



การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ใน
มะนาว

SCREENING AND EVALUATION OF EFFICIENT BACTERIAL ANTAGONIST
FOR BIOCONTROL OF CITRUS CANCKER DISEASE IN LIME

ณัฐริดา สุธะยัง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแดง
เกอร์ในมะนาว



ณัฐริดา สูดย้ง

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

SCREENING AND EVALUATION OF EFFICIENT BACTERIAL ANTAGONIST
FOR BIOCONTROL OF CITRUS CANKER DISEASE IN LIME



NATTHIDA SUDYOUNG

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Biotechnology)
Faculty of Science Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาว
ของ
ณัฐธิดา สุธะยัง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชามาภรณ์ กระจ่างสงฆ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

ชื่อเรื่อง	การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาว
ผู้วิจัย	ณัฐธิดา สุธะยัง
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริวัชร ศรณียารักษ์

โรคแคงเกอร์ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) เป็นโรคระบาดที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตมะนาวแป้น (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle cv. Paan) เกษตรกรจึงนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมโรคจนเกิดมลภาวะสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษที่สามารถยับยั้งเชื้อ Xcc และมีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อประเมินความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคแคงเกอร์ของมะนาวแป้น ทำโดยคัดแยกเชื้อ Xcc และเชื้อปฏิบั้กษจากชิ้นส่วนมะนาวแป้น การทดสอบการยับยั้งเชื้อ Xcc ด้วยวิธี dual-culture plate พบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* SWUC02 และ *Bacillus velezensis* SWUA08 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ Xcc และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบั้กษทั้ง 2 ชนิดยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Xcc อีกด้วย การประเมินเชื้อปฏิบั้กษในการเป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในต้นกล้ามะนาวแป้นที่เพาะในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและในต้นมะนาวแป้น พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถลดความรุนแรงของโรคในต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการใช้ตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบั้กษทั้ง 2 ชนิด สามารถลดดัชนีความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อนำเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี reverse-transcription PCR (RT-PCR) พบว่าเชืวดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน leucine-rich repeat receptor like kinase (*LRR8*) ที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ *B. velezensis* SWUA08 สามารถใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาวแป้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นได้อีกด้วย

คำสำคัญ : โรคแคงเกอร์, เชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ, การควบคุมโรคโดยชีววิธี, Xanthomonad, ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค

Title	SCREENING AND EVALUATION OF EFFICIENT BACTERIAL ANTAGONIST FOR BIOCONTROL OF CITRUS CANKER DISEASE IN LIME
Author	NATTHIDA SUDYOUNG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Siriruk Sarawareeyaruk

Citrus canker caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is an epidemic disease that severely affects the production of Paan-lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle cv. Paan). Hence, in order to control the disease, farmers often use various chemical bactericides that result in environmental pollution. This research aims to screen efficient bacterial antagonists against Xcc that also have plant growth promoting traits, and to evaluate the ability of bacterial antagonists to induce defense-related genes in Paan-lime tree. The Xcc and the bacterial antagonists were isolated from lime leaves, sticks and fruit and tested for antagonistic activity against Xcc of isolates by a dual-culture plate assay. *Pseudomonas aeruginosa* SWUC02 and *Bacillus velezensis* SWUA08 showed clear inhibition zones, and the cell-free cultures obtained from both strains also inhibited Xcc growth *in vitro*. Then, the bacterial cells and cell-free cultures of *P. aeruginosa* SWUC02 and *B. velezensis* SWUA08 were evaluated for their potential against Xcc in Paan-lime seedlings and trees. *P. aeruginosa* SWUC02 significantly reduced the severity of disease in Paan-lime seedlings under tissue culture conditions. The bacterial cell and cell-free cultures of both strains could significantly reduce the disease severity index ($p < 0.05$) in Paan-lime trees grown in outdoor conditions. Afterwards, *P. aeruginosa* SWUC02 was chosen to evaluate the ability to induce defense-related gene expression by reverse-transcription PCR (RT-PCR). The results showed that this strain could induce leucine-rich repeat receptor like kinase (*LRR8*) gene at twenty-four hours post-inoculation (hpi). The results indicated that *P. aeruginosa* SWUC02 and *B. velezensis* SWUA08 can be used as efficient biocontrol agents for citrus canker control in Paan-lime. In addition, *P. aeruginosa* SWUC02 has the ability to induce a defense-related gene expression.

Keyword : Citrus canker disease, Bacterial antagonist, Biocontrol, Xanthomonad, Defense-related gene

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะข้าพเจ้าได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวัชร ศรวณียารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธูมาภรณ์ กระจำงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้ที่ทุ่มเทให้ความเมตตาและความช่วยเหลือ โดยเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำทั้งในด้านการศึกษาและการทำวิจัยอย่างเต็มที่ อีกทั้งยังคอยตักเตือนสั่งสอน แนะนำในด้านวิทยาการความรู้ จริยธรรมประกอบการทำงานปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ อาจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรัย อาจารย์ ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงภาควิชาชีพวิทย์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Shinji Tokuyama of Department of Applied Life Sciences, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan ผู้ที่มอบองค์ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัย รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และสนับสนุนทุนวิจัยตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และได้กรุณาชี้แนะแนวทางและคำแนะนำทำให้ข้าพเจ้าได้พัฒนาแนวคิดและแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขออ้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดาที่สนับสนุนและให้กำลังใจข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน สำหรับมิตรภาพและน้ำใจอันมีค่า ยิ่ง อีกทั้งขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี แต่หากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความบกพร่องประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับความผิดพลาดไว้แต่เพียงผู้เดียว

ณัฐธิดา สุธัยยัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. โรคแดงเกออร์	4
1.1 การระบาดของโรคแดงเกออร์.....	4
1.2 การแพร่กระจายและวงจรการเกิดโรคแดงเกออร์.....	5
1.3 อาการของโรคแดงเกออร์	6
2. เชื้อสาเหตุโรคแดงเกออร์.....	8
2.1 สายพันธุ์.....	8
2.2 ลักษณะทั่วไป	8
2.3 กลไกการก่อโรค	9
2.4 การคัดแยกและการตรวจสอบ	10

2.5 วิวัฒนาการต้านทานต่อสารเคมี	15
3. มะนาว	16
4. การควบคุมโรคแคงเกอร์.....	17
4.1 การเผาทำลาย	17
4.2 การฉีดพ่นสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์.....	17
4.3 การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกพืชสายพันธุ์ต้านทาน	18
4.4 การควบคุมโรคโดยชีววิธี.....	19
5. กลไกของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....	21
5.1 ภาวะปรสิต	21
5.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ	21
5.3 การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ	21
5.4 ภาวะแก่งแย่งแข่งขัน	22
5.5 การชักนำความต้านทานเชิงระบบของพืช	23
6. การป้องกันตัวเองของพืช (plant defense response).....	24
6.1 Leucine-rich repeat receptor-like kinase (<i>LRR-RLK</i>) gene.....	26
6.2 Nucleotide binding site–leucine-rich repeat (<i>NBS–LRR</i>) gene family	28
6.3 Pathogenesis-related gene 1 (<i>PR-1</i>).....	30
6.4 Lipoxxygenase (<i>LOX</i>) gene family.....	32
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย.....	35
อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	35
อาหารและสารเคมี.....	36
เอนไซม์ เวกเตอร์และชุดสำเร็จ (kit)	38
วิธีดำเนินการวิจัย.....	39

1. การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์.....	39
1.1 การคัดแยกเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	39
1.2 การตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อของเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	40
1.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์.....	41
1.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคงเกอร์.....	42
2. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	42
2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	42
2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	42
3. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช .43	
3.1 การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์.....	43
3.2 การละลายธาตุฟอสฟอรัส.....	43
3.3 การผลิตซิเดอริฟอว์.....	43
3.4 การผลิตกรดอินโดลอะซิติก.....	44
3.5 การตรึงก๊าซไนโตรเจน	44
3.6 การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase	44
4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	45
5. การตรวจสอบการผลิตสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	46
6. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้า มะนาวแป้นและต้นมะนาวแป้นในสภาพจริง	47
6.1 การเตรียมต้นมะนาวแป้น	47
6.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทาง ชีวภาพในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	47
6.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทาง ชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง	50

7. การตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้น	52
7.1 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น	52
7.2 การประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี reverse-transcription PCR (RT-PCR)	60
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	66
1. การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	66
1.1 การคัดแยกเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	66
1.2 การตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	67
1.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	69
1.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคงเกอร์	70
2. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษต่อเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ...	71
3. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช .	72
4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ	73
5. การตรวจสอบการผลิตสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ	77
6. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้น	77
6.1 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	78
6.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง	81
7. การตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้น	84
7.1 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น	84

7.2 การประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้น	
ด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR)	93
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลงานวิจัย	98
บรรณานุกรม	108
ภาคผนวก.....	119
ประวัติผู้เขียน.....	127



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1	ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ Xcc.....	14
ตาราง 2	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	35
ตาราง 3	อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	36
ตาราง 4	เอนไซม์ เวกเตอร์และชุดสำเร็จที่ใช้ในการวิจัย	38
ตาราง 5	ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit	40
ตาราง 6	สภาวะปฏิกิริยา colony PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit	41
ตาราง 7	สภาวะปฏิกิริยา PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit	46
ตาราง 8	กลุ่มการทดลองการประเมินผลของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	48
ตาราง 9	คะแนนความรุนแรงสำหรับการประเมินผลของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้น	48
ตาราง 10	กลุ่มการทดลองการประเมินเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	49
ตาราง 11	คะแนนความรุนแรงสำหรับการประเมินเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	50
ตาราง 12	กลุ่มการทดลองการประเมินเชื้อปฏิปักษ์ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง	51
ตาราง 13	ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น	53
ตาราง 14	ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา	54
ตาราง 15	สภาวะปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคโดยใช้ HotStarTaq DNA polymerase	54

ตาราง 16 สภาวะปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค โดยใช้ KOD-Plus-Neo DNA polymerase	55
ตาราง 17 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Eco</i> RI	56
ตาราง 18 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษากับพลาสมิด ดีเอ็นเอ.....	58
ตาราง 19 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Xho</i> I	59
ตาราง 20 กลุ่มการทดลองการประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วย RT-PCR.....	61
ตาราง 21 ไพรมเมอร์ที่ใช้ประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี RT-PCR	62
ตาราง 22 ส่วนประกอบปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ MyTaq™ One-Step RT-PCR kit	63
ตาราง 23 สภาวะปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ MyTaq™ One-Step RT-PCR kit	63
ตาราง 24 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ Xcc^D และ Xcc^{05} ของเชื้อปฏิปักษ์	72
ตาราง 25 การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อปฏิปักษ์	73
ตาราง 26 ลักษณะโคโลนี รูปร่างและการย้อมติดสีแกรมของเชื้อปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	74
ตาราง 27 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	77
ตาราง 28 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำ pairwise alignment ของบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคและยีนเปรียบเทียบกับจีโนมของมะนาวแป้น	92

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 วงจรการเกิดโรคแคงเกอร์	5
ภาพประกอบ 2 อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบในมะนาว	7
ภาพประกอบ 3 โคโลนีของเชื้อในกลุ่ม Xanthomonads บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D11	
ภาพประกอบ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรคในรูปแบบ zig-zag	25
ภาพประกอบ 5 การชักนำระบบความต้านทาน PTI และ ETI ในพืช	26
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ LRR-RLK	27
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ NBS-LRR ทั้ง 2 ประเภท.....	29
ภาพประกอบ 8 การชักนำการแสดงออกของยีน <i>PR-1</i> โดยเชื้อสาเหตุโรคพืช	31
ภาพประกอบ 9 การสังเคราะห์กรดจัสโมนิกผ่าน octadecanoid pathway	33
ภาพประกอบ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Xcc</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D	66
ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบบริเวณยีน <i>hrpW</i> ของเชื้อ <i>Xcc</i>	67
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบยีน <i>rpf</i> และบริเวณ ITS ของเชื้อ <i>Xcc</i>	68
ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไอโซเลต E02, E05, E08 และ E15.....	69
ภาพประกอบ 14 ลักษณะอาการของใบมะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ <i>Xcc</i> เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคงเกอร์เป็นเวลา 30 วันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	70
ภาพประกอบ 15 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณยีน 16S rRNA และยีน <i>gyrase A</i> gene ด้วยวิธี neighbor-joining	76
ภาพประกอบ 16 คะแนนความรุนแรงของโรคในการประเมินผลการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรีย ปฏิบัติกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 15 (เทา) และ 30 วัน (ดำ)	78
ภาพประกอบ 17 คะแนนความรุนแรงของโรคในการประเมินผลของเชื้อปฏิบัติในการยับยั้งโรค แคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 15 (เทา) และ 30 วัน (ดำ)	80
ภาพประกอบ 18 ดัชนีความรุนแรงของโรคในการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ	82

ภาพประกอบ 19 ใบมะนาวแป้นในการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้ง.....	83
ภาพประกอบ 20 แถบแบนดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้นด้วยวิธี PCR	84
ภาพประกอบ 21 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>PR-1</i>	85
ภาพประกอบ 22 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>Pt14</i>	87
ภาพประกอบ 23 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>LRR8</i>	88
ภาพประกอบ 24 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>LOX</i> (331 คู่เบส)	89
ภาพประกอบ 25 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>LOX</i> (175 คู่เบส)	90
ภาพประกอบ 26 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน <i>Ef-1a</i>	91
ภาพประกอบ 27 การแสดงออกของยีน <i>PR-1</i> ของต้นกล้ามะนาวแป้น.....	94
ภาพประกอบ 28 การแสดงออกของยีน <i>Pt14</i> ของต้นกล้ามะนาวแป้น	95
ภาพประกอบ 29 การแสดงออกของยีน <i>LRR8</i> ของต้นกล้ามะนาวแป้น.....	96
ภาพประกอบ 30 การแสดงออกของยีน <i>LOX</i> ของต้นกล้ามะนาวแป้น.....	97

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มะนาว (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) เป็นพืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) ที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากรายงานปี 2559 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบว่า พื้นที่เพาะปลูกรวมของมะนาวภายในประเทศไทยมีทั้งหมด 106,692 ไร่ โดยให้ผลผลิตเป็น 145,952 ตัน สายพันธุ์ของมะนาวที่ได้รับความนิยมทางการค้าคือ มะนาวแป้น (*C. aurantifolia* Swingle cv. Paan) เนื่องจากสามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ ออกผลดกตลอดปี เปลือกบาง ปริมาณน้ำคั้นมาก เมล็ดน้อยและมีกลิ่นหอม ⁽¹⁾ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ แต่การเพาะปลูกและการค้ามะนาวมักประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ เนื่องจากมะนาวแป้นเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์สูง ทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกมะนาวมีความเสี่ยงต่อการขาดทุน โดยผลมะนาวที่ติดโรคแคงเกอร์ไม่ผ่านข้อกำหนดด้านคุณภาพและความปลอดภัยของมาตรฐานสินค้าการเกษตร ⁽²⁾

โรคแคงเกอร์มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) ซึ่งถูกระบุเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชกักกันในหลายประเทศ ฉะนั้นจึงมีกฎหมายควบคุมและห้ามนำเข้าพืชที่ติดเชื้อมีผลอย่างเข้มงวด ⁽²⁾ โดยเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สร้างความเสียหายให้แก่พืชตระกูลส้มในวงกว้างและพบการระบาดหนักในหลายพื้นที่ทั่วโลก เชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายจากต้นหนึ่งไปสู่อีกต้นหนึ่งผ่านละอองฝ่น กระแสลมและอุปกรณ์ทางการเกษตร จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชผ่านทางบาดแผลหรือช่องเปิดตามธรรมชาติ และก่อให้เกิดอาการของโรคแคงเกอร์ขึ้น ซึ่งอาการของโรคแคงเกอร์สามารถพบได้บนใบ กิ่ง ก้านและผลของมะนาว โดยในระยะแรกปรากฏรอยแผลเป็นสะเก็ดนูนฟูสีขาว จากนั้นพัฒนาเป็นสีน้ำตาล แข็งขรุขระ อีกทั้งมีบริเวณสีเหลือง (yellow halo) และรอยฉ่ำน้ำล้อมรอบแผล (water-soaked margin) ต้นมะนาวที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะมีต้นแคระแกร็น ใบและผลร่วง กิ่งแห้ง ผลผลิตลดลงและต้นอาจตายในที่สุด ⁽³⁾

การควบคุมและป้องกันโรคแคงเกอร์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อลดปัญหาความเสี่ยงต่อสภาวะขาดทุนในกลุ่มเกษตรกรผู้เพาะปลูกมะนาว ปัญหาด้านการค้าระหว่างประเทศ และเพื่อเพิ่มผลผลิตของมะนาวให้เท่าเทียมกับความต้องการของตลาด ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ฉีดพ่นในปริมาณมาก เพื่อกำจัดเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ดังนั้นจึงเกิดการวิวัฒนาการของเชื้อให้ทนต่อสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์มากขึ้น ทำให้ต้องใช้

สารเคมีในกลุ่มอื่นร่วมด้วย⁽⁴⁾ ซึ่งการใช้สารเคมีอาจทำให้เกิดการตกค้างบนผลมะนาวและในสิ่งแวดล้อม การควบคุมโรคแคงเกอร์อีกวิธีหนึ่งคือ การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของมะนาวให้ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์มากยิ่งขึ้น แต่การปรับปรุงสายพันธุ์ส่งผลให้คุณลักษณะที่ดีของมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้การควบคุมโรคแคงเกอร์โดยชีววิธี (biological control) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการเจริญแก่งแย่งพื้นที่อาศัย ผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารบางชนิดออกมา เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค หรือสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (defense-related gene) ให้พืชมีภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรค ซึ่งการควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นแนวทางป้องกันโรคในระยะยาวและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะนาวแป้นและยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพธรรมชาติจริง
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะนาวแป้น และการสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในมะนาว
3. เพื่อศึกษาผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาว

ขอบเขตของการวิจัย

การคัดแยกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากใบและกิ่งของมะนาว จากนั้นศึกษาคุณสมบัติของไอโซเลทที่ถูกเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะนาวแป้น ได้แก่ การสร้างฮอริโมนพืชในกลุ่มออกซิน การตรึงก๊าซไนโตรเจน การละลายธาตุฟอสฟอรัส การสร้างซิดเอร์โรฟอว์ (siderophore) การสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase และการสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide, HCN) จากนั้นจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA และยีน gyrase A นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ รวมทั้งทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ (extracellular secondary metabolite) ของเชื้อ

แบคทีเรียปฏิบัฏต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ และการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏที่คัดแยกได้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพ (biocontrol agent) เพื่อป้องกันการเกิดโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพธรรมชาติจริง อีกทั้งศึกษาผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคแคงเกอร์ของมะนาวแป้น

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์อย่างมีประสิทธิภาพ และมีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมโรคแคงเกอร์ทางชีวภาพได้จริง
2. ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคแคงเกอร์ของมะนาวแป้นกับเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ ซึ่งมีผลในการเพิ่มหรือลดความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคแคงเกอร์

1.1 การระบาดของโรคแคงเกอร์

โรคแคงเกอร์มักพบการระบาดในพืชตระกูลส้มซึ่งเกิดจากติดเชื้อแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ⁽⁵⁾ จุดกำเนิดของโรคแคงเกอร์ยังไม่มีข้อมูลที่ระบุแน่ชัดแต่เชื่อกันว่าเป็นประเทศในทวีปเอเชีย และมีการระบาดนานมากกว่า 191 ปี เนื่องจากตรวจพบรอยโรคแคงเกอร์บนชิ้นส่วนของตัวอย่างพืชตระกูลส้มในสวนพฤกษศาสตร์เมืองหลวงคิงซึ่งเป็นตัวอย่างโคมะงั่ว (*Citrus medica*) ที่ถูกเก็บจากประเทศอินเดียในช่วงปี ค.ศ. 1827-1831 ⁽⁶⁾

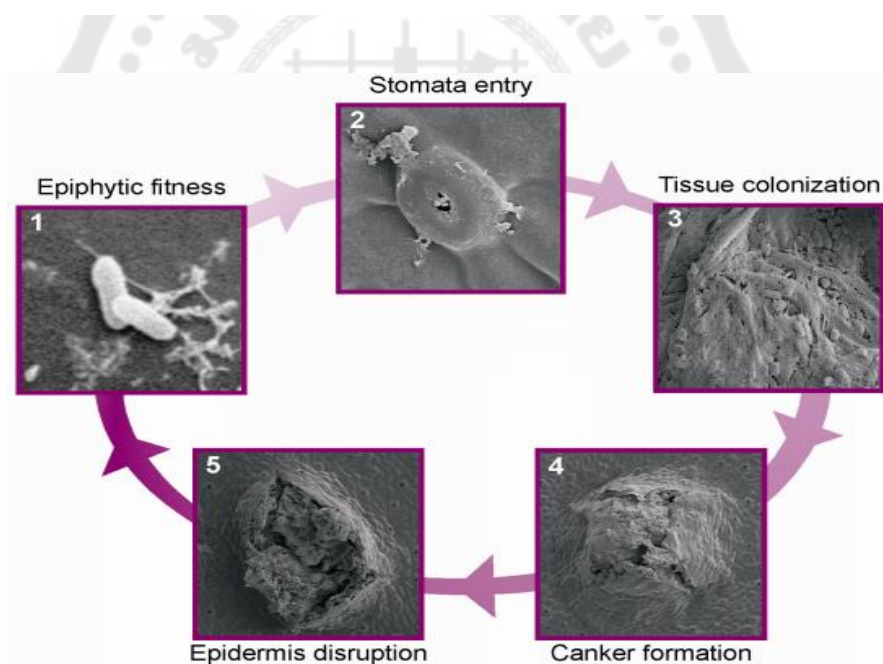
ในปัจจุบันการระบาดของโรคแคงเกอร์พบได้หลายพื้นที่ทั่วโลก เช่น ทวีปเอเชีย, ทวีปอเมริกา, ประเทศแถบตะวันออกกลาง, หมู่เกาะบนมหาสมุทรแปซิฟิกและมหาสมุทรอินเดีย สำหรับในประเทศแอฟริกาใต้และออสเตรเลียประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคแคงเกอร์ แต่จำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและตรวจสอบการนำเข้าสินค้าทางการเกษตรอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันการกลับมาระบาดของโรคแคงเกอร์อีกครั้ง อย่างไรก็ตามในเดือนเมษายนปี ค.ศ. 2018 ประเทศออสเตรเลียตรวจพบและยืนยันการระบาดของโรคแคงเกอร์อีกครั้งจึงจำเป็นต้องมีการติดตามและควบคุมโรคอย่างเข้มงวด ⁽²⁾

ประเทศไทยไม่มีหลักฐานที่บ่งชี้แน่ชัดว่าการระบาดของโรคแคงเกอร์เกิดขึ้นเมื่อใด แต่มีหนังสือและรายงานเริ่มกล่าวถึงโรคแคงเกอร์ในช่วงปี พ.ศ. 2500-2504 โดยเกษตรกรชาวไทยเรียกชื่อโรคแคงเกอร์อีกอย่างหนึ่งว่า โรคขี้กลากหรือโรคขี้เรื้อน ซึ่งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของพืชตระกูลส้มอย่างกว้างขวาง และพบการระบาดทั่วทุกแหล่งที่มีการเพาะปลูกพืชตระกูลส้ม เช่น มะนาว, ส้มเกลี้ยง (*Citrus sinensis*), ส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) และส้มที่ใช้เป็นสายพันธุ์ต้นตอ ⁽⁷⁾ และยังคงระบาดอย่างหนักมาจนถึงปัจจุบัน

1.2 การแพร่กระจายและวงจรการเกิดโรคแคงเกอร์

การแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์มักเกิดขึ้นในฤดูฝน โดยมีพาหะเป็นละอองฝนและลมพายุ นอกจากนี้การใช้ชิ้นส่วนพืชที่ติดเชื้อในการขยายพันธุ์และการใช้เครื่องมือทางการเกษตรโดยที่ไม่มีการทำความสะอาดก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยแพร่กระจายเชื้อสาเหตุโรคในระยะไกลได้ แต่ยังไม่มียางานถึงการถ่ายทอดโรคแคงเกอร์ผ่านทางเมล็ดพันธุ์⁽³⁾

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์มักเข้าบุกรุกเซลล์พืชผ่านทางปากใบ หรือบาดแผลซึ่งอาจเกิดจากการใช้อุปกรณ์ทางการเกษตรหรือการกัดกินของศัตรูพืช เมื่อมีการเพิ่มจำนวนและเข้าอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคจะทำให้เกิดรอยแผลที่มีลักษณะแตกนูน จากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่มากเกินไปของเซลล์พืช (cell hyperplasia) ซึ่งถูกชักนำโดยเชื้อสาเหตุโรค (ภาพประกอบ 1)⁽⁵⁾ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะสามารถแพร่กระจายไปสู่พืชอาศัยต้นใหม่ได้ หากเชื้อสาเหตุโรคอยู่บนบริเวณผิวของพืชอาศัยจะตายลง เนื่องจากสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง⁽⁸⁾



ภาพประกอบ 1 วงจรการเกิดโรคแคงเกอร์

ที่มา: Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Zimaro T, Sgro GG, Ficarra F, et al. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. In: Méndez-Vilas A, editor. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Spain: FORMATEX; 2010. p. 196-204⁽⁵⁾

1.3 อาการของโรคแคงเกอร์

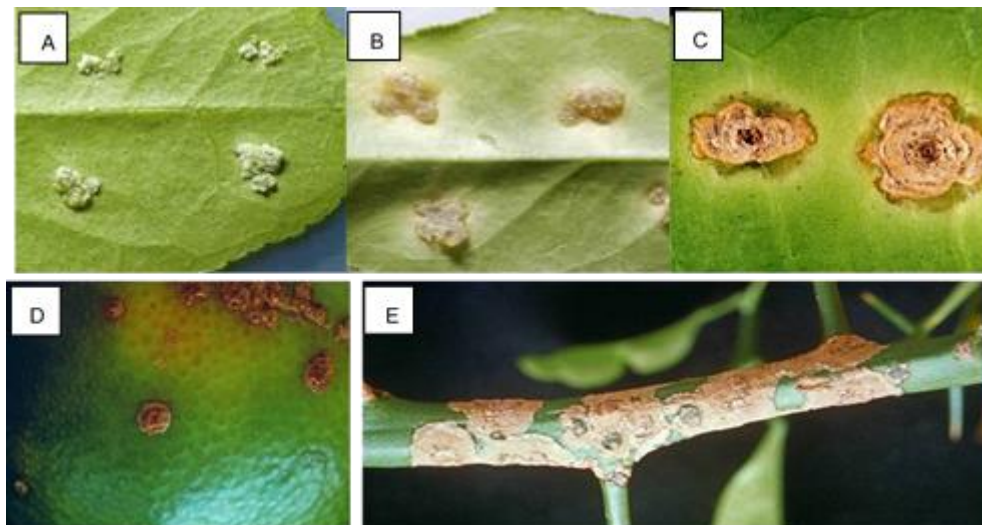
เชื้อสาเหตุโรคมักเข้าบุกรุกพืชอาศัยบริเวณส่วนเหนือดิน ขนาดของรอยโรคแคงเกอร์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืชอาศัย โดยต้นที่ติดเชื้อโรคแคงเกอร์อย่างรุนแรงจะทรุดโทรม ใบร่วง ยอดตาย ผลผลิตตกต่ำ ไม่มีคุณภาพ สุดท้ายต้นจะแคระแกร็นและตายในที่สุด

1.3.1 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์

ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเริ่มสังเกตรอยโรคแคงเกอร์บนใบได้ชัดเจนหลังจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค 7-10 วัน หากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมอาจต้องใช้เวลามากกว่า 60 วัน โดยใบแก่มีความต้านทานต่อโรคมากกว่าใบอ่อน⁽³⁾ ในระยะเริ่มแรกพบแผลเป็นจุดขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด ลักษณะฟูคล้ายฟองน้ำสีขาว (ภาพประกอบ 2A) ต่อมาขยายใหญ่ขึ้นและเป็นสีเหลืองอ่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุดประมาณ 2-10 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 2B) และพัฒนาไปเป็นแผลเนื้อเยื่อตายที่มีสะเก็ดแข็งขรุขระ เป็นสีน้ำตาล ขอบนูนตรงกลางยุบลงไปเล็กน้อย พบวงแหวนสีเหลืองและรอยฉ่ำน้ำล้อมรอบแผล (ภาพประกอบ 2C) ซึ่งวงแหวนสีเหลืองและรอยฉ่ำน้ำจะค่อย ๆ หายไปเมื่อแผลแก่⁽³⁾

อาการบนผลคล้ายกับบนใบ (ภาพประกอบ 2D) แต่แผลจะฝังลึกในเปลือกของผลประมาณ 1 มิลลิเมตร อาจมียางไหลแผลหลุดออก บางครั้งพบวงแหวนสีเหลืองรอบแผลแต่ไม่ชัดเจน⁽⁷⁾ การติดเชื้อโรคแคงเกอร์อย่างรุนแรงในผลอ่อนอาจทำให้ผลร่วงก่อนกำหนด โดยทั่วไปอาการของโรคแคงเกอร์จะพบบนเปลือกของผลเท่านั้น ไม่ทำลายถึงเนื้อภายในผล แต่บางกรณีหากแผลลึกเข้าไปถึงเนื้อผลจะเกิดเป็นรอยแตกตามขวาง และอาจเกิดการติดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นซ้ำจนแผลเน่าได้⁽⁸⁾

อาการที่พบบนกิ่งและก้านมีลักษณะคล้ายกับอาการบนใบ (ภาพประกอบ 2E) แต่แผลสามารถลามขยายไปรอบกิ่ง ทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอน อีกทั้งไม่มีวงแหวนสีเหลืองรอบรอยแผล⁽³⁾ โดยแผลจะอยู่บนกิ่งและก้านได้นานมากกว่าใบและผล ฉะนั้นจึงเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อสาเหตุโรคในฤดูกาลต่อไปได้⁽⁸⁾



ภาพประกอบ 2 อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบในมะนาว
(A-C) อาการบนใบ, (D) อาการบนผลและ (E) อาการบนกิ่ง

ที่มา : (A-B) Department of Agriculture AG. National diagnostic protocol for asiatic citrus canker, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2016. p. 33.⁽⁹⁾ (C) Florida Division of Plant Industry. Symptoms on leaves. 2007.⁽¹⁰⁾ (D) Goto M. *Xanthomonas citri* pv. *citri* infection on fruit of *Citrus unshiu* showing crater-like lesions. 2004a.⁽¹¹⁾ (E) Goto M. Stem canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* on *Citrus natsudaidai*. 2004b.⁽¹²⁾

1.3.2 ลักษณะอาการร่วมกับหนอนซอนใบ

หนอนซอนใบในพืชตระกูลส้ม (*Phyllocnistis citrella*) จะเข้าทำลายกัดกินชั้นเอพิดอร์มิส (epidermis) ของใบ ผล กิ่งและก้าน ทำให้เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถเข้าบุกรุกเนื้อเยื่อชั้นในของพืชได้ง่ายขึ้น แผลโรคแคงเกอร์จึงลุกลามไปตามรอยที่หนอนซอนใบกัดกิน ดังนั้นการระบาดของหนอนซอนใบจะช่วยให้โรคแคงเกอร์มีความรุนแรงและเกิดได้รวดเร็ว อีกทั้งยังเพิ่มการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคไปสู่พื้นที่อื่น⁽⁸⁾

2. เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

2.1 สายพันธุ์

โรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ โรคแคงเกอร์ A, B, C, D และ E โดยแต่ละชนิดถูกแบ่งตามถิ่นกำเนิด พื้นที่ระบาด ความจำเพาะกับพืชอาศัย รวมทั้งลักษณะจີโนมไทป์ของเชื้อสาเหตุโรค แต่ในปัจจุบันเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ถูกจัดกลุ่มใหม่เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน โดยเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มที่ 1 คือ *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ก่อให้เกิดโรคแคงเกอร์ A โดยสามารถเข้าบุกรุกพืชอาศัยในตระกูลส้มได้หลายชนิด มีถิ่นกำเนิดจากทวีปเอเชียและพบการระบาดมากที่สุดทั่วโลก ดังนั้นโรคแคงเกอร์ A จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Asiatic citrus canker⁽¹³⁾ เชื้อสาเหตุโรคกลุ่มที่ 2 คือ *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* สายพันธุ์ B, C และ D โดยพืชอาศัยของเชื้อสายพันธุ์ B เป็นส้มซ่า (*Citrus aurantium*), ส้มโอ, เลมอน (*Citrus limon*) และมะนาว ส่วนเชื้อสายพันธุ์ C จะก่อโรคในมะนาวเท่านั้น ทั้งเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ B และ C มีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกาใต้ สำหรับเชื้อสายพันธุ์ D มีการก่อโรคในมะนาวเช่นเดียวกัน แต่ทำให้เกิดอาการของโรคแคงเกอร์บนส่วนต่าง ๆ ยกเว้นบนผลมะนาว และถูกรายงานในประเทศเม็กซิโก ซึ่งมีลักษณะทางเซรุ่มวิทยาแตกต่างจากเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ A, B และ C สุดท้ายเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มที่ 3 คือ *X. alfae* subsp. *citrumelonis* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ E มีถิ่นกำเนิดในรัฐฟลอริดาของสหรัฐอเมริกา จากผลการทำ restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่ามีความแตกต่างกับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สายพันธุ์อื่น และมักก่อโรคในส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*), มะนาวและเกรปฟรุต (*Citrus paradisi* var. Duncan) โดยพบรอยฉ่ำน้ำและวงแหวนสีเหลืองรอบรอยแผล แต่แผลจะเรียบแบนต่างจากรอยโรคแคงเกอร์ในกลุ่มอื่น^(14, 15)

2.2 ลักษณะทั่วไป

เชื้อ Xcc เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นมีขนาด $1.5-2.0 \times 0.5-0.75$ ไมโครเมตร ต้องการอากาศในการเจริญ มีแฟลกเจลลาเส้นเดียวบริเวณปลายหรือหัวของเซลล์ (monotrichous flagellum) เชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองที่เรียกว่า แซนโทโมนาดีน (xanthomonadin) ทำให้โคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคมีสีเหลือง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบจะผลิตแซนแทน (xanthan) ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide, EPS) ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ และทำให้โคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคคือ 28-30 องศาเซลเซียส⁽⁶⁾

