

ความหลากหลายของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*
สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองและการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบ

Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the Causal Agent of Bacterial
Pustule of Soybean and Specific Primer for Detection

ลาวัลย์ กลัดสุวรรณ¹ ดุสิต อธิณูวัฒน์² และ สุตฤดี ประเทืองวงศ์^{1*}
Lawan Kladsuwan¹ Dusit Athinuwat² and Sutruedee Prathuangwong^{1*}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²สาขาวิชาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12121

²Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand

*Corresponding author: Email: g5317100119@ku.ac.th

(Received: 16 March 2017; Accepted: 21 September 2017)

Abstract: The 171-novel strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the bacterial pustule pathogen, were isolated from infected leaves of different commercial soybean fields in Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun and Lampang provinces. The genetic diversity was determined with physiological and molecular analyzed. All strains were tested for their pathogenicity on differential soybean cultivars including Williams 82, Spencer, PI520733 and SJ.5 under greenhouse conditions; then molecular diversity was analyzed by BOX-PCR fingerprinting. The pathogenicity tests showed 2 groups with a large amount of phenotypic variation between strains. Most strains were highly virulent. Using rep- PCR fingerprinting, a relationship between BOX-PCR fingerprinting and phenotype was observed. Two major groups were obtained within the soybean cluster and relationship of the virulence levels of the strains was revealed. The fingerprinting with BOX primer was more relatively unique, stable, and reproducible in that it produced a 650 bp band in all 171 strains tested. We designed primers specific for *X. axonopodis* pv. *glycines*, XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' and XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3', that amplify a 788 bp product from *hrpB*. To our knowledge, this is the first report of specific primer for identification of *X. axonopodis* pv. *glycines*, the causal pathogen of soybean bacterial pustule.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, bacterial pustule of soybean, genetic diversity

บทคัดย่อ: รวบรวมสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลืองจากการเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองฝักสดในพื้นที่ผลิตที่สำคัญของประเทศไทยทางภาคเหนือตอนบน ซึ่งประกอบด้วย จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง จำนวน 171 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการตรวจสอบลักษณะทางด้านสรีระวิทยาและโมเลกุล โดยวิเคราะห์ความสามารถในการก่อโรคบนถั่วเหลืองต่างพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Williams 82, Spencer, PI520733 และ สจ.5 ภายใต้สภาพเรือนทดลอง และศึกษาระดับโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส BOX ไพรเมอร์ ภายใต้ปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส พบว่าความสามารถในการก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ แบ่งความแตกต่างเชื้อทั้ง 171 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่ม ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์การก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์อ่อนแอ พบว่าประชากรสายพันธุ์เชื้อส่วนใหญ่มีความรุนแรงในการก่อโรคในระดับสูง เมื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BOX พบความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของเชื้อไปในทิศทางเดียวกันและสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้เป็น 2 กลุ่มอย่างเด่นชัด โดยปรากฏแถบอนุรักษขนาด 650 bp ในทุกสายพันธุ์เชื้อทดสอบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน *hrpB* จึงนำข้อมูลดังกล่าวมาพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งไพรเมอร์ XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' และ XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3' สามารถตรวจสอบได้เฉพาะเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 788 bp ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือเป็นรายงานแรกที่จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลืองที่ถูกต้อง

คำสำคัญ: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* โรคใบจุดนูนถั่วเหลือง ความหลากหลายทางพันธุกรรม

คำนำ

โรคใบจุดนูนถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* เป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทย โดยเป็นสาเหตุให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลงทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยจะแสดงอาการโรครุนแรงกับถั่วเหลืองน้ำมันพันธุ์อ่อนแอ สจ.4 และ สจ.5 (สุฤดี และคณะ, 2523) ทั้งนี้การแพร่ระบาดของโรคเป็นกลไกที่ยู่ยากซับซ้อน เพราะมีความปัจจัยผันแปรมาเกี่ยวข้อง เช่น ชนิดและพันธุ์พืช สายพันธุ์เชื้อโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยเชื้อโรคแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการเข้าทำลายพืชได้รุนแรงแตกต่างกันไป จึงทำให้การจัดการควบคุมสามารถทำได้ยาก โดย Flor (1942) อธิบายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค และพันธุ์พืชอาศัย (race-cultivars specific) ซึ่งจัดเป็นปฏิสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่าง avirulence (*avr*) genes ของเชื้อสาเหตุโรค และ resistance (*R*) genes ของพืช โดยแสดงลักษณะพีโนไฟของปฏิสัมพันธ์ด้วยการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response:

