผลกราฟ (peak) แต่ละตำแหน่ง SNP จากการวิเคราะห์ด้วย TyperAnalyzer ตรวจสอบความถูกต้องการอ่านมวลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากเทคนิค MassARRAY กับผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการนำมาออกแบบ

5. Xoo-SNPs MassARRAY based เพื่อการตรวจประชากร

นำเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่ออกแบบจากกลุ่มยีน housekeeping genes ด้วยเทคนิค MassARRAY มาประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวแทนประชากรเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ 33 races โดยใช้ชุดน้ำยา PCR accessory set และวิเคราะห์ข้อมูลเทียบกับผลการจัดกลุ่มจากตำแหน่ง SNP ดังกล่าวของเชื้อ 50 สายพันธุ์ที่ได้จาก Illumina sequence platform

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มยีน housekeeping genes ของจีโนม

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม housekeeping genes จำนวน 18 ยีน จากข้อมูลจีโนมเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ 33 races และแบ่งเป็น 5 กลุ่มจากรูปแบบปฏิกิริยาการเกิดโรคในข้าวสายพันธุ์คู่แข่ง (NILs) จำนวน 11 ยีน โดยที่ยีน *xa5* ยังเป็นยีนที่มีความต้านทานแบบกว้างต่อประชากรเชื้อเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นเชื้อในกลุ่มที่ 5 ที่สามารถเข้าทำลายยีน *xa5* โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อจาก จ. เชียงราย และสุโขทัย (Figure 1) เทียบกับข้อมูลยีนดังกล่าวในจีโนมของเชื้อ Xoo สายพันธุ์อ้างอิง SK2-3 พบตำแหน่ง SNP หรือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 11 ยีน ได้แก่ *clpA* *DnaK* *gluS* *glyA* *GyrB* *leuA* *pyk* *pyrH* *RecA* *rpoB* และ *tpiA* ในขณะที่ไม่พบตำแหน่ง SNP จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *Efp* *FusA* *Gap* *GlnA* *proC* *rho* และ *rpoD* ส่วนการเปลี่ยนแปลงในลำดับกรดอะมิโนพบเพียง 6 ยีน ได้แก่ *DnaK* *gluS* *GyrB* *pyk* *rpoB* และ *pyk* พบตำแหน่ง SNP สูงที่สุดจำนวน 14 11 9 และ 6 ตำแหน่งตามลำดับ (Table 1)

จากรายงานของ Maiden et al. (1998) พบว่า การกลายพันธุ์ใน housekeeping genes นั้นส่งผลถึงความหลากหลายและวิวัฒนาการของสายพันธุ์เชื้อ และนำมาใช้ในการตรวจสอบโคลนต่าง ๆ ของสายพันธุ์แบคทีเรียในประชากรเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า ยีน *GyrB* ของเชื้อ Xoo ในประเทศไทย มีตำแหน่ง SNP มากที่ 9 ตำแหน่ง และให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Hajri et al. (2012) ที่พบความแตกต่างมากภายในยีน *GyrB* และนำมาจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ Xoo จากเอเชียและแอฟริกาออกจากกันได้ ซึ่งยีน *GyrB* มีความเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอ การกลายพันธุ์และความต่างภายใน

ยีนนี้ เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (Jung et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง SNP ในยีน *RecA* ซึ่งยีนนี้มีหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ การรวมตัวของดีเอ็นเอ หากมีการแสดงออกในระดับสูงร่วมกับลำดับเบสซ้ำ ๆ ภายในจีโนมและยีน *avr* จะเพิ่มการรวมตัวกันภายในเซลล์ใหม่ ส่งผลให้การทำงานของยีนเปลี่ยนไป โดยพบรายงานกลายพันธุ์ภายในยีน *RecA* จะส่งผลต่อการก่อโรคของเชื้อ *Xanthomonas* (Rabibhadana

et al.,1993; Sukchawalit and Mongkolsuk, 2001) ในขณะที่ *rpoD* ไม่พบตำแหน่ง SNP เนื่องจากยีนดังกล่าวมีความอนุรักษ์สูง มีหน้าที่สำคัญที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย การตอบสนองต่อความเครียด และความรุนแรงการก่อโรค การกลายพันธุ์ของยีนนี้จะส่งผลการถอดรหัสที่ผิดปกติ ส่งผลต่อความรุนแรงและความสามารถในการเข้าทำลายพืชผลลง (Xu et al., 2023)