2.3 กลไกการก่อโรค

เชื้อ *Xcc* มีกลไกที่หลากหลายในการเข้าบุกรุกและก่อให้เกิดอาการของโรคแคงเกอร์ สำหรับกลไกที่ใช้เพื่อเข้ายึดเกาะกับพื้นผิวของพืชอาศัย ทำโดยการสร้างโปรตีน XacFhaB เป็นโปรตีนแอดฮีซิน (adhesin) ที่มีความจำเพาะต่อการเข้ายึดเกาะและสำคัญต่อการก่อโรคแคงเกอร์ รวมทั้งมีผลต่อความรุนแรงของโรคโดยตรง เนื่องจากเมื่อทดสอบการกลายของยีน *XacFhaB* พบว่าเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์กลายจะเข้ายึดเกาะผิวของพืชอาศัยได้น้อยลง นอกจากนี้ขนาดและจำนวนของรอยแผลที่พบมีอาการไม่รุนแรงเท่ากับอาการที่เกิดจากเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ปกติ⁽¹⁶⁾

เมื่อเชื้อสามารถเข้ายึดเกาะกับผิวของพืชอาศัยได้สำเร็จจะมีการส่งผ่านโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (effector protein) เข้าสู่เซลล์พืชผ่านทาง type III protein secretion system (T3SS) โดยกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่สร้าง T3SS คือ hypersensitive response และ pathogenicity (*hrp*) gene ซึ่ง effector protein มีบทบาทไปปรับเปลี่ยนหรือลดการตอบสนองในกลไกการป้องกันตัวเองของพืช ส่งผลให้สภาวะภายในเซลล์พืชเหมาะสมต่อการเข้าบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค หรือเหมาะสมต่อการก่อโรคแคงเกอร์⁽⁵⁾

โปรตีน PthA เป็น effector protein ที่จำเป็นต่อการเกิดอาการของโรคแคงเกอร์ ซึ่งถูกกำหนดการแสดงออกโดยบริเวณ pathogenicity gene (*PthA*) ที่มีอยู่หลายตำแหน่งบนพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *Xcc* แต่ไม่พบยีน *PthA* ในเชื้อ *Xanthomonas* ชนิดอื่นที่ไม่ก่อโรคแคงเกอร์ มีการทดลองยืนยันทำโดยแยกยีน *PthA* จากเชื้อ *Xcc* ถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Xanthomonas* อื่น ๆ และทดสอบการก่อโรคแคงเกอร์พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดอาการของโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มได้⁽¹⁷⁾

เชื้อ *Xcc* สามารถสร้างแซนแทนที่มีลักษณะเป็นเมือกหลังออกมาออกเซลล์ ซึ่งการสร้างแซนแทนถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน regulation of pathogenicity factors (*rpf*)⁽⁵⁾ แซนแทนไม่ได้มีบทบาทในระยะแรกของการเข้าบุกรุก แต่มีความสำคัญในการเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Xcc* ในเซลล์พืช นอกจากนี้แซนแทนและโปรตีน XacFhaB ยังเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อบริเวณผิวนอกของพืชอาศัย และเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Xcc* ไปยังเซลล์ข้างเคียง ทำให้เกิดการขยายและลุกลามของอาการโรคแคงเกอร์⁽¹⁶⁾

จีโนมของเชื้อ *Xcc* มีบริเวณยีน plant natriuretic peptide (PNP)-like (*XacPNP*) โดยจะพบการแสดงออกในระหว่างที่เชื้อก่อให้เกิดโรคแคงเกอร์ในพืชเท่านั้น ซึ่ง XacPNP เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่จัดเป็น effector protein ชนิดหนึ่งซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน PNP ที่พืชสร้างขึ้นเอง เพื่อควบคุมสมดุลไอออนและน้ำภายในเซลล์ของพืช โปรตีน XacPNP มีบทบาทไป

กระตุ้นการสังเคราะห์แสง และช่วยลดความเครียดของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยจะเป็นผลดีต่อการดำรงชีวิตของเชื้อ Xcc ภายในเซลล์พืช เนื่องจากเชื้อ Xcc จะอาศัยอยู่ในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (biotrophic lifestyle) ⁽⁵⁾

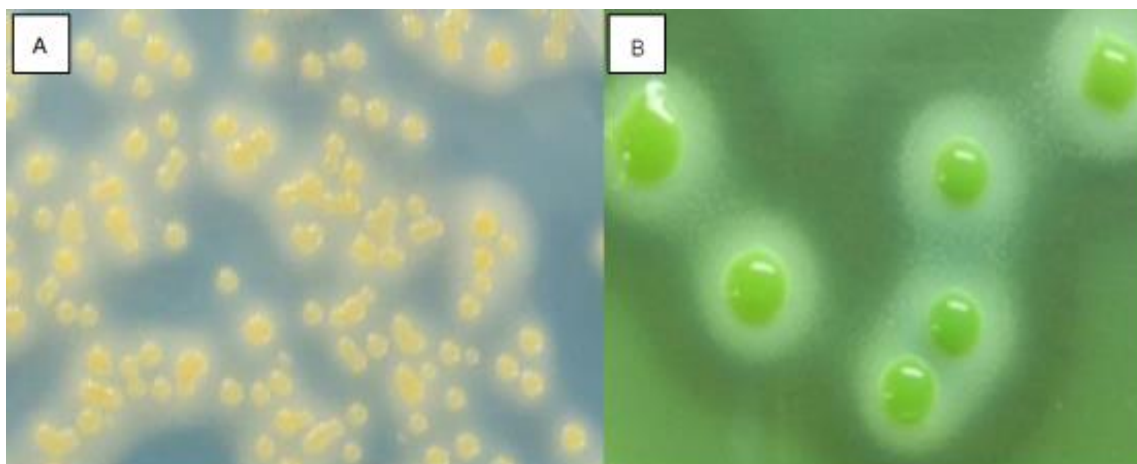
2.4 การคัดแยกและการตรวจสอบ

2.4.1 การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค

เชื้อ Xcc สามารถคัดแยกได้จากใบ ผล กิ่งและก้านของพืชตระกูลส้มที่มีรอยโรคแคงเกอร์ ซึ่งควรคัดแยกเชื้อทันทีหลังจากการเก็บตัวอย่าง โดยใช้อาหาร nutrient agar ที่เติม 0.1% กลูโคส (NGA) กรณีที่แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างที่ได้มาจากสิ่งแวดล้อมควรใช้อาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 0.01% หรืออาจคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone glucose agar และ Wakimoto medium โดยเติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas* จะมีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบและมีเมือกเยิ้มบนอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เวลาบ่ม 3-5 วันที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ⁽¹³⁾

อาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือก modified tween medium B (mTMB) ที่มี tween 80 เป็นส่วนประกอบสำคัญและมีการเติมยาปฏิชีวนะ cephalixin, 5-fluorouracil, tobramycin sulphate และ nystatin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด แบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Pseudomonas* และเชื้อรา ซึ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas* บนอาหาร mTMB หลังจากบ่ม 4-7 วันจะมีสีเหลืองอ่อน กลม นูน ขนาดเล็ก มีเมือกเยิ้มเล็กน้อย พบตะกอนขาวขุ่น (ภาพประกอบ 3A) เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลาย Tween 80 ในอาหาร mTMB ได้ ⁽¹⁸⁾

Lee และคนอื่น ๆ (2009) ได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas* differential medium (Xan-D) ซึ่งเป็นอาหารที่บ่งบอกความแตกต่าง (differential medium) ของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonads* ออกจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีโคโลนีสีเหลืองคล้ายคลึงกัน อาหารเลี้ยงเชื้อ Xan-D มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ Tween 80 และ skim milk อีกทั้งมีการเติมอินดิเคเตอร์ (indicator) เป็น bromothymol blue และยาปฏิชีวนะ cephalixin, 5-fluorouracil และ cycloheximide เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียแกรมบวก โดยหลังจากการบ่ม 3-4 วัน โคโลนีของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonads* จะมีลักษณะมันวาว กลม นูน และมีสีเหลืองอมเขียว เนื่องจากเชื้อสามารถย่อย Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จึงทำให้ค่าพีเอชของอาหารสูงขึ้น ส่งผลให้ bromothymol blue เปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีเขียว และพบตะกอนขาวขุ่นขนาดเล็กครอบโคโลนีจากการย่อยสลาย Tween 80 และรอบนอกของบริเวณขาวขุ่นพบบริเวณใสขนาดใหญ่จากการย่อยสลาย skim milk (ภาพประกอบ 3B) ⁽¹⁹⁾



ภาพประกอบ 3 โคโลนีของเชื้อในกลุ่ม Xanthomonads บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D
(A) อาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ (B) อาหารเลี้ยงเชื้อ Xan-D

ที่ ม า : (A) International Seed Federation. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. on pepper seed. 2013. p. 1-7. ⁽²⁰⁾ (B) Lee YA, Sung AN, Liu TF, Lee YS. Combination of chromogenic differential medium and *estA*-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(21): 6831-8. ⁽¹⁹⁾

2.4.2 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค

การระบุชนิดของเชื้อ *Xcc* ควรตรวจสอบด้วยเทคนิคที่หลากหลาย เนื่องจากเชื้อในสกุล *Xanthomonas* บางชนิด สามารถคัดแยกได้จากพืชตระกูลส้มเช่นเดียวกัน ดังนั้นควรใช้เทคนิคที่นอกเหนือจากการศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.2.1 การตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา

เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยาถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Xcc* ยกตัวอย่างเช่น indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ double antibody sandwich ELISA ซึ่งต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *Xcc* เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อ *Xcc* โดยใช้เทคนิค ELISA แต่ต้องใช้ตัวตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น เนื่องจากมีความไวต่ำกว่าที่จะใช้ตรวจหาเชื้อ *Xcc* ในตัวอย่างพืช และยังสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) กับเชื้อในสกุลเดียวกันได้⁽¹³⁾

2.4.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี

เชื้อ *Xcc* มีลักษณะทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน ซึ่งมีลักษณะบางประการทางชีวเคมีที่นิยมใช้จัดจำแนก โดยเชื้อ *Xcc* ให้ผลบวกกับการทดสอบการย่อยแป้ง, casein, Tween 80, esculin, gelatin และ pectin, การทดสอบ catalase, การใช้กรดอะมิโน methionine และ cysteine และให้ผลลบกับการทดสอบ oxidase, การทดสอบ nitrate reduction, การใช้กรดอะมิโน asparagine และ 0.02% triphenyltetrazolium chloride⁽¹³⁾

2.4.2.3 การตรวจสอบความสามารถในการก่อโรค

ทำโดยปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบการก่อโรคบนใบพืช และควรทดสอบในพืชที่เป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ ยกตัวอย่างเช่น เกรปฟรุ้ต, ส้มวาเลนเซีย (*C. sinensis* var. Valencia) และมะนาว เพื่อยืนยันความถูกต้องในการระบุชนิดของเชื้อ *Xcc* ที่มีความสามารถในการก่อโรคแคงเกอร์ โดยทำแผลบนใบแล้วทาเชื้อทดสอบหรือฉีดพ่นใบด้วยเชื้อทดสอบ นอกจากนี้ควรทดสอบโดยใช้ใบอ่อน เนื่องจากอยู่ในระยะที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคสูง อาการของโรคแคงเกอร์จะปรากฏขึ้นหลังจากปลูกเชื้อ 7-14 วันหากสภาวะเหมาะสม ระยะแรกแผลจะมีลักษณะเป็นสีขาวฟู สำหรับการทดสอบการก่อโรคควรใช้เชื้อทดสอบที่มีจำนวน 10^6 - 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (colony forming unit per mL, CFU/mL) และควรมีชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของรอยโรคแคงเกอร์⁽¹³⁾

2.4.2.4 การตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

การใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Xcc* ควรใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดที่ต่างกัน เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียวยังขาดความจำเพาะและไม่น่าเชื่อถือมากพอตามคำแนะนำของมาตรฐาน International Standards for Phytosanitary Measure (ISPM) 27⁽¹³⁾ โดยคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 สามารถเลือกใช้ไพรเมอร์ *J-pth1/J-pth2* ซึ่งจำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน PthA หรือใช้ไพรเมอร์ *J-RXg/J-RXc2* ซึ่งจำเพาะกับบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) regions ของ 16S และ 23S rDNAs ในเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ A ส่วนคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 2 สามารถเลือกใช้ไพรเมอร์ *Xac01/Xac02* ซึ่งจำเพาะกับบริเวณกลุ่มของยีน *rpf* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแซนแทนหรือเอนไซม์ที่จำเป็นในการก่อโรคแคแคงเกอร์ หรือเลือกใช้ไพรเมอร์ *XACF/XACR* ซึ่งจำเพาะกับบริเวณยีน *hrpW* ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *hrp* โดยยีน *hrpW* มีโดเมนที่คล้ายคลึงกับบริเวณยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโครงสร้าง hairpin และเอนไซม์ pectate lyase ของบริเวณ T3SS ที่ใช้แทงทะลุผ่านและย่อยสลายผนังเซลล์พืช ตามลำดับ⁽²¹⁾ ข้อมูลของไพรเมอร์ที่กล่าวด้านบนแสดงดังตาราง 1



ตาราง 1 โปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ *Xcc*

โปรแกรม	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	บริเวณจำเพาะ	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>J-pth1</i> (Forward)	CTTCAACTCAAACGCCGGAC	Pathogenicity gene (<i>pthA</i>)	198	(22)
<i>J-pth2</i> (Reverse)	CATCGGCTGTTCGGGAG			
<i>J-Rxg</i> (Forward)	GCGTTGAGGCTGAGACATG	Internal transcribed spacer (ITS) regions of 16S and 23S rDNAs	179	(22)
<i>J-Rxc2</i> (Reverse)	CAAGTTGCCCTCGGAGCTATC			
<i>Xac01</i> (Forward)	CGCCATCCCCACCACCACGAC	Regulation of pathogenicity factor (<i>rpf</i>) gene cluster	582	(23)
<i>Xac02</i> (Reverse)	AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA			
<i>XACF</i> (Forward)	CGTCGCAATACGATTGGAAC	Hypersensitive response and pathogenicity gene (<i>hrpW</i>)	561	(21)
<i>XACR</i> (Reverse)	CGGAGGCATTGTCGAAGGAA			

ที่มา: ดัดแปลงจาก ISPM 27 Annex 06. DP 06: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Diagnostic protocols for regulated pests. Rome: IPPC, FAO; 2014. p. 1-22. ⁽¹³⁾

2.5 วิวัฒนาการด้านทานต่อสารเคมี

ในธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียสามารถเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนยีน หรือสามารถถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านกระบวนการถ่ายทอดยีนแนวนราบ (horizontal gene transfer) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคบางยีนที่อยู่บนพลาสมิดอาจถูกถ่ายทอดไปสู่เชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด ทำให้เกิดวิวัฒนาการของเชื้อสาเหตุโรคเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค หรือมีความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์

Behlau และคนอื่น ๆ (2011) ⁽²⁴⁾ รายงานว่าการต้านทานต่อสารเคมีประเภท คอปเปอร์ของเชื้อ *Xcc* เกิดจากกระบวนการขับสารดังกล่าวออกนอกเซลล์และการสะสมไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่าปกติ ซึ่งกลไกเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีน *copL*, *copA* และ *copB* โดยเกี่ยวข้องในการสร้างโปรตีนที่จับกับสารกลุ่มคอปเปอร์ ส่วนมากมักพบยีนอยู่บนพลาสมิดของเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นการถ่ายทอดพลาสมิดที่มียีนต้านทานสารคอปเปอร์ผ่านกระบวนการคอนจูเกชันเป็นผลให้การควบคุมโรคแคงเกอร์ด้วยสารเคมีกลุ่มดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ

เชื้อ *Xcc* สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่ใช้ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ โดย Chiou และ Jones (1995) ⁽²⁵⁾ ตรวจพบการกลายแบบ point mutation บริเวณยีน *rpsL* ซึ่งถูกแปลรหัสเป็น ribosomal protein S12 (องค์ประกอบของไรโบโซม) ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถขัดขวางการทำงานของไรโบโซมในสายพันธุ์ที่มีการกลายได้ และอีกกลไกหนึ่งเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะ streptomycin ยกตัวอย่างเช่น พลาสมิด pEa3 ที่มี transposon Tn5393 ซึ่งมีลำดับที่ซ้ำกันของยีน *strA-strB* โดยพลาสมิดดังกล่าว สามารถถูกส่งถ่ายไปยังเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ผ่านกระบวนการคอนจูเกชัน ⁽²⁶⁾ Hyun และคนอื่น ๆ (2012) ⁽²⁷⁾ ศึกษาการกลไกการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin ของเชื้อ *Xcc* จำนวน 21 ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรคแคงเกอร์บนเกาะเชจู พบว่ามีจำนวน 18 ไอโซเลทที่เกิดการกลายบริเวณยีน *rpsL* ที่โคดอนตำแหน่ง 41 จาก AAG เป็น AGG เป็นผลให้กรดอะมิโน lysine ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน arginine และตรวจพบการได้รับพลาสมิดที่มียีน *strB* ดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับรายงานข้างต้น อีกทั้งการชักนำให้เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin สามารถเกิดขึ้นได้ง่าย โดยการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ต้านทานและสายพันธุ์อ่อนแอร่วมกัน

3. มะนาว

มะนาวเป็นพืชตระกูลส้มที่จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Rutaceae โดยเชื่อกันว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บริเวณภูมิภาคอินโดมาลายัน (Indo-Malayan region) ในปัจจุบันการปลูกมะนาวแพร่กระจายไปในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภูมิอากาศอบอุ่นและเขตร้อน

ประเทศไทยมีการค้ามะนาวเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยนิยมปลูกทางการค้า 2 ชนิดหลัก ได้แก่ *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle ซึ่งมีชื่อสามัญว่า Mexican lime หรือ key lime ครอบคลุมมะนาวไทย เช่น มะนาวแป้น มะนาวไข่ มะนาวหนัง และลูกผสมอื่น ๆ อีกชนิดหนึ่งคือ *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka ซึ่งมีชื่อสามัญว่า Persian lime, bearss lime หรือ Tahiti lime เช่น มะนาวตาฮิติ และลูกผสมอื่น ๆ ⁽²⁸⁾ ในปี พ.ศ. 2559 พื้นที่การปลูกมะนาวในประเทศไทยมีทั้งหมด 106,692 ไร่ ซึ่งมีผลผลิต 145,952 ตันต่อปี ภูมิภาคที่มีการเพาะปลูกมะนาวมากที่สุดของประเทศไทยคือ ภาคกลางและภาคเหนือ โดยสายพันธุ์ของมะนาวที่ได้รับความนิยมทางการค้าคือมะนาวแป้น เนื่องจากสามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ ออกผลตลอดปี ให้ผลดก เปลือกบาง ปริมาณน้ำคั้นมาก เมล็ดน้อยและมีกลิ่นหอม มะนาวพันธุ์แป้นเกิดจากการเพาะเมล็ดของมะนาวพื้นบ้านจนมีการกลายพันธุ์ได้ลักษณะที่ดี ⁽¹⁾ ทำให้เป็นที่ต้องการของตลาดภายในและภายนอกประเทศ แต่การเพาะปลูกและการค้ามะนาวแป้นมักประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ เนื่องจากมะนาวแป้นเป็นพืชอาศัยที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์สูงมาก ⁽³⁾ ทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกมะนาวมีความเสี่ยงต่อการขาดทุน ยกเว้นมะนาวแป้นพันธุ์พิจิตร 1 ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้ดียิ่งขึ้น แต่การปรับปรุงพันธุ์ส่งผลให้คุณลักษณะที่ดีของมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ⁽²⁹⁾

การกำหนดมาตรฐานของมะนาวทั้งด้านคุณภาพและความปลอดภัยถูกระบุไว้ในมาตรฐานสินค้าเกษตร โดยมีข้อกำหนดขั้นต่ำคือ ผลมะนาวต้องสด สภาพดี ไม่มีรอยข้ำและแตกผา ไม่เน่าเสีย ไม่มีกลิ่นหรือรสชาติที่ผิดปกติ มีอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม มีปริมาณน้ำคั้นไม่ต่ำกว่า 40% โดยคำนวณจากน้ำหนักของผลมะนาว ผิวมะนาวควรมีสีเขียวหรือพบแต้มสีเหลืองต่ำกว่า 30% ของพื้นที่ผิว ไม่มีความเสียหายจากศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อคุณภาพภายในของมะนาว และไม่มีศัตรูพืชหรือโรคพืช ยกตัวอย่างเช่น โรคแคงเกอร์ และโรคจากราดำ นอกจากนี้ยังมีข้อกำหนดในการบรรจุหีบห่อ โดยให้มีการติดฉลากและเครื่องหมายแสดงรายละเอียดที่หีบห่ออย่างชัดเจน มีเครื่องหมายรับรองมาตรฐานสินค้าการเกษตร อีกทั้งยังมีการตรวจสอบปริมาณสารพิษตกค้างและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช ⁽²⁸⁾

4. การควบคุมโรคแคงเกอร์

โรคแคงเกอร์เป็นโรคกักกันที่รุนแรงในหลายประเทศ ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องอาศัยมาตรการทางการกักกันพืช เพื่อกีดกันไม่ให้เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าสู่ประเทศและป้องกันการระบาดของโรค ในประเทศที่สภาพอากาศเหมาะสมต่อการแพร่กระจายของเชื้อ Xcc มาตรการกักกันพืชจะยิ่งเข้มงวดมากขึ้นในการนำเข้ากิ่งพันธุ์ หรือชิ้นส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ และผลจากประเทศที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์อยู่ก่อนแล้ว นอกจากนี้ยังมีมาตรการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ Xcc ผ่านทางผู้ปฏิบัติงานและอุปกรณ์เครื่องมือทางการเกษตร ยกตัวอย่างเช่น เสื้อผ้า, ผิวน้ำ, ถุงมือ และเครื่องพ่นสารเคมี โดยต้องมีการฆ่าเชื้อ Xcc ด้วยสารเคมีก่อนเข้าและภายหลังออกจากบริเวณเพาะปลูก^(3, 8) วิธีการกำจัดและป้องกันการเกิดโรคแคงเกอร์มีหลายวิธีด้วยกัน ทั้งในแง่ของการเผาทำลายต้นพืชที่เป็นโรค การใช้สารเคมีฉีดพ่น การควบคุมโรคโดยชีววิธีและการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลส้ม หรือการปลูกพืชสายพันธุ์ต้านทานทดแทน

4.1 การเผาทำลาย

เมื่อตรวจพบโรคแคงเกอร์ในบริเวณที่มีการเพาะปลูกพืชตระกูลส้ม การกำจัดเชื้อ Xcc ในขั้นต้น ทำได้โดยการตัด ถอนรากถอนโคน และเผาทำลายต้นที่ปรากฏอาการของโรคทิ้งไป ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการกำจัดโรคแคงเกอร์ รัฐฟลอริดามีกฎหมายที่กำหนดไว้ว่า หากพบต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ทั้งในที่อยู่อาศัยและพื้นที่เพาะปลูกทางการค้าจะต้องทำลายต้นส้มทุกต้นในรัศมี 579 เมตร⁽³⁾

4.2 การฉีดพ่นสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์

คอปเปอร์เป็นโลหะหนักซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต แต่หากได้รับคอปเปอร์ปริมาณมากเกินไปจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีผลไปทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิก รบกวนระบบการถ่ายทอดพลังงาน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้สารเคมีในกลุ่มคอปเปอร์เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย⁽³⁰⁾ โดยสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์สามารถป้องกันการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่บนผิวของพืชเท่านั้นจึงต้องมีการฉีดพ่นอยู่บ่อยครั้ง เพื่อให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพสูงสุด หากพืชอาศัยมีความอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์มากจำเป็นต้องใช้วิธีควบคุมหลายแนวทางร่วมกัน เนื่องจากการฉีดพ่นสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์เพียงอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ⁽³¹⁾

สารเคมีกลุ่มคอปเปอร์ที่เกษตรกรนิยมใช้มีหลายสูตรด้วยกัน ได้แก่ คอปเปอร์ออกไซด์, คอปเปอร์ซัลเฟต, คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์และคอปเปอร์ออกไซด์ แต่การใช้สารดังกล่าวฉีดพ่นเป็นระยะเวลานานส่งผลให้เกิดการกลายของเชื้อ Xcc เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารเคมี

กลุ่มคอปเปอร์ ทำให้การควบคุมโรคแคงเกอร์ทำได้ยากมากขึ้น⁽³¹⁾ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารในกลุ่มคอปเปอร์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ streptomycin⁽²⁷⁾ และสารเคมีกลุ่มอื่น ๆ เช่น แมนโคเซบ⁽⁴⁾ ซึ่งการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องในปริมาณมากอาจทำให้เกิดการตกค้างอยู่บนผลมะนาวและในสิ่งแวดล้อมได้

4.3 การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกพืชสายพันธุ์ต้านทาน

แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลส้มให้ต้านทานต่อการเกิดโรคแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก วิธีแรกคือการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) ยกตัวอย่างเช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทาน, การนำเข้าพืชสายพันธุ์ต้านทาน และการผสมพันธุ์พืชจากต้นพ่อพันธุ์และต้นแม่พันธุ์ที่ต้านทานต่อการเกิดโรคแคงเกอร์ สำหรับวิธีที่สองคือการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดัดแปรพันธุกรรม (non - conventional method) ยกตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดการกลาย, การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ และการดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอื่น ๆ⁽³²⁾

Prasad และคนอื่น ๆ (1997)⁽³³⁾ รายงานถึงการผสมพันธุ์มะนาวเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์โดยการคัดเลือกเลมอนสายพันธุ์ Nepali oblong หรือ Assam lemon (*C. limon* (L.) Burm. f.) ที่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์มาผสมกับมะนาวเกิดเป็นลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ระดับปานกลางและมีคุณลักษณะที่ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานการคัดเลือกพืชตระกูลส้มสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ เพื่อใช้เป็นต้นกล้าในการเพาะปลูก ทำโดยตรวจวัดปริมาณอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่พืชสร้างขึ้นและประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค หลังจากพืชถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อ Xcc อีกทั้งยังทดสอบการปลูกเชื้อ Xcc และสังเกตความรุนแรงของรอยโรคแคงเกอร์ที่เกิดขึ้นว่ามีมากหรือน้อยเพียงใด เพื่อคัดเลือกต้นแม่พันธุ์และต้นพ่อพันธุ์ในการสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้ดี⁽³⁴⁾

ในประเทศไทยมีการปรับปรุงพันธุ์มะนาวด้วยวิธีดั้งเดิม จากการผสมมะนาวพันธุ์แป้นรำไพและมะนาวพันธุ์น้ำหอมจนได้ลูกผสมที่มีชื่อว่ามะนาวแป้นพันธุ์พิจิตร 1 เนื่องจากมะนาวพันธุ์แป้นรำไพมีคุณลักษณะที่ดีแต่อ่อนแอต่อการเกิดโรคแคงเกอร์ ส่วนมะนาวพันธุ์น้ำหอมเป็นมะนาวที่มีความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์สูง ดังนั้นมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ที่ได้จากการผสมจึงมีลักษณะที่ดี เจริญเติบโตรวดเร็ว ต้นสูง ให้ผลผลิตไว ปริมาณน้ำคั้นสูง และมีความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์มากกว่ามะนาวพันธุ์แป้นรำไพ โดยพบอาการของโรคแคงเกอร์บนใบน้อยกว่ามะนาวพันธุ์แป้นรำไพประมาณ 4.5 เท่า⁽²⁹⁾

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการดัดแปรพันธุกรรม ยกตัวอย่างเช่น การสร้างสั้มดัดแปรพันธุกรรมให้ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ โดยการนำยีน *Xa21* จากข้าวซึ่งเป็นยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นตัวรับรู้ (receptor) ที่ดีต่อการจดจำเชื้อสาเหตุโรคในสกุล *Xanthomonas* โดยถ่ายทอดยีนดังกล่าวเข้าไปในจีโนมของสั้มผ่านกระบวนการ protoplast transformation ⁽³⁵⁾

4.4 การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การลดปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคในระยะเริ่มต้นหรือลดกิจกรรมการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรค โดยใช้สิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิดที่นอกเหนือจากมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย, แอคติโนมัยสิตและเชื้อรา ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคโดยชีววิธีเหล่านี้ถูกเรียกว่า ตัวควบคุมโรคทางชีวภาพหรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยที่จุลินทรีย์จะมีความสัมพันธ์ในเชิงปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้การควบคุมโรคโดยชีววิธียังรวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ได้จากการสกัดหรือการหมัก ข้อดีในการใช้ตัวควบคุมโรคทางชีวภาพคือมีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคจึงไม่มีผลในวงกว้างต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ยั่งยืน ราคาถูก และปราศจากสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ⁽³⁶⁾ โดยการควบคุมโรคแคงเกอร์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* เป็นอีกหนึ่งวิธีที่เป็นแนวทางเลือกที่ถูกใช้อยู่ในปัจจุบัน

ในประเทศไทยมีการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาวโดยชีววิธี นลินีและคนอื่น ๆ ⁽²⁵⁵⁶⁾ ⁽³⁷⁾ ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* N5102 ในรูปแบบผลิตภัณฑ์น้ำหมักและแบบผงต่อการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาว จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* N5102 ในรูปแบบผงอัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์สูงกว่ารูปแบบน้ำหมัก อีกทั้งยังสามารถลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้เทียบเท่ากับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ไม่ทำให้ผลร่วงก่อนถึงระยะเก็บเกี่ยวและมีน้ำหนักเฉลี่ยของผลมะนาวมากกว่าการใช้สารเคมีดังกล่าว

พงศธร ⁽²⁵⁶⁰⁾ ⁽³⁸⁾ ได้พัฒนาสูตรชีวภัณฑ์อารักขาพืชชนิดผงจากผงถ่านชีวภาพ เพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์พบว่าการผสมเชื้อ *B. subtilis* TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม ซึ่งสูตรชีวภัณฑ์นี้ประกอบด้วยผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม, โดโลไมต์, แคลเซียมคาร์บอเนต, คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสและน้ำสกัดถั่วเหลือง โดยสูตรดังกล่าวสามารถคงการมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และลดจำนวนเชื้อ *Xcc* ได้ดีที่สุด อีกทั้งยังช่วยชักนำการสะสมกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ในต้นมะนาวได้อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งช่วยให้ต้นมะนาวต้านทานต่อการเข้าบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้

โดยกรรมวิธีการใช้สารชีวภัณฑ์ดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ การราดลงในดินบริเวณแปลงปลูก

การควบคุมโรคแคงเกอร์โดยชีววิธีมีการศึกษาและค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Xcc* เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มที่เป็นพืชเศรษฐกิจของแต่ละประเทศเช่นกัน Huang และคนอื่น ๆ (2012) ⁽³⁹⁾ รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* TKS1-1 และเชื้อ *Bacillus* ชนิดอื่น ๆ ที่แยกมาจากบริเวณแปลงปลูก ดินรอบแปลงปลูกและปุ๋ยอินทรีย์สามารถยับยั้งเชื้อ *Xcc* ได้อย่างดีเยี่ยม โดยมีผลไปขัดขวางการเข้าอาศัยและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Xcc* จึงลดอาการของโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวลงได้ นอกจากนี้ได้ทดสอบการยับยั้งโรคแคงเกอร์โดยการฉีดพ่นเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* TKS1-1 พบว่าการใช้เอนโดสปอร์จำนวน 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตรสามารถลดการเกิดโรคแคงเกอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากฉีดพ่นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนปลูกเชื้อ *Xcc*

Khodakaramian และคนอื่น ๆ (2008) ⁽¹⁴⁾ รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* Pf-15 และ *Pseudomonas putida* Pp-1 สามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพเพื่อลดอาการของโรคแคงเกอร์ โดย *P. fluorescens* Pf-15 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสภาพโรงเรือน

De Oliveira และคนอื่น ๆ (2016) ⁽⁴⁰⁾ ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Pseudomonas aeruginosa* LV ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีโลหะหนักคอปเปอร์ 0.01% พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารประกอบออร์แกโนคอปเปอร์ (organocopper) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xcc* ได้ดี เมื่อนำสารดังกล่าวมาฉีดพ่นเพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์บนต้นส้มวาเลนเซียในสภาพโรงเรือน พบว่าสามารถลดอาการของโรคแคงเกอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลดจำนวนของเชื้อ *Xcc* ได้ทั้งในเซลล์และนอกเซลล์พืช ซึ่งสารดังกล่าวมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ของเชื้อ *Xcc* จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ไม่มีผลต่อเซลล์ของพืช และที่สำคัญคือไม่มีผลต่อเซลล์สัตว์ซึ่งได้ทำการทดสอบกับเซลล์ไคลิง (LLC-MK2 cell) อีกทั้งสารยังมีความคงทนสามารถอยู่ได้หลายสัปดาห์ทั้งบริเวณผิวนอกและในเซลล์ของพืช

Michavila และคนอื่น ๆ (2017) ⁽⁴¹⁾ คัดแยกเชื้อ *Pseudomonas protegens* CS1 ที่สามารถผลิตสาร pyochelin ซึ่งเป็นซีเคอโรฟอรชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xcc* ได้ โดยมีผลเกี่ยวข้องกับการสร้าง ROS ที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์พืช โดยเชื้อ *P. protegens* CS1 ถูกแยกจากบริเวณส่วนเหนือดินของต้นเลมอน และถูกนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Xcc* ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo*

5. กลไกของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยสภาวะปฏิปักษ์จะเกิดขึ้นระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน และมีความเฉพาะเจาะจงในการตอบสนองต่อกัน โดยการเป็นปฏิปักษ์ทางตรงเป็นผลมาจากการสัมผัสทางกายภาพ และกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางอ้อมเกิดจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ไม่เกี่ยวข้องในการตรวจจับหรือการกำหนดเป้าหมายของโฮสต์โดยตรง โดยกลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใช้มี 5 รูปแบบหลัก ⁽⁴²⁾