HR) และเรียกทฤษฎีนี้ว่า gene-for-gene hypothesis ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในงานด้านอณูกรรมวิธาน ความผันแปรทางพันธุกรรม และโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic structure) ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคเพื่อให้ความรวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคมายิ่งขึ้น โดยที่ผ่านมาสามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี Koch's postulates ซึ่งต้องใช้เวลาอันยาวนาน ดุสิต และคณะ (2548) วิเคราะห์ความสามารถในการก่อโรคบนถั่วเหลืองต่างสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX (interspersed repetitive sequence) เนื่องจากเป็น repetitive sequence ที่มีลักษณะอนุรักษสูง สามารถผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้อย่างเด่นชัดในทุกสายพันธุ์ แต่ยังมีได้มีการรายงานเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคเพื่อความเร็วและแม่นยำ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงในการก่อโรค ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX แล้วนำข้อมูลที่ได้มา

พัฒนาเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย การจำแนกเชื้อ และการพิสูจน์โรค

รวบรวมสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* จากการเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองฝักสดในพื้นที่ผลิตที่สำคัญของประเทศไทยทางภาคเหนือตอนบน ซึ่งประกอบด้วย จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง ช่วงเดือนตุลาคม ปี 2555 มาแยกเชื้อด้วยวิธี cross-streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA) (Schaad, 2001) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกลโคไลเดี่ยวที่มีลักษณะกลมมน สีเหลืองอำพัน เป็นมันเยิ้ม ขอบเรียบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ cross streak ซ้ำ 2-3 ครั้ง จึงนำมาทดสอบการเกิดโรคตามการพิสูจน์โรคของ Koch's postulation เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใน glycerol 20% เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคใบจุดบนถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

เตรียม cell suspension ของ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 171 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml) ฟัน cell suspension เชื้อแบคทีเรียบนใบถั่วเหลืองพันธุ์ Williams 82, Spencer, PI520733 และ สจ.5 อายุ 21 วัน ปริมาตรต้นละ 30 มิลลิลิตร (Park *et al.*, 2008) จำนวน 3 ต้น ต่อเชื้อ 1 สายพันธุ์ สำหรับ control ฟันด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเก็บรักษาต้นถั่วเหลืองไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และประเมิน

ความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ตามวิธีการของ ชัยสิทธิ์ (2531)

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยเทคนิค rep-PCR

3.1 การเตรียมเชื้อเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* จำนวน 171 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าเชื้อ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNeasy) (Qiagen Valencia, CA)

3.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR และอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาศึกษาความหลากหลายโดยไพรเมอร์ ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al.*, 1994) ซึ่งมีลำดับไพรเมอร์ดังนี้ 5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3' เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ สุริยะ และคณะ (2559) โดยปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.5 ไมโครลิตร, 2mM dNTPs 2 ไมโครลิตร, *Taq* polymerase 0.5 ไมโครลิตร, sterile water 17 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ BOX 2 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันบ่มหลอด PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ (Sambrook and Russell, 2001) initial denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ปรับอุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ และปรับอุณหภูมิ final extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน

1.5% agarose gel ด้วย horizontal slab gel electrophoresis (GelMate 2000, Toyobo) ตรวจสอบแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้ UV transilluminators พร้อมถ่ายรูปเพื่อบันทึกข้อมูล

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ไพรเมอร์ BOX ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและชัดเจนโดยให้คะแนน แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเท่ากับ 1 ถ้าไม่ปรากฏให้คะแนนเท่ากับ 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System (NTSYS-pc version 2.10) (Rohlf, 1993) วิเคราะห์ dendrogram ที่ได้เปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มของเชื้อตามความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลือง

4. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* บริเวณ *hrpB*

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี BOX ไพรเมอร์พบว่าปรากฏแถบอนุรักษขนาด 650 bp ในทุกสายพันธุ์เชื้อทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกุลขนา (2546) ที่นำเทคนิค rep-PCR มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 650 bp บนเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทุกสายพันธุ์ จากนั้นนำแถบอนุรักษขนาดดังกล่าวมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน *hrpB* ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจสอบและจำแนกชนิด *X. axonopodis* pv. *glycines* จากบริเวณ *hrpB* โดยเลือกตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะสูงในเบสที่เรียก *X. axonopodis* pv. *glycines* ต่างสายพันธุ์ คือ 8ra (AF_499777), CFBP2526 (NZ_CM002268.1) และ CFBP7119 (NZ_CM002264.1) เปรียบเทียบกับ *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (NC_007086), *X. oryzae* pv. *oryzae* PX099A (NC_010712), *X. axonopodis* pv. *citri* 306 (NC_003919.1), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* NCPPB