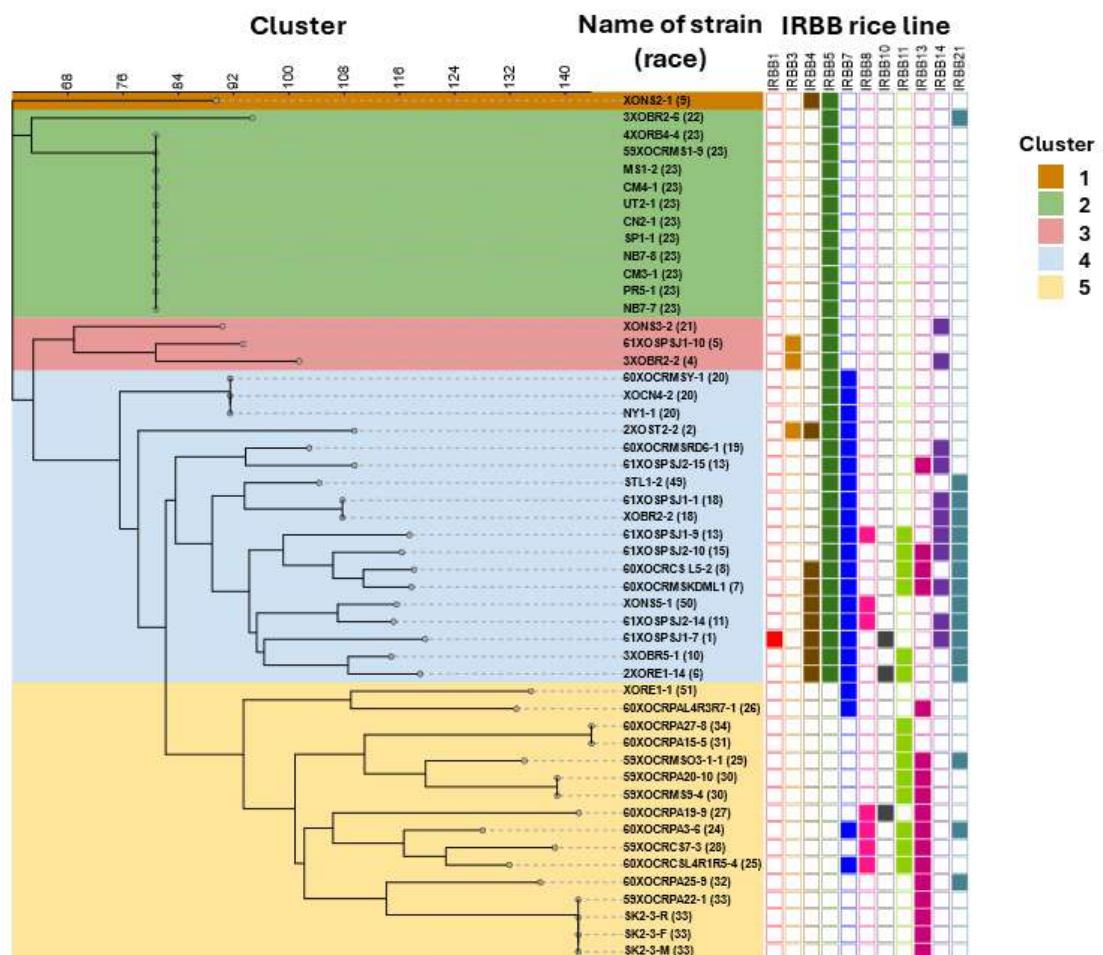


Figure 1 Dendrogram of 50 Xoo strains based on reaction to 11 NIL lines using neighbor-joining tree method (highlight boxes = resistance reaction, no highlight = susceptible reaction)

Table 1 Number of nucleotide and amino acid variations of housekeeping genes and cluster analysis based on nucleic acid sequence of individual gene

Gene	Size(bp)	Product	No. of nucleotide variation	No. of amino acid variation	No. of clusters by maximum likelihood
<i>clpA</i>	2211	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	1	0	2
<i>DnaK</i>	1926	chaperone protein DnaK	3	2	3
<i>Efp</i>	552	translation elongation factor P	0	0	1
<i>FusA</i>	2073	translation elongation factor G	0	0	1
<i>Gap</i>	1002	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	0	0	1
<i>GlnA</i>	1404	glutamine synthetase, type I	0	0	1
<i>gluS</i>	1404	glutamyl-tRNA synthetase	14	5	3
<i>glyA</i>	1254	serine hydroxymethyltransferase	1	0	2
<i>GyrB</i>	2445	DNA gyrase subunit B	9	1	4
<i>leuA</i>	1476	2-isopropylmalate synthase	1	0	2
<i>proC</i>	861	pyrroline-5-carboxylate reductase	0	0	1
<i>pyk</i>	1401	pyruvate kinase	6	5	6
<i>pyrH</i>	723	uridylate kinase	1	0	2
<i>RecA</i>	1035	protein RecA	1	0	2
<i>rho</i>	1890	transcription termination factor Rho	0	0	1
<i>rpoB</i>	4152	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	2	1	3
<i>rpoD</i>	1890	RNA polymerase sigma-70 factor	0	0	1
<i>tpiA</i>	756	triosephosphate isomerase	11	7	3

2. การคัดเลือกตำแหน่ง SNP จากกลุ่มยีน housekeeping genes

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ กลุ่มยีน housekeeping genes บนจีโนมของเชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์เทียบกับ SK2-3 ที่คัดเลือกได้ 11 ยีน มาสร้าง phylogenetic tree พบว่า มี 10 ยีน ได้แก่ *DnaK gluS glyA GyrB leuA pyk pyrH RecA rpoB* และ *tpiA* สามารถแบ่งกลุ่มประชากร เชื้อได้ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป โดยมีความสัมพันธ์กับ ทางภูมิศาสตร์แหล่งที่มาของเชื้อและความต้านทาน โรคบางยีน ยกเว้นยีน *clpA* ที่ให้ผลการแบ่งกลุ่ม ประชากรเชื้อไม่สัมพันธ์กับสิ่งใด โดยยีน *pyk* ให้ผล การแบ่งกลุ่มได้มากที่สุดจำนวน 6 กลุ่ม (Table 1) ยีน *GyrB* สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม พบว่า เชื้อในกลุ่มที่ 1 และ 4 เป็นเชื้อที่พบใน จ. สุโขทัย และร้อยเอ็ดเท่านั้น (Figure 2A) ส่วนยีน *DnaK* สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม พบว่า เชื้อในกลุ่ม ที่ 1 เป็นเชื้อที่พบใน จ. สุโขทัย และเชื้อในกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อที่มาจาก จ. เชียงราย และเข้าทำลาย พันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดใน จ. เชียงราย ได้ (Figure 2B) จึง