5.1 ภาวะปรสิต

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถดำรงชีวิตแบบปรสิตในเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค โดยที่ไม่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่างชนิดที่ไม่ใช่โฮสต์ (host) ดังนั้นจึงมีความจำเพาะระหว่างชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งจัดเป็นการยับยั้งทางตรง Elad (1983) ⁽⁴³⁾ รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เป็นปรสิตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เพื่อทำลายเซลล์และเข้าไปอยู่อาศัยในเซลล์ของเชื้อราเหล่านั้น

5.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช ในการประยุกต์ใช้สารเหล่านี้เพื่อควบคุมโรคพืช ความเข้มข้นของสารต้องเพียงพอต่อจำนวนของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งโรค เชื้อในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* และ *Trichoderma* มีรายงานถึงการผลิตสารปฏิชีวนะได้อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น bacillomycin, fengycin, iturin A, mycosubtilin, zwittermicin A ที่ถูกผลิตโดยเชื้อในสกุล *Bacillus* และ pyoluteorin, pyrrolnitrin, phenazine และ DAPG ที่ผลิตโดยเชื้อในสกุล *Pseudomonas* ⁽⁴²⁾

5.3 การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

เชื้อจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการผลิตและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิเมอร์ เช่น ไคติน, โปรตีน, เซลลูโลส และดีเอ็นเอ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีผลยับยั้งกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้โดยตรง นอกจากนี้เชื้อในสกุล *Pseudomonas* spp. มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีผลยับยั้งการทำงานของไซโตโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase) จึงมีความเป็นพิษสูงต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ ⁽⁴²⁾

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth promoting bacteria, PGPB) สามารถแสดงความเป็นปฏิปักษ์ทางอ้อมต่อเชื้อสาเหตุโรคได้เช่นกัน โดยการเพิ่มความแข็งแรงให้พืชต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค รวมทั้งลดความเครียดที่เกิดจากการตอบสนองต่อการติดเชื้สาเหตุโรค เชื้อ PGPB สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อย่อยสลาย ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์เอทิลีนของพืช ดังนั้นจึงช่วยควบคุมระดับเอทิลีนไม่ให้สูงเกินไปจนยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สามารถยับยั้งการพัฒนาโรคปุ่มปมที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Agrobacterium tumefaciens* ได้⁽⁴⁴⁾

เชื้อ *P. fluorescens* SP007s สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA และ gibberellins ซึ่งมีผลช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ด เพิ่มจำนวนรากแขนง เพิ่มความสูงลำต้นและความยาวของราก ทำให้ส่วนลำต้นเหนือดินเจริญเติบโตรวดเร็วจึงลดโอกาสการเกิดโรคในระยะต้นกล้า⁽⁴⁵⁾ นอกจากนี้ความสามารถในการละลายธาตุฟอสฟอรัส และการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ PGPB ก็ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง เนื่องจากธาตุไนโตรเจนและธาตุฟอสฟอรัสมีความจำเป็นอย่างมากในการเจริญเติบโตของพืช แต่มักมีอยู่อย่างจำกัดในดินหรืออยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จะช่วยเปลี่ยนรูปธาตุทั้ง 2 ชนิดให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์พืชและนำไปใช้ประโยชน์ได้^(46, 47)

5.4 ภาวะแก่งแย่งแข่งขัน

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีปัจจัยจำกัดที่สำคัญ เช่น สารอาหารในดินและพื้นที่อาศัย โดยการแก่งแย่งสารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคมีผลต่อความสำเร็จในการเข้าอาศัยในเซลล์พืช การเกิดอาการและความรุนแรงของโรค โดยช่วยลดการบุกรุกและการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช⁽⁴²⁾

เหล็กเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ มีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึมและเป็นส่วนประกอบของเซลล์ แต่เหล็กมักเป็นปัจจัยจำกัดในดินเนื่องจากส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ได้ ฉะนั้นเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากจึงผลิตซิเดอโรฟอรัสที่มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลทจับไอออนของธาตุเหล็ก เพื่อนำเข้าสู่เซลล์และใช้ในการดำรงชีวิต แต่ซิเดอโรฟอรัสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีความสามารถในการจับไอออนเหล็กได้แตกต่างกัน เช่น ซิเดอโรฟอรัสของเชื้อ *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพในการจับไอออนของเหล็กได้มากกว่าซิเดอโรฟอรัสที่สร้างจาก *Erwinia carotovora* และ *Fusarium oxysporum* ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชเหล่านี้ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากขาดธาตุเหล็กซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญ⁽⁴²⁾

5.5 การชักนำความต้านทานเชิงระบบของพืช

พืชสามารถตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่พบในธรรมชาติทั่วไป รวมถึงสิ่งเร้าที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีผลชักนำหรือปรับเปลี่ยนระบบภูมิคุ้มกันของพืชให้ต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคเฉพาะบริเวณและ/หรือชักนำเชิงระบบ โดยกลไกการชักนำความต้านทานนี้แสดงความเป็นปฏิปักษ์ทางอ้อมต่อเชื้อสาเหตุโรค ความต้านทานเชิงระบบของพืชที่ถูกชักนำโดยเชื้อจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ (1) systemic acquired resistance (SAR) และ (2) induced systemic resistance (ISR) โดยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกระตุ้นที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์และโมเลกุลส่งสัญญาณภายในระบบ ⁽⁴²⁾

5.5.1 การชักนำความต้านทานแบบ systemic acquired resistance (SAR)

SAR เป็นระบบการป้องกันตัวเองของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด โดยมีโมเลกุลส่งเสริมสัญญาณคือกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นฮอรโมนพืชที่มักผลิตขึ้นเมื่อพืชถูกบุกรุกโดยเชื้อสาเหตุโรค ต่อมาจึงกระตุ้นการตอบสนองฉับพลันของพืช (hypersensitive response) เป็นผลให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ติดเชื้อ เพื่อจำกัดการแพร่กระจายของโรคไปยังส่วนอื่น ๆ และระบบ SAR ยังส่งผลต่อการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์พืช เพิ่มการสะสม ROS และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค โดยเฉพาะยีนในกลุ่ม pathogenesis-related (PR) gene ⁽⁴⁸⁾ การชักนำระบบ SAR จะเกิดขึ้นหลังจากการบุกรุกของเชื้อเพียงระยะเวลาสั้น ๆ แต่สามารถคงอยู่ได้เป็นเวลานาน ฉะนั้นพืชจึงมีความต้านทานต่อการติดเชื้อซ้ำ ซึ่งอาจเป็นเชื้อสาเหตุโรคชนิดเดิมหรือต่างจากชนิดเดิมก็ได้ ⁽⁴⁹⁾ เชื้อ PGPB บางชนิดสามารถผลิตกรดซาลิไซลิกได้ในสภาวะที่ดินมีธาตุเหล็กจำกัด ยกตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* 7NSK2 ซึ่งกรดซาลิไซลิกที่ถูกผลิตมานั้นสามารถชักนำความต้านทานของพืชในเชิงระบบได้ ⁽⁵⁰⁾

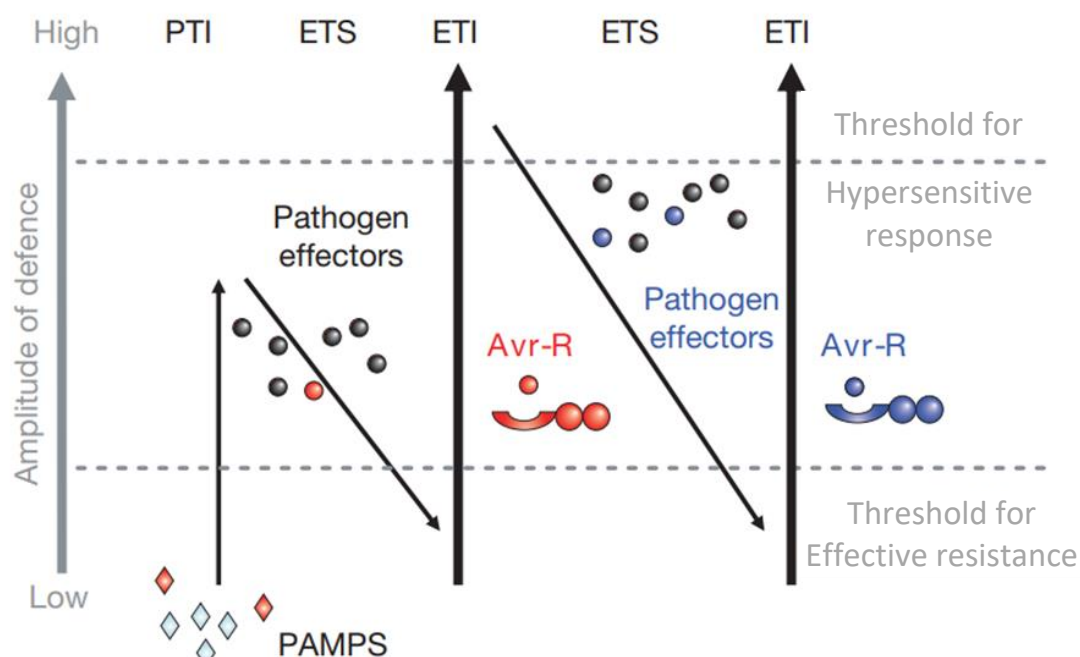
5.5.2 การชักนำความต้านทานแบบ induced systemic resistance (ISR)

ISR เป็นระบบการป้องกันตัวเองของพืชที่ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรค เช่นเดียวกับระบบ SAR แต่มีโมเลกุลส่งเสริมสัญญาณเป็นกรดจัสโมนิกและ/หรือเอทิลีน ซึ่งโมเลกุลทั้งสองมักถูกกระตุ้นโดยเชื้อกลุ่ม PGPB ระบบ ISR มักมีการสร้างโปรตีนที่เฉพาะเจาะจง เพิ่มการสะสมแคลโลสและสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช รวมทั้งสร้างสารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ที่เป็นพิษต่อเชื้อสาเหตุโรค ⁽⁵¹⁾ ดังนั้นการชักนำความต้านทานโดยเชื้อ PGPB จึงเป็นการเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืช เพื่อเตรียมรับมือต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืชในวงกว้าง มีรายงานจำนวนมากกล่าวถึงความสามารถของ *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* spp. ในการชักนำความต้านทานของพืชผ่านระบบ ISR ^(52, 53)

เชื้อ PGPB บางชนิดสามารถชักนำความต้านทานผ่านระบบ SAR และ ISR ร่วมกันได้ ซึ่งการชักนำทั้ง 2 ระบบจะช่วยเพิ่มขอบเขตการป้องกันเชื้อสาเหตุโรคได้ในวงกว้างมากกว่าความต้านทานจากระบบใดระบบหนึ่ง Niu และคนอื่น ๆ (2011) ⁽⁵⁴⁾ รายงานว่า *Bacillus cereus* AR156 สามารถชักนำความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ในต้นอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana*) โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน PR-1, PR-2 และ PR-5 ซึ่งเป็นยีนที่จัดอยู่ในระบบ SAR นอกจากนี้ยังส่งผลให้พืชสร้างโปรตีน defensin 1.2 ที่ถูกแปลรหัสจากยีน PDF1.2 ซึ่งอยู่ในระบบ ISR นอกจากนี้ Lee และคนอื่น ๆ (2012) ⁽⁵⁵⁾ พบว่าสารระเหยของ *Paenibacillus polymyxa* E681 สามารถชักนำระบบ SAR และ ISR เพื่อต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค *P. syringae* pv. *maculicola*

6. การป้องกันตัวเองของพืช (plant defense response)

พืชมีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคหลายวิธี อาจเป็นความต้านทานทางกายภาพที่มีอยู่แต่แรก เช่น ความหนาและความแข็งแรงของผนังเซลล์ อีกส่วนหนึ่งคือความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค โดยพืชมีโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้ (pattern recognition receptor, PRR) คอยตรวจจับโมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) ตัวอย่าง เช่น โปรตีนแฟลกเจลลิน และองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยเรียกความต้านทานในลักษณะนี้ว่า PAMP-triggered immunity (PTI) ซึ่งอาศัยความจดจำระหว่าง PRR และ PAMP แต่บางครั้งความต้านทานแบบ PTI อาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคบางชนิดที่สร้าง avirulence (Avr) protein หรือ effector protein ที่มีผลยับยั้งการส่งสัญญาณหรือชะลอการต้านทานโรคในเซลล์พืช (effector-triggered susceptibility, ETS) ทำให้พืชยังคงเป็นโรคและตายลงในที่สุด ดังนั้นพืชจึงพัฒนากลไกการตรวจจับ effector protein โดยการสร้าง avirulence receptor (Avr-R) protein ซึ่งเป็นตัวรับรู้ที่จดจำต่อ effector protein ของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อตอบสนองแบบฉับพลันต่อการยับยั้งการเจริญและแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคในเซลล์พืช เรียกความต้านทานในลักษณะนี้ว่า effector-triggered immunity (ETI) ⁽⁵⁶⁾ ดังนั้นจึงเกิดวิวัฒนาการของเชื้อสาเหตุโรคและพืชอาศัยร่วมกันตลอดเวลา หาก Avr-R protein ของพืชไม่สามารถจดจำ effector protein ได้จะส่งผลให้พืชอาศัยเป็นโรคในที่สุด ฉะนั้นการตอบสนองแบบ PTI และ ETI จึงถูกเรียกว่า zig-zag model ดังแสดงในภาพประกอบ 4 ⁽⁵⁷⁾



ภาพประกอบ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรคในรูปแบบ zig-zag

PAMPs = pathogen-associated molecular patterns, Avr-R = avirulence receptor protein,

PTI = PAMP-triggered immunity, ETS = effector-triggered susceptibility

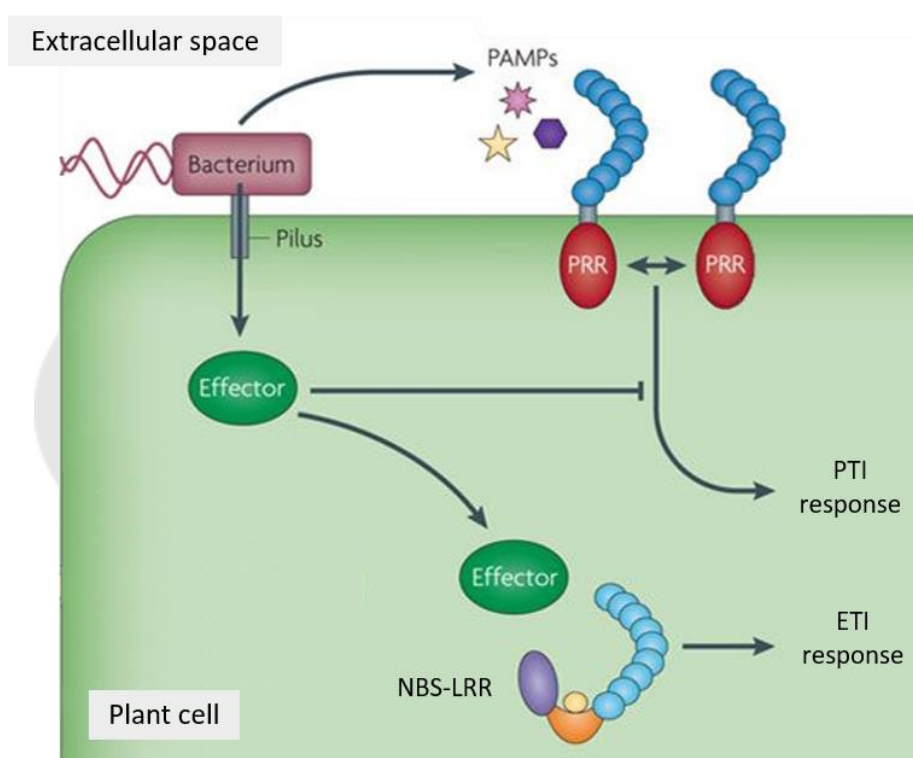
และ ETI = effector-triggered immunity

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 2006; 444: 323–9. ⁽⁵⁷⁾

การชักนำเชิงระบบของพืชมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในพืชได้หลายกลุ่ม ฉะนั้นจึงมีรายงานถึงข้อมูลของยีนเหล่านี้ของพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ แต่การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในมะนาวยังมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะกล่าวถึงเฉพาะยีนที่ใช้ศึกษาในการวิจัยนี้เท่านั้น ซึ่งมีทั้งหมดจำนวน 4 ยีน

6.1 Leucine-rich repeat receptor-like kinase (*LRR-RLK*) gene

LRR-RLK เป็นกลุ่มยีนต้านทานของพืชที่แสดงออกเป็น PRR ซึ่งเป็นตัวรับรู้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช โดยเกี่ยวข้องในกระบวนการตรวจสอบ PAMP จากภายนอกเซลล์พืช เพื่อกระตุ้นความต้านทานแบบ PTI ต่อไป (ภาพประกอบ 5) ส่งผลให้เกิดการป้องกันการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยชักนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค การสะสม ROS และการสะสมแคลโลสในผนังเซลล์ของพืช



ภาพประกอบ 5 การชักนำระบบความต้านทาน PTI และ ETI ในพืช

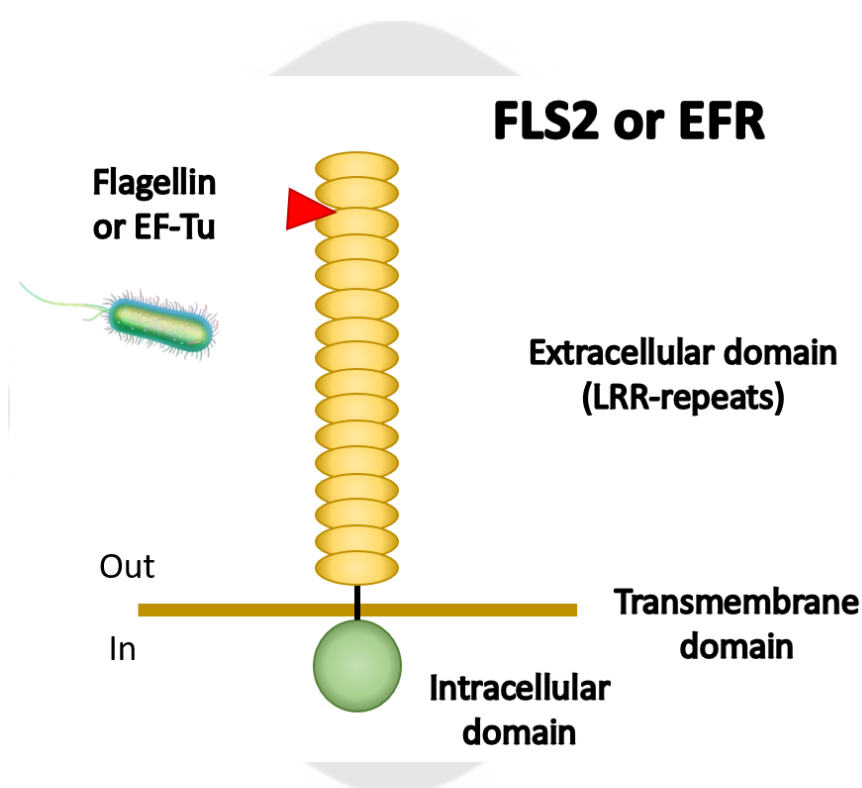
PAMPs = pathogen-associated molecular patterns, PTI = PAMP-triggered immunity,

ETI = effector-triggered immunity, PRR = pattern recognition receptor

และ NBS-LRR = nucleotide binding site-leucine-rich repeat

ที่มา: ดัดแปลงจาก Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nat Rev Genet. 2010; 11: 539. ⁽⁵⁸⁾

โครงสร้างของโปรตีน LRR-RLK แบ่งเป็น 3 โดเมน ได้แก่ (1) extracellular domain, (2) transmembrane domain และ (3) intracellular domain ซึ่ง extracellular domain จะมีทั้งจำนวนชุดที่ซ้ำกันของ LRR และมีบริเวณที่มีความหลากหลายของ LRR (ภาพประกอบ 6) เพื่อช่วยให้สามารถตรวจจับ PAMP ได้อย่างหลากหลาย โดย LRR-RLK มีการตอบสนองต่อ PAMP แบบจำเพาะ ตัวอย่างของ LRR-RLK ได้แก่ flagellin sensing 2 (FLS2) และ elongation factor thermo unstable (EF-Tu) receptor (EFR) ที่ตอบสนองต่อโปรตีนแฟลกเจลลินและโปรตีน EF-Tu ของเชื้อแบคทีเรีย ตามลำดับ ⁽⁵⁹⁾



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ LRR-RLK

FLS2 = flagellin sensing 2, EFR = elongation factor thermo unstable receptor,

EF-Tu = elongation factor thermo unstable และ LRR = leucine rich repeat

Rodrigues และคนอื่น ๆ (2013) ⁽⁶⁰⁾ ศึกษาการแสดงออกของยีนในต้นส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) ด้วยวิธี RNA sequencing หลังจากปลูกเชื้อ *Xylella fastidiosa* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบเลอะเหลืองของส้ม (*Citrus variegated chlorosis*) จากผลพบว่าการแสดงออกของยีนที่ถูกแปลรหัสเป็น PRR หลายชนิดรวมถึง LRR-RLK หลังจากการ

ปลูกเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ การเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ และการสร้างฮอริโมนพืช ยกตัวอย่างเช่น กรดจัสโมนิกและกรดแอบไซซิก (abscisic acid)

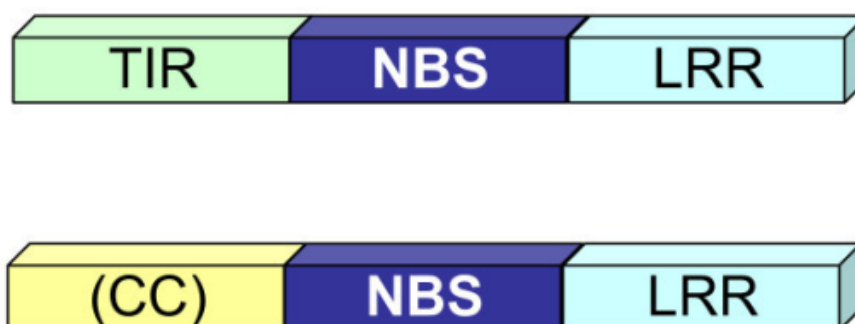
Pitino และคนอื่น ๆ (2015)⁽³⁴⁾ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ ROS ที่ต้นส้มวาเลนเซียสร้างขึ้นกับระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค โดยมียีน *LRR-RLK* เป็นหนึ่งในกลุ่มยีนที่ศึกษา โดยออกแบบไพรเมอร์ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นส้มแมนดาริน ซึ่งพบว่าต้นส้มที่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้ดีสามารถชักนำการแสดงออกของยีน *LRR-RLK* ได้สูงตรงกับปริมาณ ROS ที่เพิ่มสูงขึ้น

Magalhães และคนอื่น ๆ (2016)⁽⁶¹⁾ ศึกษาวิวัฒนาการของยีนในกลุ่ม *LRR-RLK* ของส้มคลีเมนไทน์ (*Citrus clementina*) และส้มเกลี้ยง เนื่องจากมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค เพื่อด้านทานต่อการเกิดโรคในพืชตระกูลส้ม

6.2 Nucleotide binding site–leucine-rich repeat (NBS–LRR) gene family

NBS-LRR เป็นกลุ่มยีนต้านทานที่แสดงออกเป็นตัวรับรู้ต่อ effector protein ที่ผลิตโดยเชื้อสาเหตุโรค โดยโปรตีน NBS-LRR จะตรวจจับ effector protein บริเวณภายในเซลล์ของพืช ซึ่งเป็นการชักนำความต้านทานของพืชในรูปแบบ ETI⁽⁶²⁾ เมื่อ NBS-LRR ตรวจจับ effector protein จะนำไปสู่การชักนำยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค การสังเคราะห์ ROS และกรดซาลิไซลิก รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมายเช่นเดียวกับการชักนำความต้านทานแบบ PTI⁽⁶³⁾ ดังแสดงในภาพประกอบ 5

โปรตีน NBS-LRR ในพืชแบ่งเป็น 2 ประเภทขึ้นกับโดเมนที่อยู่บริเวณ N-terminus ได้แก่ (1) toll and interleukin-1-like receptor (TIR) domain และ (2) coiled-coil (CC) domain⁽⁶³⁾ (ภาพประกอบ 7) โดเมน NBS มีบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นโมทีฟ (motif) อยู่ในโครงสร้าง เช่น P-loop/kinase 1, kinase 2 และ kinase 3-a และ hydrophobic GLPL โดยบริเวณโมทีฟเหล่านี้มักถูกใช้ประโยชน์ในการศึกษา ยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs, RGAs หรือ resistance gene candidates, RGCs) เพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สำหรับปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคพืชต่าง ๆ ส่วนโดเมน LRR อยู่บริเวณ C-terminal ของยีน *NBS-LRR* เป็นโดเมนที่มีบทบาทสำคัญในการจดจำ effector protein ของเชื้อสาเหตุโรค⁽⁶⁴⁾



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ NBS-LRR ทั้ง 2 ประเภท

TIR = toll and interleukin-1-like receptor domain, NBS = nucleotide binding site,

CC = coiled-coil domain และ LRR = leucine rich repeat

ที่มา : Tarr DEK, Alexander HM. TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots:

Evidence from diverse monocot orders. BMC Res Notes. 2009; 2: 197. ⁽⁶⁵⁾

Deng และคนอื่น ๆ (2000) ⁽⁶⁶⁾ ทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *RGCs* ในพืชตระกูลส้มสายพันธุ์ผสมระหว่างส้มสามใบและส้มโอ ซึ่งได้ยีน *RGCs* ทั้งหมด 10 คลาส ได้แก่ *RGC1-RGC10* โดยยีนในคลาส *RGC2* คือ *Pt14* ซึ่งโปรตีน *Pt14* ถูกจัดอยู่ใน NBS-LRR ประเภทที่มี TIR domain เนื่องจากโปรตีน *Pt14* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน *N* และ *L6* คิดเป็นร้อยละ 48 และ 33 ตามลำดับ โดยที่ยีน *N* และ *L6* เป็นยีนในกลุ่ม *RGCs* ของต้นยาสูบ และต้นลินิน ตามลำดับ ซึ่งถูกแปลรหัสเป็นบริเวณ N-terminus ที่มี TIR domain อยู่ในโครงสร้าง

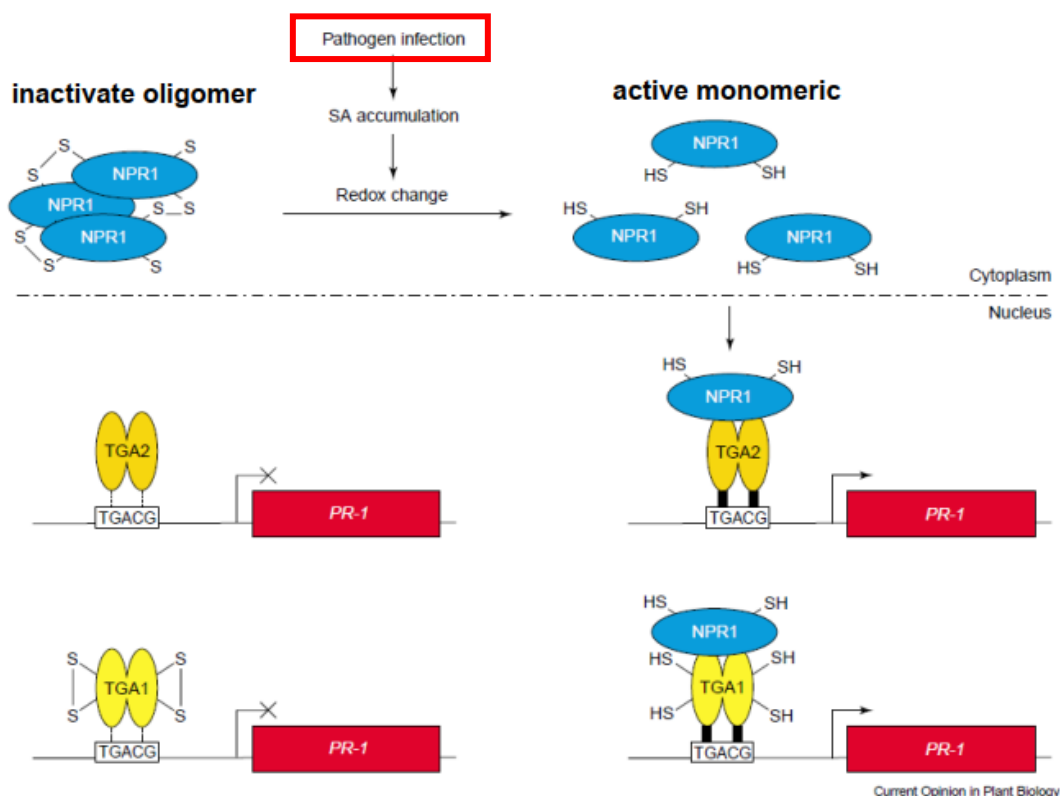
การศึกษาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาว โดยวิเคราะห์ยีนในกลุ่ม *NBS-LRR* ทำโดยวิธี PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ายีน *Pt14* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa1* สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความต้านทานหรือความอ่อนแอของมะนาวต่อโรคแคงเกอร์ได้ โดยประเมินความต้านทานต่อโรคเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อลงในมะนาวแป้น มะนาวน้ำหอมและมะนาวพันธุ์พิจิตร ⁽⁶⁷⁾

6.3 Pathogenesis-related gene 1 (PR-1)

PR-1 เป็นยีนในกลุ่ม PR gene ที่มีการแสดงออกเป็น pathogenesis-related proteins (PRs) ซึ่งในพืชมีโปรตีน PRs อยู่ทั้งหมด 17 กลุ่ม จากการศึกษาถึงการแสดงออกของ PR gene ของพืชตระกูลส้ม พบว่ายีนแต่ละกลุ่มมีการแสดงออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้น อวัยวะ ชนิดของพืช และระยะเวลาหลังจากถูกกระตุ้น โดยโปรตีน PRs เหล่านี้มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันพืชจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค เช่น โปรตีน PR-3, PR-4, PR-8 และ PR-11 มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ chitinase โปรตีน PR-9 มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ peroxidase และโปรตีน PR-2 มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ β -1,3-glucanase⁽⁶⁸⁾

โปรตีน PR-1 จัดอยู่ใน cysteine-rich secretory protein, antigen 5, and pathogenesis-related-1 (CAP) protein superfamily โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการจับและปลดปล่อยสเตอรอล และการจับไคโอรินต่าง ๆ^(69, 70) Gamir และคนอื่น ๆ (2017)⁽⁷¹⁾ รายงานว่าโปรตีน P14c และ PR-1a ซึ่งเป็นโปรตีน PR-1 ที่ได้จากต้นมะเขือเทศและต้นยาสูบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora brassicae* แต่ไม่มีผลยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Botrytis cinerea* แต่เมื่อเติมยาฆ่าเชื้อราในความเข้มข้นต่ำ เพื่อยับยั้งกระบวนการสร้างสเตอรอล พบว่า P14c สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้มากขึ้น จากการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของโปรตีน PR-1 เกี่ยวข้องกับการดั่งสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ออกไป หรือรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. brassicae* ที่ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์สเตอรอลได้เอง (sterol auxotroph)

โปรตีน PR-1 สามารถพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดที่มีการศึกษาและมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีน PRs กลุ่มอื่น และมักถูกใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกถึงการชักนำความต้านทานเชิงระบบแบบ SAR อีกด้วย เมื่อพืชถูกบุกรุกโดยเชื้อสาเหตุโรคหรือสิ่งกระตุ้นอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดการผลิตและสะสมกรดซาลิไซลิก จากนั้นกรดซาลิไซลิกจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณกระตุ้น nonexpressor of pathogenesis related 1 (NPR1) protein ที่อยู่รูปในมัลติเมอร์บริเวณไซโตพลาสซึมซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้โปรตีน NPR1 ถูกรีดิวซ์กลายเป็นโมเลกุลที่ทำงานได้ในรูปโมโนเมอร์และเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส และเข้าจับกับ TGA transcription factor (TGA) ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน PR-1 ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 การชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยเชื้อสาเหตุโรคพืช

NPR1 = nonexpressor of pathogenesis related 1, SA = salicylic acid,

TGA = transcription factor และ *PR-1* = pathogenesis-related gene 1

ที่มา : Pieterse CMJ, Van Loon LC. *NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways*. Curr Opin Plant Biol. 2004; 7(4): 456-64.⁽⁷²⁾

พืชสายพันธุ์ต้านทานมักมีการแสดงออกของโปรตีน PRs ที่สูงมากกว่าพืชสายพันธุ์อ่อนแอ Pitino และคนอื่น ๆ (2015)⁽³⁴⁾ ทำการศึกษาถึงวิธีการคัดเลือกส้มสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ เพื่อใช้เป็นต้นกล้าในการเพาะปลูก โดยพบว่าต้นส้มที่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้ดี จะมีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงกว่าต้นที่อ่อนแอ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*