1713 (JWTD02000065.1) และ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 ซึ่งมีข้อมูลรายงาน (complete genome) ในฐานข้อมูล GenBank คัดเลือกบริเวณจำเพาะโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี clustalW2 multiple alignment เพื่อหาตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยสามารถกำหนดลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ คือ XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' เป็น forward primer และ XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3' เป็น reward primer ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดเท่ากับ 788 bp นำเชื้อที่มีแนวโน้มเป็น *X. axonopodis* pv. *glycines* จากการศึกษาในข้อ 1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยเปรียบเทียบกับเบสที่เรียกในกลุ่มใกล้เคียงและต่างกลุ่มเพื่อยืนยันความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ได้แก่ *X. campestris* pv. *campestris* 8004, *X. campestris* pv. *campestris* 2015, *X. oryzae* pv. *oryzae* S345, *X. oryzae* pv. *oryzae* S225, *X. axonopodis* pv. *citri* 11, *X. axonopodis* pv. *citri* 12, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* P5, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* P21, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* E15 และ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* A6 โดย PCR mixer ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยโคไลนิซของเบสที่เรียกที่ต้องการตรวจสอบ 1 ไมโครลิตร, sterile water 15 ไมโครลิตร, 10X Taq buffer 2 ไมโครลิตร, 2.5 μM dNTPs 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2.5 ไมโครลิตร, Taq DNA - polymerase 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM primer mix 2 ไมโครลิตร) กำหนดรอบปฏิกิริยา PCR 30 รอบ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ คือ denaturation temperature 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, annealing temperature 52 องศาเซลเซียส 1 นาที, extension temperature 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension temperature สุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาด 788 bp) ด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ย้อม gel ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบด้วย UV illumination

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย การจำแนกเชื้อ และการพิสูจน์โรค

การทดลองในครั้งนี้ใช้แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* จำนวน 171 สายพันธุ์ ในการศึกษาโดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้ใหม่จากตัวอย่างใบถั่วเหลืองฝักสดที่เก็บจากพื้นที่ผลิตที่สำคัญของประเทศไทยทางภาคเหนือตอนบน จำนวน 169 สายพันธุ์ซึ่งประกอบด้วย จังหวัดเชียงรายจำนวน 41 สายพันธุ์ เชียงใหม่จำนวน 53 สายพันธุ์ ลำพูนจำนวน 49 สายพันธุ์ และลำปางจำนวน 26 สายพันธุ์ และจากการเก็บรวบรวมไว้ก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 2 สายพันธุ์ (Xag12-2 และ KU-P-SW005) และเมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคตามการพิสูจน์โรคของ Koch's postulation เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ซึ่งจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบจุดบนถั่ว

2. การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคบนถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

เมื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 171 สายพันธุ์ บนถั่วเหลืองพันธุ์ Williams 82, Spencer, PI520733 และ สจ.5 นั้น สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 4 ฟิโนไทป์ ได้แก่ ฟิโนไทป์ A, B, C, และ D (ตารางที่ 1) โดยฟิโนไทป์ D มีจำนวนประชากรเชื้อสูงที่สุดเท่ากับ 107 สายพันธุ์ (คิดเป็น 62.57 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด) ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์ใน ฟิโนไทป์ D จัดอยู่ใน race 2 เนื่องจากเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงและสามารถก่อโรครุนแรงบนถั่วเหลืองทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ รองลงมาคือฟิโนไทป์ C มีจำนวนประชากรเชื้อเท่ากับ 34 สายพันธุ์ (คิดเป็น 19.89 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด) โดยเชื้อทุกสายพันธุ์บนฟิโนไทป์ C จัดอยู่ใน race 3 ซึ่งก่อโรคเฉพาะบนถั่วเหลืองพันธุ์อ่อนแอ (Spencer, PI520733, และ สจ.5) แต่ไม่ก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทาน (William 82) ส่วนฟิโนไทป์ A และฟิโนไทป์ B มีจำนวนประชากรเชื้อเท่ากับ