เลือกทั้ง 10 ยีน และนำตำแหน่ง SNP ที่พบในแต่ ละยีนมาคัดเลือกเพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย โมเลกุล SNP โดยนำตำแหน่ง SNP ดังกล่าว จำนวน ทั้งสิ้น 54 ตำแหน่ง มาสร้าง phylogenetic tree เพื่อจัดกลุ่มเชื้อ Xoo 50 สายพันธุ์

จาก SNP 54 ตำแหน่ง ที่นำมาทดสอบ พบว่า มี SNP เพียงจำนวน 12 ตำแหน่ง ใน housekeeping genes จำนวน 10 ยีนประกอบด้วย ได้แก่ *DnaK gluS glyA GyrB leuA pyk pyrH RecA rpoB* และ *tpiA* (Table 2) ที่สามารถ แบ่งกลุ่มประชากรเชื้อตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป มีความสัมพันธ์กับทางภูมิศาสตร์แหล่งที่มาของเชื้อ และความต้านทานโรคบางยีน ได้แก่ SNP ที่ตำแหน่ง 161 ของยีน *DnaK* สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งเชื้อในกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อจาก จ. เชียงรายที่ส่วนใหญ่ทำลายข้าวที่มีถิ่นกำเนิดใน จ. เชียงราย เช่นเดียวกับ SNP ที่ตำแหน่ง 511 ของ ยีน *pyk* (Figure 3G) และ SNP ที่ตำแหน่ง 153 ของ ยีน *RecA* (Figure 3J) ในขณะที่ SNP ที่ตำแหน่ง 659 ของยีน *gluS* (Figure 3B) และ SNP ที่ตำแหน่ง 1962

ของยีน *GyrB* (Figure 3E) สามารถแบ่งเชื้อในกลุ่มที่ 1 ที่มาจาก จ. สุโขทัยได้ ส่วน SNP ที่ตำแหน่ง 1020 ของยีน *glyA* (Figure 3C) และ SNP ที่ตำแหน่ง 3593 ของยีน *rpoB* (Figure 3K) สามารถแบ่งเชื้อในกลุ่มที่ 2 ที่มาจาก จ. บุรีรัมย์ ในขณะที่ SNP ที่ตำแหน่ง 1602 ของยีน *GyrB* (Figure 3D) และ SNP ที่ตำแหน่ง 718 ของยีน *pyk* (Figure 3H) สามารถแบ่งเชื้อในกลุ่มที่ 2 ที่มาจาก จ. ร้อยเอ็ดได้ ส่วน SNP ที่ตำแหน่ง 144 ของยีน *pyrH* (Figure 3I) และ SNP ที่ตำแหน่ง 337 ของยีน *tpiA* (Figure 3L) สามารถแบ่งเชื้อในกลุ่มที่ 2 ที่มาจาก จ. นครศรีธรรมราช จึงคัดเลือกตำแหน่ง SNP จากยีนทั้ง 10 ยีนดังกล่าว มาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจเชื้อ Xoo ด้วยเทคนิค MassArray ต่อไป

3. เครื่องหมายโมเลกุล SNP จากกลุ่ม housekeeping genes เพื่อตรวจเชื้อด้วยเทคนิค MassARRAY

ข้อมูล SNP จำนวน 12 ตำแหน่ง จาก housekeeping genes จำนวน 10 ยีน (Table 2) นำมาออกแบบ PCR amplification primer และ extension primer เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ Xoo ด้วยเทคนิค MassARRAY พบว่า PCR amplification primer ให้ขนาดของผลผลิต PCR อยู่ในช่วง 92-140 bp (Table 2) และ extension primer ให้น้ำหนักของโมเลกุล mass (Da) ที่ต่างกัน เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุล SNP ทั้ง 12 ตำแหน่ง มาทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ พบว่า มีเพียงเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 9 ตำแหน่ง (Table 3) ที่อ่านน้ำหนักโมเลกุลของเบสได้ถูกต้อง โดยพบ analyte peak ขนาดใหญ่และไม่เกิด extend peak เกิดผลผลิต PCR ได้ดี (Figure 4A) ไม่ถูกต้องจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 12 *glyA* 1020 01 *GyrB* 1602 และ 01 *GyrB* 1962 เกิด analyte peak ขนาดเล็ก และเกิด