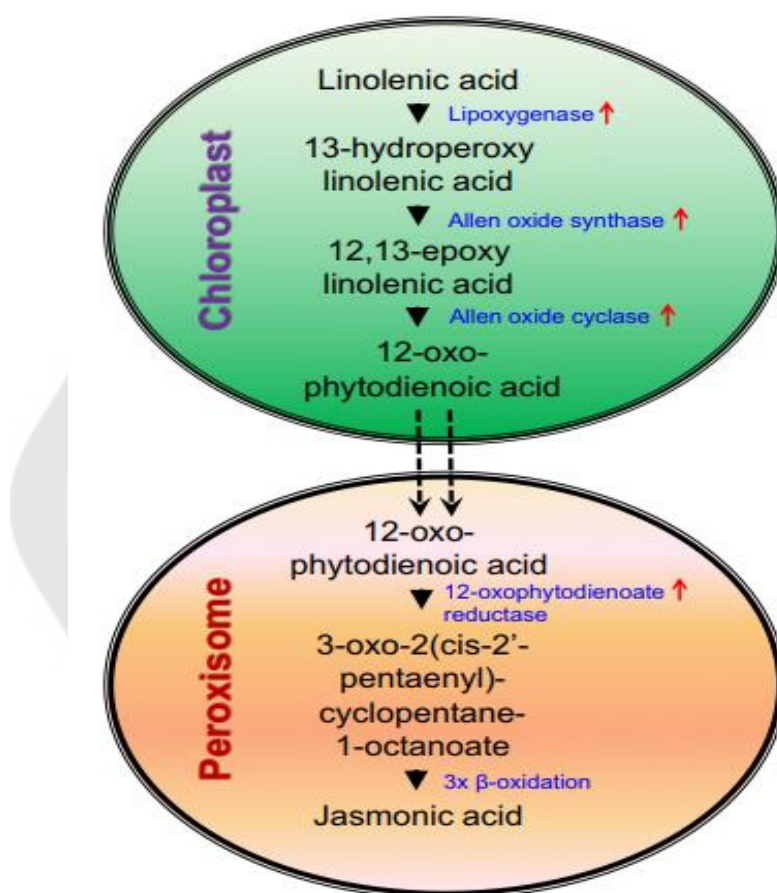
Li และคนอื่น ๆ (2015)⁽⁷³⁾ พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพ เพื่อควบคุมโรคราแป้งในต้นแตงกวา โดยกระตุ้นให้ต้นแตงกวาผลิตกรดซาลิไซลิกและชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้มากกว่าในกลุ่มการทดลองที่ไม่ได้ใช้ตัวควบคุมโรคทางชีวภาพถึง 5 เท่า หลังจากการปลูกเชื้อ *B. amyloliquefaciens* LJ02 เป็นเวลานาน 3 วัน นอกจากนี้ *P. polymyxa* AC-1 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเชื้อ PGPB สามารถชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* ในต้นอะราบิโดพซิส เพื่อต้านทานต่อการบุกรุกของ *P. syringae*⁽⁷⁴⁾

6.4 Lipxygenase (LOX) gene family

ยีน LOX มีการแสดงออกเป็นเอนไซม์ lipxygenases (LOXs) ที่มีกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) ยกตัวอย่างเช่น linolenic acid, linoleic acid และ arachidonic acid โดยจัดจำแนกเอนไซม์ LOXs ที่เกี่ยวข้องในการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหล่านี้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ 9-LOX และ 13-LOX ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งคาร์บอนที่ถูกออกซิไดซ์ เกิดเป็นสารในกลุ่มออกซีไลพิน (oxylipin) ที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาและการป้องกันตัวเองต่อแมลงและเชื้อสาเหตุโรคของพืช นอกจากนี้ออกซีไลพินยังถูกสังเคราะห์เพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่ไม่มีชีวิต⁽⁷⁵⁾ ยกตัวอย่างเช่น กรดจัสโมนิกและสารระเหยจากใบพืชสีเขียว ซึ่งกรดจัสโมนิกเป็นโมเลกุลส่งเสริมสัญญาณที่สำคัญในระบบ ISR ของพืช

การสังเคราะห์กรดจัสโมนิกในพืชเกิดขึ้นผ่าน octadecanoid pathway ดังแสดงในภาพประกอบ 9 เริ่มจากเอนไซม์ 13-LOX ไปออกซิไดซ์ α -linolenic acid (18:3) ทำให้เกิด 13-hydroperoxy linolenic acid แล้วถูกเปลี่ยนต่อเป็น 12,13-epoxy linolenic acid และ 12-OPDA โดยเอนไซม์ allene oxide synthase และ allene oxide cyclase ตามลำดับ ซึ่งปฏิกิริยาที่กล่าวมาเกิดขึ้นบริเวณพลาสติดในคลอโรพลาสต์ ต่อจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์กรดจัสโมนิกในเพอร์ออกซิโซม (peroxisome) ซึ่ง 12-OPDA จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ 12-OPDA reductase แล้วเกิดกระบวนการเบตาออกซิเดชันของกรดไขมันจำนวน 3 รอบ จนได้เป็นกรดจัสโมนิก^(76, 77) นอกจากนี้กรดจัสโมนิกยังสามารถถูกเปลี่ยนเป็น methyl jasmonate ซึ่งเป็นสารระเหยชนิดหนึ่งและ jasmonoyl isoleucine (JA-Ile) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในรูปแบบที่สามารถทำงานกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน jasmonate ZIM-domain (JAZ) ที่เป็นโปรตีนควบคุม (repressor protein) การแสดงออกของยีนในระบบป้องกันตัวเองของพืชที่ขึ้นกับการชักนำของกรดจัสโมนิก⁽⁷⁸⁾

García-Gutiérrez และคนอื่น ๆ (2013)⁽⁷⁹⁾ รายงานว่า *B. subtilis* UMAF6639 มีคุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Podosphaera fusca* ที่ก่อโรคราแป้งในเมล่อน (*Cucumis melo* L.) โดยสามารถชักนำการแสดงออกของยีน LOX2 ในต้นเมล่อนได้ในระดับปานกลาง



ภาพประกอบ 9 การสังเคราะห์กรดจัสโมนิกผ่าน octadecanoid pathway

ที่มา: Gupta R, Lee SJ, Min CW, Kim SW, Park K-H, Bae D-W, et al. Coupling of gel-based 2-DE and 1-DE shotgun proteomics approaches to dig deep into the leaf senescence proteome of *Glycine max*. J Proteomics. 2016; 148: 65-74.⁽⁷⁶⁾

สารไลโปเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic lipopeptide) ได้แก่ surfactin, fengycin และ iturin A ที่ถูกสร้างจากเชื้อ *B. subtilis* ABS-S14 สามารถชักนำการแสดงออกของ ยีน *LOX* ในสั้มาเลนเซียได้ โดยพบว่ายีน *LOX* เริ่มมีการแสดงออกในชั่วโมงที่ 48 และสูงที่สุดใน ชั่วโมงที่ 72 หลังจากหยดสาร surfactin ลงในแผลที่ทำขึ้น ส่วนสาร fengycin และ iturin A สามารถชักนำการแสดงออกของยีน *LOX* ได้เล็กน้อยในชั่วโมงที่ 48 และค่อย ๆ ลดลง โดยศึกษา การแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time (qRT) PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *13-LOX* ของสั้มาเลนเซีย ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับ กลไกการต้านทานโรคในสั้มาเลนเซียได้⁽⁸⁰⁾



บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง Whatman No.1	Schleicher & Schuell	Germany
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Zeiss	Germany
เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ	Nipro	Japan
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Forma Scientific	USA
เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)	Scientific Industries	USA
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (dry bath incubator)	Major Science	USA
เครื่องชั่งสาร	Sartorius	Germany
เครื่องถ่ายภาพเจล	Bio-Rad	USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ	Tomy	Japan
เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler)	Scilogex	USA
เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)	Shimadzu	Japan
เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (nanodrop)	Thermo Scientific	USA
เครื่องวัดพีเอช	Suntex	Taiwan
เครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis)	Bio-Rad	USA
ตู้อบเชื้อ	Shel Lab	USA
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	NuAire	USA
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilizing oven)	Fisher Scientific	USA
พาราฟิล์ม	Bemis	USA
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	Tomy	Japan

อาหารและสารเคมี

ตาราง 3 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)	Sigma-Aldrich	USA
1 kb DNA ladder	SibEnzyme	Russia
100 bp DNA ladder	SibEnzyme	Russia
10X loading buffer	Takara	Japan
10X tris borate EDTA (TBE) solution	Bio Basic	Canada
5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal)	Wako	Japan
70% perchloric acid	Qrec	New Zealand
Absolute ethanol	Qrec	New Zealand
Agar	Himedia	India
Agarose	Invitrogen	USA
Ammonium chloride (NH_4Cl)	Ajax Finechem	Australia
Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	EMSURE	Germany
Ampicillin, sodium salt	VWR	USA
Boric acid (H_3BO_3)	Ajax Finechem	Australia
Calcium chloride (CaCl_2)	Ajax Finechem	Australia
Casamino acid	Bio Basic	Canada
Chrome Azurol S (CAS)	Sigma-Aldrich	USA
Citric acid	Fluka	Switzerland
Copper (II) chloride anhydrous (CuCl_2)	Ajax Finechem	Australia
Copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia
D-glucose anhydrous	Ajax Finechem	Australia
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem	Australia
Ethachinmate	Nippon Gene	Japan

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Ethidium bromide solution	Bio Basic	Canada
Ferric chloride anhydrous (FeCl_3)	Fluka	Switzerland
Ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia
Glacial acetic acid	EMSURE	Germany
Glycine	Fisher Scientific	England
Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	Fluka	Switzerland
Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Takara	Japan
Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck	USA
Manganese sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia
Molybdenum trioxide (MoO_3)	Ajax Finechem	Australia
Murashige & Skoog (MS) basal medium	Himedia	India
Nutrient broth (NB)	Himedia	India
Peptone, bacteriological	Himedia	India
Picric acid	Merck	USA
PIPES, sodium Salt	Bio Basic	Canada
Potassium bromide (KBr)	Ajax Finechem	Australia
Potassium chloride (KCl)	Ajax Finechem	Australia
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Ajax Finechem	Australia
Skim milk	Ajax Finechem	Australia
Sodium carbonate (NaCO_3)	Ajax Finechem	Australia
Sodium chloride (NaCl)	Ajax Finechem	Australia
Sodium-D-gluconate, A.R.	Himedia	India
Sodium hypochlorite (NaOCl)	Kao	Thailand
Sucrose	Ajax Finechem	Australia

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	Merck	USA
Tryptone soya broth (TSB)	Himedia	India
Tryptophan	Pacific science	Thailand
Tween 80	Ajax Finechem	Australia
Yeast extract	Ajax Finechem	Australia
Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia

เอนไซม์ เวกเตอร์และชุดสำเร็จ (kit)

ตาราง 4 เอนไซม์ เวกเตอร์และชุดสำเร็จที่ใช้ในการวิจัย

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
AccuPrep® Genomic DNA extraction kit	Bioneer	Korea
<i>Bam</i> HI	Takara	Japan
DNase I	Invitrogen	USA
<i>Eco</i> RI	Takara	Japan
<i>Hind</i> III	Takara	Japan
HiYield™ Gel/PCR DNA fragments extraction kit	RBC Bioscience	Taiwan
HotStarTaq DNA polymerase	Qiagen	Germany
KAPA Taq ReadyMix PCR Kit	KAPA Biosystems	USA
KOD-Plus-Neo DNA polymerase	Toyobo	Japan
Ligation-Convenience kit manual (4 th edition)	Nippon Gene	Japan
MyTaq™ One-Step RT-PCR kit	Bioline	Canada
NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)	Macherey-Nagel	Germany

ตาราง 4 (ต่อ)

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
pBluescrip SK (-)	Stratagene	USA
Proteinase K	Macherey-Nagel	Germany
Total RNA extraction kit (plant)	RBC Bioscience	Taiwan
XhoI	Takara	Japan

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

1.1 การคัดแยกเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ทำโดยนำใบ และกิ่งของมะนาวแป้นที่มีรอยโรคแคงเกอร์ล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ แล้วเลือกตัดบริเวณขึ้นพืชมะนาวที่มีรอยโรคแคงเกอร์ โดยตัดใบและเปลือกของผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 ตารางเซนติเมตร และตัดกิ่งเป็นท่อนยาวขนาด 1 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วย 1% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ตัดผ่ากลางรอยโรคแคงเกอร์ด้วยมีดปลอดเชื้อ จากนั้นแบ่งการคัดแยกเชื้อเป็น 2 วิธี ดังนี้ (1) นำชิ้นพืชที่ถูกผ่าวางบนอาหาร mTMB (ภาคผนวก)⁽¹⁸⁾ และ Xan-D (ภาคผนวก)⁽¹⁹⁾ และ (2) นำชิ้นพืชที่ถูกผ่าแช่ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจาง และเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหาร mTMB และ Xan-D ซึ่งเป็นอาหารสูตรสำหรับบ่งบอกความแตกต่างโคโลนีของเชื้อ *Xcc* ออกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังการบ่มสำหรับอาหาร mTMB คัดเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองอ่อน ขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ มีเมือก พบตะกอนขาวห่อรอบโคโลนี ส่วนอาหาร Xan-D คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเช่นเดียวกับอาหาร mTMB แต่มีโคโลนีสีเหลืองอมเขียว และพบบริเวณใสรอบตะกอนขาวห่อ โดยเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีบนอาหารทั้ง 2 ชนิดกับเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตร (*Xcc*^D) โคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวถูกทำเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อจัดจำแนกชนิดต่อไป

1.2 การตรวจหาเชื้อในจีโนมของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

นำเชื้อบริสุทธิ์ของไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมาขีดไขว้ (cross streak) แล้วบ่ม จากนั้น เชียโคโลนีเดี่ยวจำนวน 3-4 โคโลนีลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 20 นาที แล้วใช้สารแขวนลอยเซลล์ที่ถูกต้มแทน ดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำ colony PCR ด้วย KAPA Taq ReadyMix PCR kit โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ J-RXg/J-RXc2, Xac01/Xac02 และ XACF/XACR ดังตาราง 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ควรมีความยาว 179, 582 และ 561 คู่เบส ตามลำดับ สำหรับส่วนประกอบในปฏิกิริยาแสดงดัง ตาราง 5 และกำหนดสภาวะดังตาราง 6 ผลผลิต PCR ถูกตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ (agarose gel) ความเข้มข้น 1% ใน 0.5X tris borate EDTA (TBE) buffer หยดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในช่อง เจล แยกขนาดของดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลแช่ใน สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 15 นาที เมื่อครบกำหนดตักเจลแช่ในน้ำสะอาด เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกก่อนไปส่อง ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล โดยใช้ 1 kb ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ในการเปรียบเทียบขนาด ซึ่งไอโซเลทที่ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ จะถูกนำไปทดสอบต่อไป

ตาราง 5 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X KAPA Taq ReadyMix	25	1X
10 ไมโครโมลาร์ forward primer	2	0.4 ไมโครโมลาร์
10 ไมโครโมลาร์ reverse primer	2	0.4 ไมโครโมลาร์
น้ำกลั่นปราศจาก RNase และ DNase	16	-
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	250 นาโนกรัม
รวม	50	

หมายเหตุ: 2X KAPA Taq ReadyMix ที่ 1X มี $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, KAPA Taq DNA polymerase 1 หนึ่งหน่วยต่อ 50 ไมโครลิตร ของปริมาตรรวม, KAPA Taq buffer และสารให้ความคงตัว (stabilizer)

ตาราง 6 สภาวะปฏิกิริยา colony PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Annealing	50-55*	5 นาที	1
Extension	72	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	30
Annealing	50-55*	45 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

หมายเหตุ: * อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับค่า Tm ของไพรเมอร์แต่ละชนิด

1.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

1.3.1 การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทมาศึกษารูปร่างของเซลล์เบื้องต้น คุณสมบัติในการย้อมติดสีและลักษณะโคโลนี โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar (TSA) (ภาคผนวก) ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกรูปร่างและสีของโคโลนี จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์มาย้อมสีแกรม และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกรูปร่างของเซลล์และการย้อมติดสีแกรม

1.3.2 การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้บริเวณยีน 16S rRNA

ทำโดยวิธี colony PCR ด้วย KAPA Taq ReadyMix PCR kit (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ Xcc) โดยใช้คู่ไพรเมอร์สากล 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' GGTTACCTTGT TACGACTT 3') ซึ่งมีส่วนประกอบปฏิกิริยาดังตาราง 5 และกำหนดสภาวะการทำ colony PCR ดังตาราง 6 ผลผลิต PCR ถูกตรวจสอบแถบแบนดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ Xcc) ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ควรมีความยาว 1,465 คู่เบส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ทำโดยนำผลผลิต PCR ที่ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA มาทำบริสุทธิ์ตามคู่มือของชุด

HiYield™ Gel/PCR DNA fragments extraction kit จากนั้นยืนยันการคงอยู่ของชิ้นดีเอ็นเออีกครั้ง โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ผลผลิต PCR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน 16S rRNA ที่ได้รับถูกนำมาตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.26⁽⁸¹⁾ แล้วนำมาเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยคำสั่ง Nucleotide BLAST (BLASTN) ร่วมกับการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) ในฐานข้อมูล EzTaxon เพื่อความแม่นยำและความถูกต้องในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

1.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคแคงเกอร์

ทำโดยนำต้นกล้ามะนาวแบบที่ปลูกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำแผลต้นละ 2 ใบ ใบละ 6 แผลด้วยเข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ทาแผลด้วยเชื้อไอโซเลทที่คัดแยกได้ โดยมีเชื้อ *Xcc*^D และนำปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเชิงบวกและเชิงลบ ตามลำดับ เพาะเลี้ยงต้นกล้ามะนาวต่อในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังการปลูกเชื้อ 30 วัน สังเกตรอยสะเก็ดสีขาวฟูบริเวณแผลที่ถูกปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลท โดยเปรียบเทียบรอยโรคแคแคงเกอร์จากชุดควบคุมเชิงบวก หากพบรอยโรคแคแคงเกอร์จะยืนยันได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นเชื้อ *Xcc* ที่ก่อให้เกิดโรคแคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแบบ

2. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำใบ และกิ่งของมะนาวแบบที่มีรอยโรคและปราศจากรอยโรคแคแคงเกอร์มาล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ ตัดใบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 ตารางเซนติเมตร และตัดกิ่งเป็นท่อนยาวขนาด 1 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วย 1% โซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ตัดผ่ากลางชิ้นพืชด้วยมีดปลอดเชื้อ จากนั้นแบ่งการคัดแยกเชื้อเป็น 2 วิธีเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* แต่ทำการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังจากนั้นบ่มอาหารจากทั้ง 2 วิธีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ขึ้นบนอาหารมาทำเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งแต่ละไอโซเลทจะถูกนำไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* ต่อไป

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำโดยเลี้ยงเชื้อ *Xcc* ที่คัดแยกได้หรือ *Xcc*^D ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในหัวข้อ 2.1 บนจานเพาะเชื้อเดียวกัน (dual-culture plate) เริ่มจากนำอาหาร TSA มาเกลี่ยเชื้อ

Xcc ความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิเมตรให้ทั่วผิวน้ำอาหาร ทิ้งให้แห้ง จากนั้นเจาะให้เป็นช่องด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร แล้วนำเชื้อแต่ละไอโซเลทที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิเมตรปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในช่องที่เจาะไว้ โดยมีอาหารเหลว tryptone soya broth (TSB) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง หลังบ่มวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯที่สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งได้มากที่สุดจะถูกคัดเลือกไปตรวจสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป โดยระหว่างการศึกษาเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯถูกเก็บรักษาในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3.1 การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์

ทำโดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ที่เติมกรดอะมิโนไกลซีน (ปริมาณ 4.4 กรัมต่อลิตร) จากนั้นนำกระดาษกรองปลอดเชื้อที่ชุ่มด้วย 0.5% สารละลายกรดพิคริก (picric acid solution) (ภาคผนวก) ใน 2% สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง จากนั้นวางกระดาษกรองให้ติดผิวน้ำในจานเพาะเชื้อ ปิดครอบขอบจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตสีของกระดาษกรอง หากเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำตาลอมแดงแสดงว่ามีการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ เนื่องจากกรดพิคริกจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นกรดไอโซเพอพิวริก (isopurpuric acid) ในสภาวะที่มีไฮยาไนด์อิสระ⁽⁸²⁾

3.2 การละลายธาตุฟอสฟอรัส

ทำโดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar (PVK) (ภาคผนวก) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หากพบบริเวณใส (clear zone) แสดงว่าเชื้อสามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ในอาหาร PVK ได้ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีในหน่วยมิลลิเมตร⁽⁸³⁾

3.3 การผลิตซิเดอโรฟอรัส

ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฯที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome Azurol-S (CAS) agar (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หากพบบริเวณฮาโล (halo

zone) รอบโคโลนีแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตซิเดอโรฟออร์มาจับกับเฟอร์ริกไอออนในอาหารได้ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีเหลืองส้มในหน่วยมิลลิเมตร⁽⁸⁴⁾

3.4 การผลิตกรดอินโดลอะซิติก

ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ที่เติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน (ปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร) จากนั้นเขย่าด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใสที่ปราศจากตัวเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทดสอบกับ Salkowski reagent (ภาคผนวก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที สังเกตการเกิดสารละลายสีชมพูแดง หากพบแสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetic acid, IAA) ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปฏิกิริยาระหว่าง IAA และ Salkowski reagent ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน tris-(indole-3-acetato) iron (III) ที่มีสีชมพูแดง⁽⁸⁵⁾

3.5 การตรึงก๊าซไนโตรเจน

ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dworkin and Foster (DF) salt medium (ภาคผนวก)⁽⁸⁶⁾ 2 ชนิด ได้แก่ (1) อาหารเลี้ยงเชื้อ DF ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและ (2) อาหารเลี้ยงเชื้อ DF ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DF ทั้ง 2 ชนิด หากเชื้อมีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศได้จะพบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด

3.6 การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DF 3 ชนิด ได้แก่ (1) อาหารเลี้ยงเชื้อ DF ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (2) อาหารเลี้ยงเชื้อ DF ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและ (3) อาหารเลี้ยงเชื้อ DF ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว⁽⁸⁷⁾ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 และ 2 ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบและเชิงบวก ตามลำดับ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DF ทั้ง 3 ชนิด หากเชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้จะพบการเจริญบนอาหารชนิดที่ 2 และ 3 แต่ไม่พบการเจริญบนอาหารชนิดที่ 1 เนื่องจากเชื้อขาดแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโต

เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค Xcc และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีจะถูกจัดจำแนกชนิดต่อไป

4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่ถูกคัดเลือก ทำโดยศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น (เช่นเดียวกับขั้นตอนการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทาง สัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสาเหตุโรค) และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้ บริเวณยีน 16S rRNA เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็น เวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยงหนี ศูนย์กลาง 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บตัวเซลล์เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในคู่มือชุด สกัด AccuPrep Genomic DNA extraction kit สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ถูกตรวจสอบการมีอยู่ของ ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหาชิ้นในจีโนมของเชื้อ Xcc)

สารละลายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ถูกใช้เป็นตัวเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเพิ่มจำนวน บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์สากล 27F และ 1492R (เช่นเดียวกับขั้นตอน การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้บริเวณยีน 16S rRNA) และสำหรับเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้องใช้บริเวณ ยีน *gyrA* ในการจัดจำแนกชนิดเพิ่มเติม จะใช้คู่ไพรเมอร์ P-*gyrA*-F (5' CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT 3') และ P-*gyrA*-R (5' CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT 3') ในการเพิ่มจำนวนให้เกิดแถบแบนดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 1,000 คู่เบส⁽⁸⁸⁾ ซึ่งส่วนประกอบในปฏิกิริยาและการกำหนดสภาวะปฏิกิริยา PCR แสดง ดังตาราง 5 และ 7 ตามลำดับ จากนั้นผลผลิต PCR ถูกตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และทำบริสุทธิ์ผลผลิต PCR เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับมาตรวจสอบความถูกต้องและเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon (เช่นเดียวกับขั้นตอนการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้บริเวณยีน 16S rRNA)

ตาราง 7 สภาวะปฏิกิริยา PCR โดยใช้ KAPA Taq ReadyMix PCR kit

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	
Annealing	52-55 *	45 วินาที	30
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

หมายเหตุ: * อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับค่า T_m ของไพรเมอร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA และยีน gyrase A ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต้นแบบถูกนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทั้ง 2 บริเวณ โดยเริ่มจากการทำ multiple sequence alignment จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.26 โดยวิธี neighbor joining ที่ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง

5. การตรวจสอบการผลิตรายูบิกวินนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำโดยวิธี agar well diffusion เริ่มจากนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ถูกเลือกมาเลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม 0.01% คอปเปอร์คลอไรด์ (copper(II) chloride, CuCl_2) ⁽⁸⁹⁾ เป็นเวลา 3 วัน เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 8,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมารองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการกรองปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยอดลงในช่องที่ถูกเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีการเคลือบด้วยเชื้อ Xcc เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณยับยั้งและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้น กล่ำมะนาวแป้นและต้นมะนาวแป้นในสภาพจริง

6.1 การเตรียมต้นมะนาวแป้น

การเตรียมต้นกล่ำมะนาวแป้นปลอดเชื้อในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำโดยนำเมล็ดจากผลมะนาวแป้นที่ปราศรอยโรคแคงเกอร์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5% โซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที จากนั้นนำไปเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร Murashige & Skoog (MS) (ภาคผนวก)⁽⁹⁰⁾ ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วปลอดเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง โดยมีการควบคุมให้แสงต่อวันนาน 12 ชั่วโมงเป็นเวลาประมาณ 60 วัน เพื่อให้ต้นกล่ำมะนาวแป้นเจริญอยู่ในระยะที่มีจำนวนใบ 4-7 ใบต่อต้น

การทดสอบในสภาพจริงจะใช้ต้นมะนาวแป้นจากกรมวิชาการเกษตร โดยเป็นกิ่งมะนาวแป้น (*C. aurantifolia*) ที่ถูกต่อกิ่งลงบนต้นตอแรงเพอร์ไลม์ (rangpur lime) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus limonia* โดยแต่ละต้นมีความสูงประมาณ 1.2 เมตรเท่าๆ กัน สำหรับใช้ทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกันจำนวน 2 ครั้ง โดยต้นมะนาวถูกวางไว้ในสภาพธรรมชาติจริง และมีการให้น้ำในปริมาณเท่า ๆ กันจำนวน 3 ครั้งต่อสัปดาห์

6.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6.2.1 การประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในการอยู่ร่วมกับต้นกล่ำมะนาวแป้น (co-culture) ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำโดยแบ่งต้นกล่ำมะนาวแป้นในขวดแก้วปลอดเชื้อเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ต้น ดังตาราง 8 โดยมีกลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุมเชิงลบ ทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกันจำนวน 3 ครั้ง เริ่มจากนำต้นกล่ำมะนาวในแต่ละกลุ่มมาทำแผลต้นละ 2 ใบ ใบละ 3 แผลด้วยเข็มฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 0.4×25 มิลลิเมตร แล้วทาด้วยไม้พันสำลีปลอดเชื้อที่ชุบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิเมตร นำต้นกล่ำทั้งหมดเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 30 วัน โดยในวันที่ 15 และ 30 หลังจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ สังเกตลักษณะรอยแผลและการเจริญเติบโตของต้นกล่ำมะนาวแป้น แล้วให้คะแนนความรุนแรงดังตาราง 9 นำคะแนนที่ได้จากแต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างค่ามัธยฐานด้วยวิธีครัสคาล-วัลลิส (Kruskal-Wallis test) และเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparisons) ด้วยวิธีแมน-วิทนียู (Mann-Whitney U test) ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS 25.0 (IBM Corp.)

ตาราง 8 กลุ่มการทดลองการประเมินผลของเชื้อปฏิบัติในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กลุ่มการทดลอง	การปฏิบัติ
1	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ
2	ทาเชื้อปฏิภาณชนิดที่ 1
3	ทาเชื้อปฏิภาณชนิดที่ 2
4	ทาเชื้อปฏิภาณชนิดที่ 3
5	ทาเชื้อปฏิภาณชนิดที่ 4

ตาราง 9 คะแนนความรุนแรงสำหรับการประเมินผลของเชื้อปฏิบัติในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้น

ลำดับ	ลักษณะของต้นกล้ามะนาว	คะแนนความรุนแรง
1	ใบร่วงหมดต้น หรือต้นตาย	4
2	มีใบร่วง และไม่มีใบเขียวสมบูรณ์	3
3	มีใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ ใบมีเนื้อเยื่อตายตั้งแต่ 3 ใบขึ้นไป	2
4	มีใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ เนื้อเยื่อตาย 1-2 ใบ	1
5	สุขภาพดี ใบเขียวสมบูรณ์ ไม่พบว่ามีใบร่วงหรือใบเหลือง	0

6.2.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำโดยแบ่งต้นกล้ามะนาวแป้นในขวดแก้วปลอดเชื้อเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ต้น ดังตาราง 10 โดยมีกลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นชุดควบคุมเชิงลบและเชิงบวก ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกันจำนวน 3 ครั้ง เริ่มจากทำแผลต้นกล้ามะนาวแป้นในแต่ละกลุ่มการทดลอง (เช่นเดียวกับขั้นตอนการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติในการอยู่ร่วมกับต้น

กล้ามเนื้อมะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) แล้วทำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณห์ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทำซ้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือเชื้อสาเหตุโรค Xcc (ใช้ Xcc ที่คัดแยกได้และ Xcc^D) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณห์และเชื้อสาเหตุโรค Xcc ถูกปรับให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 และ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำต้นกล้าทั้งหมดเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 15 และ 30 หลังจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณห์ สังเกตลักษณะรอยแผลและการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะนาวแป้น แล้วให้คะแนนความรุนแรงดังตาราง 11 จากนั้นทดสอบความแตกต่างค่ามัธยฐานของคะแนนและเปรียบเทียบพหุคูณ (เช่นเดียวกับขั้นตอนการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณห์ในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

ตาราง 10 กลุ่มการทดลองการประเมินเชื้อปฏิบัณห์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กลุ่มการทดลอง	วิธีการปฏิบัติ	
	ปลูกเชื้อครั้งที่ 1	24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อครั้งที่ 1
1	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ
2	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ	ทาเชื้อ Xcc
3	ทาเชื้อปฏิบัณห์ชนิดที่ 1	ทาเชื้อ Xcc
4	ทาเชื้อปฏิบัณห์ชนิดที่ 2	ทาเชื้อ Xcc
5	ทาเชื้อปฏิบัณห์ชนิดที่ 3	ทาเชื้อ Xcc
6	ทาเชื้อปฏิบัณห์ชนิดที่ 4	ทาเชื้อ Xcc

ตาราง 11 คะแนนความรุนแรงสำหรับการประเมินเชื้อปฏิบัติในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลำดับ	ลักษณะของต้นกล้ามะนาว	คะแนนความรุนแรง
1	ใบร่วงหมดต้น หรือต้นตาย	7
2	มีใบร่วง และไม่มีใบเขียวสมบูรณ์	6
3	พบรอยสะเก็ดสีขาวฟู และ/หรือ ใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ เนื้อเยื่อตาย ตั้งแต่ 3 ใบขึ้นไป	5
4	มีใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ ใบมีเนื้อเยื่อตายตั้งแต่ 3 ใบขึ้นไป	4
5	พบสะเก็ดสีขาวฟูร่วมกับมีใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ เนื้อเยื่อตาย 1-2 ใบ	3
6	พบสะเก็ดสีขาวฟูเพียงอย่างเดียว	2
7	มีใบร่วง และ/หรือ ใบเหลือง และ/หรือ เนื้อเยื่อตาย 1-2 ใบ	1
8	สุขภาพดี ใบเขียวสมบูรณ์ ไม่พบว่า มีใบร่วงหรือใบเหลือง	0

เชื้อแบคทีเรียปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค Xcc และการลดการเกิดโรคแคงเกอร์ในต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะถูกคัดเลือกไปศึกษาในขั้นต่อไป

6.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง

ทำโดยแบ่งต้นมะนาวแป้นเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ต้น ดังตาราง 12 ทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกันจำนวน 2 ครั้ง โดยมีกลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นชุดควบคุมเชิงลบและเชิงบวก ตามลำดับ แต่ละกลุ่มการทดลองถูกปลูกเชื้อ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ทาใบมะนาวให้ทั่วด้วย phosphate buffer saline (PBS) หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ หรือส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทาซ้ำด้วย PBS หรือเชื้อสาเหตุโรค Xcc (ใช้ Xcc ที่คัดแยกได้เท่านั้น) โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติและเชื้อสาเหตุโรค Xcc ถูกปรับให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 และ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำต้นกล้าทั้งหมดเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน

ในวันที่ 30 หลังจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัตินี้ ทำการนับจำนวนรอยแผลโรคแดงเกอ์บนใบที่ถูกปลูกเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) เพื่อคำนวณดัชนีความรุนแรงของโรคโดยนำจำนวนรอยแผลที่นับได้ของแต่ละใบหารด้วยพื้นที่ใบนั้น ๆ (หน่วยเป็นตารางเซนติเมตรหรือ cm^2) ซึ่งพื้นที่ใบคำนวณได้จากโปรแกรม ImageJ analysis 1.52a (NIH, USA) ⁽³⁹⁾ จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองด้วย ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วย Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS 25.0 (IBM Corp.) นอกจากนี้ทำการคำนวณค่าร้อยละของประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (% disease control efficacy) โดยใช้ค่าความรุนแรงของชุดควบคุมเชิงบวก (C) และกลุ่มการทดลองที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัตินี้ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค Xcc (T) ในการคำนวณด้วยสูตรด้านล่าง ⁽⁹¹⁾

$$\text{ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (\%)} = \frac{C-T}{T} \times 100$$

ตาราง 12 กลุ่มการทดลองการประเมินเชื้อปฏิบัตินี้ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง

กลุ่มการทดลอง	การปฏิบัติ	
	ปลูกเชื้อครั้งที่ 1	24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อครั้งที่ 1
1	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ
2	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ	ทาเชื้อ Xcc
3	ทาเชื้อปฏิบัตินิตที่ 1	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ
4	ทาเชื้อปฏิบัตินิตที่ 2	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ
5	ทาเชื้อปฏิบัตินิตที่ 1	ทาเชื้อ Xcc
6	ทาเชื้อปฏิบัตินิตที่ 2	ทาเชื้อ Xcc
7	ทาสวนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบัตินิตที่ 1	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ
8	ทาสวนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบัตินิตที่ 2	ทา PBS ที่ปลอดเชื้อ
9	ทาสวนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบัตินิตที่ 1	ทาเชื้อ Xcc
10	ทาสวนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิบัตินิตที่ 2	ทาเชื้อ Xcc

7. การตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่ปฏิบัติในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้น

7.1 การตรวจหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น

7.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำโดยนำใบอ่อนของมะนาวแป้นมาบดให้เซลล์แตกด้วยไนโตรเจนเหลวในโถรงจนเป็นผงละเอียด แล้วนำใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามคู่มือในชุดสกัดดีเอ็นเอ AccuPrep® Genomic DNA extraction kit นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหา ยีนในจีโนมของเชื้อ *Xcc*)