13 สายพันธุ์ และ 17 สายพันธุ์ (คิดเป็น 7.60 และ 9.94 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมดตามลำดับ) โดยเชื้อที่จัดอยู่ในฟิโนไทป์ A และ B จัดอยู่ใน race 1 เนื่องจากสามารถก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคได้เพียงพันธุ์เดียวเท่านั้นแต่เชื้อที่จัดอยู่ในฟิโนไทป์ B ก่อโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ได้รุนแรงกว่าเชื้อที่จัดอยู่ในฟิโนไทป์ A โดยข้อมูลที่ได้ สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์ถูกจัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำแต่ถูกจัดเป็นสายพันธุ์รุนแรงเมื่อระยะเวลาผ่านไป (กุลขนา, 2546; ดุสิต และคณะ, 2548) ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อสามารถปรับเปลี่ยนได้ โดยแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะของ spontaneous mutation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ในสภาพธรรมชาติโดยลักษณะการกลายพันธุ์ดังกล่าว เชื้อสาเหตุโรคสามารถพัฒนาและเข้าทำลายพืชพันธุ์ใหม่ที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรสดังกล่าวได้ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่นักโรคพืชและปรับปรุงพันธุ์พืชต้องคำนึงถึงในการปรับปรุงพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีลักษณะแตกต่างจากเดิมโดยอาจส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคที่เดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือก่อให้เกิดโรคเพียงเล็กน้อยแต่ผันแปรก่อให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรง (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011; Tervor, 1988)

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิค BOX-PCR

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยไพรเมอร์ BOX สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ออกเป็น 2 กลุ่มที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.55 ได้อย่างชัดเจนคือ กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 (ภาพที่ 1) โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ 30 สายพันธุ์ (คิดเป็น 17.54 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด) ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม 1 คือ race 1 โดยเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในฟิโนไทป์ A และ B เนื่องจากไม่เกิดโรคบนถั่วเหลืองทุกสายพันธุ์ทดสอบทั้งพันธุ์ต้านทาน (Williams 82) และพันธุ์อ่อนแอ (Spencer และ PI520733) แต่สามารถเกิดโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 เพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น ซึ่งเป็นพันธุ์ที่

Table 1. Phenotype differentiation in *X. axonopodis* pv. *glycines* strains with an extend rang of differential soybean cultivars

Phenotype ¹	Bacterial strains ²	Soybean cultivars				Total strains
		Williams82	Spencer	PI529733	SJ.5	
A	102/104/107/139/141/143/144/150/151/153/154/155/159/	-	-	-	+	13
B	4/95/98/99/109/112/114/116/118/124/127/128/130/133/ 135/ 136/No.4	-	-	-	++	17
C	7/8/15/24/38/55/56/79/94/97/103/106/110/111/115/117/ 119/120/122/123/125/126/129/131/132/137/138/140/142/ 156/158/163/167/KU-P-W005	-	+	++	++	34
D	2/3/5/6/9/10/11/12/13/14/16/17/18/19/ 20/21/ 22/23/ 25/ 26/27/ 28/29/30/ 31/32/33/34/35/36/37/39/40/41/42/43/44/45/46/47/48/ 49/50/51/52/53/54/57/58/59/60/6162/63/64/65/66/67/68/64/69/70/ 71/72/73/74/75/76/77/78/80/ 81/82/ 83/84/ 85/ 86/87/ 88/ 89/90/91/ 92/93/96/100/101/ 105/108/113/ 121/ 134/145/146/147/148/149/ 152/157/160/161/162/164/165/166/168/Xag12-2	++	++++	++++	++++	107

¹ + = compatible (disease severity between 1.0-25.0 %), ++ = compatible (disease severity between 26.0-50.0 %), +++ = compatible (disease severity between 51.0-75.0 %), ++++ = compatible (disease severity between 76.0-100.0 %) and - = incompatible (no disease symptom)