extend peak ขนาดใหญ่ เครื่องหมายโมเลกุล SNP ไม่สามารถสร้างผลผลิต PCR ได้ (Figure 4B) โดยพบว่ามี 2 ใน 3 ตำแหน่งนี้ไม่สามารถอ่านน้ำหนักโมเลกุลของเบสได้ในบางจุด ซึ่งไม่เกิด analyte peak และเกิด extend peak ขนาดใหญ่ (Figure 4C) ซึ่งทั้งสองกรณีนี้ เนื่องจากการที่เครื่องหมายโมเลกุล SNP ไม่สามารถสร้างผลผลิต PCR ได้ และการจับกันเองของ primer-primer dimer (Gabriel et al., 2009) ทั้งนี้ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์พบการแจ้งเตือนว่าไพรเมอร์ที่ไม่สามารถอ่านมวลได้ถูกต้อง จะมีโอกาสเกิด extend primer dimer ร่วมกับไพรเมอร์อื่นในระดับน้อยถึงปานกลาง ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า การออกแบบไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการทำ multiplex assay ด้วยเทคนิค MassARRAY ควรหลีกเลี่ยงการเกิด primer-primer dimer ค่า Tm ระหว่างคู่ไพรเมอร์ไม่ควรต่างกันมากกว่า 4 °ซ. (Nyasinga et al., 2019)

แสดงให้เห็นว่าเทคนิค MassARRAY สามารถวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของเบสของเชื้อ Xoo ได้อย่างถูกต้อง และได้จำนวนมากพร้อมกันในคราวเดียว (high-throughput multiplex detection) ทราบผลได้ภายใน 2 วัน ไม่นับรวมขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อ โดยในเชื้อ 1 ตัวอย่าง สามารถตรวจสอบได้พร้อมกันกับ 9 ไพรเมอร์ อีกทั้งยังตรวจสอบได้มากถึง 45 ตัวอย่าง/วัน ใช้ระยะเวลาน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ เช่น การใช้ข้าวสายพันธุ์คู่แฝดที่ต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 2 เดือน/เชื้อ/ตัวอย่าง การใช้เทคนิค PCR ที่ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ไพรเมอร์ และการวิเคราะห์ข้อมูล SNP ทั้งจีโนมที่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญทางด้านชีวสารสนเทศ (แสงชัย, 2552; ปริศนา

และคณะ, 2558ก; ไพเราะ และคณะ, 2562; สุจิตา และคณะ, 2553; จารูวี และคณะ, 2564; จิติมา และคณะ, 2565) ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุล SNP เพื่อการตรวจหาและจำแนกประชากรเชื้อ Xoo ของเทคนิค MassARRAY จึงมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจำนวนหลายตัวอย่างพร้อม ๆ กันได้ในคราวเดียวกัน

4. Xoo-SNPs MassARRAY based เพื่อการตรวจประชากร

ผลการตรวจประชากร พบว่า ตำแหน่ง SNP ที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์จำเพาะกับแหล่งที่มาของเชื้อ เช่น จ.นครศรีธรรมราช บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด สุโขทัย และเชียงราย และเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกเชื้อเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่

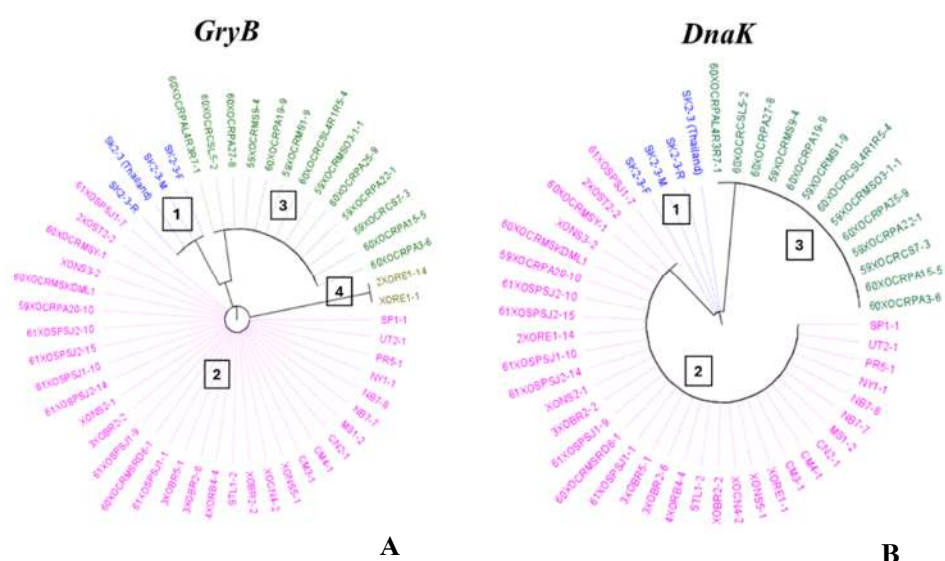


Figure 2 Phylogenetic tree clustering based on nucleic acid sequence of selected housekeeping genes of 50 Thai Xoo strains, (A) Phylogenetic tree of *GyrB* gene, (B) Phylogenetic tree of *DnaK* gene

Table 2 List of twelve SNP primers from housekeeping genes for SNP-Xoo MassARRAY based primer development