7.1.2 การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค

7.1.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา

ทำโดยวิธี PCR ซึ่งใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของมะนาวแป้นเป็นต้นแบบ ตาราง 13 แสดงข้อมูลของไพรเมอร์ที่ถูกดัดแปลงจากพืชตระกูลส้มสายพันธุ์อื่น ๆ ให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI* อยู่บริเวณปลาย 5' ของ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ อีกทั้งยังมีบริเวณเบสส่วนเกิน 4 ตำแหน่งที่เติมอยู่บริเวณปลาย 5' ถัดจากตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR แสดงดังตาราง 14 ยีน *PR-1* ซึ่งใช้ HotStarTaq DNA polymerase มีการกำหนดสภาวะในการทำ PCR ดังตาราง 15 สำหรับยีน *Pt14*, *LRR8*, *LOX* และ *Ef-1a* ซึ่งใช้ KOD-Plus-Neo DNA polymerase มีการกำหนดสภาวะในการทำ PCR ดังตาราง 16

ตาราง 13 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหาเชื้อที่เกี่ยวข้อกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -3')	บริเวณจำเพาะ	สายพันธุ์ส้ม	ที่มา
rePR1f (Forward)	CCCTAAGCTTACAAACACACATCTCCGAAA	Pathogenesis-related gene 1	C. reticulata	(34)
rePR1r (Reverse)	GCATGAATTCCTTGAAATGAGCAGCAGCAAA	(PR-1)		
rePt14UP (Forward)	ATTTAAGCTTGACAAATATCTCTTAACAGTT	Putative citrus canker	C. grandis x P.	(66)
rePt14LW (Reverse)	TACTGAATTCGAGCTCAAAAATAACCAATCTG	resistance gene (Pt14)	trifoliata	
reLRR8f (Forward)	ACGGAAGCTTTGACCCAGAGCTAGCCTACA	Leucine-rich repeat receptor	C. reticulata	(34)
reLRR8r (Reverse)	GACAGAAATTCGATGGATATGGAAGCCGAGA	kinase gene (LRR8)		
reLOXf (Forward)	TGGCAAGCTTGTCGTTCTGGAACCTTGTCGG	Lipoxygenase gene (LOX)	C. sinensis	(80)
reLOXr (Reverse)	TTATGAATTCCTGTGATTGCACCAGGCGTC			
nreLOXf (Forward)	ATTTAAGCTTAATTTGTTATTATAATTTC		C. aurantiifolia	ในงานวิจัยนี้
reEf-1af (Forward)	TTTAAAGCTTACATGATTACCGGTACCTCA	Elongation factor 1 alpha	C. sinensis	(80)
reEf-1ar (Reverse)	CATCGAATTCACACCAAGGTTGAAAGCAAG	gene (Ef-1a) *		

หมายเหตุ: * หมายถึงยีนเบียร์ยบ (housekeeping gene) และตัวอักษรหน้าหมายถึงบริเวณจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII และตัวอักษรที่ถูกต้องเส้นใต้หมายถึงบริเวณจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI

ตาราง 14 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	5	1X
2 มิลลิโมลาร์ dNTPs	5	0.2 มิลลิโมลาร์
25 มิลลิโมลาร์ MgSO ₄	2-3*	1.0-1.5 มิลลิโมลาร์
10 ไมโครโมลาร์ forward primer	1	0.2 ไมโครโมลาร์
10 ไมโครโมลาร์ reverse primer	1	0.2 ไมโครโมลาร์
KOD-Plus-Neo หรือ HotStarTaq DNA polymerase	1	1 ยูนิต
น้ำกลั่นปราศจาก RNase และ DNase	33-34**	-
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	40 นาโนกรัม
รวม	50	

หมายเหตุ: * และ ** ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดยีนที่ศึกษา

ตาราง 15 สภาวะปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค โดยใช้ HotStarTaq DNA polymerase

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial activation step	95	15 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	
Annealing	54	30 วินาที	35
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1

ตาราง 16 สภาวะปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค โดยใช้ KOD-Plus-Neo DNA polymerase

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	98	10 วินาที	
Annealing	55-62*	30 วินาที	35
Extension	68	30 วินาที	
Final extension	68	7 นาที	1

หมายเหตุ: * อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับค่า Tm ของไพรเมอร์แต่ละชนิด

ผลผลิต PCR ถูกตรวจสอบแถบแบนดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5X TBE หยดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรที่ผสมกับ 5X loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงในช่องเจล แยกขนาดของดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยมี 100 bp ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำเจลไปย้อมและล้างเอธิเดียมโบรไมด์ (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหาในจีโนมของเชื้อ Xcc) แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล ทำปฏิกิริยาผลผลิต PCR ตามขั้นตอนในคู่มือของชุดทำปฏิกิริยา HiYield™ Gel/PCR DNA fragments extraction kit แล้วนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาอีกครั้งด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีด้านบน วัดความเข้มข้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (nanodrop)

จากนั้นตัดผลผลิต PCR ที่ถูกทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน (double digestion) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI* ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตาราง 17 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารผสมของฟีนอลและคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น เขย่าให้เข้ากันด้วยการวอร์เท็กซ์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสของ

สารละลายด้านบน (upper phase) ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 3.3 ไมโครลิตรต่อ 100 ไมโครลิตรของสารละลายดีเอ็นเอ แล้วเติม ethachinmate ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าด้วยการวอร์เท็กซ์ จากนั้นเติม 100% เอทานอล เขย่าด้วยการวอร์เท็กซ์อีกครั้งก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง เติม tris EDTA (TE) buffer เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน และตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีด้านบน โดยสารละลายดีเอ็นเอจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการเจือจางชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาด้วย TE buffer โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8*, *LOX* และ *Ef-1a* ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.7, 4.0, 1.8, 3.0 และ 1.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ในขั้นตอนการสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid)

ตาราง 17 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X M buffer	3	1X
ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธ์ หรือพลาสมิดดีเอ็นเอ	25	0.2-1.4 ไมโครกรัม* 1.9 ไมโครกรัม**
<i>HindIII</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	15 ยูนิต
<i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	15 ยูนิต
รวม	30	

หมายเหตุ: * ความเข้มข้นสุดท้ายขึ้นกับความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธ์เริ่มต้น และ

** ความเข้มข้นสุดท้ายของพลาสมิดดีเอ็นเอ

7.1.2.2 การเตรียมพาหะดีเอ็นเอ (DNA vector)

พาหะดีเอ็นเอที่ใช้ในการถ่ายยีนคือ พลาสมิด pBluescript SK (-) (ภาคผนวก) เริ่มจากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI* ในปฏิกิริยาเดียวกัน ส่วนประกอบในปฏิกิริยาแสดงดังตาราง 16 สำหรับขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ การตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอ การละลายตะกอนด้วย TE buffer การวัดความเข้มข้นและการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอมีกระบวนการเช่นเดียวกับขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา แต่ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ Lambda-*HindIII* ladder ในการเปรียบเทียบขนาด และเจือจางพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้ในขั้นตอนการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

7.1.2.3 การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ผู้รับ (transformation)

ทำโดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษากับพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน (ligation) ด้วยชุด Ligation-Convenience kit manual (4th edition) ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดังตาราง 18 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรที่มี competent cell ของแบคทีเรียผู้รับ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรอยู่ภายในหลอด สำหรับชุดควบคุมเชิงลบดูดสารละลายพลาสมิดเปล่าความเข้มข้น 1 พิโคกรัมปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับเซลล์แบคทีเรียผู้รับปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนานเป็นเวลา 30 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แล้วรีบย้ายมาบ่มในน้ำแข็งนานเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ super optimal broth with catabolite repression (SOC) (ภาคผนวก) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์มาทำการเกลี่ยบนอาหาร Luria-Bertani agar (LBA) (ภาคผนวก) ที่เติม X-Gal (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), IPTG (1 มิลลิโมลาร์) และ ampicillin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังการบ่มคัดเลือกโคโลนีจากสีของโคโลนี (blue-white screening) โคโลนีสีขาวจำนวน 6 โคโลนีถูกทำเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร LBA ที่เติม ampicillin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาต่อไป

ตาราง 18 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษากับพลาสมิดดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X ligation mix	5	1X
พลาสมิดดีเอ็นเอ	1	30 นาโนกรัม
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา	1	0.7-4.0 นาโนกรัม *
น้ำกลั่นปราศจาก RNase และ DNase	3	-
รวม	10	

หมายเหตุ * ความเข้มข้นขึ้นกับชนิดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากแต่ละยีน

7.1.2.4 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

ทำโดยเลี้ยงโคโลนีสีขาวที่ถูกคัดเลือกในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวเซลล์เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามคู่มือของชุดสกัด NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) วัดความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตรด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน และตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับขั้นตอนการเตรียมพาหะดีเอ็นเอ

จากนั้นตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เพื่อตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา และมีชิ้นยีนดังกล่าวเพียง 1 ชุดเท่านั้น โดยมีส่วนประกอบในปฏิกิริยาดังตาราง 19 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ทำโดยนำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับ 5X loading buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงในช่องเจลอะกาโรสความ

เข้มข้น 1.5% และปฏิบัติตามขั้นตอนที่กล่าวด้านบน สุดท้ายเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่
ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I กับ Lambda-*Hind*III ladder

เซลล์ผู้รับ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่
ต้องการศึกษาถูกเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในกลีเซอรอล 20% และพลาสมิดดีเอ็นเอ
ลูกผสมที่เหลือจะถูกใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 19 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X K buffer	1.5	1X
พลาสมิดดีเอ็นเอ	11.5	1-1.5 ไมโครกรัม
<i>Bam</i> HI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	20 ยูนิต
<i>Xho</i> I (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	15 ยูนิต
น้ำกลั่นปราศจาก RNase และ DNase	-	
รวม	15	

7.1.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทาน
โรค

ทำโดยส่งสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของแต่ละยีนที่ต้องการศึกษา
ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท FASMAC ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้คู่มือเมอร์ M13M3
(5' GTAAACGACGGCCAGT 3') และ M13RV (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') ซึ่งมี
บริเวณจับอย่างจำเพาะบนพลาสมิด pBluescript SK (-) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
บริเวณยีนที่ต้องการศึกษาที่ได้รับถูกนำมาตรวจสอบวิเคราะห์ และเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอ
ไทด์ของบริเวณดังกล่าวในพืชตระกูลส้มในฐานข้อมูล GenBank ด้วยคำสั่ง BLASTN และทำการ
pairwise alignment เพื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ลำดับ
อีกครั้งด้วยโปรแกรม EMBOSS MATCHER (European Bioinformatics Institute) สำหรับยืนยัน
ว่ายีนเหล่านี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น

7.2 การประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี reverse-transcription PCR (RT-PCR)

7.2.1 การปลูกเชื้อแบคทีเรีย และการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบมะนาวแป้น

ทำโดยแบ่งต้นกล้ามะนาวแป้นในขวดแก้วปลอดเชื้อเป็น 4 กลุ่ม ดังตาราง 20 ทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกันจำนวน 3 ครั้ง เริ่มจากทำแผลต้นกล้ามะนาวแป้นในแต่ละกลุ่ม (เช่นเดียวกับขั้นตอนการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษาในการอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) แล้วทาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษา หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทาซ้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* (ใช้ *Xcc* ที่คัดแยกได้เท่านั้น) โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษาและเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* ถูกปรับให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 และ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

หลังจากปลูกเชื้อ 24 และ 48 ชั่วโมง นำใบมะนาวแป้นจากแต่ละกลุ่มในปริมาณเท่า ๆ กันมาทำให้เซลล์แตกโดยบดด้วยไนโตรเจนเหลวในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอตามคู่มือของชุดสกัด RBC Real Genomics total RNA extraction kit (plant) แล้วกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนมาในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I ทำโดยผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตรที่อยู่ในกล่องเก็บความเย็น ดังนี้ (1) สารละลายอาร์เอ็นเอ 17 ไมโครลิตร (2) 10X DNase I reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ (3) DNase I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตอย่างระมัดระวัง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I โดยเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ *Xcc*) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบแบนอาร์เอ็นเอจากภาพเจลที่ส่องดูด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล จากนั้นอาร์เอ็นเอถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป

ตาราง 20 กลุ่มการทดลองการประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วย RT-PCR

กลุ่มการทดลอง	วิธีการปฏิบัติ	
	ปลูกเชื้อครั้งที่ 1	24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อครั้งที่ 1
กลุ่มที่ 1	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ
กลุ่มที่ 2	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ	ทาเชื้อ Xcc
กลุ่มที่ 3	ทาเชื้อปฏิปักษ์	ทาเชื้อ Xcc
กลุ่มที่ 4	ทา TSB ที่ปลอดเชื้อ	ทาเชื้อปฏิปักษ์

7.2.2 การเพิ่มจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี RT-PCR

ทำโดยนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบมะนาวแป้นทั้ง 4 กลุ่มการทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันมาทำ RT-PCR สำหรับชุดควบคุมเชิงลบใช้น้ำกลั่นปราศจาก nuclease แทนอาร์เอ็นเอต้นแบบ ตาราง 21 แสดงไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ที่ถูกใช้ในการทำ RT-PCR ด้วยชุด MyTaq™ One-Step RT-PCR kit ซึ่งส่วนประกอบปฏิกิริยาแสดงดังตาราง 22 แล้วกำหนดสภาวะดังตาราง 23 เมื่อครบกำหนดนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยหยอดผลผลิต RT-PCR ปริมาตร 1 ไมโครลิตรที่ผสมกับ 2X loading buffer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ลงในช่องของเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% แยกขนาดของดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ 100 bp ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาด ย้อมและล้างเอธิเดียมโบรไมด์ (เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ Xcc) แล้วนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล โดยทำวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสซ้ำ 3 ครั้ง ต่อการทำ RT-PCR 1 รอบ และเลือกภาพที่มีความชัดเจนมากที่สุดใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 21 โปรแกรมที่ใช้ประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของมะนาวแบบด้วยวิธี RT-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -3')	บริเวณจำเพาะ	สายพันธุ์ส้ม	ที่มา
PR1f (Forward)	ACAAACACACATCTCCGAAATGA	Pathogenesis-related gene 1	<i>C. reticulata</i>	(34)
PR1r (Reverse)	TTGAAATGAGCAGCAGCAAAA	(PR-1)		
Pt14UP (Forward)	GACAAATATCTCTTATCAGTTTGATG	Putative citrus canker	<i>C. grandis</i> x <i>P. trifoliata</i>	(66)
Pt14LW (Reverse)	GAGCTCAAAATAACCAATCTGTAG	resistance gene (<i>Pt14</i>)		
LRR8f (Forward)	TGCACCAGAGCTAGCCTACA	Leucine-rich repeat receptor	<i>C. reticulata</i>	(34)
LRR8r (Reverse)	GATGGATATGGAAAGCCGAGA	kinase gene (<i>LRR8</i>)		
nreLOXf (Forward)	ATTTAAGCTTAATTGTTATTATAATTTC	Lipoxygenase gene (<i>LOX</i>)	<i>C. aurantifolia</i>	ในงานวิจัยนี้
LOXr (Reverse)	CTGTGATTGCACCAGGCGTCCC		<i>C. sinensis</i>	(80)
Ef-1af (Forward)	ACATGATTACCGGTGCCTCACA	Elongation factor 1 alpha gene	<i>C. sinensis</i>	(80)
Ef-1ar (Reverse)	ACACCAAGGGTGAAAGCAAGCA	(<i>Ef-1a</i>) *		

หมายเหตุ: * ยีนเปรียบเทียบกับ

ตาราง 22 ส่วนประกอบปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ MyTaq™ One-Step RT-PCR kit

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2x MyTaq One-Step mix	5	1X
Reverse transcriptase	0.1	0.2 มิลลิโมลาร์
RiboSafe RNase inhibitor	0.2	1.0-1.5 มิลลิโมลาร์
10 ไมโครโมลาร์ forward primer	0.4	0.4 ไมโครโมลาร์
10 ไมโครโมลาร์ reverse primer	0.4	0.4 ไมโครโมลาร์
น้ำกลั่นปราศจาก RNase และ DNase	2.9	-
อาร์เอ็นเอต้นแบบ	1	
รวม	10	

ตาราง 23 สภาวะปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ MyTaq™ One-Step RT-PCR kit

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Reverse transcription	45	20 นาที	1
Polymerase activation	95	1 นาที	1
Denaturation	95	10 วินาที	
Annealing	55-62*	10 วินาที	30-40***
Extension	72	20-35 วินาที**	
Final extension	72	7 นาที	1

หมายเหตุ: * อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับค่า Tm ของไพรเมอร์, ** เวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาวของแต่ละชิ้น และ *** จำนวนรอบที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้น

7.2.3 การเปรียบเทียบการแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค

ทำโดยใช้โปรแกรม Image Lab 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) แปลงความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอบนภาพเจลเดียวกันเป็นค่าตัวเลขความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอ โดยให้ค่าตัวเลขความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคเป็น X และค่าตัวเลขความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอของยีนเปรียบเทียบเป็น Y จากนั้นหาค่ากลับพื้นหลังด้วยค่าตัวเลขของชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (Z) ดังสมการที่ 1 จะได้ค่ากลับพื้นหลังของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (A) และค่ากลับพื้นหลังของยีนเปรียบเทียบ (B) จากนั้นนำมาคำนวณค่าความสัมพันธ์การแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (C) ดังสมการที่ 2

X = ค่าตัวเลขความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทาน

Y = ค่าตัวเลขความเข้มแถบแบนดีเอ็นเอของยีนเปรียบเทียบ

Z = ค่าตัวเลขของชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ

A = ค่ากลับพื้นหลังของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค

B = ค่ากลับพื้นหลังของยีนเปรียบเทียบ

C = ค่าความสัมพันธ์การแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค

เปรียบเทียบกับค่าการแสดงผลของยีนเปรียบเทียบ

$$X - Z = A \text{ หรือ } Y - Z = B \text{ ----- (1)}$$

$$\frac{A}{B} = C \text{ ----- (2)}$$

จากนั้นคำนวณค่า E ซึ่งเป็นค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของกลุ่มการทดลองที่ปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ ดังสมการที่ 3

Ct = ค่าความสัมพันธ์การแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของกลุ่มการทดลอง (กลุ่มที่ถูกปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ หรือเชื้อสาเหตุโรค หรือเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน)

C1 = ค่าความสัมพันธ์การแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของกลุ่มการทดลองควบคุม (กลุ่มที่ไม่ถูกปลูกเชื้อ)

E = ค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของกลุ่มการทดลองที่ปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ

$$\frac{C_t}{C_1} \times 100 = E \text{ ----- (3)}$$

การประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วย RT-PCR จะทำการทดลองซ้ำอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออก (E) ของแต่ละยีน จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองด้วย ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วย Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS 25.0 (IBM Corp.)



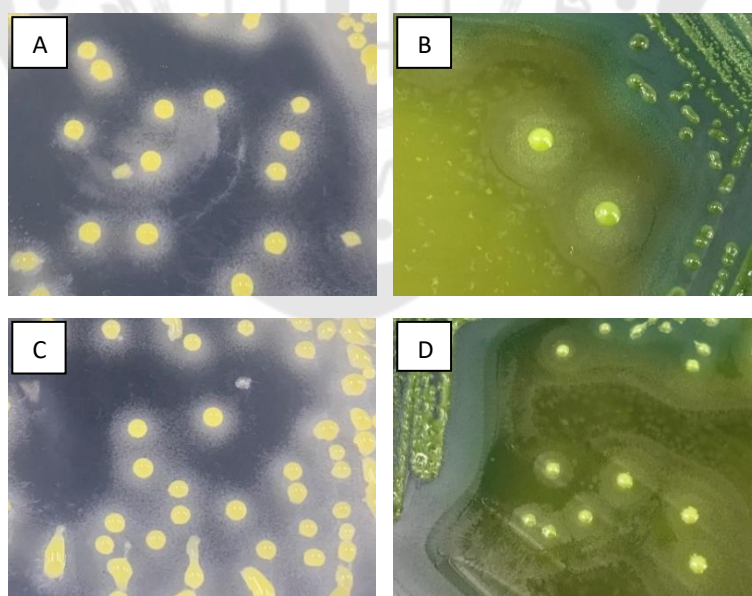
บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

1.1 การคัดแยกเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

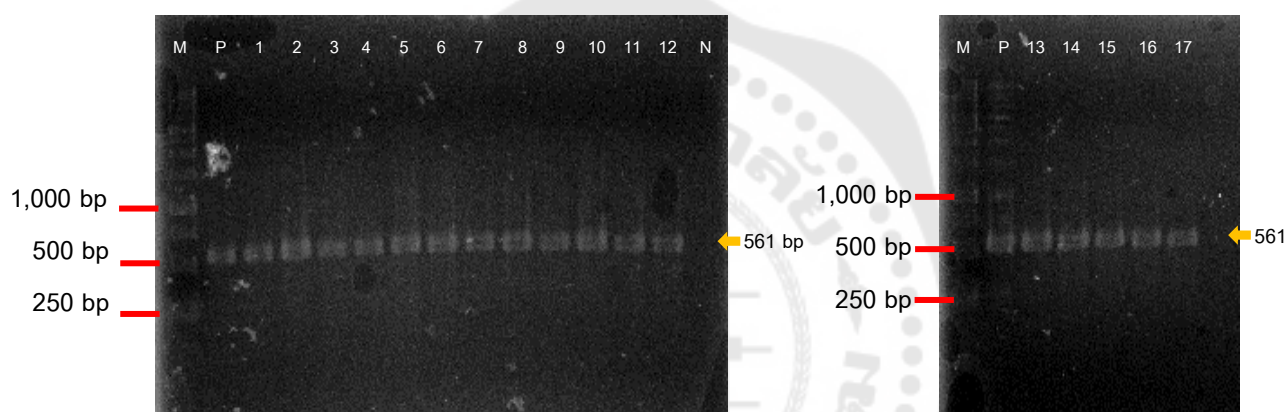
การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* จากใบและกิ่งของมะนาวแป้นที่มีรอยโรคแคงเกอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D สามารถคัดแยกและทำให้เชื้อให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 86 ไอโซเลท โดยโคโลนีที่ถูกคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อน พบตะกอนขาวขุ่นรอบโคโลนีจากการย่อยสลาย Tween 80 (ภาพประกอบ 10A) และโคโลนีที่ถูกคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Xan-D มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลืองอมเขียว พบตะกอนขาวขุ่นรอบโคโลนี และรอบนอกของโคโลนีพบบริเวณใสขนาดใหญ่จากการย่อยสลาย skim milk (ภาพประกอบ 10B) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับโคโลนีของเชื้อ *Xcc*^D ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D ดังภาพประกอบ 10C และ 10D ตามลำดับ เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดจะถูกตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ *Xcc* ต่อไป



ภาพประกอบ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xcc* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mTMB และ Xan-D
 (A) โคโลนีของเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท E05) บนอาหาร mTMB และ (B) Xan-D
 และ (C) โคโลนีของเชื้อ *Xcc*^D บนอาหาร mTMB และ (D) Xan-D

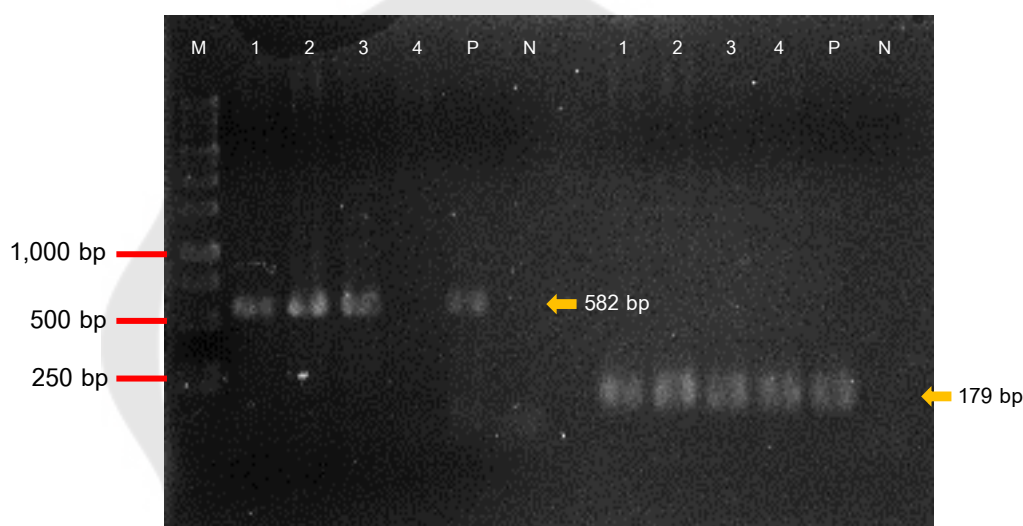
1.2 การตรวจหายีนในจีโนมของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

เชื้อทั้งหมด 86 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ถูกนำมาทำ colony PCR เพื่อตรวจหาบริเวณยีนบนจีโนมของเชื้อ *Xcc* ได้แก่ ยีน *hrpW*, ยีน *rpf* และบริเวณ ITS โดยทำการคัดเลือกเบื่องต้นด้วยไพรเมอร์ XACF/XACR (ตาราง 1) ที่จำเพาะกับบริเวณยีน *hrpW* เป็นอันดับแรก ซึ่งให้ผลผลิตแถบแบนดีเอ็นเอขนาด 561 คู่เบส ผลการทดลองพบว่า 17 ไอโซเลทจาก 86 ไอโซเลท คือไอโซเลท E01-E17 ปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอขนาด 561 คู่เบส และให้ผลเช่นเดียวกับชุดควบคุมเชิงบวกที่เป็นเชื้อ *Xcc*^D ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบยีน *hrpW* ของเชื้อ *Xcc*
โดย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, หมายเลข 1-17 คือเชื้อไอโซเลท E01-E17,
P คือชุดควบคุมเชิงบวกและ N คือชุดควบคุมเชิงลบ

จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบบสุ่มจำนวน 4 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ XACF/XACR คือ ไอโซเลท E02, E05, E08 และ E15 เพื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์อีก 2 คู่ คือ Xac01/Xac02 และ *J-Rxg/J-Rxc2* (ตาราง 1) ที่จำเพาะกับยีน *rpf* และบริเวณ ITS ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตแถบแบนดิเอ็นเอขนาด 582 คู่เบสและ 179 คู่เบส ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท E02, E05 และ E08 เกิดแถบแบนดิเอ็นเอทั้งสองขนาดและให้ผลเช่นเดียวกับชุดควบคุมเชิงบวก ส่วนไอโซเลท E15 เกิดแถบแบนดิเอ็นเอขนาด 179 คู่เบสเท่านั้น แต่ไม่เกิดแถบแบนดิเอ็นเอขนาด 582 คู่เบส ดังแสดงในภาพประกอบ 12



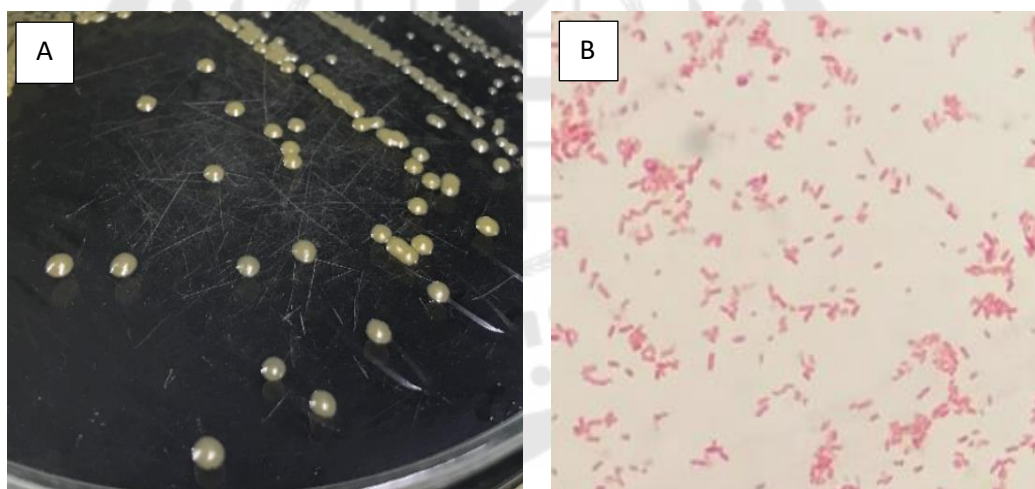
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบยีน *rpf* และบริเวณ ITS ของเชื้อ *Xcc* โดย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, หมายเลข 1-4 คือเชื้อไอโซเลท E02, E05, E08 และ E15 ตามลำดับ, P คือชุดควบคุมเชิงบวกและ N คือชุดควบคุมเชิงลบ

1.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

โคโลนีของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท E02, E05, E08 และ E15 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มีลักษณะกลมขนาดเล็ก มันวาว และมีสีเหลืองอ่อน (ภาพประกอบ 13A) และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีการจัดเรียงตัวแบบกระจายเดี่ยว (ภาพประกอบ 13B)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลท E02, E05, E08 และ E15 โดยเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยคำสั่ง BLASTN พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทมีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) เท่ากับ 100 กับเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สายพันธุ์ Aw12879 (accession No. CP003778.1)

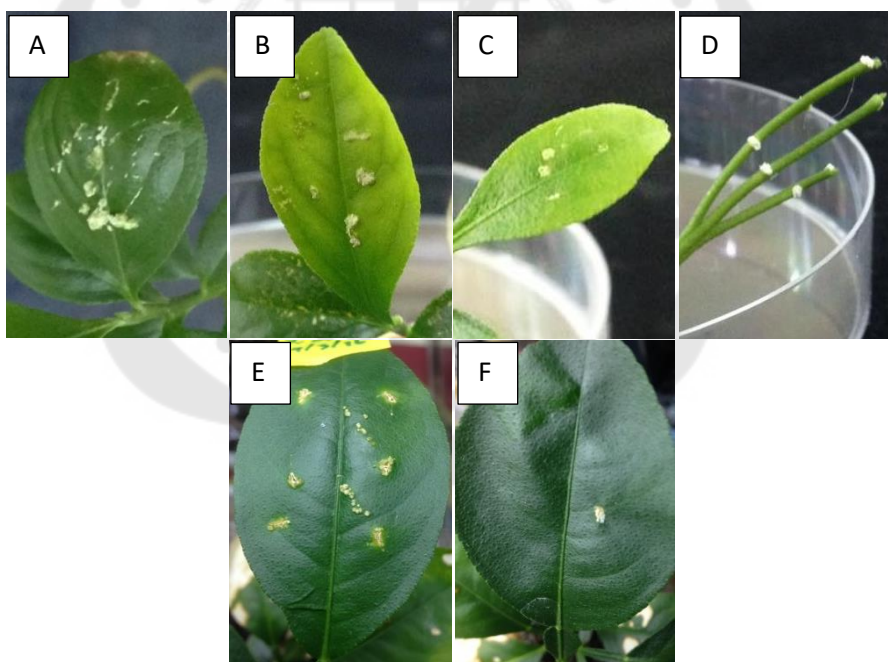
จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*



ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไอโซเลท E02, E05, E08 และ E15
(A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ (B) รูปร่างและการย้อมติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์
กำลังขยาย 1,000 เท่า

1.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคแคงเกอร์

หลังจากการปลูกเชื้อบริสุทธิ์ *Xcc* E02, E05, E08 และ E15 ลงบนใบของมะนาว เป็นเป็นเวลา 30 วันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าบริเวณรอยแผลที่ถูกปลูกเชื้อ E02, E05 และ E08 เกิดสะเก็ดหนูนฟูสีขาว บางส่วนเป็นสีน้ำตาลดังภาพประกอบ 14A, 14B และ 14C ตามลำดับ ซึ่งเป็นอาการของโรคแคแคงเกอร์และรอยแผลดังกล่าวยังมีลักษณะเช่นเดียวกับชุดควบคุมเชิงบวกที่ปลูกด้วยเชื้อ *Xcc*^D (ภาพประกอบ 14E) สำหรับต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ E15 มีอาการใบร่วงและเกิดสะเก็ดหนูนฟูสีขาวบริเวณที่ใบร่วง (ภาพประกอบ 14D) สำหรับชุดควบคุมเชิงลบที่ถูกปลูกด้วยน้ำปลอดเชื้อบริเวณบางส่วนไม่เกิดรอยแผลใด ๆ และบางส่วนเกิดรอยแผลเนื้อเยื่อตายลักษณะเรียบแบน (ภาพประกอบ 14F) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Xcc* E02, E05, E08 และ E15 ที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้เป็นเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคแคแคงเกอร์ในมะนาวได้จริง รวมถึงเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย ณ ปัจจุบัน



ภาพประกอบ 14 ลักษณะอาการของใบมะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *Xcc* เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคแคแคงเกอร์เป็นเวลา 30 วันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(A) เชื้อ *Xcc* E02, (B) เชื้อ *Xcc* E05, (C) เชื้อ *Xcc* E08, (D) เชื้อ *Xcc* E15, (E) ชุดควบคุมเชิงบวก และ (F) ชุดควบคุมเชิงลบ

2. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

เชื้อแบคทีเรียจำนวน 55 ไอโซเลทถูกคัดแยกจากใบและกิ่งของมะนาวแป้นที่มีรอยโรคและปราศจากรอยโรคแคงเกอร์ จากผลการทำ dual-culture plate เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Xcc* 2 สายพันธุ์คือ *Xcc*^D และ *Xcc* E05 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้เอง (*Xcc*⁰⁵) ซึ่งสุ่มเลือกจากผลการทดลองในหัวข้อก่อนหน้า พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมด 20 ไอโซเลทจาก 55 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งหรือแย่งพื้นที่การเจริญของเชื้อ *Xcc*^D ได้ ตาราง 24 แสดงเชื้อปฏิปักษ์จำนวน 8 ไอโซเลทที่เกิดบริเวณยับยั้งสมบูรณ์ต่อเชื้อ *Xcc*^D โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไอโซเลท SWUA08 และ SWUC02 โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมีขนาด 30 ± 0.58 มิลลิเมตร และ 20 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลทพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมีค่าต่ำกว่าการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Xcc*^D โดยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อไอโซเลท SWUA08 และ SWUC02 มีขนาด 18 ± 0 มิลลิเมตรและ 11 ± 1.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีเพียง 4 ชนิดที่ยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ได้อย่างสมบูรณ์ ได้แก่ เชื้อไอโซเลท SWUC02, SWUA08, SWUA18 และ SWUA26 เนื่องจากบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ชนิดไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SWUC04, SWUC08 และ SWUC14 เกิดบริเวณยับยั้งไม่สมบูรณ์ โดยบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทยังคงพบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Xcc*⁰⁵ แต่มีปริมาณน้อยกว่าบริเวณอื่น ๆ จึงเรียกได้ว่าการยับยั้งเพียงบางส่วนหรือการยับยั้งแบบไม่สมบูรณ์ และสำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SWUA23 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ได้เลย โดยไม่เกิดบริเวณยับยั้งขึ้นซึ่งแตกต่างจากการทดสอบกับเชื้อ *Xcc*^D อย่างชัดเจน

