รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by multiplex PCR

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รุ่งนภา ทองเครง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) ของข้าว เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เพื่อป้องกันการไม่ให้สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศ การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้เพื่อการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R, Xoo80F/ Xoo80R Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R ผลการทดลองพบว่า วิธี Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถใช้ตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ได้ และมีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยไพรเมอร์ Xoo80F/ Xoo80R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ไพรเมอร์ Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* ส่วนไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด มีความไวในการตรวจ แบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอในระดับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลแบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 240 และ 320 CFU/ปฏิกิริยา ตามลำดับ

Bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, are quarantine organisms that are under phytosanitary regulation in numerous countries. The need for the precise diagnostic tool is acutely important for regulatory reasons. In this study, the Multiplex PCR used to detect *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* using four pairs of primers Xo3756F/Xoc3756R, Xoo80F/Xoo80R, Xoc3866F/Xoc3866R and Xoc3864F/Xoc3864R. The results showed that Multiplex PCR assay using a set of primers had high specific for *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. The sensitivity of detection by Multiplex PCR was at the minimum DNA concentration of 0.5 pg/reaction and the lowest concentration of cell suspension at 240 and 320 CFU/reaction respectively.

6. คำนำ

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) ของข้าว และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) เป็นเชื้อที่แพร่ระบาดทำความเสียหายให้กับแหล่งปลูกข้าวทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชีย (Mew, 1987) ทั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A1 เชื้อนี้มีรายงานว่าสามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne) ทำให้ทีโอกาสถ่ายทอดโรคทางเมล็ดได้ (seed transmission) (Singh *et.al*., 1983) และเชื้อนี้สามารถอยู่ในเมล็ดได้นาน 7-8 เดือน (Reddy, 1972)

แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อที่มีความผันแปรในแง่ของความรุนแรงสูง มีการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อ (race) ตามปฏิกิริยาระหว่างสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงกับพันธุ์ข้าวมาตรฐาน (differential varieties) ที่มียีนต้านทาน (Mew, 1987) ประเทศไทยมีการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (race) ที่พบในประเทศไทยออกเป็น 3 กลุ่มตามความรุนแรงบนพันธุ์ข้าวมาตรฐาน (Eamchit and Mew, 1982; นงรัตน์ และคณะ,2530) สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงต่อพันธุ์ข้าวมาตรฐานแตกต่างกัน สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ของประเทศไทยแตกต่างจากสายพันธุ์เชื้อจากประเทศอื่น เช่น สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากประเทศญี่ปุ่น จำแนกตามความรุนแรงบนพันธุ์ข้าวมาตรฐานได้ 7 กลุ่ม ในขณะที่สายพันธุ์จากฟิลิปปินส์ จำแนกได้ 6 กลุ่ม อินโดนีเซีย ได้ 9 กลุ่มเป็นต้น(Mew, 1987)

แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่ง สามารถทำให้เกิดโรคที่ความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวโดยทำให้เมล็ดข้าวลีบสูญเสียน้ำหนักได้มากถึง 17% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและสภาพภูมิอากาศ แบคทีเรียชนิดนี้จะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในส่วนของเอเชียที่มีการปลูกข้าวพันธุ์ลูกผสมที่มีความอ่อนแอต่อแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้มีการกระจายของแบคทีเรียอย่างกว้างขวางในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เอเชียรวมทั้งจีน, ไทย, มาเลเซีย, อินเดีย, เวียดนาม,ฟิลิปปินส์อินโดนีเซีย, เวสต์แอฟริกา, South America, และออสเตรเลีย

จากความสำคัญและความรุนแรงของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ทำให้แต่ละประเทศโดยเฉพาะประเทศไทยที่มีการปลูกข้าวเลี้ยงประชากรของประเทศต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ (exotic pathogen) โดยพยายามหามาตรการต่างมาเพื่อป้องกัน การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ในห้องปฏิบัติของกักกันพืชเพื่อป้องกันการเข้ามาของสายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนั้นต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า สถาบันข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้นำเสนอวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียในกลุ่ม *X. oryzae* pathovars ได้แก่ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงอย่างสูง 3 คู่ ทำปฏิกริยาในหลอดPCR เดียวกัน.ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pathovars ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสามสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค multiplex PCR มาปรับใช้ในการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวและตัวอย่างใบที่เป็นโรคใบไหม้และใบขีดโปร่งแสงให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*

วิธีการ

ออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูล เพื่อหาลำดับเบสของชุดไพรเมอร์ที่ Lang *et.al,* (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* นำลำดับเบสมาสังเคราะห์ชุดไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA)

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher et al. (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 oC จำนวน378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR

โดยทำการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยชุดไพรเมอร์ที่ Lang *et.al,* (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่แยกได้จากข้าวในประเทศไทย จำนวน 8 และ 6 สายพันธุ์ ตามลำดับ (Table 1) จำนวน 50 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบปฏิกิริยา PCR ในครั้งนี้