SNP name	Gene name	SNP position	SNP (reference/alternate)	Amplicon size (bp)	Remark
03_DnaK_161	<i>DnaK</i>	161	G/A	130	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRCSL5-2, 59XOCRMS1-9)
18_gluS_659	<i>gluS</i>	659	A/G	92	Separate members from Sukhothai (SK2-3F, SK2-3M, SK2-3R)
12_glyA_1020	<i>glyA</i>	1020	G/A	114	Separate members from Buriram (3XOBR2-2, 3XOBR5-1, XOBR2-2)
01_GyrB_1602	<i>GyrB</i>	1602	G/C	109	Separate members from Roi Et (2XORE1-14, XORE1-1)
01_GyrB_1962	<i>GyrB</i>	1962	C/A	133	Separate members from Sukhothai (SK2-3F, SK2-3M, SK2-3R)
15_leuA_120	<i>leuA</i>	120	C/T	115	Separate members from Chiang Rai and Sukhothai, infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRCSL5-2, 59XOCRMS1-9)
14_pyk_511	<i>pyk</i>	511	G/A	130	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRCSL5-2, 59XOCRMS1-9)
14_pyk_718	<i>pyk</i>	718	C/A	105	Separate members from Roi Et (2XORE1-14, XORE1-1)
17_pyrH_144	<i>pyrH</i>	144	A/G	93	Separate members from Nakhon Si Thammarat (XONS2-1, XONS3-2)
07_RecA_153	<i>RecA</i>	153	G/C	98	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRCSL5-2, 59XOCRMS1-9)
09_rpoB_3593	<i>rpoB</i>	3593	G/C	100	Separate members from Buriram (XOBR2-2, 3XOBR2-2)
10_tpiA_337	<i>tpiA</i>	337	T/C	140	Separate members from Nakhon Si Thammarat (XONS2-1, XONS3-2)

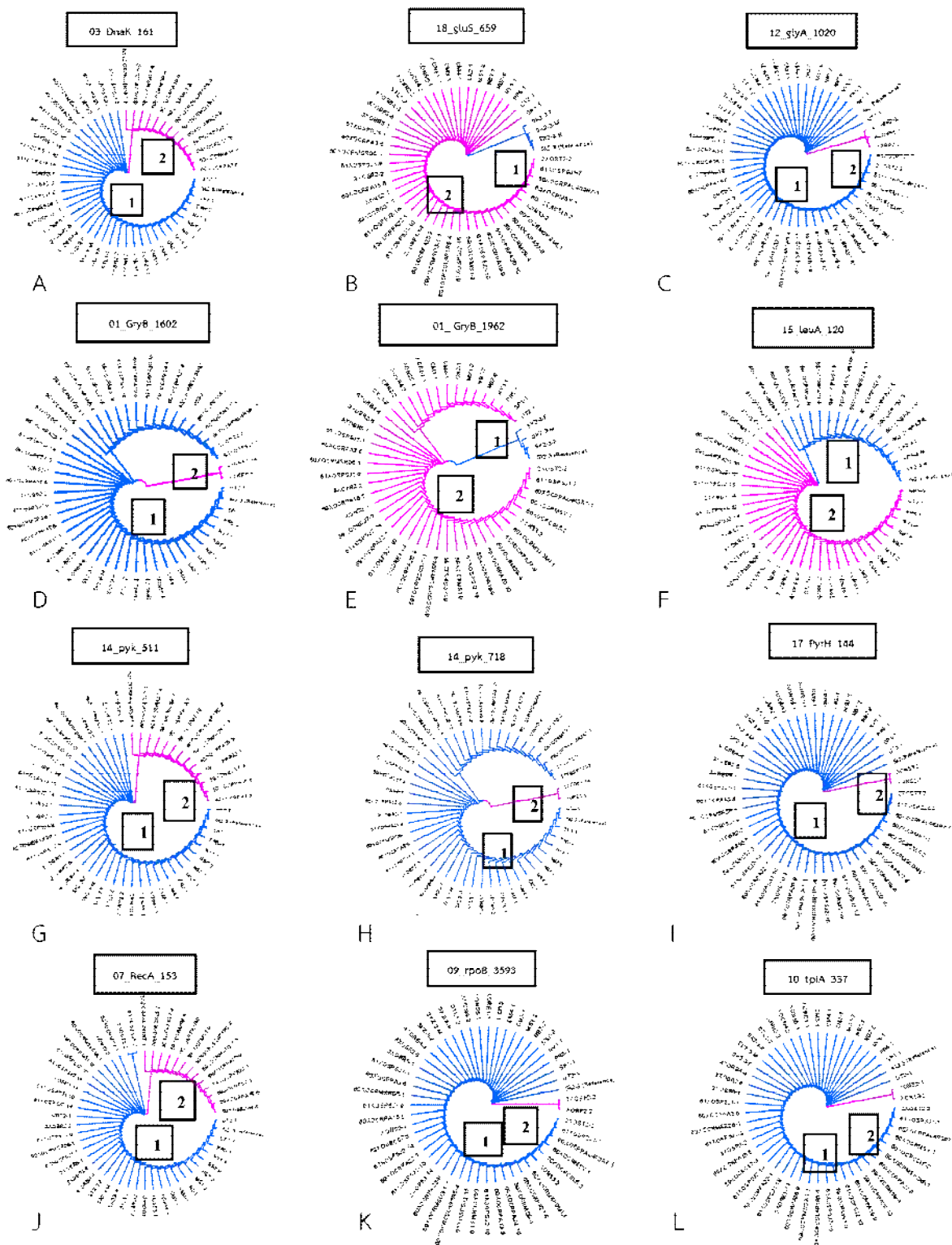


Figure 3 Phylogenetic tree clustering based on nucleic acid sequence of individual SNP position of 12 selected housekeeping genes of 50 Thai Xoo strain, (A) *DnaK* at position 161, (B) *gluS* at position 659, (C) *glyA* at position 1020, (D) *GryB* at position 1602, (E) *GryB* at position 1962, (F) *leuA* at position 120, (G) *pyk* at position 511, (H) *pyk* at position 718, (I) *PyrH* at position 144, (J) *RecA* at position 153, (K) *rpoB* at position 3593, (L) *tpiA* at position 337