ตาราง 24 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ Xcc^D และ Xcc^{05} ของเชื้อปฏิบัติ

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	Xcc^D	Xcc^{05}
SWUC02	20 ± 0.58	11 ± 1.15
SWUC04	11 ± 1.15	+/-
SWUC08	11 ± 1.73	+/-
SWUC14	12 ± 3.06	+/-
SWUA08	30 ± 0.58	18 ± 0
SWUA18	13 ± 2.65	10 ± 2.00
SWUA23	2 ± 1.15	-
SWUA26	6 ± 1.00	4 ± 0

+/- หมายถึง บริเวณยับยั้งไม่สมบูรณ์ และ - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

3. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เชื้อแบคทีเรียปฏิบัติทั้ง 8 ไอโซเลทมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอย่างน้อย 2 ประการ ได้แก่ ความสามารถในการผลิตซิเดอรโอโพรและการผลิตฮอร์โมนพืช IAA โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติที่มีคุณสมบัติหลากหลายมากที่สุดคือ เชื้อไอโซเลท SWUC02 ซึ่งมีคุณสมบัติครบทั้ง 6 ประการที่ถูกทดสอบดังแสดงในตาราง 25 ซึ่งเป็นเพียงไอโซเลทเดียวที่พบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ และนอกเหนือจากนี้ยังสามารถละลายธาตุฟอสฟอรัสได้มากกว่าเชื้อปฏิบัติไอโซเลทอื่น ๆ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไลบนอาหารทดสอบ PVK มีขนาด 23 ± 1.00 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติไอโซเลทที่มีคุณสมบัติที่ด้อยลงมา ได้แก่ SWUA23, SWUA08, SWUA18 และ SWUA26 ตามลำดับ โดยเชื้อปฏิบัติไอโซเลท SWUA08 และ SWUA18 สามารถผลิตซิเดอรโอโพรได้อย่างมีประสิทธิภาพบนอาหารทดสอบ CAS ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณฮาโลเท่ากับ 10 ± 0 และ 9 ± 1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เชื้อปฏิบัติที่มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็น PGPB ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค Xcc^D และ Xcc^{05} คือ ไอโซเลท SWUC02,

SWUA08, SWUA18 และ SWUA26 ดังนั้นจึงถูกเลือกไปทำการจัดจำแนกชนิดต่อไป สำหรับไอโซเลท SWUA23 มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นเชื้อ PGPB แต่ไม่ถูกเลือกไปศึกษาต่อเนื่องจากไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ได้จากผลการทำ dual-culture plate เช่นเดียวกับเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท SWUC04, SWUC08 และ SWUC14 ที่ยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ได้อย่างไม่สมบูรณ์

ตาราง 25 การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อปฏิปักษ์

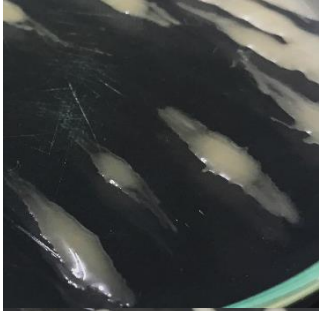
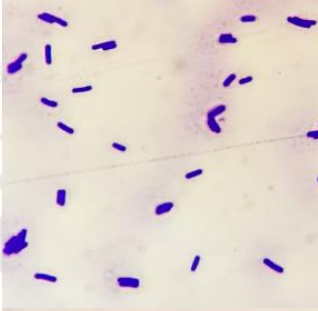
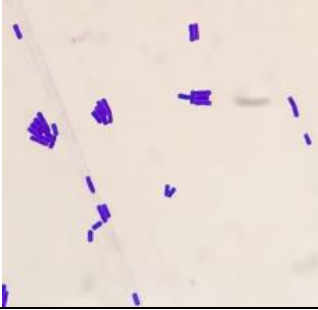
ไอโซเลท	การผลิต				การละลายธาตุ	การตรึงก๊าซไนโตรเจน
	ไฮโดรเจนไซยาไนด์	ซิเดอร์โฟร (มิลลิเมตร)	IAA	ACC deaminase	ฟอสฟอรัส (มิลลิเมตร)	
SWUC02	+	2 ± 0	+	+	23 ± 1.00	+
SWUC04	-	2 ± 0	+	-	-	-
SWUC08	-	2 ± 0	+	-	-	-
SWUC14	-	2 ± 0	+	-	-	-
SWUA08	-	10 ± 0	+	-	14 ± 1.00	-
SWUA18	-	9 ± 1.00	+	-	5 ± 1.00	-
SWUA23	-	3 ± 0.58	+	+	4 ± 0	+
SWUA26	-	2 ± 0.58	+	-	4 ± 0.58	-

+ และ - หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์มีและไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว ตามลำดับ

4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SWUC02, SWUA08, SWUA18 และ SWUA26 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าเชื้อไอโซเลท SWUC02 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเชื้อไอโซเลท SWUA08, SWUA18 และ SWUA26 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ดังแสดงในตาราง 26

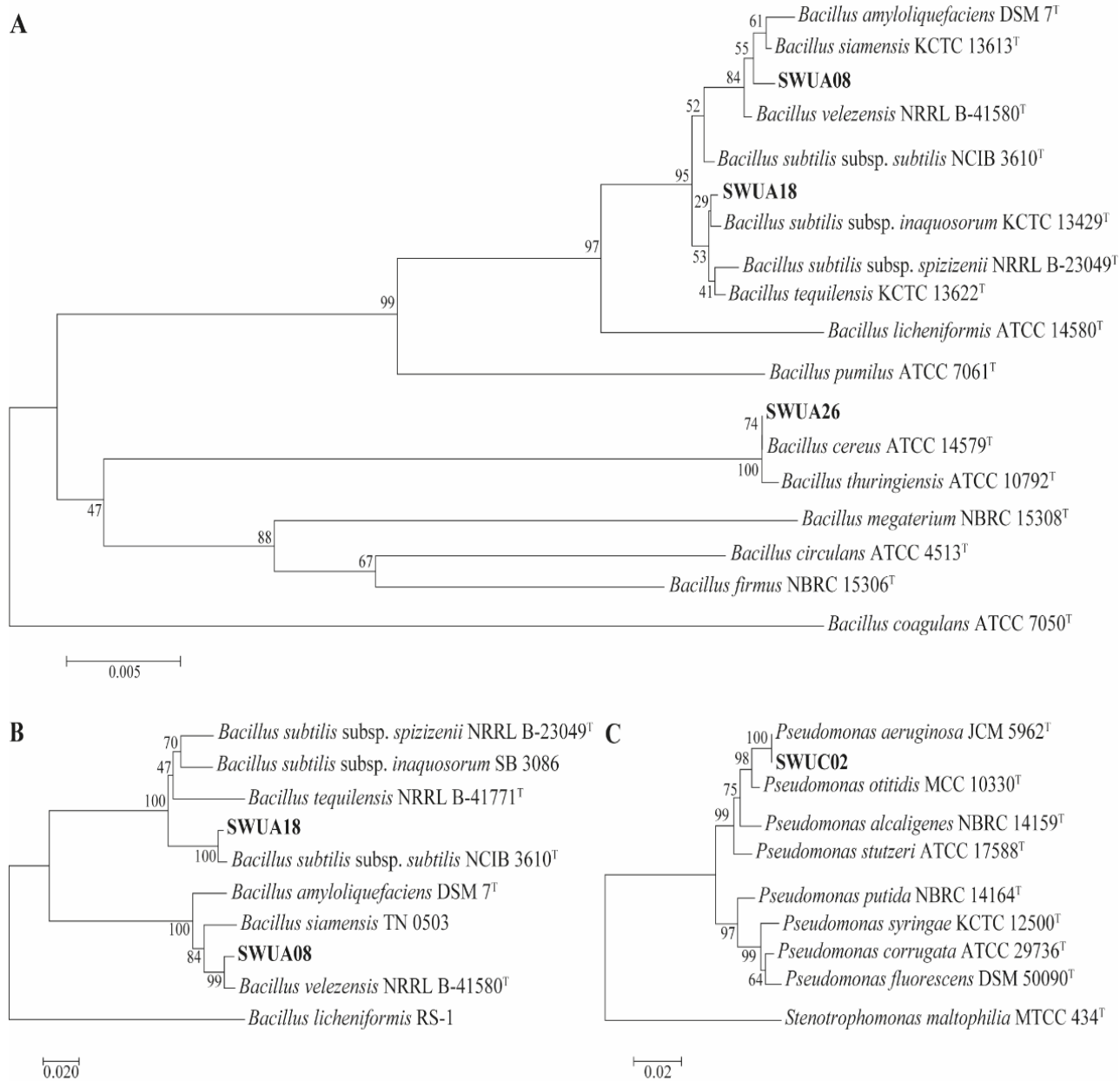
ตาราง 26 ลักษณะโคโลนี รูปร่างและการย้อมติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ไอโซเลต	ภาพโคโลนี	ภาพรูปร่างและสีแกรม	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
SWUCO2			- โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ ขนาดเล็ก - ย้อมติดสีแกรมลบ ท่อนสั้น กระจายแบบเดี่ยว
SWUA08			- โคโลนีสีขาวครีม ชุ่ม รูปร่างไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ มีเมือกเยิ้มเล็กน้อย - ย้อมติดสีแกรมบวก ท่อนยาว กระจายแบบเดี่ยว
SWUA18			- โคโลนีสีขาวครีม ชุ่ม รูปร่างไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ มีเมือกเยิ้มมาก - ย้อมติดสีแกรมบวก ท่อนยาว กระจายแบบเดี่ยว
SWUA26			- โคโลนีสีขาว ชุ่ม รูปร่างกลม ชุ่ม ขอบเรียบ - ย้อมติดสีแกรมบวก เป็นท่อน กระจายแบบเดี่ยว

จากผลการวิเคราะห์และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีเพียงเชื้อไอโซเลท SWUC02 และ SWUA26 ที่สามารถถูกจัดจำแนกชนิดด้วยบริเวณยีน 16S rRNA ได้ โดยเชื้อไอโซเลท SWUC02 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับเชื้อ *P. aeruginosa* JCM 5962^T (accession No. LC069033.1) และเชื้อไอโซเลท SWUA26 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.71 กับ *B. cereus* ATCC 14579^T (accession No. AE016877.1) ในขณะที่ไอโซเลท SWUA08 และ SWUA18 สามารถจัดจำแนกได้เพียงว่าเป็นเชื้อในสกุล *Bacillus* เท่านั้น โดยเชื้อไอโซเลท SWUA08 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.85 กับเชื้อ *Bacillus velezensis* NRRL B-41580^T (accession No. KY694464.1) และ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T (accession No. KT781674.1) และเชื้อไอโซเลท SWUA18 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.93 กับเชื้อ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T (accession No. KT989848.1) และ *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T (accession No. AYTO01000043) และมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 98.85 กับเชื้อ *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610^T (accession No. MK559753.1) เนื่องจากเหตุผลนี้จึงจำเป็นต้องใช้บริเวณยีน *gyrase A* เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกชนิด

จากผลการวิเคราะห์และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *gyrase A* ของเชื้อไอโซเลท SWUA08 พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 98.88 กับเชื้อ *B. velezensis* NRRL B-41580^T (accession No. EU138622.1) ในขณะที่มีค่าร้อยละความเหมือนกับเชื้อ *B. siamensis* TN 0503 (accession No. KY777250.1) เพียงร้อยละ 96.64 เท่านั้น สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท SWUA18 พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.12 กับเชื้อ *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610^T (accession No. EF134425.1) แต่เมื่อเทียบกับบริเวณดังกล่าวของเชื้อ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* SB 3086 (accession No. GU724986.1) และ *B. tequilensis* NRRL B-41771^T (accession No. EU138625.1) พบว่ามีค่าร้อยละที่ต่ำกว่าคือเท่ากับ 94.93 และ 93.05 ตามลำดับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 บริเวณถูกนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยภาพประกอบ 15A แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อปฏิภักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท และภาพประกอบ 15C แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณยีน *gyrase A* ของเชื้อไอโซเลท SWUA08 และ SWUA18 แสดงดังภาพประกอบ 15B



ภาพประกอบ 15 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณยีน 16S rRNA และยีน gyrase A gene ด้วยวิธี neighbor-joining

(A) บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลท SWUA08, SWUA18 และ SWUA26; (B) บริเวณยีน gyrase A ของไอโซเลท SWUA08 และ SWUA18 และ (C) บริเวณยีน 16S rRNA ของ SWUC02

5. การตรวจสอบการผลิตสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ผลการทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ชนิด โดยเชื้อปฏิปักษ์แต่ละชนิดถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมหรือไม่เติม 0.01% CuCl_2 เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ Xcc^{05} ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Xcc^{05} ทั้งในสภาวะที่มีการเติมและไม่มีการเติม 0.01% CuCl_2 ในขณะที่เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Xcc^{05} ได้เฉพาะการเลี้ยงในสภาวะที่เติม 0.01% CuCl_2 เท่านั้น สำหรับเชื้อ *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 และ *B. cereus* SWUA26 ไม่พบการสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Xcc^{05}

ตาราง 27 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	Xcc^{05}	$Xcc^{05} *$
SWUC02	-	23 ± 0
SWUA08	16 ± 0.47	18 ± 0.29
SWUA18	-	-
SWUA26	-	-

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง และ * หมายถึง น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลว TSB ที่เติม 0.01% CuCl_2

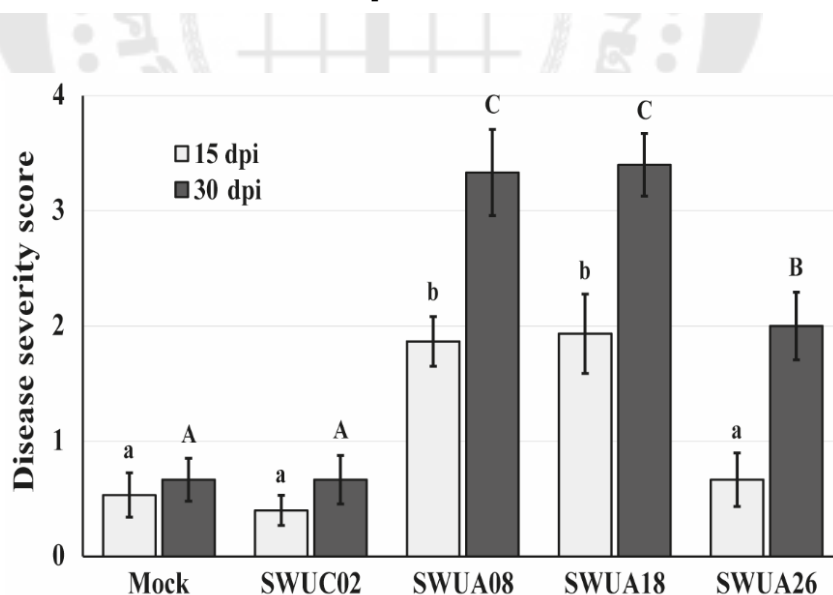
6. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้น

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* SWUC02, *B. velezensis* SWUA08, *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 และ *B. cereus* SWUA26 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ Xcc^D และ Xcc^{05} รวมทั้งมีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชถูกคัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในต้นมะนาวแป้นที่ปลูกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพธรรมชาติจริง

6.1 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6.1.1 การประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ในการอยู่ร่วมกันกับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์แต่ละชนิดลงบนใบของต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อทดสอบผลของการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์และต้นกล้ามะนาวเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วัน พบว่าการปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อต้นกล้ามะนาวแป้น ซึ่งมีคะแนนความรุนแรงของโรคเทียบเท่ากับชุดควบคุมเชิงลบหรือ mock ซึ่งไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ ที่ 15 และ 30 วัน เช่นเดียวกับการปลูกเชื้อ *B. cereus* SWUA26 ที่ 15 วัน แต่ในทางตรงกันข้ามที่ 30 วันของการปลูกเชื้อ *B. cereus* SWUA26 มีผลเพิ่มคะแนนความรุนแรงของโรคมากขึ้น โดยพบอาการใบเหลืองซีด เนื้อเยื่อตายและใบร่วง สำหรับการปลูกเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 และ *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 พบอาการใบร่วง ใบเหลืองและเนื้อเยื่อตาย ตั้งแต่ 15 วันหลังจากการปลูกเชื้อ และมีผลทำให้ต้นกล้ามะนาวแป้นตายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ดังภาพประกอบ 16

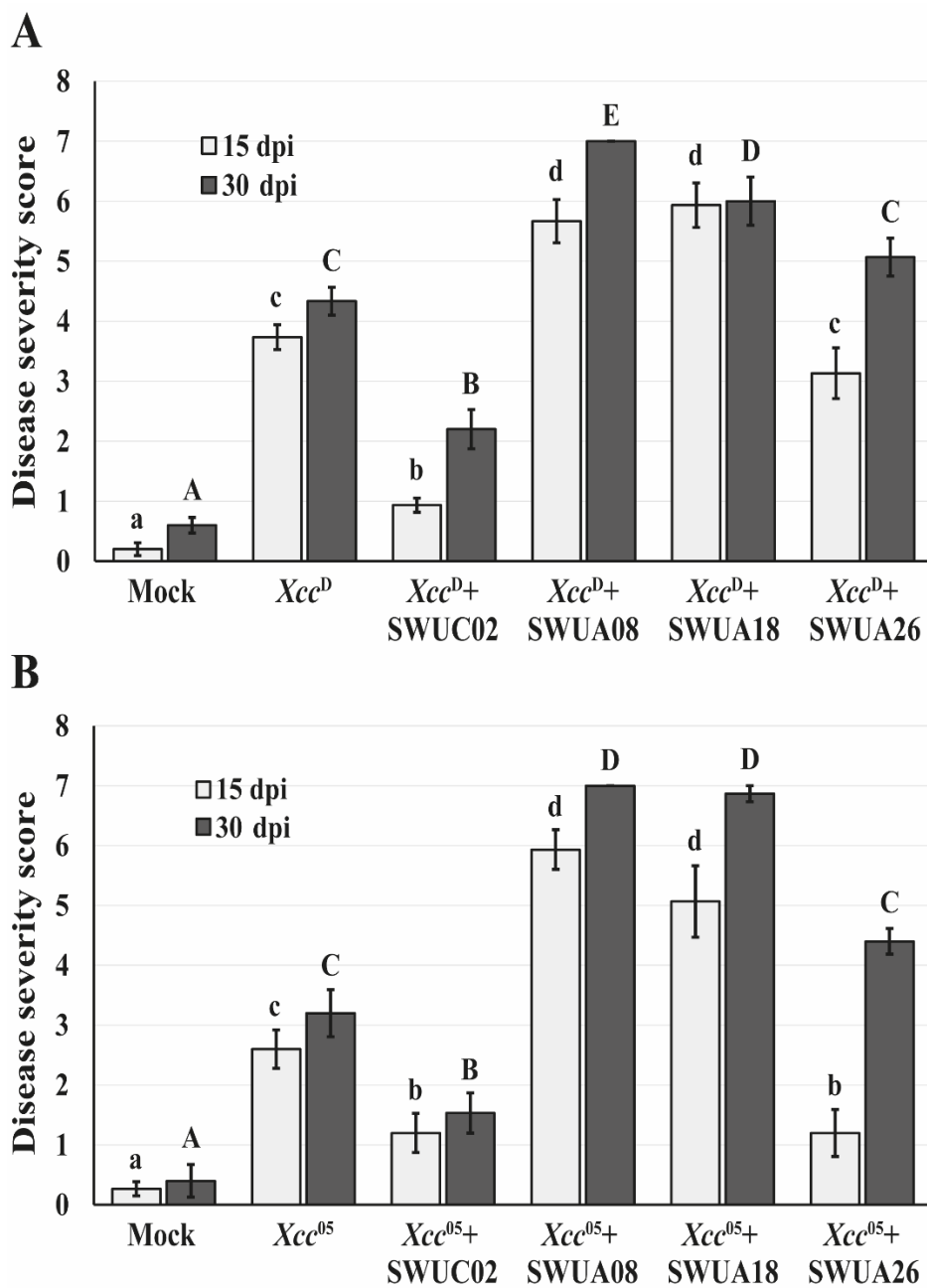


ภาพประกอบ 16 คะแนนความรุนแรงของโรคในการประเมินผลการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์กับต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 15 (เทา) และ 30 วัน (ดำ) โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน; mock = ชุดควบคุมเชิงลบที่ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ; dpi = day post inoculation

6.1.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นกล่ำมะนาวในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อปฏิชีวนะแต่ละชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Xcc*^D และ *Xcc*⁰⁵ ในต้นกล่ำมะนาวแป้นที่ปลูกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อลดการเกิดโรคแคงเกอร์ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถยับยั้งการเกิดอาการของโรคแคงเกอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยลดคะแนนความรุนแรงของโรคลงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกที่ปลูกด้วยเชื้อ *Xcc* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังภาพประกอบ 17A และ 17B ส่วนเชื้อ *B. cereus* SWUA26 ที่ 30 วันหลังจากการปลูกเชื้อมีคะแนนความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกับชุดควบคุมเชิงบวก นอกเหนือจากนี้การปลูกเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 และ *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 ที่ 15 และ 30 วัน ส่งผลให้ต้นกล่ำมะนาวแป้นตายลง และมีคะแนนความรุนแรงของโรคสูงมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลจากการประเมินนี้สอดคล้องกับผลการประเมินการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะกับต้นกล่ำมะนาวแป้น

โดยเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ถูกเลือกไปศึกษาการควบคุมโรคแคงเกอร์ต่อในสภาพธรรมชาติจริง เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพการเจริญเติบโตของต้นกล่ำมะนาวแป้น และมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ และเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ถูกเลือกไปทดสอบในสภาพธรรมชาติจริงเช่นกัน เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวยังสามารถสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* ได้ จึงนำทั้งตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการใช้เป็นตัวควบคุมโรคแคงเกอร์



ภาพประกอบ 17 คะแนนความรุนแรงของโรคในการประเมินผลของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรค
 แดงเกอร์ในต้นกล่ำมะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 15 (เทา) และ 30 วัน (ดำ)
 (A) เชื้อ *Xcc^D* และ (B) เชื้อ *Xcc^{O5}* โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน; mock
 = ชุดควบคุมเชิงลบที่ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ; dpi = day post inoculation

6.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริง

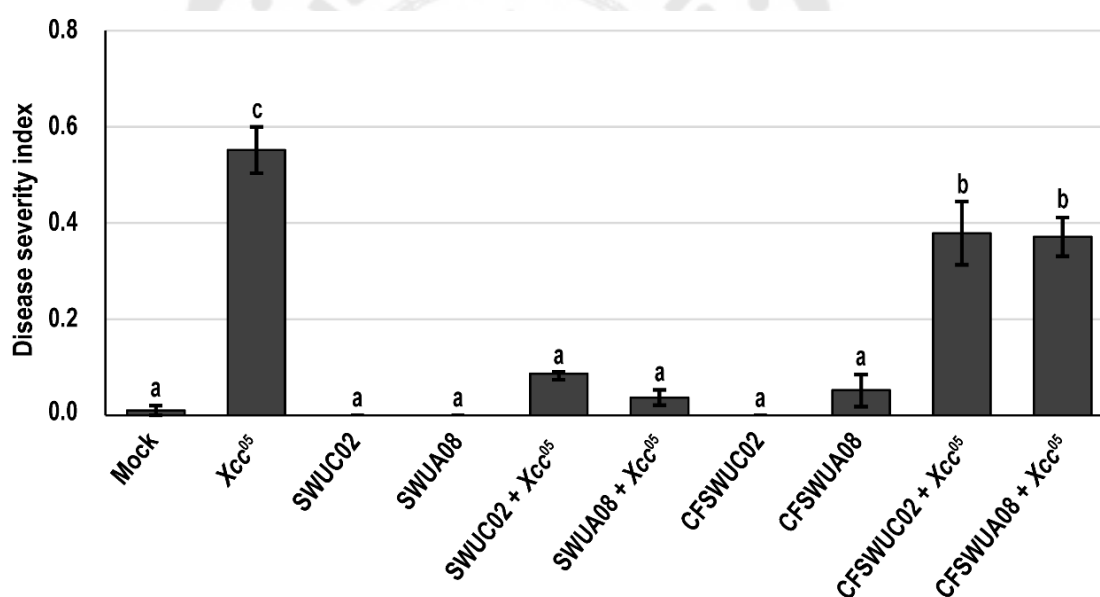
จากผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อปฏิชีวนะ *P. aeruginosa* SWUC02 และ *B. velezensis* SWUA08 รวมทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดที่มีการเติม 0.01% CuCl_2 ในการยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ในต้นมะนาวแป้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติจริง เพื่อลดการเกิดโรคแคงเกอร์แสดงภาพประกอบ 18 พบว่าใบมะนาวแป้นที่ถูกปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (ภาพประกอบ 19E และ 19M) และเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 (ภาพประกอบ 19F และ 19N) ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่าร้อยละของประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเท่ากับ 84 และ 93 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบมะนาวแป้นในชุดควบคุมเชิงบวกที่ถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เพียงอย่างเดียว (ภาพประกอบ 19B และ 19L) ซึ่งลดดัชนีความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้เทียบเท่ากับใบมะนาวแป้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ (ภาพประกอบ 19A และ 19K) ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

นอกเหนือจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดยังสามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพได้เช่นเดียวกัน โดยใบมะนาวแป้นที่ถูกปลูกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (ภาพประกอบ 19I และ 19O) และน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 (ภาพประกอบ 19J และ 19P) ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่าร้อยละของประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเท่ากับ 31 และ 33 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบมะนาวแป้นที่ถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เพียงอย่างเดียว (ภาพประกอบ 19B และ 19L) แต่ประสิทธิภาพในการลดดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าการใช้ตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะดังแสดงในภาพประกอบ 18

จากผลการประเมินในสภาพธรรมชาติจริงพบว่าต้นมะนาวแป้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อในใด ๆ และต้นที่ถูกปลูกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 เพียงอย่างเดียวมีอาการของโรคแคงเกอร์เกิดขึ้น ซึ่งมีดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 0.01 และ 0.05 ตามลำดับ เนื่องจากต้นมะนาวถูกปลูกอยู่ในสภาพจริง และอาจเนื่องจากการติดเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์มาก่อนหน้า (ภาพประกอบ 18) สำหรับการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. aeruginosa* SWUC02 (ภาพประกอบ 19C) หรือ *B. velezensis* SWUA08 (ภาพประกอบ 19D) เพียงอย่างเดียว รวมทั้งการปลูกน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (ภาพประกอบ 19G) หรือน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 (ภาพประกอบ 19H) ไม่มีผลเสียที่กระทบต่อสภาพต้นมะนาวแป้น โดยต้นมะนาวแป้นจากแต่ละกลุ่มการทดลองมีดัชนีความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกับต้นมะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ (ภาพประกอบ 19A และ 19K) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ผลการ

ประเมินในสภาพธรรมชาติจริงมีความสอดคล้องกับผลการประเมินในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่สำหรับผลการประเมินของเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ในสภาพธรรมชาติจริง พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในต้นมะนาวแป้นได้ดีเทียบเท่ากับเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ซึ่งแตกต่างกับผลการประเมินในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีผลทำให้ต้นกล่อมะนาวแป้นตายภายใน 30 วันหลังจากการปลูกเชื้อ

ดังนั้นจากผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัักษ์และน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัักษ์ในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคแคงเกอร์ทางชีวภาพในสภาพธรรมชาติจริงพบว่าตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัักษ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพได้จริงในสภาพธรรมชาติจริง แต่การใช้ตัวเซลล์สามารถลดดัชนีความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้ดีมากกว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัักษ์ดังกล่าว

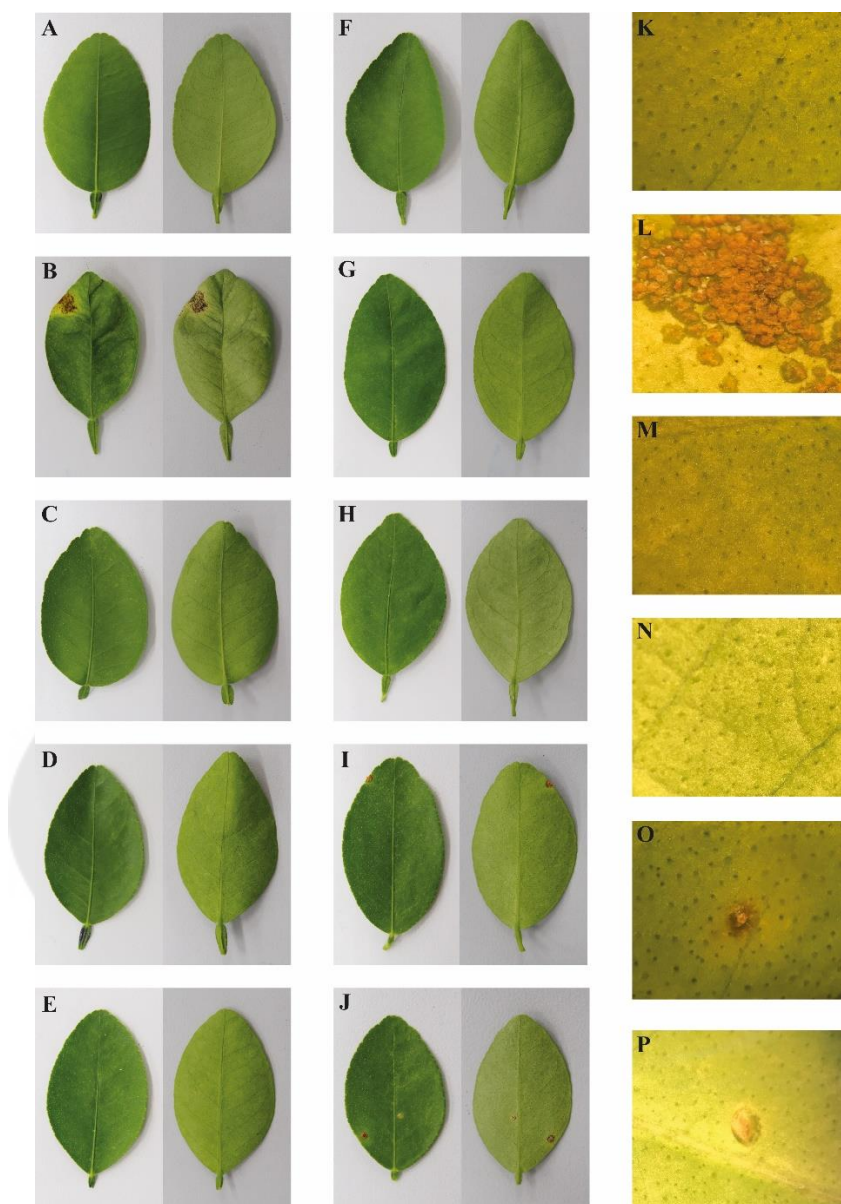


ภาพประกอบ 18 ดัชนีความรุนแรงของโรคในการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัักษ์

ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้นในสภาพธรรมชาติจริงที่ 30 วัน

โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, mock = ชุดควบคุมเชิงลบ

ที่ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ



ภาพประกอบ 19 ใบมะนาวแป้นในการประเมินผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการยับยั้ง

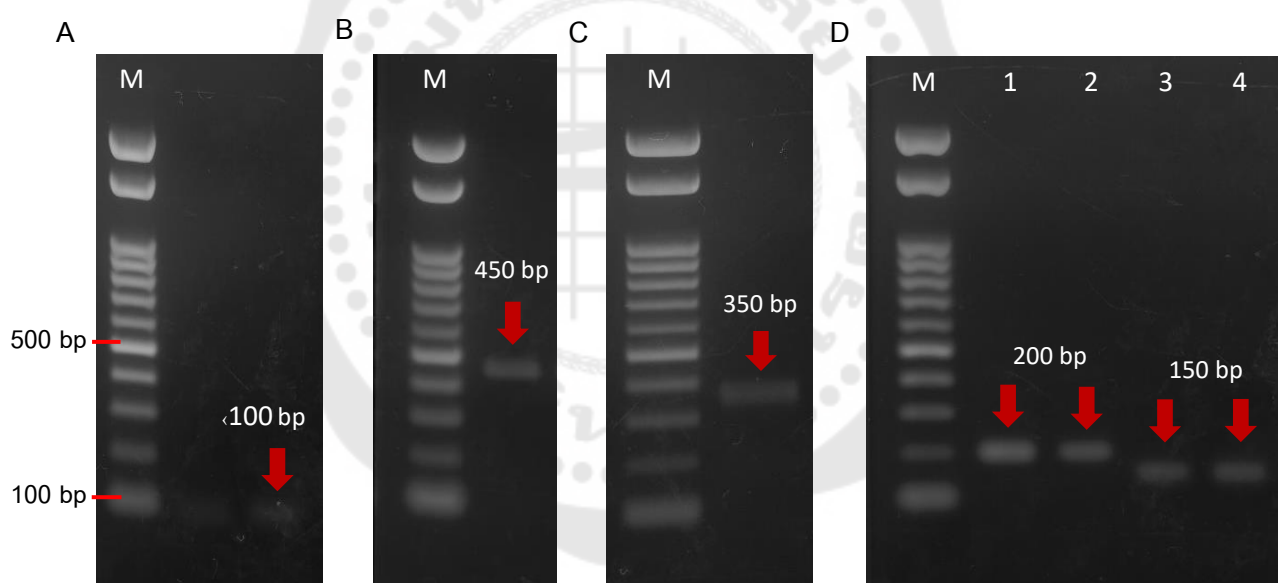
โรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้นในสภาพธรรมชาติจริงที่ 30 วัน