² Code of bacterial isolate

แยกเชื้อสาเหตุโรคได้ ส่วนกลุ่ม 2 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 141 สายพันธุ์ (คิดเป็น 82.46 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด) นอกจากนี้ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.61 ยังแบ่งประชากรเชื้อในกลุ่ม 2 ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม 2A และ 2B โดยกลุ่ม 2A ประกอบด้วยประชากรเชื้อ 34 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง (คิดเป็น 24.11 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อในกลุ่ม 2) ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม 2A คือ race 3 โดยจัดอยู่ในฟีโนไทป์ C เนื่องจากไม่เกิดโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทาน (Williams 82) แต่เกิดโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์อ่อนแอทุกสายพันธุ์ทดสอบ (Spencer, PI520733 และ สจ.5) ส่วนกลุ่ม 2B ประกอบด้วยประชากรเชื้อ 107 สายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (คิดเป็น 75.89 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อในกลุ่ม 2) โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม 2B คือ race 2 จัดอยู่ในฟีโนไทป์ D เนื่องจากสามารถก่อโรคได้ทั้งบนถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทาน (Williams 82) และพันธุ์อ่อนแอ (Spencer, PI520733 และ สจ.5) เมื่อวิเคราะห์ dendrogram ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มเชื้อเป้าหมายโดย BOX-PCR เปรียบเทียบกับการก่อให้โรคกับถั่วเหลืองเฉพาะพันธุ์ สจ.5 (ตารางที่ 2) ผลการทดลองพบว่าลักษณะลายพิมพ์ DNA ของเชื้อในกลุ่ม 1 ประชากรเชื้อทั้งหมดในกลุ่มเป็น

เชื้อที่มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ (เฉลี่ยความรุนแรงของโรค 34.7 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นเชื้อในฟีโนไทป์ A และ B ส่วนกลุ่ม 2 ประกอบด้วยประชากรเชื้อที่มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคสูง โดยประชากรเชื้อในกลุ่ม 2A สามารถก่อโรคได้รุนแรงเฉลี่ย 57.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อในฟีโนไทป์ C ทั้งหมด และกลุ่ม 2B สามารถก่อโรคได้รุนแรงเฉลี่ย 89.67 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นเชื้อในฟีโนไทป์ D ทั้งหมด พบว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยไพรเมอร์ BOX สามารถแบ่งเชื้อสายพันธุ์รุนแรงและสายพันธุ์อ่อนแอได้อย่างชัดเจนเนื่องจากไพรเมอร์ BOX แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันชัดเจนระหว่างเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกุลชนา (2546) ที่นำเทคนิค rep-PCR มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นที่น่าสนใจยิ่งเนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอขนาด 650 bp ตามรายงานของกุลชนา (2546) จากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ที่แยกได้ใหม่จำนวน 169 สายพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่รวบรวมมาจากแหล่งพื้นที่หรือพันธุ์ถั่วเหลืองใดก็ตาม และจากการเก็บรวบรวมไว้ก่อนหน้านี้ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