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

	Initial concentration	V tube (1l)	Final concentration
PCR buffer	10.0 x	2.00	1.0 x
MgCl2	25.0 mM	1.60	2.0 mM
dNTPs	2.5 mM	1.60	0.2 mM
Primer mix*		3.20*	

Xo3756F	5.0 8M	0.40	0.1 8M
Xo3756R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80R	5.0 8M	0.40 0.	1 8M
Xoc318-3866F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc318-3866R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc321-3864F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc321-3864R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Taq DNA Pol	5.0 U/1l	0.10	0.5 U
Water		6.50	
DNA template	80 ng/ 1l	5.00	

ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา multiplex PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Lang et.al, (2010)

ปฏิกิริยา	**อุณหภูมิ (°C)**	**เวลา (นาที)**
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	0.5
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing	64	0.5
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	68	2
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	68	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นำ ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 ul มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol 28 blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 ul จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity)

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยใช้ DNA และเซลของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola*

การทดสอบความจำเพาะ ใช้ DNA และเซลของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นได้แก่ แบคทีเรีย *X. vesicatoria*, *X. citri* subsp. *citri* โดยความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 นาโนกรัม และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 CFU/ml

การทดสอบความไว ใช้ DNA ของ แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลแบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

เวลาและสถานที่

ต.ค.56 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR

ทำการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ด้วยชุดไพรเมอร์และวิธีการของ Lang *et.al* (2010) ผลการทดสอบพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 14 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ 162 และ 331 bp จาก ดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 8 สายพันธุ์ ของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ ได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาดคือ 331, 691 และ 945 bp จากดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 6 สายพันธุ์ ของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* (figure 1) โดยไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 331 bp จากต้นแบบทั้ง 14 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ซึ่งผลการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถใช้ในจำแนกและการวินิจฉัยแบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ได้ ผลการทดสอบที่ได้ตรงกับ ที่ Lang *et.al* (2010) ได้ศึกษาไว้ และสอดคล้องกับ Lee and Vera Cruz (2014) ได้รายงานไว้

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity)

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ทั้ง 14 สายพันธุ์ แต่ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรีย *X. vesicatoria* และ *X. citri* subsp. *citri* ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดย ไพรเมอร์ Xoo80F/ Xoo80R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ไพรเมอร์ Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* ส่วนไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด (Table 1)

ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae*

pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอทั้งแบคทีเรียทั้งสองคือ 25 pg/ปฏิกิริยา (Table 3) ความเข้มข้นของสารละลายเซลของแบคทีเรีย ต่ำสุดคือ 240 และ 320 CFU/ปฏิกิริยา ตามลำดับ (Table 4)

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomomnas oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ด้วยปฏิกิริยา multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R, Xoo80F/ Xoo80R Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบและเซลของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยไพรเมอร์ Xoo80F/ Xoo80R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ไพรเมอร์ Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* ส่วนไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด มีความไวในการตรวจ แบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอในระดับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลแบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 240 และ 320 CFU/ปฏิกิริยา ตามลำดับ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน เป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และเป็นวิธีการที่ต่างประเทศยอมรับสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการกักกันพืชเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย X. oryzae pv. oryzae และ X. oryzae pv. oryzicola ในห้องปฏิบัติของกักกันพืชเพื่อป้องกันการเข้ามาของสายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. 2530. การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อขอบใบแห้ง (*Xanthomonas campestris pv. oryzae*) บนพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมต่างกัน น 50-60 ใน รายงานผลงานวิจัยกลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

Adachi, N. and Okua, T. 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 (4): 303-309.

Eamchit, S. and T.W. Mew. 1982. Camparision of virulence of *Xanthomonas campertris pv. oryzae* in Thailand and the Philippines. Plant Disease 66:556-559.

Fraaije B A, Lovell D, Coelho J M, Baldwin S, Hollomon D W. 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. European Journal of Plant Pathology 107:905-917.

Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogt P H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-bystep protocol. Biotechniques 23:504-511.

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

Mew, T.W. 1987. Current status and future prospects of research on bacteril blight of rice. Ann.Rev. Phythopathol. 25: 359-382.

Reddy, P.R. 1972. Studies on bacteriophages of *Xanthomonas oryzae* and *Xanthomonas translucens f.sp. oryzicola*, the incitants of blight and streak diseases of rice. PhD thesis, Banaras Hindu University. Varanasi, India.

Singh, D., F.Vinther and S.B. Mathur. 1983. Seed transmission of bacterial leaf blight in rice. Seed Pathology News No.15,p.11

13. ภาคผนวก

Table 1 Strains of *Xanthomonas* spp. used in this study.