(A) ใบมะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ หรือ mock; (B) Xcc^{05} ; (C) SWUC02; (D) SWUA08; (E) SWUC02 + Xcc^{05} ; (F) SWUA08 + Xcc^{05} ; (G) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWUC02; (H) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWA08; (I) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWUC02 + Xcc^{05} ; (J) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWUA08 + Xcc^{05} ; ภาพได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอของ (K) ใบมะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ หรือ mock; (L) Xcc^{05} (M) SWUC02 + Xcc^{05} (N) SWUA08 + Xcc^{05} (O) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWUC02 + Xcc^{05} และ (P) น้ำเลี้ยงเชื้อ SWUA08 + Xcc^{05}

7. การตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้น

7.1 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น

การโคลนยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8*, *LOX* และยีนเปรียบเทียบ *Ef-1a* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกดัดแปลงจากพืชตระกูลส้มสายพันธุ์อื่น ๆ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนทั้ง 5 ยีนด้วยวิธี PCR แสดงดังภาพประกอบ 20 พบว่าแต่ละยีนเกิดแถบแบนดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียงขนาดเดียว โดยยีน *PR-1* (ภาพประกอบ 20A), *Pt14* (ภาพประกอบ 20B), *LOX* (ภาพประกอบ 20C), *LRR8* และ *Ef-1a* (ภาพประกอบ 20D) มีขนาดประมาณ <100 คู่เบส, 450 คู่เบส, 350 คู่เบส, 200 คู่เบส และ 150 คู่เบส ตามลำดับ



ภาพประกอบ 20 แถบแบนดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้นด้วยวิธี PCR

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส; (A) ยีน *PR-1* มีขนาดต่ำกว่า 100 คู่เบส; (B) *Pt14* มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส; (C) *LOX* มีขนาดประมาณ 350 คู่เบส และ (D) *LRR8* และ *Ef-1a* ที่มีขนาดประมาณ 200 คู่เบสและ 150 คู่เบส ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของจีนดีเอ็นเอทั้ง 5 ยีน และผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และผลการทำ pairwise alignment เพื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังนี้

7.1.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน PR-1

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ rePR1f/rePR1r มีขนาด 71 คู่เบส แสดงตามลำดับด้านล่าง โดยตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงบริเวณที่จำเพาะกับ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และการทำ pairwise alignment พบว่ายีน PR-1 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับ PREDICTED: *Citrus sinensis* pathogenesis-related protein PR-1 (LOC102623146), transcript variant X2, mRNA ของ *C. sinensis* (ภาพประกอบ 21)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน PR-1 ในการศึกษา

>PR-1_gene of *Citrus aurantifolia*

ACAAACACACATCTCCGAAATGAGCAAATTAATCCTTGCCACCGTCG

GCATTTTGCTGCTGCTCATTTCAA

Sequence 1: PR-1_gene from *Citrus aurantifolia*

Sequence 2: XM_025097265.1 PREDICTED: *Citrus sinensis* pathogenesis-related protein PR-1 (LOC102623146), transcript variant X2, mRNA

PR-1_gene	1	ACAAACACACATCTCCGAAATGAGCAAATTAATCCTTGCCACCGTCGGCA	50
XM_025097265.	110	ACAAACACACATCTCCGAAATGAGCAAATTAATCCTTGCCACCGTCGGCA	159
PR-1_gene	51	TTTTGCTGCTGCTCATTTCAA	71
XM_025097265.	160	TTTTGCTGCTGCTCATTTCAA	180

ภาพประกอบ 21 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน PR-1

โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ rePR1f และ rePR1r ตามลำดับ

7.1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Pt14*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ *rePt14UP/rePt14LW* มีขนาด 426 คู่เบส ดังแสดงตามลำดับด้านล่าง โดยตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้ และตัวอักษรหนาแสดงบริเวณที่จำเพาะกับ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และการทำ pairwise alignment พบว่ายีน *Pt14* มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับ *Citrus aurantiifolia* clone PC2 putative citrus canker resistance protein *Pt14R* gene, partial ของ *C. aurantiifolia* (ภาพประกอบ 22)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Pt14* ในการศึกษาครั้งนี้

>*Pt14*_gene of *Citrus aurantifolia*

GACAATATCTCTTATCAGTTTGATGGTAGTAGCTTCCTTGCCAATGTTA
GAGAAGTTTCTCAGACACGAGGTCTTGTTGCTCTACAAGAACAGCTTGTTTCTGAAATT
TTGCTGGATAAAAAATGTAAAGATATGGGATGTTCATAAAGGATGTCATATGATACGTAG
CAAATTACGTCATAAAAGGGTTCTTCTCGTAATTGATGATGTAGATGAATTTGACCAATT
ACAAGCATTAGCTGGACAGCGTGATTGGTTTGGTTTGGGGAGTAGAATCATTATTACC
AATAGAGATCGACATTTGCTCGTCAGATGTGACGTGGAAGACACATATATGGTCGAGA
AATTGAATTATAACGAAGCTCTTCATCTCTTTTCTTGAAAGCCTTTAGAAAAGGTCATC
CTACAGATGGTTATTTTGAGCTC

Sequence 1: *Pt14* gene from *Citrus aurantifolia*
 Sequence 2: HQ875732.1 *Citrus aurantiifolia* clone PC2 putative citrus canker resistance protein *Pt14R* gene, partial cds

<i>Pt14</i> gene	1	GACAAATATCTCTTATCAGTTTGATGGTAGTAGCTTCCTTGCCCAATGTTAG	50
HQ875732.1	1	GACAAATATCTCTTATCAGTTTGATGGTAGTAGCTTCCTTGCCCAATGTTAG	50
<i>Pt14</i> gene	51	AGAAGTTTCTCAGACACGAGGCTTGTTGCTCTACAAGAACAGCTTGTTT	100
HQ875732.1	51	AGAAGTTTCTCAGACACGAGGCTTGTTGCTCTACAAGAACAGCTTGTTT	100
<i>Pt14</i> gene	101	CTGAAATTTTGCTGGATAAAAAATGTAAGATATGGGATGTTTCATAAAGGA	150
HQ875732.1	101	CTGAAATTTTGCTGGATAAAAAATGTAAGATATGGGATGTTTCATAAAGGA	150
<i>Pt14</i> gene	151	TGTCATATGATACGTAGCAAATTACGTCATAAAAGGGTTCTTCTCGTAAT	200
HQ875732.1	151	TGTCATATGATACGTAGCAAATTACGTCATAAAAGGGTTCTTCTCGTAAT	200
<i>Pt14</i> gene	201	TGATGATGTAGATGAATTTGACCAATTACAAGCATTAGCTGGACAGCGTG	250
HQ875732.1	201	TGATGATGTAGATGAATTTGACCAATTACAAGCATTAGCTGGACAGCGTG	250
<i>Pt14</i> gene	251	ATTGGTTTGTTGGGGAGTAGAATCATTATTACCAATAGAGATCGACAT	300
HQ875732.1	251	ATTGGTTTGTTGGGGAGTAGAATCATTATTACCAATAGAGATCGACAT	300
<i>Pt14</i> gene	301	TTGCTCGTCAGATGTGACGTGGAAGACACATATATGGTCGAGAAAATTGAA	350
HQ875732.1	301	TTGCTCGTCAGATGTGACGTGGAAGACACATATATGGTCGAGAAAATTGAA	350
<i>Pt14</i> gene	351	TTATAACGAAGCTCTTCATCTCTTTTCTTGAAAGCCTTTAGAAAAGGTC	400
HQ875732.1	351	TTATAACGAAGCTCTTCATCTCTTTTCTTGAAAGCCTTTAGAAAAGGTC	400
<i>Pt14</i> gene	401	ATCCTACAGATGCTTATTTTGAGCTC	426
HQ875732.1	401	ATCCTACAGATGCTTATTTTGAGCTC	426

ภาพประกอบ 22 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน *Pt14*

โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์

rePt14UP และ rePt14LW ตามลำดับ

7.1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LRR8*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ *reLRR8f/reLRR8r* มีขนาด 177 คู่เบส แสดงตามลำดับด้านล่าง โดยตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงบริเวณที่จำเพาะกับ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และการทำ pairwise alignment พบว่ายีน *LRR8* มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 97 กับ PREDICTED: *Citrus sinensis* MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like (LOC102627068), transcript variant X2, mRNA ข อ ง *C. sinensis* (ภาพประกอบ 23)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LRR8* ในการศึกษา

>*LRR8*_gene of *Citrus aurantifolia*

TGCACCAGAGCTAGCCTACACAATGAAGGTTACTGAAAAATGCGATG
TGTACAGTTTTGGAGTGTTAGCATTAGAAGTGATCAAAGGGAAGCATCCAAGGGATTTT
CTTTTTGAAATATCATCTTCATCTTCCAATATGAACATAGAAATATTGGACTCTCGGCTT
CCATATCCATC

```
Sequence 1: LRR8_gene from Citrus aurantifolia
Sequence 2: XM_006475281.3 PREDICTED: Citrus sinensis MDIS1-interacting
receptor like kinase 2-like (LOC102627068), transcript variant X2, mRNA

LRR8_gene      1  TGCACCAGAGCTAGCCTACACAATGAAGGTTACTGAAAAATGCGATGTGT      50
                  |||
XM_006475281. 1507 TGCACCAGAGCTAGCCTACACATTGAAGGTTACTGAAAAATGCGATGTGT      1556
                  |||

LRR8_gene      51  ACAGTTTTGGAGTGTTAGCATTAGAAGTGATCAAAGGGAAGCATCCAAGG      100
                  |||
XM_006475281. 1557 ACAGTTTTGGAGTGTTAGCATTAGAAGTTATCAAAGGGAAGCATCCAAGG      1606
                  |||

LRR8_gene      101 GATTTTCCTTTTGAATATCATCTTCATCTTCCAATATGAACATAGAAAT      150
                  |||
XM_006475281. 1607 GATTTTCCTTTTGAATATCATCTTCATCTTCCAATATGAACATAGAAAT      1656
                  |||

LRR8_gene      151 ATTGGACTCTCGGCTTCCATATCCATC      177
                  |||
XM_006475281. 1657 GTTGGACTCTCGGCTTCCATATCCATC      1683
                  |||
```

ภาพประกอบ 23 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน *LRR8*

โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์

reLRR8f และ reLRR8r ตามลำดับ

7.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LOX*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ reLOXf/reLOXr มีขนาด 331 คู่เบส แสดงตามลำดับด้านล่าง โดยตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงบริเวณที่จำเพาะกับ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และการทำ pairwise alignment พบว่ายีน *LOX* มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 62 กับ PREDICTED: *Citrus sinensis* linoleate 13S-lipoxygenase 3-1, chloroplastic-like (LOC102622489), mRNA ของ *C. sinensis* (ภาพประกอบ 24)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LOX* ในการศึกษา

>*LOX*_gene of *Citrus aurantifolia*

GTCGTTCTGGAACCTTGTCGGCACTGACGTTGATCCCAGTAAGTGCTTC
 TGCAGCTTATGCCCACAAATTAATTTTTGTTCTTTAGCCTTTAGCCAAAAGCAGCCATTT
 CCCTTTGGATCTTCGCTCCATATGATTCTCATGGGTTAATTTTTGTCAAATTTGTTATTTA
 TAATTTCTTTTATTCTTATAAAAAGGAACAAAGGGACCAAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTT
 CTGAAGGATTGGTCAAAGAAATCAAATGTTAAGGCTGAAAGGGTCCATTACACGGCTG
 AATTTTTAGTGGACTCAAATTTTGGGACGCCTGGTGCAATCACAG

Sequence 1: LOX_gene from *Citrus aurantifolia*

Sequence 2: XM_006465842.3 PREDICTED: *Citrus sinensis* linoleate 13S-lipoxxygenase 3-1, chloroplastic-like (LOC102622489), mRNA

LOX_gene	1	GTCGTTCTGGAACCTTGTCGGCACTGACGTTGA--TCCCAGTAAGTGCTTC	48
			
XM_006465842.	356	GAAGATTTGGTAAAAGGAGCTGCTTCTCTGCCGTGCCCGGGGCTGCTGA	405
LOX_gene	49	TGCAGCTTATGCCCACAAATTAATTTTTGTTCTTTAGCCTTTAGCCAAA	98
			
XM_006465842.	406	AAAGCCAGTGAAGTTTAAGGTGAGAGCTGTGCTGACGGTGAGGAAGAACA	455
LOX_gene	99	GCA--GCCATTTCCCTTTGGATCTTCG---CTCCATATGATTCTCATGGG	143
			
XM_006465842.	456	TCAAAGAAGATTTCAAAGAGACCCTTGTTAATCAGTTTGATGCTTTAACT	505
LOX_gene	144	TTAATTTTTGTCAAATTTGTTATTTATAATTTCTTTTATTCT-----TAT	188
			
XM_006465842.	506	GAAAAGATTGGCAGAAATGTCGTTCTGGAACCTTGTCGGCACTGAAGTTGA	555
LOX_gene	189	AAAAGGAACAAAGGGACCAAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTTCTGAAGGATT	238
			
XM_006465842.	556	TCCCAGAACAAAGGGACCAAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTTCTGAAGGATT	605
LOX_gene	239	GGTCAAAGAAATCAAATGTTAAGGCTGAAAGGGTCCATTACACGGCTGAA	288
			
XM_006465842.	606	GGTCAAAGAAATCAAATGTTAAGGCTGAAAGGGTCCATTACACGGCTGAA	655
LOX_gene	289	TTTTTAGTGGACTCAAATTTTGGGACGCCTGGTGCAATCACAG	331
			
XM_006465842.	656	TTTTTAGTGGACTCAAATTTTGGGACGCCTGGTGCAATCACAG	698

ภาพประกอบ 24 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน LOX (331 คู่เบส)
 โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์
 reLOXf และ reLOXr ตามลำดับ

ชั้นยีนที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ reLOXf/reLOXr จากจีโนมของมะนาวแป้น (*C. aurantifolia*) มีขนาดยาวถึง 331 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับชั้นยีน LOX ที่ใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันในการเพิ่มจำนวนชั้นยีนจากจีโนมของ *C. sinensis* ซึ่งมีขนาดเพียง 175 คู่เบส (ตำแหน่งเบสที่ 524 ถึง 698 ในภาพประกอบ 24) จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณถัดจากตำแหน่งที่

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LOX* ในการศึกษา

AATTTGTTATTTATAATTTCTTTTATTCTTATAAAAGGAACAAAGGGACC
AAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTTCTGAAGGATTGGTCAAAGAAATCAAATGTTAAGGCT
GAAAGGGTCCATTACACGGCTGAATTTTTAGTGGACTCAAATTTTGGGACGCCTGGTG
CAATCACAG

```

Sequence 1: LOXN_gene from Citrus aurantifolia
Sequence 2: XM_006465842.3 PREDICTED: Citrus sinensis linoleate 13S-
lipoygenase 3-1, chloroplastic-like (LOC102622489), mRNA

LOXN_gene      1  AATTTGTTATTTATAATTC--TTTATCTTATAAAAGGAACAAAGGGA      48
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
XM_006465842.  522 ATGTCGTTCTGGAAGCTGTGCGGCACTGAAGTTGATCCCAGAACAAAGGGA      571

LOXN_gene      49  CCAAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTTCTGAAGGATTGGTCAAAGAAATCAA      98
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
XM_006465842.  572 CCAAAGAAAAGCAGAGAAGCAGTTCTGAAGGATTGGTCAAAGAAATCAA      621

LOXN_gene      99  TGTTAAGGCTGAAAGGGTCCATTACACGGCTGAATTTTAAAGTGGACTCAA      148
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
XM_006465842.  622 TGTTAAGGCTGAAAGGGTCCATTACACGGCTGAATTTTAAAGTGGACTCAA      671

LOXN_gene      149 ATTTTGGGACGCCTGGTGCAATCACAG      175
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
XM_006465842.  672 ATTTTGGGACGCCTGGTGCAATCACAG      698

```

ภาพประกอบ 25 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน LOX (175 คู่เบส)
โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์
nreLOXf และ reLOXr ตามลำดับ

7.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Ef-1a*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ *reEf-1af/reEf-1ar* มีขนาด 133 คู่เบส แสดงตามลำดับด้านล่าง โดยตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงบริเวณที่จำเพาะกับ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และการทำ pairwise alignment พบว่ายีน *Ef-1a* มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับ *Citrus clementina* elongation factor 1-alpha (LOC18035130), mRNA ของ *C. clementina* (ภาพประกอบ 26)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Ef-1a* ในการศึกษานี้

>*Ef-1a*_gene of *Citrus aurantifolia*

ACATGATTACCGGTACCTCACAGGCTGACTGTGCCGTCCTCATCATTG
ACTCCACCACCGGTGGTTTTGAAGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGC
ATGCTTTGCTTGCTTTCACCCTTGGTGT

Sequence 1: *Ef-1a*_gene from *Citrus aurantifolia*

Sequence 2: XM_006424569.2 PREDICTED: *Citrus clementina* elongation factor 1-alpha (LOC18035130), mRNA

<i>Ef-1a</i> _gene	1	ACATGATTACCGGTACCTCACAGGCTGACTGTGCCGTCCTCATCATTGAC	50
XM_006424569.	421	ACATGATTACCGGTACCTCACAGGCTGACTGTGCCGTCCTCATCATTGAC	470
<i>Ef-1a</i> _gene	51	TCCACCACCGGTGGTTTTGAAGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCG	100
XM_006424569.	471	TCCACCACCGGTGGTTTTGAAGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCG	520
<i>Ef-1a</i> _gene	101	TGAGCATGCTTTGCTTGCTTTCACCCTTGGTGT	133
XM_006424569.	521	TGAGCATGCTTTGCTTGCTTTCACCCTTGGTGT	553

ภาพประกอบ 26 การทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน *Ef-1a*

โดยบริเวณตัวอักษรที่ถูกขีดเส้นใต้และตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ *reEf-1af* และ *reEf-1ar* ตามลำดับ

จากผลการทดลองในหัวข้อนี้พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคและยีนเปรียบเทียบกับมะนาวแป้น ได้แก่ ยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8*, *LOX* และ *Ef-1a* มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100, 100, 97, 85 และ 100 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบบริเวณยีนดังกล่าวบนจีโนมของพืชตระกูลส้มอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 28 ดังนั้นจึงสามารถนำบริเวณที่ถูกตรวจสอบ

เหล่านี้ไปใช้ในการประเมินการแสดงออกของยีนในจีโนมของต้นมะนาวแป้นที่ถูกปลูกเชื้อในแต่ละกลุ่มการทดลอง เพื่อตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่เรีบบกษาในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคต่อไป

ตาราง 28 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำ pairwise alignment ของบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคและยีนเปรียบเทียบกับจีโนมของมะนาวแป้น

ยีน	ขนาด (คู่เบส)	สายพันธุ์ส้ม	Accession No.	บริเวณจำเพาะ	ค่าร้อยละ ความเหมือน
<i>PR-1</i>	71	<i>C. sinensis</i>	XM_025097265.1	Pathogenesis-related protein PR-1 gene	100
<i>Pt14</i>	426	<i>C. aurantiifolia</i>	HQ875732.1	Putative citrus canker resistance protein Pt14R gene	100
<i>LRR8</i>	177	<i>C. sinensis</i>	XM_006475281.3	MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like	97
<i>LOX*</i>	331	<i>C. sinensis</i>	XM_006465842.3	Linoleate 13S-lipoxygenase 3-1	62
<i>LOX**</i>	175	<i>C. sinensis</i>	XM_006465842.3	Linoleate 13S-lipoxygenase 3-1	85
<i>Ef-1a</i>	133	<i>C. clementina</i>	XM_006424569.2	Elongation factor 1-alpha	100

* และ ** หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกโคลน ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย reLOXf/reLOXr และ nreLOXf/reLOXr ตามลำดับ

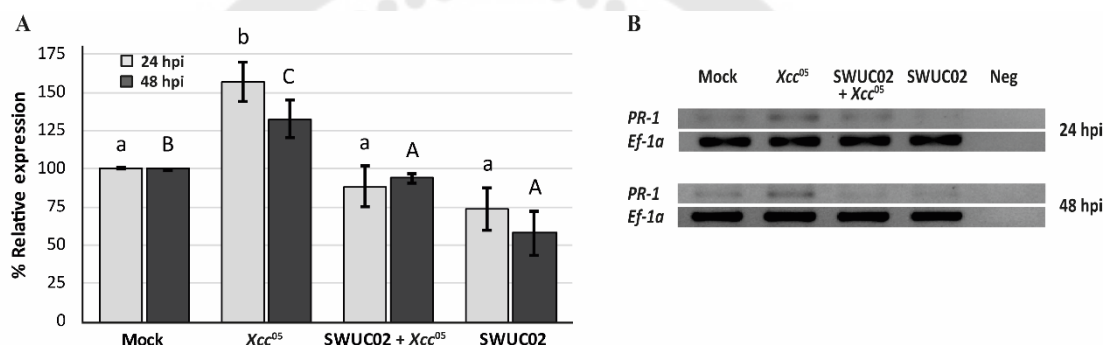
7.2 การประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR)

หลังจากการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะนาวแป้นที่ถูกปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของ 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ ใบมะนาวแป้นที่ถูกทำด้วย (1) อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB, (2) เชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵, (3) เชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 ก่อนทำซ้ำด้วยเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ และ (4) เชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 ดังตาราง 20 ในขั้นตอนการประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นด้วยวิธี RT-PCR ทำการศึกษา ยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8* และ *LOX* ในต้นกล้ามะนาวแป้นโดยมียีน *Ef-1a* เป็นยีนเปรียบเทียบกับ เพื่อตัดปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมได้ยากในสภาพธรรมชาติจริง ยกตัวอย่างเช่น อุณหภูมิ แสงและเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ดังนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 จึงถูกเลือกมาเป็นตัวแทนของเชื้อปฏิปักษ์ทั้งหมด เนื่องจากเชื้อดังกล่าวไม่ส่งผลเสียต่อสภาพของต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



7.2.1 การประเมินการแสดงออกของยีน *PR-1*

จากผลการทำ RT-PCR ของบริเวณยีน *PR-1* พบว่าต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *Xcc*⁰⁵ เพียงอย่างเดียวที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงกว่าต้นกล้ามะนาวในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ อีกทั้งพบว่าต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* ต่ำกว่าต้นกล้ามะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในภาพประกอบ 27 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ามีเพียงเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ

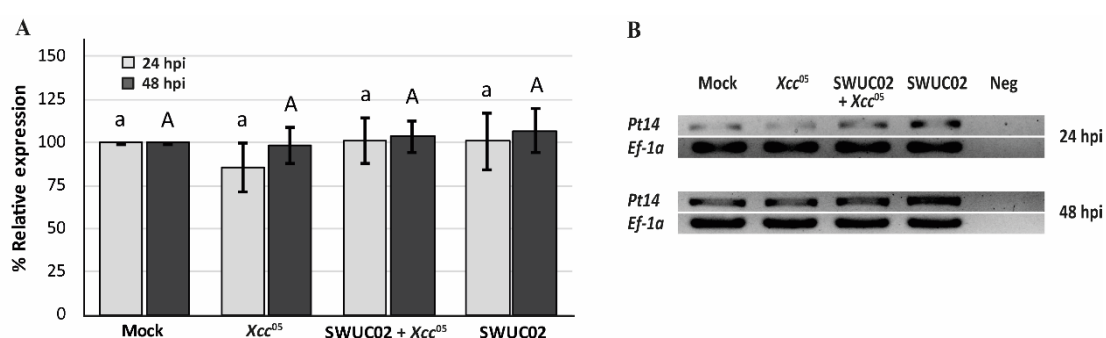


ภาพประกอบ 27 การแสดงออกของยีน *PR-1* ของต้นกล้ามะนาวเป็น

(A) แผนภูมิแท่งแสดงค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่ 24 (เทา) และ 48 (ดำ) ชั่วโมง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ (B) ความเข้มแถบแบน ดีเอ็นเอของยีน *PR-1* และ *Ef-1a* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง; hpi = hour post inoculation

7.2.2 การประเมินการแสดงออกของยีน *Pt14*

จากผลการทำ RT-PCR ของบริเวณยีน *Pt14* พบว่าต้นกล้ามะนาวในแต่ละกลุ่ม การทดลองมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *Pt14* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในภาพประกอบ 28 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้งเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Pt14* ได้ทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ

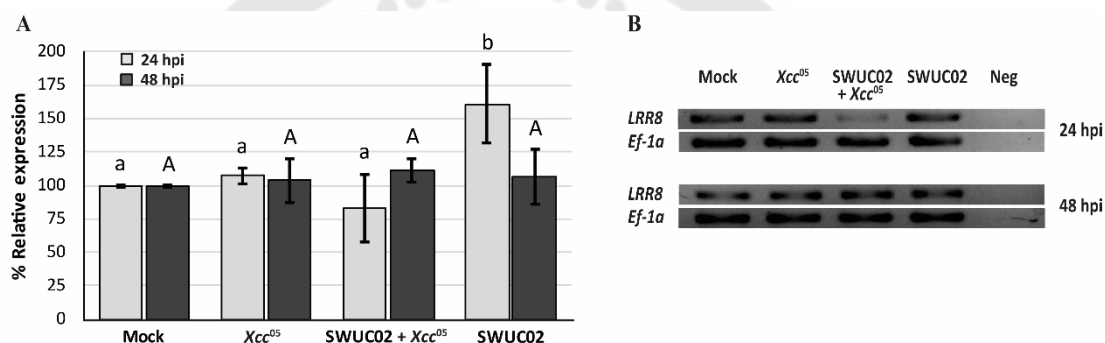


ภาพประกอบ 28 การแสดงออกของยีน *Pt14* ของต้นกล้ามะนาวแป้น

(A) แผนภูมิแท่งแสดงค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *Pt14* ที่ 24 (เทา) และ 48 (ดำ) ชั่วโมง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ (B) ความเข้มแถบแบนดิเอ็นเอของยีน *Pt14* และ *Ef-1a* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง; hpi = hour post inoculation

7.2.3 การประเมินการแสดงออกของยีน *LRR8*

จากผลการทำ RT-PCR ของบริเวณยีน *LRR8* พบว่าต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 เพียงอย่างเดียวที่ 24 ชั่วโมง มีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *LRR8* สูงกว่าต้นกล้ามะนาวในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ สำหรับการแสดงออกของยีน *LRR8* ที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อของแต่ละกลุ่มการทดลองมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในภาพประกอบ 29 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *LRR8* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อ

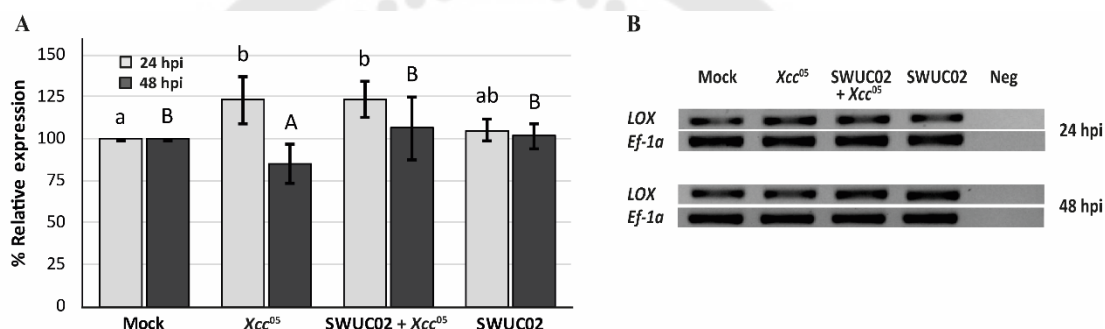


ภาพประกอบ 29 การแสดงออกของยีน *LRR8* ของต้นกล้ามะนาวแป้น

(A) แผนภูมิแท่งแสดงค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *LRR8* ที่ 24 (เทา) และ 48 (ดำ) ชั่วโมง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ (B) ความเข้มแถบแบนดิเอ็นเอของยีน *LRR8* และ *Ef-1a* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง; hpi = hour post inoculation

7.2.4 การประเมินการแสดงออกของยีน LOX

จากผลการทำ RT-PCR ของบริเวณยีน LOX พบว่าต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *Xcc*⁰⁵ เพียงอย่างเดียวและต้นกล้ามะนาวที่ถูกปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ก่อนปลูกเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ที่ 24 ชั่วโมงมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน LOX สูงกว่าต้นกล้ามะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ สำหรับผล RT-PCR ที่ 48 ชั่วโมงพบว่าต้นกล้ามะนาวแต่ละกลุ่มการทดลองมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกเท่ากับหรือต่ำกว่าต้นกล้ามะนาวที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในภาพประกอบ 30 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน LOX ได้ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ



ภาพประกอบ 30 การแสดงออกของยีน LOX ของต้นกล้ามะนาวแป้น

(A) แผนภูมิแท่งแสดงค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน LOX ที่ 24 (เทา) และ 48 (ดำ) ชั่วโมง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ (B) ความเข้มแถบแบนดิเอ็นเอของยีน LOX และ *Ef-1a* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง; hpi = hour post inoculation

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลงานวิจัย

การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* จากมะนาวแป้นที่มีรอยโรคแคงเกอร์จำเป็นต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกของชิ้นส่วนมะนาว เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ที่บนผิวนอกส่วนต่าง ๆ ของพืช และผ่ากลางชิ้นพืชบริเวณรอยโรคแคงเกอร์ก่อนนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก หรือก่อนนำไปเขย่าในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.85% เนื่องจากเชื้อ *Xcc* มักอาศัยและเพิ่มจำนวนอยู่ในรอยโรคมากกว่าบริเวณอื่น ๆ ⁽⁵⁾ อีกทั้งทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งคัดเลือก mTMB และ Xan-D โดยในอาหารทั้ง 2 ชนิดมีการเติมยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก, เชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดและเชื้อรา เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการคัดแยกเชื้อ *Xcc* เนื่องจากเชื้อ *Xcc* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ⁽¹³⁾ จากการคัดแยกเชื้อ *Xcc* ทั้ง 2 วิธี พบว่าการนำชิ้นพืชที่ถูกผ่ากลางรอยโรคไปเขย่าในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% สามารถคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะตามที่ต้องการได้มากกว่า ในขณะที่วิธีการวางชิ้นพืชบนอาหารคัดเลือกอาจแยกเชื้อ *Xcc* ได้ยากมากกว่าเนื่องจากมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นกลบการเจริญของเชื้อ *Xcc* โดยหลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 วัน โคโลนีของเชื้อ *Xcc* จะมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของเชื้อชนิดอื่น ๆ และพบตะกอนขาวขุ่นของกรดไขมันรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งคัดเลือก mTMB และ Xan-D เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* สามารถย่อยสลาย Tween 80 ในอาหารคัดเลือกได้ โดยในจีโนมของเชื้อ *Xcc* มียีน *estA* ที่ถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ *esterase* ซึ่งเร่งกิจกรรมการย่อยสลาย Tween 80 นอกจากนี้บนอาหาร Xan-D พบว่าโคโลนีของเชื้อ *Xcc* เป็นสีเหลืองอมเขียว เนื่องจากการย่อยสลาย Tween 80 มีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น ดังนั้น bromothymol blue ที่เดิมเป็นอินดิเคเตอร์ในอาหารจึงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว และบนอาหาร Xan-D ยังพบบริเวณใสรอบนอกบริเวณขาวขุ่น โดยเกิดจากการย่อยสลาย skim milk ซึ่งเชื้อ *Xcc* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีน casein ที่เป็นองค์ประกอบของ skim milk ในอาหาร Xan-D ได้ ^(19, 20)

การคัดแยกและระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* จำเป็นต้องใช้วิธียืนยันหลายขั้นตอน เนื่องจากอาจเกิดผลบวกที่ผิดพลาด (false positive) กับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มที่ 2 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii*) และกลุ่มที่ 3 (*X. alfalfa* subsp. *citrumelonis*) ที่สามารถคัดแยกได้จากมะนาวเช่นเดียวกัน ⁽¹³⁾ จากผลการคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* จากการตรวจหายีนหรือบริเวณต่าง ๆ บนจีโนมของเชื้อ *Xcc* โดยมีเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*^D (สายพันธุ์ที่ได้รับจากกรมวิชาการ

เกษตร) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทเกิดแถบแบนดีเอ็นเอขนาด 561 คู่เบส จากการทำ colony PCR กับคู่ไพรเมอร์ XACF/XACR แสดงให้เห็นว่าทุกไอโซเลทมียีน *hrpW* ที่ถูกแปลรหัสเป็นโครงสร้างของ type III protein secretion system และเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ pectate lyase ที่เชื้อ *Xcc* ใช้แทงทะลุผ่านและย่อยสลายผนังเซลล์พืช ตามลำดับ⁽²¹⁾ และเมื่อทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *rpf* (ขนาด 582 คู่เบส) ด้วยคู่ไพรเมอร์ Xac01/Xac02 พบว่าทุกไอโซเลทที่สุ่มเลือกมาเกิดแถบแบนดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว ยกเว้นเชื้อไอโซเลท E15 ซึ่งอาจเกิดจากการกลายของบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับจึงไม่เกิดแถบแบนดีเอ็นเอของบริเวณนั้นขึ้น โดยการมีอยู่ของกลุ่มยีน *rpf* แสดงว่าเชื้อไอโซเลทนั้นมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนที่จำเป็นในการก่อโรคแคแคงเกอร์^(13, 92) การตรวจสอบการมีอยู่ของบริเวณ ITS (ขนาด 179 คู่เบส) ด้วยคู่ไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทที่สุ่มเลือกมาเกิดแถบแบนดีเอ็นเอของบริเวณ ITS จึงยืนยันได้ว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทคือ เชื้อสาเหตุโรค *Xcc* สายพันธุ์ A ที่มักก่อโรคในพืชตระกูลส้มและมีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 มีความจำเพาะกับบริเวณ ITS ของเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ A ดังนั้นจากการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอกับทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่ถูกเลือกมาทดสอบจึงยืนยันได้ว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีโอกาสเป็นเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* สายพันธุ์ A และจากผลการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทถูกจัดจำแนกว่าเป็นเชื้อ *Xcc* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการก่อโรคแคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้นได้จริง ดังนั้นจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงเป็นการยืนยันได้ว่าในการศึกษานี้สามารถคัดแยกเชื้อ *Xcc* สายพันธุ์ A ที่ก่อโรคแคแคงเกอร์และพบการระบาดในประเทศไทย ณ ปัจจุบัน ซึ่งในการศึกษานี้สุ่มเลือกเชื้อ *Xcc* ไอโซเลท E05 (*Xcc*⁰⁵) เพียงไอโซเลทเดียวสำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติต่อเชื้อสาเหตุโรคแคแคงเกอร์จากใบ และกิ่งของมะนาวแป้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธีเช่นเดียวกับการคัดแยกเชื้อ *Xcc* ซึ่งจากผลการทำ dual-culture plate เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xcc*^D และ *Xcc*⁰⁵ พบว่าเชื้อปฏิบัติทั้ง 8 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ต่ำกว่าการยับยั้งเชื้อ *Xcc*^D อาจเนื่องจากเชื้อ *Xcc*^D ถูกคัดแยกและเก็บรักษาในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาเป็นระยะเวลานานมากกว่า 3 ปี ในขณะที่เชื้อ *Xcc*⁰⁵ ถูกคัดแยกได้ในภายหลัง และอาจเกิดวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อปฏิบัติในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นจึงอาจเป็นเหตุผลให้เชื้อ *Xcc*⁰⁵ มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติได้มากกว่า

การศึกษาคคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีความโดดเด่นและมีประสิทธิภาพที่ดีในการเป็นเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือเชื้อ PGPB โดยเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์, ซิเดอรอฟอร์, ฮอริโมนพืช IAA, เอนไซม์ ACC deaminase และมีคุณสมบัติในการละลายธาตุฟอสฟอรัสและตรึงไนโตรเจน มีรายงานว่าเชื้อ *P. aeruginosa* MAJ PIA03 มีความสามารถในการเป็นเชื้อ PGPB โดยพบการผลิตฮอริโมนพืช IAA, ไฮโดรเจนไซยาไนด์, เอนไซม์ ACC deaminase, แอมโมเนียและซิเดอรอฟอร์ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ถึง 5 ชนิด อีกทั้งการปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* MAJ PIA03 ให้กับต้นละหุ่ง (*Ricinus communis*) มีผลช่วยเพิ่มจำนวนและน้ำหนักใบ ความยาวและน้ำหนักราก ความกว้างฐานลำต้น องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการในใบละหุ่งให้มากขึ้นกว่าเดิม⁽⁹³⁾ จากการศึกษาของ Roychowdhury และคนอื่น ๆ (2017)⁽⁹⁴⁾ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* PGP ที่ถูกคัดแยกจากดินบริเวณกองขยะมีความสามารถในการละลายธาตุฟอสฟอรัส ตรึงไนโตรเจน ผลิตฮอริโมนพืช IAA, ไฮโดรเจนไซยาไนด์, แอมโมเนียและซิเดอรอฟอร์เช่นกัน อีกทั้งมีผลเพิ่มน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวรากและยอดของต้นผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) มากกว่าต้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อร้อยละ 140, 88, 25 และ 14 ตามลำดับ และช่วยเพิ่มปริมาณของธาตุไนโตรเจนและธาตุฟอสฟอรัสในเมล็ดผักกาดเขียวร้อยละ 40.6 และ 10 ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตซิเดอรอฟอร์ได้มากที่สุดบนอาหารทดสอบ CAS คือ เชื้อ *B. velezensis* SWUA08 และ *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 ซึ่งมีรายงานอื่น ๆ พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถดังกล่าวเช่นเดียวกัน^(95, 96) และเชื้อทั้ง 2 ชนิดยังมีความสามารถในการละลายธาตุฟอสฟอรัสและการผลิตฮอริโมนพืช IAA ได้อีกด้วย Zhang และคนอื่น ๆ (2018)⁽⁹⁷⁾ รายงานว่าเชื้อ *B. velezensis* NJAU-Z9 สามารถผลิตฮอริโมนพืช IAA ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกหยวก (*Capsicum annuum* L.)