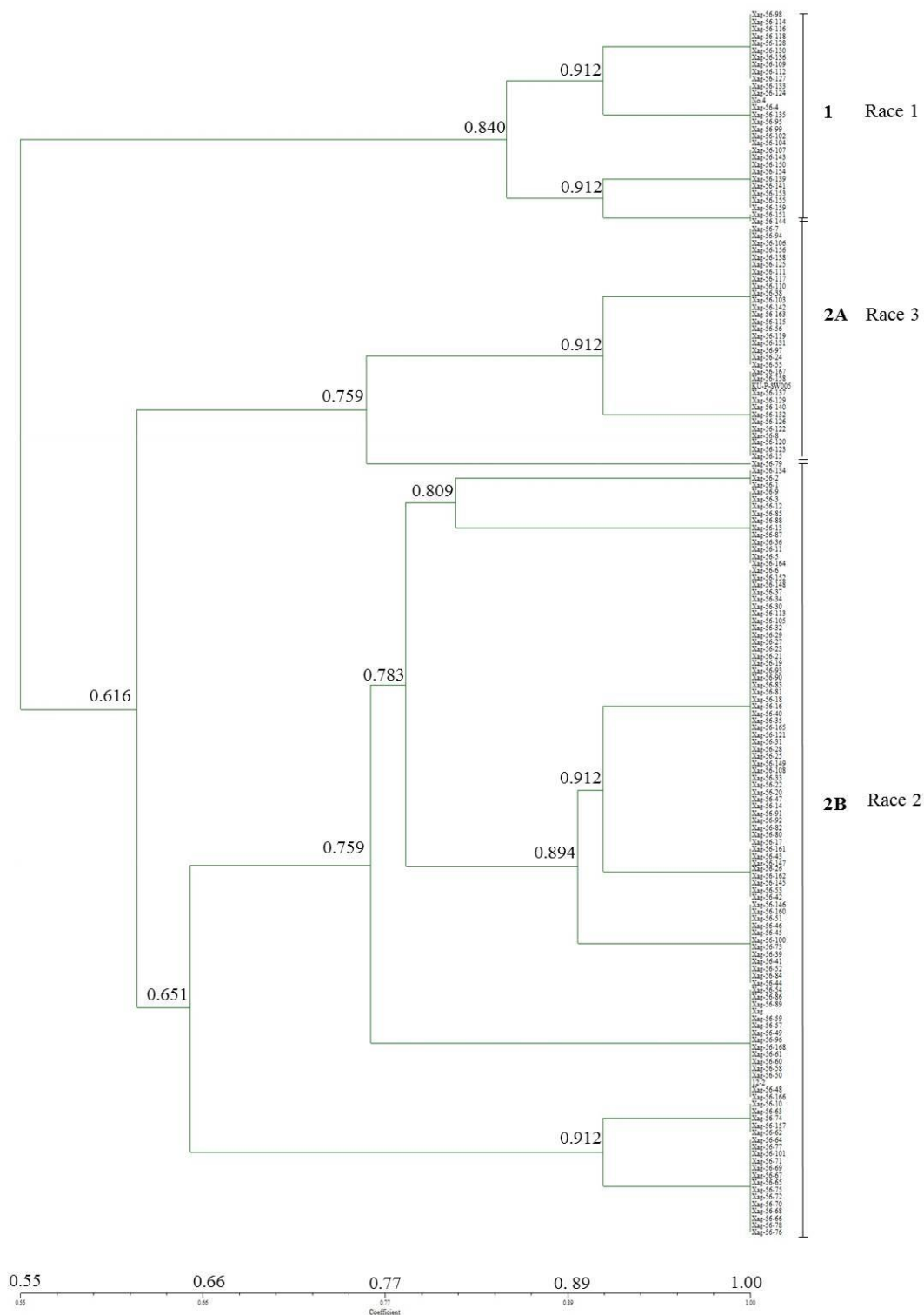


Figure 1. Dendrogram of DNA fingerprinting of 171 strains of *X. axonopodis* pv. *glycines* were identified by repetitive sequence-based (rep-PCR) with BOX primer using program NTSYSpc2.1 for analyzed

Table 2. Grouping of *X. axonopodis* pv. *glycines* strains based on BOX-PCR fingerprinting patterns. The patterns of PCR products was generated with BOX primer

Group ¹	Bacterial strains ²
1	98/114/116/118/128/130/136/109/112/127/133/124/No.4/4/135/95/99/102/104/107/143/150/154/ 139/141/153/155/159/151/144
2A	7/94/106/156/138/125/111/117/110/38/103/142/163/115/56/119/131/97/24/55/167/158/137/129/ 140/132/126/122/8/120/123/15/79
2B	134/2/19/3/12/85/88/13/87/36/11/5/164/6/152/148/37/34/30/113/105/32/29/27/23/21/19/93/90/83/ 81/18/16/40/35/165/121/31/28/25/149/108/33/22/20/47/14/91/92/82/80/17/161/43/147/26/162/ 145/53/42/146/160/51/46/45/100/73/39/41/52/84/44/54/86/89/59/57/49/96/168/61/60/58/50/48/ 166/10/63/74/157/62/64/77/101/71/69/67/65/75/72/ 70/68/66/78/76

Group 1 ¹ = Weakly strains (30 strains), Group 2A = Moderately strains (34 strains), Group 2B = Virulent strains (107 strains)

² = Code number of *X. axonopodis* pv. *glycines*

จำนวน 2 สายพันธุ์ คณะผู้วิจัยจึงนำแถบดีเอ็นเอขนาด 650 bp ส่ง sequencing เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ว่าเป็นยีนอะไร จากนั้นคัดเลือกรหัสเฉพาะซึ่งดำเนินการโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี clustalW2 multiple alignment เพื่อหาตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์เฉพาะของ *X. axonopodis* pv. *glycines* เพื่อพัฒนาเป็นไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยจะเป็นวิธีการในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ออกจากเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกลุ่ม Xanthomonads ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งแต่เดิมการจำแนกเชื้อนี้ประสบปัญหาในเรื่องต้องใช้เวลานาน แม้จะมีการค้นพบอาหารทั้งเปลือกเฉพาะแล้วก็ตาม (ชนิษฐา 2532; Wydra et al., 2004)

4. ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* บริเวณ *hrpB*

Kim et al. (2003) รายงานเกี่ยวกับ *hrp* cluster ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งประกอบไปด้วย *hrpA*, *hrpB*, *hrpD*, *hrpC*, *hrpE*, *hrpF* โดยพบว่า *hrpB* สำคัญในการก่อโรคและเมื่อศึกษา *hrp* cluster ของเชื้อในกลุ่ม Xanthomonads ซึ่งประกอบไปด้วย *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* และ

X. oryzae pv. *oryzae* พบว่าบริเวณ promoter ของ *hrpB* ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน จึงนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ (specific primer) ที่มีความจำเพาะ เพื่อใช้ตรวจสอบ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ promoter ของ *hrpB* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ 8ra (AF_499777), CFBP2526 (NZ_CM002268.1) และ CFBP7119 (NZ_CM002264.1) เปรียบเทียบกับยีนบริเวณ promoter *hrpB* ของ *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (NC_007086), *X. oryzae* pv. *oryzae* PX099A (NC_010712), *X. axonopodis* pv. *citri* 306 (NC_003919.1), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* NCPPB 1713 (JWTD02000065.1) และ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 โดยสามารถกำหนดลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ คือ XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' เป็น forward primer และ XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3' เป็น reward primer ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวตรวจสอบ เฉพาะเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เท่านั้นที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 788 bp (Lanes ที่ 1-13) ได้ (ภาพที่ 2) ส่วนเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* (Lanes ที่ 14-15), *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lanes ที่ 16-17), *X. axonopodis* pv. *citri*

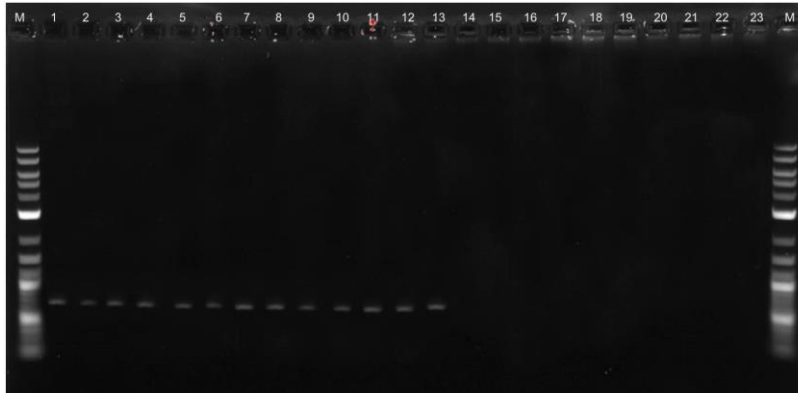


Figure 2. The specific band of *X. axonopodis* pv. *glycines* designed from *hrpB* gene separated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel. Lane M = 1 kb DNA Ladder, lanes 1-13 = *X. axonopodis* pv. *glycines* strains No.4, 12-2, KU-P-SW005, 35, 36, 37, 94, 98, 106, 114, 134, 162, and 166 respectively, lane 14 = *X. campestris* pv. *campestris* 8004, lane 15 = *X. campestris* pv. *campestris* 2015, lane 16 = *X. oryzae* pv. *oryzae* S345, lane 17 = *X. oryzae* pv. *oryzae* S225, lane 18 = *X. axonopodis* pv. *citri* 11, lane 19 = *X. axonopodis* pv. *citri* 12, lane 20 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* P5, lane 21 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* P21, lane 22 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and lane 23 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

(Lanes ที่ 18-19), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Lanes ที่ 20-21), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* E15 (Lane ที่ 22) และ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* A6 (Lane ที่ 23) ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวได้ แสดงว่าไพรเมอร์ XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' และ XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3' มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และจำเพาะเจาะจง โดยใช้เวลาในการตรวจสอบด้วยวิธี PCR เพียง 3 ชั่วโมงซึ่งรวดเร็วกว่าวิธีเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี Koch's postulates ซึ่งต้องใช้เวลาในการตรวจสอบอย่างน้อย 7 วันจนกว่าพืชจะแสดงอาการ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือเป็นรายงานแรกที่จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองที่ถูกต้อง และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่มีประสิทธิภาพ