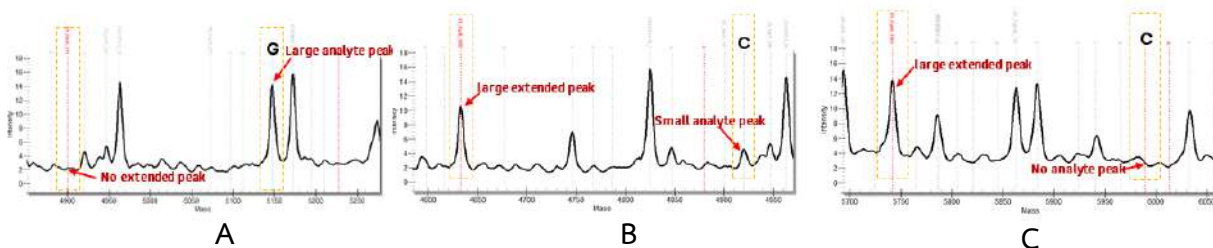


Figure 4 Types of the difference peak intensities base call of SNP primers in the MassARRAY assay, (A) Correct base call primer, (B) Miscalls primer, (C) No-call primer

เชื้อส่วนใหญ่ทำลายข้าวที่มียืนต้นทาน *xa5* และกลุ่มที่เชื้อส่วนใหญ่ไม่ทำลายข้าวที่มียืนต้นทาน *xa5* แต่เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของเชื้อที่เข้าทำลายในแปลง ปีที่สำรวจ หรือชนิดของ race สอดคล้องกับการทำ phylogenetic clustering ของตำแหน่งของข้อมูลที่ได้จาก Illumina sequence platform (Table 3) และการแบ่งกลุ่มโดยใช้ SNP จำนวน 21,181 ตำแหน่ง ด้วยวิธี neighbor joining และ PCA (อิติมา และคณะ, 2565) อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างกับรายงานของ Aung (2017) ที่ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNP จากตัวแทนเชื้อในกลุ่ม race และ lineage ต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ติดตามกลุ่มประชากรเชื้อ Xoo ในฟิลิปปินส์ พบชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อ 3 lineage หลัก ได้แก่ PX-A PX-B PX-C และ 4 กลุ่มย่อยของ PX-A และ PX-B ของประชากรเชื้อ Xoo ที่พบในฟิลิปปินส์ และสามารถนำมาใช้ตรวจสอบโคโลนีและสารแขวนลอย (bacterial oozing out) จากตัวอย่างใบที่เป็นโรคได้ ซึ่งในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล Xoo-SNPs MassARRAY based ในขั้นตอนต่อไป อาจนำวิธีการใช้สารแขวนลอยจากใบที่เป็นโรคขอบใบแห้งมาทดสอบ เพื่อลดขั้นตอนการแยกและเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ Xoo-SNPs MassARRAY based สำหรับใช้ตรวจ

ติดตามประชากรเชื้อ Xoo หรือ clone ของสายพันธุ์เชื้อที่ระบาดในแต่ละพื้นที่ในคราวเดียวกันอย่างแม่นยำเทียบเคียงได้กับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาตำแหน่ง SNP และการวิเคราะห์ SNP ด้วยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่ออกแบบจาก housekeeping genes นี้ อาจพบข้อจำกัดในการตรวจติดตามประชากรเชื้อ Xoo ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีการกลายพันธุ์จำนวนมาก ทำให้ต้องใช้จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล SNP หลายตำแหน่งเพื่อให้ครอบคลุมประชากรเชื้อ Xoo ทั้งหมด

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกตำแหน่ง SNP 12 ตำแหน่งจาก 10 housekeeping genes ได้แก่ *DnaK* *gluS* *glyA* *GyrB* *leuA* *pyk* *pyrH* *RecA* *rpoB* และ *tpiA* เพื่อใช้ในการติดตามประชากรเชื้อ Xoo สาเหตุของโรคขอบใบแห้ง ด้วยเทคนิค MassARRAY พบเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 9 ตำแหน่ง (75%) ที่สามารถอ่านน้ำหนักโมเลกุลของเบสได้ถูกต้อง เกิด analyte peak ขนาดใหญ่และไม่เกิด extend peak โดยเทคนิค MassARRAY สามารถวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของเบสของเชื้อ Xoo ได้จำนวนมากและพร้อมกันในคราวเดียว ใช้ระยะเวลาสั้น สามารถทราบผลได้ภายใน 2 วัน