Taxon	Strains	Host	PCR results			
			Primers Xo3756F/ Xoc3756R	Primers Xoo80F/ Xoo80R	Primers Xo3756F/ Xoc3756R	Primers Xo3756F/ Xoc3756R
X. oryzae pv *oryzae*	Xoo 0035 Xoo 0039 Xoo 0043 Xoo 0049 Xoo 0092 Xoo 0094 Xoo 0096 Xoo 0101	Rice	+	+	-	-
X. oryzae pv *oryzicola*	Xoc 1120 Xoc 1361 Xoc 1563 Xoc 1564 Xoc 1566 Xoc 1568	Rice	+	-	+	+
X. axonopodis pv. *citri*	Xcc 967	Leech Lime	-	-	-	-
X. vesicatoria	Xv 1726	Tomato	-	-	-	-

PCR results: + = positive ; - = negative (no band)

Table 2 Primers used in this study

Target	Primer	Sequence	Product Size (bp)
X. oryzae	Xo3756F	CATCGTTAGGACTGCCAGAAG	331
	Xo3756R	GTGAGAACCACCGCCATCT	
X. oryzae pv *oryzae*	Xoo80F	GCCGCTAGGAATGAGCAAT	162
	Xoo80R	GCGTCCTCGTCTAAGCGATA	
X. oryzae pv *oryzicola*	Xoc3866F	ATCTCCCAGCATGTTGATCG	691
	Xoc3866R	GCGTTCAATCTCCTCCATGT	
	Xoc3864F	GTGCGTGAAAATGTCGGTTA	945
	Xoc3864R	GGGATGGATGAATACGGATG	

Table 3 The result of sensitivity were detected DNA of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using Multiplex PCR

DNA of Xoo / ปฏิกิริยา	DNA of Xoc / ปฏิกิริยา	ผลการตรวจ Multiplex PCR
250 ng	250 ng	+
25 ng	25 ng	+
2.5 ng	2.5 ng	+
250 pg	250 pg	+
25 pg	25 pg	+
2.5 pg	2.5 pg	-
250 fg	250 fg	-

Table 4 The result of sensitivity were detected bacterial cell of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using Multiplex PCR

Bacterial Cell of Xoo	CFU / ปฏิกิริยา	ผลการตรวจ Multiplex PCR	Bacterial Cell of Xoc	CFU / ปฏิกิริยา	ผลการตรวจ Multiplex PCR
O.D. 0.1 $_{600\ nm.}$	2.4×10^{6}	+	O.D. 0.1 $_{600\ nm.}$	3.2×10^{6}	+
10^{-1}	2.4×10^{5}	+	10^{-1}	3.2×10^{5}	+
10^{-2}	2.4×10^{4}	+	10^{-2}	3.2×10^{4}	+
10^{-3}	2.4×10^{3}	+	10^{-3}	3.2×10^{3}	+
10^{-4}	2.4×10^{2}	+	10^{-4}	3.2×10^{2}	+
10^{-5}	24	-	10^{-5}	32	-
10^{-6}	2	-	10^{-6}	3	-

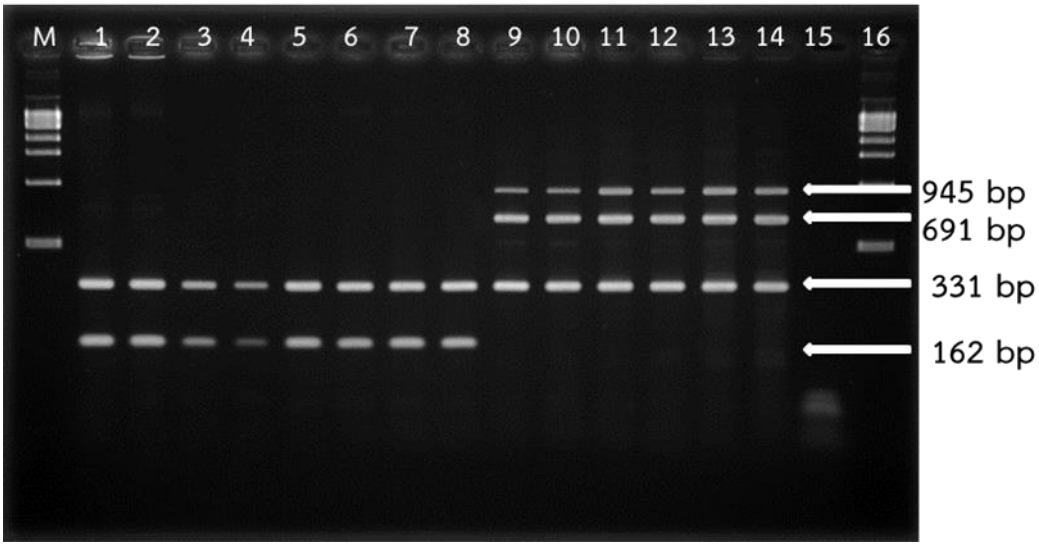

Figure 1 The result of Multiplex PCR test for detected DNA of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane M 100 bp plus; Lane 1-8 *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ Xoo 0035, Xoo 0039, Xoo 0043, Xoo 0049, Xoo 0092, Xoo 0094, Xoo 0096, Xoo 0101; Lane 9-14 *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ Xoc 1120, Xoc 1361, Xoc 1563, Xoc 1564, Xoc 1566