สรุป

เมื่อนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง มาทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคบนถั่วเหลืองต่างสายพันธุ์ (Williams 82, Spencer, PI520733 และ สจ.5) นั้น สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 4 ฟิโนไทป์ตามระดับความรุนแรงในการก่อโรค เมื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 171 สายพันธุ์ โดยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มโดยแยกระหว่างสายพันธุ์อ่อนแอ (กลุ่ม 1) และเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (กลุ่ม 2A และ 2B) ได้ชัดเจน เนื่องจากไพรเมอร์ BOX แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันชัดเจนระหว่างเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์รุนแรงจำนวน 4 แถบ นอกจากนี้แล้วยังพบแถบดีเอ็นเอขนาด 650 bp จากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทั้ง 171 สายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์รุนแรงหรือสายพันธุ์อ่อนแอ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวส่ง sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นส่วนหนึ่งของยีน *hrpB* จึงนำข้อมูลที่ได้มา

พัฒนาเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยออกแบบไพรเมอร์บริเวณ promoter ของ *hrpB* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ 8ra, CFBP2526 และ CFBP7119 เปรียบเทียบกับยีนบริเวณ *hrpB* ของ *X. campestris* pv. *campestris* 8004 และ *X. oryzae* pv. *oryzae* PX099A ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ XagF: 5'ATGGATGCCACCGCACAG3' และ XagR: 5'GCGTCGAACCGCACATC3' สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 788 bp ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เท่านั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือเป็นรายงานแรกที่จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองที่ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยปริญญาเอกกาญจนาภิเษกและสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กุลขนา เกศสุวรรณ. 2546. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ด้วยเทคนิค rep-PCR. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 96 หน้า.
- ชนิษฐา ชันเดช. 2532. การแพร่ระบาดของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 105 หน้า.
- ชัยสิทธิ์ ปรีชา. 2531. การแพร่กระจาย ความรุนแรง และการประเมินความเสียหายเนื่องจากโรคใบจุดบนถั่วเหลืองในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 104 หน้า.
- ดุสิต อธิวัฒน์ สุธฤดี ประเทืองวงศ์ ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และ ประชุม จุฑาวรรณะ. 2548. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* โดยวิเคราะห์การเกิดโรคการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน และ BOX-PCR. หน้า 50-51. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการอรัญญาพิชแห่งชาติ “อรัญญาพิช เพื่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม” ครั้งที่ 7. 2-4 พฤศจิกายน 2548, เชียงใหม่.
- สุธฤดี ประเทืองวงศ์ สุพัฒน์ อรรถธรรม สฤทธิพร สุประยูร และ ปรีดา สัจจนเสถียรชัย. 2523. โรคแบคทีเรียและไวรัสถั่วเหลือง. หน้า 119-135. ใน: รายงานการสัมมนาการวิจัยและพัฒนาพืชโปรตีนสูง ประจำปี 2523. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริยะ สะวานนท์ สาธกา อินทะเวียง ภูมิพงศ์ บุญแสน และ พิรมา พิริยางกูร. 2559. ความหลากหลายของจุลินทรีย์และนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด. วารสารเกษตร 33(2): 235-244.
- Flor, H.H. 1942. Inheritance of pathogenicity of *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Kim, J.G., B.K. Park, C.H. Yoo, E. Jeon, J. Oh and I. Hwang. 2003. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *Journal of Bacteriology* 185(10): 3155-3166.
- Louws, F.J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and*

- Environmental Microbiology 60(7): 2286-2295.
- Mhedbi-Hajri, N., A. Darrasse, S. Pigné, K. Durand, S. Fouteau, V. Barbe, C. Manceau, C. Lemaire and M. A. Jacques. 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. BMC Evolutionary Biology 11: 67. doi: 10.1186/1471-2148-11-67.
- Park, H. J., S. W. Han, C. Oh, S. Lee, D. Ra, S.H. Lee and S. Heu. 2008. Avirulence gene diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolated in Korea. Journal of Microbiology and Biotechnology 18(9): 1500-1509.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 999 p.
- Schaad, N.W. 2001. Initial identification of common genera. pp.1-16. In: N. W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun (eds.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivaraition System Version 2.10. Applied Biostatic Inc., New York.
- Tervor, W. 1988. Plant genetic resources and food security. Food Policy 13(2): 178-184.
- Wydra, K., G. Khatri-Chhetri, A. Mavridis, R. Sikirou and K. Rudolph. 2004. A diagnostic medium for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. European Journal of Plant Pathology 110(10): 991-1001.
-