โดยไม่นับรวมขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อ อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบได้มากถึง 45 ตัวอย่าง/วัน เครื่องหมายโมเลกุล Xoo-SNP MassARRAY based จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่ออกแบบจาก housekeeping genes จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *DnaK* *gluS* *leuA* *pyk* *pyrH* *RecA* *rpoB* และ *tpiA* สามารถตรวจประชากรเชื้อ Xoo จำนวน 50 สายพันธุ์ซึ่งเป็นตัวแทนของ 33 races ที่ระบาดในประเทศไทย โดยพบว่า ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถระบุความสัมพันธ์จำเพาะกับแหล่งที่มาของเชื้อจาก

จ. นครศรีธรรมราช บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด สุโขทัย และ เชียงราย และตรวจแยกกลุ่มเชื้อ Xoo ที่ทำลายหรือไม่ทำลายข้าวที่มียืนต้นทาน *xa5* อย่งไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่ออกแบบจากกลุ่มยีน housekeeping genes ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับ ชนิดของ race หรือลักษณะความรุนแรงของโรค ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่จำเพาะต่อ race จะสามารถปรับปรุงวิธีการนี้ให้เป็นประโยชน์สำหรับการตรวจติดตามประชากรของเชื้อ Xoo และการป้องกันโรคได้

Table 3 Summary results of twelve SNP markers for genotyping 50 Thai Xoo strains based on MassARRAY technology

SNP primer name	Gene	SNP (ref/alt)	Genomic DNA of 50 strains			Potential of SNP primer	Remark
			Reference allele frequency ^A	Alternate allele frequency	Miss call frequency		
03_DnaK_161	<i>DnaK</i>	G/A	G 100% (37/37)	A 100% (13/13)	-	/ ^B	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRC5L5-2, 59XOCRMS1-9)
18_gluS_659	<i>gluS</i>	A/G	A 100% (47/47)	G 100% (3/3)	-	/	Separate members from Sukhothai (SK2-3F, SK2-3M, SK2-3R)
12_glyA_1020	<i>glyA</i>	G/A	G 98% (47/46)	A 0% (3/0)	8% (4)	- ^C	Separate members from Buriram (3XOBR2-2, 3XOBR5-1, XOBR2-2)
01_GyrB_1602	<i>GyrB</i>	G/C	G 58% (48/28)	C 50% (2/1)	42% (21)	-	Separate members from Roi Et (2XORE1-14, XORE1-1)
01_GyrB_1962	<i>GyrB</i>	C/A	C 0% (3/0)	A 94 % (47/44)	12% (6)	-	Separate members from Sukhothai (SK2-3F, SK2-3M, SK2-3R)
15_leuA_120	<i>leuA</i>	C/T	C 100% (16/16)	T 100% (34/34)	-	/	Separate members from Chiang Rai and Sukhothai, infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRC5L5-2, 59XOCRMS1-9)
14_pyk_511	<i>pyk</i>	G/A	G 100% (37/37)	A 100% (13/13)	-	/	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRC5L5-2, 59XOCRMS1-9)
14_pyk_718	<i>pyk</i>	C/A	C 100% (48/48)	A 100% (2/2)	-	/	Separate members from Roi Et (2XORE1-14, XORE1-1)
17_pyrH_144	<i>pyrH</i>	A/G	A 100% (48/48)	G 100% (2/2)	-	/	Separate members from Nakhon Si Thammarat (XONS2-1, XONS3-2)
07_RecA_153	<i>RecA</i>	G/C	G 100% (37/37)	C 100% (13/13)	-	/	Separate members from Chiang Rai and infected IRBB5 (<i>xa5</i>) except 2 isolates (60XOCRC5L5-2, 59XOCRMS1-9)
09_rpoB_3593	<i>rpoB</i>	C/T	C 100% (48/48)	T 100% (2/2)	-	/	Separate members from Buriram (XOBR2-2, 3XOBR2-2)
10_tpiA_337	<i>tpiA</i>	T/C	T 100% (48/48)	C 100% (2/2)	-	/	Separate members from Nakhon Si Thammarat (XONS2-1, XONS3-2)

A: The number of isolates in which a given SNP allele was identified

B: SNP markers can detect Xoo strains and show specific results according to the primer design

C: SNP markers show miscall and no-call results and cannot detect Xoo strains in some positions

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการ Real Time Deployment of Pathogen Resistance Genes in Rice (รหัสโครงการ P-16-50284) โครงการระบบแนะนำพันธุ์ข้าวที่เหมาะสม สำหรับการปลูกในแต่ละพื้นที่และฤดูกาล (รหัส โครงการ P-18-51456)

โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในการสนับสนุนการใช้งานเครื่อง MassARRAY และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จารุวิ อ้นเซตา อีรยุทธ ตูจินดา คณินนิตย เจริญวรการ และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2564. การกระจายตัวของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในภาคกลางของประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร. 50(1): 204-215.
- อติมา จินตกานนท์ จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์ ภัสสร วรรณพินิจ ภูมิพัฒน์ ทองอยู่ และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2565. ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมและโครงสร้างประชากรของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร. 40(1): 45-58.
- ปริศนา วงศ์ล้อม จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์ สุจินต์ ภัทรภูวดล และวิชัย โสสิตรัตน. 2558ก. การประเมินความหลากหลายในการก่อโรคของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46(2): 165-175.
- ปริศนา วงศ์ล้อม จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์ สุจินต์ ภัทรภูวดล และวิชัย โสสิตรัตน. 2558ข. การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศไทยด้วยเทคนิค AFLP, rep-PCR และ RFLP-Tal. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46(3): 273-286.
- ไพเราะ ขวัญงาม มัชฌิมา สังข์วรรณะ นุจรินทร์ จังชันธ จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์ และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2562. การสำรวจโรคและการศึกษาการกระจายตัวของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในจังหวัดเชียงรายในปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2561. น. 136. ใน: การประชุมวิชาการอรัญญาพิช ครั้งที่ 14. 12-14 พฤศจิกายน 2562. โรงแรมดุสิตธานี หัวหิน อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี.
- สุธิดา เรืองบุญ พยอม โคเบลลี และธีรดา หวังสมบุญดี. 2553. การใช้ยีน *avr* เพื่อจัดกลุ่ม *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. 2(พิเศษ): 221-232.
- แสงชัย ศรีประโคน. 2552. การจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) และการบ่งชี้ตำแหน่งยีนต้านทานในข้าวพื้นเมืองพันธุ์เขียงรุ่ง (*Oryza sativa* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 127 หน้า.
- Aung, E.E. 2017. Development of SNP Markers and Genome-Wide Association Mapping of Virulence Factors of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Ph.D. Thesis, University of the Philippines Los Baños.
- 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. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1-8.
- Gabriel, S., L. Ziaugra and D. Tabbaa. 2009. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Current Protocols in Human Genetics*. 60(1): 2.12.1 - 2.12.18.
- Hajri, A., C. Brin, S. Zhao, P. David, J.X. Feng, R. Koebnik, B. Szurek, V. Verdier, T. Boureau and S. Poussier. 2012. Multilocus sequence analysis and type III effector repertoire mining provide new insights into the evolutionary history and virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Molecular Plant Pathology*. 13(3): 288-302.
- Jung, H.Y., K.J. Lee, K.H. Kim, J.H. Hyung, M.R. Han, H.K. Kim, L.W. Kang, Y.J. Ahn and Y.S. Heo. 2010. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of DNA gyrase *GyrB* subunit from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 66(1): 48-50.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 1547-1549.
- 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, G.B. Lee, H. Kim, H.S. Park, K.O. Yoon, J.H.

- Kim, C.H. Jung, N.H. Koh, J.S. Seo and S.J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*. 33(2): 577-586.
- Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman and B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(6): 3140-3145.
- Marcelletti, S., P. Ferrante and M. Scortchini. 2010. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Diversity*. 2(11): 1205-1222.
- Nyasinga, J., C. Kyany'a, R. Okoth, V. Oundo, D. Matano, S. Wacira, W. Sang, S. Musembi and L. Musila. 2019. A Six-member SNP assay on the iPLEX MassARRAY platform provides a rapid and affordable alternative for typing major African *Staphylococcus aureus* types. *Access Microbiology*. 1(3): e000018.
- Patiya, P. 2020. MassARRAY Technology. Available at: <https://www.scispec.co.th/learning/index.php/blog/genomics/patiya>. Accessed: November 22, 2023.
- Rabibhadana, S., S. Chamnongpol, J.E. Trempey, N.P. Ambulos Jr. and S. Mongkolsuk. 1993. Isolation and expression in *Escherichia coli* of a *Xanthomonas oryzae* RecA-like Gene. *Gene*. 132(1): 113-118.
- Sakthivel, K., A. Kumar, R.K. Gautam, K. Manigundan, G.S. Laha, R. Velazhahan, R. Singh and I.S. Yadav. 2021. Intra-regional diversity of rice bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, in the Andaman Islands, India: Revelation by pathotyping and multilocus sequence typing. *Journal of Applied Microbiology*. 130(4): 1259-1272.
- 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, R. Madupu, D. Puiu, D. Radune, M. Shumway, C. Trapnell, G. Aparna, G. Jha, A. Pandey, P.B. Patil, H. Ishihara, D.F. Meyer, B. Szurek, V. Verdier, R. Koebnik, J.M. Maxwell, R.P. Ryan, H. Hirata, S. Tsuyumu, S. Won Lee, P.C. Ronald, R.V. Sonti, M.A. Van Sluys, J. E. Leach, F.F. White and A.J. Bogdanove. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 A. *BMC Genomics*. 9(1): 1-16.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis, version 2.000. Genetics and biometry laboratory, department of anthropology, University of Geneva, Switzerland. 1: 1-111.
- Sukchawalit, R. and S. Mongkolsuk. 2001. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *recA* is transcribed and regulated from multiple promoters. *FEMS Microbiology Letters*. 197(1): 35-40.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731-2739.
- Xu, Z.Z., G.C. Wu, B. Wang, B.D. Guo, C. Sheng, Y.Y. Zhao, B. Tang, Y.C. Zhao and F.Q. Liu. 2023. Sigma factor 70 *RpoD* contributes to virulence by regulating cell motility, oxidative stress tolerance, and manipulating the expression of *hrpG* and *hrpX* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Integrative Agriculture*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.10.017>.