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในการเกษตร ยกตัวอย่างเช่นเชื้อ *B. subtilis* TKS1-1 และ *P. protegens* CS1 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* และลดอาการหรือลดการเกิดโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(39, 41) เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ที่สามารถคัดแยกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02, *B. velezensis* SWUA08, *B. subtilis* subsp. *subtilis* SWUA18 และ *B. cereus* SWUA26 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Xcc*^D และ *Xcc*⁰⁵ ได้ในระดับ *in vitro*

จากการทดสอบ dual-culture plate นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ *B. velezensis* SWUA08 ยังสามารถสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xcc*⁰⁵ ได้ ในปี 2016 Palazzini และคนอื่น ๆ⁽⁹⁸⁾ พบว่าจีโนมของเชื้อ *B. velezensis* RC 218 มียีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างชนิด (antibiotic gene) จำนวน 10 ยีน ได้แก่ ยีนที่สร้างโปรตีน ericin, surfactin, iturin, fengycin, bacillibactin, bacilysin, amylocyclicin, macrolactin, bacillaene และ difficidin ในปี 2015 Wu และคนอื่น ๆ⁽⁹⁹⁾ รายงานว่า difficidin และ bacilysin ของเชื้อ *B. velezensis* FZB42 (ชื่อเดิมคือ *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *Xanthomonas oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้งและโรคใบขีดโปรงแสงในข้าว ซึ่งเชื้อ *B. velezensis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานถึงการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในการเกษตรและมีความปลอดภัยในการใช้งาน โดยไม่พบความสามารถในการก่อโรคในมนุษย์⁽¹⁰⁰⁾ และจากการศึกษานี้พบว่าการเติม CuCl_2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีผลไปเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคของสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ซึ่งมีรายงานว่า การเติมโลหะหนัก CuCl_2 , CuSO_4 และ MnSO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีโอกาสไปกระตุ้นการสร้างสารประกอบชนิดใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้^(101, 102)

สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* มีรายงานถึงความสามารถในการสร้างโปรตีนยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างชนิด (antibiotic) ตัวอย่างเช่น phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide, organohalogen compound, pyocin และ pyocyanin^(40, 103-105) แต่ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีการสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc* ก็ต่อเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการเติม 0.01% CuCl_2 เท่านั้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gionco และคนอื่น ๆ (2017)⁽¹⁰⁶⁾ ที่รายงานว่าเชื้อ *P. aeruginosa* LV สามารถสร้างสารทุติยภูมิออกนอกเซลล์ที่มีสารประกอบออร์กาโนเมทัลลิกซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive organometallic compound) โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในจีโนมของเชื้อ *P. aeruginosa* LV ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี CuCl_2 พบว่ายีนที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มี CuCl_2 คือยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตคอปเปอร์ส่วนเกินออกจากเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมคอปเปอร์ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และคาดว่าจะมีผลต่อการสร้างสารประกอบออร์กาโนเมทัลลิก

จากผลการประเมินผลของการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และต้นกล้ามะนาวแป้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นการตัดปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพอื่น ๆ ที่อยู่นอกเหนือขอบเขตการศึกษา พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถอยู่ร่วมกับต้นกล้ามะนาวแป้นได้โดยไม่มีผลเสียใด ๆ และเป็นตัวควบคุมโรคแคงเกอร์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้ามะนาวแป้นที่ถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว ในขณะที่การปลูกเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดส่งผลให้ต้นกล้ามะนาวแป้นที่ปลูกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตายภายใน 30 วันหลังจากปลูกเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงองค์ประกอบของอากาศภายในท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ (vessel)^(107, 108) ยกตัวอย่างเช่น การเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus circulans* บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่งผลเสียต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดของต้นแอปริคอต (*Prunus armeniaca*)⁽¹⁰⁹⁾ แต่เชื้อ *Bacillus* และ *Pseudomonas* บางชนิดก็มีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชบางชนิดที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เช่นกัน⁽¹⁰⁸⁾

จากผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวแป้นในสภาพธรรมชาติจริง พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ *B. velezensis* SWUA08 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ โดยการปลูกเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ไม่ส่งผลเสียต่อสภาพต้นมะนาว ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจเนื่องจากสภาพต้นมะนาวแข็งแรงกว่าต้นกล้าที่เพาะในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาจเนื่องจากจำนวนของเชื้อ *B. velezensis* SWUA08 ลดลงในสภาพธรรมชาติจริง ซึ่งเป็นผลมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นและความชื้นที่ต่ำกว่าในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ตัวเซลล์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคมกกว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบของน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ไม่ทนต่อสภาพแวดล้อม หรือมีความเข้มข้นต่ำจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ไม่ดีเท่าที่ควร เช่นเดียวกับรายงานของ Lin และคนอื่น ๆ (2009)⁽¹¹⁰⁾ ที่ศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium dahliae* ในต้นมะเขือยาว (*Solanum melongena* L.) ในสภาพโรงเรือน พบว่าการใช้ตัวเซลล์ของเชื้อ *B. subtilis* Jaas ed1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ร้อยละ 88.57 แต่การใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์สามารถควบคุมโรคได้เพียงร้อยละ 16.39 ที่ 26 วันหลังจากปลูกเชื้อ เนื่องจากตัวเซลล์แบคทีเรียสามารถเข้าอาศัยและตั้งรกรากในต้นพืช หรือสร้างสารปฏิชีวนะออกมาระหว่างที่ยังมีชีวิต หรือแม้กระทั่งกระตุ้นยีนในระบบภูมิคุ้มกันของพืชได้ ในขณะที่

มีรายงานว่าสารประกอบออร์กาโนเมทัลลิกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* LV ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนสามารถยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ในต้นส้มเกลี้ยงที่ปลูกในสภาพโรงเรือนได้ถึงร้อยละ 97 และความเข้มข้นของสารที่ใช้ยังต่ำกว่าความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีส่วนประกอบของคอปเปอร์ในเชิงการค้าถึง 500 เท่า⁽⁴⁰⁾ ดังนั้นน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 หากถูกทำให้เข้มข้นมากขึ้นจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพมากขึ้น นอกจากนี้อาจเป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัยมากกว่าการใช้ตัวเซลล์ของเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ในมนุษย์

สำหรับการตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของต้นมะนาวแป้นได้หรือไม่ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นการตัดปัจจัยที่อาจมีผลต่อการกระตุ้นยีนเหล่านี้ให้มีผลน้อยที่สุด และเลือกใช้เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการนำมาทดสอบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เนื่องจากสามารถอยู่ร่วมกับต้นกล่ำมะนาวแป้นได้โดยไม่เกิดผลเสียในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของมะนาวแป้นยังคงมีการศึกษาอยู่น้อยมาก ซึ่งในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *PR-1*, *Pt14*, *LRR8* และ *LOX* โดยมีเพียงยีน *Pt14* ที่มีการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นไว้ก่อนหน้านี้⁽¹¹¹⁾ อีกทั้งยีน *Per1a* ก็ยังไม่มีรายงานถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมะนาวแป้นด้วยเช่นกัน ทำให้ในการศึกษานี้ต้องมีการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนทั้ง 5 ยีนที่เลือกมาทำการศึกษาโดยการโคลนยีนเข้าพลาสมิด เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และทำ pairwise alignment เพื่อวิเคราะห์ค่าร้อยละความเหมือนกับลำดับดังกล่าวจากฐานข้อมูล GenBank

จากข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เลือกมาทำการศึกษาจากทั้งหมด 5 ยีน พบว่ามีเพียง 3 ยีน ได้แก่ *PR-1*, *Pt14* และ *Ef-1a* ที่มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณยีนดังกล่าวบนจีโนมของพืชตระกูลส้มชนิดอื่น และมีขนาดของยีนยีนเท่ากับพืชตระกูลส้มเหล่านั้น คือ 71, 426 และ 133 คู่เบส ซึ่งในการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากพืชตระกูลส้มชนิดอื่น ๆ สำหรับยีน *Pt14* ในจีโนมของมะนาวแป้นในการศึกษานี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับยีน *Pt14* ที่ถูกศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ในมะนาวแป้นซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นจึงไม่มีความแปรผันหรือวิวัฒนาการในบริเวณดังกล่าว⁽¹¹¹⁾ จากการศึกษาของ Campos และคนอื่น ๆ (2007)⁽⁶⁸⁾ พบว่ายีน

ในกลุ่ม PR ของพืชตระกูลส้มมีทั้งหมด 17 กลุ่ม ได้แก่ PR-1 ถึง PR-17 ซึ่งยังรายงานว่ายีน PR แต่ละกลุ่มจากพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดมีรูปแบบการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทางชีวภาพและกายภาพที่คล้ายคลึงกัน หรือมีการแสดงออกในอวัยวะเดียวกัน แม้ว่าจะมีการวิวัฒนาการของพืชในตระกูลส้มก็ตามแต่หน้าที่ของยีน PR-1 ในแต่ละกลุ่มจะมีการอนุรักษ์การทำงานดังกล่าวไว้ ซึ่งยีนในกลุ่ม PR ยังถูกใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการศึกษาอนุกรมวิธานและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชได้⁽¹¹²⁾ ส่วนยีน *Ef-1a* เป็นยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน elongation factor 1-alpha ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิต โดยทำหน้าที่กระตุ้นการเข้าจับของ aminoacyl-tRNA เข้าสู่ตำแหน่ง A-site ของไรโบโซมเพื่อทำการต่อสายโพลีเปปไทด์ ดังนั้นจึงเป็นโปรตีนที่มักถูกอนุรักษ์ในระหว่างการศึกษาวิวัฒนาการ และถูกใช้เป็นเครื่องหมายเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตได้⁽¹¹³⁾ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพืชตระกูลส้มมีการอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน PR-1 และ *Ef-1a*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำ pairwise alignment ของบริเวณยีน *LRR8* ในการศึกษาพบว่ามีความคล้ายคลึงความเหมือนเท่ากับ 97 กับบริเวณ receptor like kinase ของส้มเกลี้ยง โดยโปรตีน LRR-RLK ซึ่งเป็นตัวรับรู้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการจดจำ การตอบสนองต่อตัวกระตุ้นทางชีวภาพและกายภาพ รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชแต่ละชนิด มีรายงานถึงการศึกษาการวิวัฒนาการของ LRR-RLK ในส้มคลีเมนไทน์และส้มเกลี้ยง และพบว่ายีน *LRR8* ระหว่างส้มทั้ง 2 ชนิดมีจำนวนแตกต่างกัน⁽⁶¹⁾ ดังนั้นการวิวัฒนาการอาจเป็นสาเหตุให้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *LRR8* ของมะนาวแตกต่างจากส้มเกลี้ยงได้เช่นกัน ซึ่ง Magalhães และคนอื่น ๆ (2016)⁽⁶¹⁾ ยังรายงานอีกว่ายีน *LRR12* ของส้มคลีเมนไทน์และส้มเกลี้ยงมีจำนวนถึง 148 และ 140 ชุดในจีโนมซึ่งมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่ายีน *LRR* ในกลุ่มอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *LRR* บนจีโนมของต้นอะราบิโดพซิส โดยอาจมีสาเหตุจากกระบวนการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซม (tandem duplication) เนื่องจากการวิวัฒนาการของพืชร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพืช จากข้อมูลข้างต้นของการเพิ่มจำนวนยีน *LRR12* ในพืชตระกูลส้มอาจใช้อธิบายผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *LOX* ของมะนาวแบบได้เช่นกัน จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LOX* บนจีโนมของมะนาวแบบมีขนาดใหญ่ถึง 331 คู่เบส ในขณะที่การใช้ไพรเมอร์เดียวกันเพิ่มจำนวนยีนบริเวณดังกล่าวบนจีโนมของส้มเกลี้ยงมีขนาดเพียง 175 คู่เบส⁽⁸⁰⁾ ดังนั้นทำให้ค่าร้อยละความเหมือนต่ำเท่ากับร้อยละ 62 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับระหว่าง forward primer และ reverse primer ถูกแทรกด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 156 คู่เบส ซึ่งข้อมูลของยีน *LOX*

ในพืชตระกูลส้มยังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมะนาวแป้นที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน แต่มีรายงานเกี่ยวกับยีน *LOX* ในพืชตระกูลถั่ว⁽¹¹⁴⁾ ข้าวโพด⁽⁷⁵⁾ และพืชดอกบางชนิด⁽¹¹⁵⁾ ถึงความผันแปรของยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดวิวัฒนาการที่อาจมีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซม หรือการแทรกตัวของทรานสโพซิเบิลอีลิเมนต์ (transposable element) ดังนั้นจากการศึกษา ยีน *LOX* ของมะนาวแป้นจึงได้ออกแบบ forward primer เส้นใหม่เพื่อให้ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอขนาด 175 คู่เบสเช่นเดียวกับบริเวณยีน *LOX* ของส้มเกลี้ยงที่ใช้เป็นลำดับเปรียบเทียบในการทำ pairwise alignment และให้ค่าร้อยละความเหมือนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 85

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8* และ *LOX* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานของมะนาวแป้น โดยเปรียบเทียบกับยีน *Ef-1a* พบว่ามีเพียงยีน *LRR8* ของต้นกล่อมะนาวแป้นที่ถูกปลูกด้วยเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 เพียงชนิดเดียวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่มีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกสูงกว่าต้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ ในทางตรงกันข้ามต้นกล่อมะนาวที่ถูกปลูกเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 ก่อนเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ มีค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกับต้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ ทั้งนี้ อาจต้องทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *LRR8* เพิ่มเติมในช่วงเวลาอื่น ๆ เนื่องจากพืชต่างชนิดอาจมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันออกไป โดยหน้าที่สำคัญของยีน *LRR8* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนตัวรับรู้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์พืชที่คอยตรวจสอบการมีอยู่ของ effector protein ที่สร้างโดยเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นการปลูกเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 อาจช่วยให้พืชต้านทานต่อการเกิดโรคได้ Pitino และคนอื่น ๆ⁽³⁴⁾ รายงานว่าต้นส้มที่มีการแสดงออกของยีน *LRR8* สูงสามารถต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้มากกว่าต้นส้มที่มีการแสดงออกของยีน *LRR8* ต่ำ

ยีน *PR-1* ของต้นกล่อมะนาวแป้นสามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เท่านั้น โดยโปรตีน PRs มักมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช และการแสดงออกของยีน *PR-1* ถือว่าเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึงการกระตุ้นความต้านทานแบบ SAR ในพืชซึ่งเป็นระบบที่มักตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคเท่านั้น เช่นเดียวกับผลจากการศึกษาที่มีเพียงเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ที่สามารถกระตุ้นความต้านทานในระบบ SAR ของต้นมะนาวแป้นได้ โดยที่เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่มีความสามารถกระตุ้นระบบดังกล่าว Arseneault และคนอื่น ๆ (2014)⁽¹¹⁶⁾ ศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของต้นมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรค *Streptomyces scabies* และเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp.

LBUM223 โดยมีการรายงานถึงการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่ 5 และ 10 สัปดาห์หลังจากการปลูกเชื้อ พบว่าต้นมันฝรั่งที่ถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรคมีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงขึ้น ในขณะที่การปลูกเชื้อ *Pseudomonas* sp. LBUM223 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้

ยีน *LOX* ของต้นกล้วยมะนาวแป้นสามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกที่ 24 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ เพียงอย่างเดียว และการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ หลังจากเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 มีรายงานถึงการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *LOX* ในต้นมันฝรั่ง หลังจากการปลูกเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp. LBUM223 และเชื้อสาเหตุโรค *S. scabies* เป็นเวลา 5 และ 10 สัปดาห์ แต่ต้นมันฝรั่งที่ถูกปลูกเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp. LBUM223 ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค *S. scabies* มีการแสดงออกของยีน *LOX* สูงกว่าการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว⁽¹¹⁶⁾ ซึ่งเป็นกระบวนการเตรียมพร้อมล่วงหน้าของพืชก่อนการถูกบุกรุกโดยเชื้อสาเหตุโรคผ่านการกระตุ้นระบบ ISR โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่ในการศึกษานี้ยีน *LOX* ในต้นกล้วยมะนาวแป้นถูกกระตุ้นโดยเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ได้มากกว่าเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่ 24 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมงค่าร้อยละความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีน *LOX* ในต้นที่ถูกปลูกเชื้อ *Xcc*⁰⁵ อย่างเดียวกลับลดต่ำกว่าต้นมะนาวที่ไม่ปลูกเชื้อใด ๆ จากผลการทดลองอาจต้องทำการศึกษาในช่วงเวลายาวนานกว่า 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ เนื่องจาก Waewthongrak และคนอื่น ๆ (2014)⁽⁸⁰⁾ รายงานว่าการแสดงออกของยีน *LOX* ในผลส้มเกลี้ยงสามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกได้ที่ 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ รวมทั้งตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ lipoxygenase ที่ 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ โดยที่ 72 ชั่วโมงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนและมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

สำหรับยีน *Pt14* ของต้นมะนาวแป้นไม่สามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนหลังจากการปลูกเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 และเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกับต้นมะนาวแป้นที่ไม่ถูกปลูกเชื้อใด ๆ อาจต้องทำการศึกษาใน *Pt14* ในช่วงเวลาที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 และเชื้อสาเหตุโรค *Xcc*⁰⁵ ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Pt14* ได้จริง เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานที่ศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *Pt14* ในพืชตระกูลส้มมาก่อนหน้า

ดังนั้นผลงานวิจัยเรื่องการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาวพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. aeruginosa* SWUC02 และ

B. velezensis SWUA08 มีประสิทธิภาพที่ดีในการเป็นตัวควบคุมโรคแคงเกอร์ทางชีวภาพในต้นมะนาวแป้น และยังมีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกแนวทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคแคงเกอร์อาจประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์แทนการใช้ตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งในอนาคตจำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบ และตรวจสอบชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตออกมาภายนอกเซลล์ต่อไป โดยตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องถูกประเมินประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพในแปลงเพาะปลูกจริงอีกครั้งก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตร เพื่อควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์กับสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้ผลจากการวิจัยยังได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคบางส่วน ได้แก่ ยีน *PR-1*, *Pt14*, *LRR8* และ *LOX* และยีนเปรียบเทียบ *Ef-1a* บนจีโนมของมะนาวแป้น เพื่อเป็นฐานข้อมูลเพิ่มเติมเนื่องจากการศึกษายีนเหล่านี้ในพืชตระกูลส้มยังมีอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะในมะนาวแป้นที่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาในอนาคตต่อไป



บรรณานุกรม

1. ศุภกิจ แก้วถนอม. การปลูกมะนาว. กรุงเทพมหานคร: อักษรสยามการพิมพ์; 2540.
2. Nursery & Garden Industry Australia. Biosecurity advice update - Citrus canker WA detection. 2018 [cited 2018 August 14]; Retrieved August 14, from https://www.ngia.com.au/Story?Action=View&Story_id=2475. (Online).
3. Gottwald TR, Graham JH, Schubert T. Citrus canker: The pathogen and its impact. Plant Health Prog. 2002: 1-34.
4. Canteros BI, Gochez AM, Moschini RC. Management of citrus canker in Argentina, a success story. Plant Pathol J. 2017; 33(5): 441-9.
5. Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Zimaro T, Sgro GG, Ficarra F, et al. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. In: Méndez-Vilas A, editor. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Spain: FORMATEX; 2010. p. 196-204.
6. Fawcett HS, Jenkins AE. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. Phytopathology. 1933; 23: 820-4.
7. จำไพวรรณ ภราดรน์วัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำฉายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม, นิพนธ์ ทวีชัย. โรคส้มในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: หจก.พันธ์พืชลิขชิง; 2527.
8. Gottwald TR, Graham JH. Citrus canker. Plant Health Instr. 2000.
9. Department of Agriculture AG. National diagnostic protocol for asiatic citrus canker, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2016. p. 33.
10. Florida Division of Plant Industry. Symptoms on leaves. 2007.
11. Goto M. *Xanthomonas citri* pv. *citri* infection on fruit of *Citrus unshiu* showing crater-like lesions. 2004a.
12. Goto M. Stem canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* on *Citrus natsudaidai*. 2004b.
13. ISPM 27 Annex 06. DP 06: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Diagnostic protocols for regulated pests. Rome: IPPC, FAO; 2014. p. 1-22.

14. Khodakaramian GH, Heydari A, Balestra GM. Evaluation of pseudomonads bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. *Int J Agric Res.* 2008; 3(4): 268-72.
15. Lertsuchatavanich U, Paradornuwat A, Chunwongse J, Schaad NW, Thaveechai N. Novel PCR primers for specific detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* the causal agent of bacterial citrus canker. *Kasetsart Journal - Natural Sciences.* 2007; 41(2): 262-73.
16. Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One.* 2009; 4(2): e4358.
17. Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DW. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. *Phytopathology.* 1991; 81(7): 802-9.
18. McGuire RG, Jones JB, Sasser M. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Dis.* 1986; 70(9): 887-91.
19. Lee YA, Sung AN, Liu TF, Lee YS. Combination of chromogenic differential medium and *estA*-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(21): 6831-8.
20. International Seed Federation. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. on pepper seed. 2013. p. 1-7.
21. Park DS, Hyun JW, Park YJ, Kim JS, Kang HW, Hahn JH, et al. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiol Res.* 2006; 161(2): 145-9.
22. Cubero J, Graham JH. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(3): 1257-64.
23. Coletta-Filho HD, Takita MA, Souza AA, Neto JR, Destéfano SAL, Hartung JS, et al. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas*

axonopodis pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. J Appl Microbiol. 2005; 100(2): 279-85.

24. Behlau F, Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Graham JH. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(12): 4089-96.

25. Chiou C-S, Jones AL. Molecular analysis of high level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Phytopathology. 1995; 85: 324-8.

26. Sundin GW, Bender CL. Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. Mol Ecol. 1996; 5(1): 133-43.

27. Hyun JW, Kim HJ, Yi PH, Hwang RY, Park E. Mode of action of streptomycin resistance in the citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju island. Plant Pathol J. 2012; 28(2): 207-11.

28. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มะนาว. In: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, editor. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ; 2560.

29. ณรงค์ แดงเปี่ยม, เสี่ยงม แฉ่มจำรูญ, วสรณ ฝ่องสมบุญ, ปัญญา ธิยามานนท์, สุชน สุวรรณบุตร, นรินทร์ พูลเพิ่ม, et al. มะนาวพันธุ์พิจิตร 1. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2555. กรุงเทพมหานคร: กรมวิชาการเกษตร; 2555. p. 320.

30. ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร; 2551.

31. Behlau F, Canteros BI, Jones JB, Graham JH. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Eur J Plant Pathol. 2012; 133: 949-63.

32. Rauf S, Iqbal Z, Shahzad M. Genetic improvement of *Citrus* for disease resistance. Arch Phytopathology Plant Protect. 2013; 46(17): 2051-61.

33. Prasad MBNV, Singh R, Rekha A, Chand R. Evaluation of lemon cultivars and acid lime × lemon hybrids for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Sci Hort. 1997; 71(3): 267-72.

34. Pitino M, Armstrong CM, Duan Y. Rapid screening for citrus canker resistance

employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. *Hortic Res.* 2015; 2: 15042.

35. Omar A, Murata M, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing *Xa21* from rice. *Transgenic Res.* 2018; 27(2): 179-91.

36. O'Brien P. Biological control of plant diseases. *Australas Plant Path.* 2017; 46(4): 293-304.

37. นลินี ศิวากรณ์, พจนา ตระกูลสุขรัตน์, วสันต์ ผ่องสมบุญ. ศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาว. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร; 2556. p. 429-36.

38. พงศธร ปรโลกานนท์. การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะจากถ่านชีวภาพเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานมะนาวอินทรีย์ต่อต้านโรคแคงเกอร์ [วิทยานิพนธ์วท.ม. สาขาเทคโนโลยีการเกษตร]. ปทุมธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2560.

39. Huang T-P, Tzeng DD-S, Wong ACL, Chen C-H, Lu K-M, Lee Y-H, et al. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *PLoS One.* 2012; 7(7): e42124.

40. De Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MOP, Da Silva CS, Barazetti AR, et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 113.

41. Michavila G, Adler C, De Gregorio PR, Lami MJ, Caram Di Santo MC, Zenoff AM, et al. *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent. *Plant Biol.* 2017; 19(4): 608-17.

42. Pal KK, McSpadden GB. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instr.* 2006: 1-25.

43. Elad Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* -- Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology.* 1983; 73(1): 85-8.

44. Hao Y, Charles TC, Glick BR. ACC deaminase activity in avirulent *Agrobacterium tumefaciens* D3. *Can J Microbiol.* 2011; 57(4): 278-86.

45. วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ดุสิต อธิโนวัฒน์. ฮอริโมนพืชผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้าอินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2014; 3(3): 196-205.
46. Hariprasad P, Niranjana SR. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. Plant Soil. 2008; 316: 13-24.
47. Gopalakrishnan S, Srinivas V, Samineni S. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biocatal Agric Biotechnol. 2017; 11: 116-23.
48. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol Mol Plant Pathol. 1999; 55(2): 85-97.
49. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol. 2006; 44: 135-62.
50. Deng G, Capieau K, Audenaert K, Buchala A, Métraux JP, Höfte M. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. Mol Plant Microbe Interact. 1999; 12(5): 450-8.
51. Okada K, Abe H, Arimura G-I. Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. Plant Cell Physiol. 2015; 56(1): 16-27.
52. Van Loon LC. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Eur J Plant Pathol. 2007; 119(3): 243-54.
53. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet Mol Biol. 2012; 35(4): 1044-51.
54. Niu D-D, Liu H-X, Jiang C-H, Wang Y-P, Wang Q-Y, Jin H-L, et al. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. Mol Plant Microbe Interact. 2011; 24(5): 533-42.
55. Lee B, Farag MA, Park HB, Kloepper JW, Lee SH, Ryu C-M. Induced resistance by

a long-chain bacterial volatile: Elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. PLoS One. 2012; 7(11): e48744.

56. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. กลไกการต้านทานของพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 2556; 31(3): 76-82.
57. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. Nature. 2006; 444: 323–9.
58. Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. Nat Rev Genet. 2010; 11: 539.
59. Liu P-L, Du L, Huang Y, Gao S-M, Yu M. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRR-RLK*) genes in plants. BMC Evol Biol. 2017; 17: 47.
60. Rodrigues C, Souza A, Takita M, Kishi L, Machado M. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. BMC Genomics. 2013; 14: 676.
61. Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA, et al. LRR-RLK family from two *Citrus* species: Genome-wide identification and evolutionary aspects. BMC Genomics. 2016; 17: 623.
62. Tör M, Lotze MT, Holton N. Receptor-mediated signalling in plants: Molecular patterns and programmes. J Exp Bot. 2009; 60(13): 3645-54.
63. Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2003; 15(4): 809-34.
64. Noir S, Combes M-C, Anthony F, Lashermes P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). Mol Genet Genomics. 2001; 265(4): 654-62.
65. Tarr DEK, Alexander HM. TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: Evidence from diverse monocot orders. BMC Res Notes. 2009; 2: 197.
66. Deng Z, Huang S, Ling P, Chen C, Yu C, Weber C, et al. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. Theor Appl Genet. 2000; 101(5): 814-22.
67. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์. การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคง

เกษรในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33)2556.

68. Campos MA, Rosa DD, Teixeira JÉC, Targon MLPN, Souza AA, Paiva LV, et al. *PR* gene families of citrus: their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. *Genet Mol Biol.* 2007; 30: 917-30.
69. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—Roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008; 29(7): 865-97.
70. Schneider R, Di Pietro A. The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. *Biomol Concepts.* 2013; 4(5): 519-25.
71. Gamir J, Darwiche R, Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneider R, et al. The sterol-binding activity of pathogenesis-related protein 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* 2017; 89(3): 502-9.
72. Pieterse CMJ, Van Loon LC. NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.* 2004; 7(4): 456-64.
73. Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q, Wang Y. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Front Microbiol.* 2015; 6: 883.
74. Hong CE, Kwon SY, Park JM. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana*. *Microbiol Res.* 2016; 185: 13-21.
75. Ogunola OF, Hawkins LK, Mylroie E, Kolomiets MV, Borrego E, Tang JD, et al. Characterization of the maize lipoxygenase gene family in relation to aflatoxin accumulation resistance. *PLoS One.* 2017; 12(7): e0181265.
76. Gupta R, Lee SJ, Min CW, Kim SW, Park K-H, Bae D-W, et al. Coupling of gel-based 2-DE and 1-DE shotgun proteomics approaches to dig deep into the leaf senescence proteome of *Glycine max*. *J Proteomics.* 2016; 148: 65-74.
77. Turner JG, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* 2002; 14: 153-64.
78. Browse J, Wager A. Social network: JAZ protein interactions expand our

knowledge of jasmonate signaling. *Front Plant Sci.* 2012; 3(41).

79. García-Gutiérrez L, Zeriuoh H, Romero D, Cubero J, Vicente A, Pérez-García A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb Biotechnol.* 2013; 6(3): 264-74.
80. Waewthongrak W, Leelasuphakul W, McCollum G. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. *PLoS One.* 2014; 9(10): e109386.
81. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33(7): 1870-4.
82. Castric PA. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* 1975; 21(5): 613-8.
83. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology.* 1984; 17: 362-70.
84. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987; 160(1): 47-56.
85. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 1951; 26(1): 192-5.
86. Dworkin M, Foster JW. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J Bacteriol.* 1958; 75(5): 592-603.
87. Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol.* 1994; 40(12): 1019-25.
88. Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000; 78(2): 123-7.
89. Murate LS, De Oliveira AG, Higashi AY, Barazetti AR, Simionato AS, Da Silva CS, et al. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. *Agric Sci.* 2015; 6(3): 295-303.
90. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with

Tobacco Tissue Cultures. 2006.

91. Jaiswal A, Elad Y, Graber E, Frenkel O. *Rhizoctonia solani* suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. *Soil Biol Biochem.* 2014; 69: 110-8.
92. OEPP/EPPO. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. EPPO Bull. 2005; 35(2): 289-94.
93. Sandilya S, Moni Bhuyan P, Nageshappa V, Gogoi D, Kardong D. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of *Samia ricini*. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2017; 17(2): 499-514.
94. Roychowdhury R, Qaiser T, Mukherjee P, Roy M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain PGP for plant growth promotion. *P Natl A Sci India B.* 2017; 89: 353-60.
95. Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek K-h. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules.* 2019; 24(6): 1046.
96. Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol.* 2011; 47(2): 138-45.
97. Zhang Y, Gao X, Wang S, Zhu C, Li R, Shen Q. Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 enhanced plant growth associated with efficient rhizospheric colonization monitored by qPCR with primers designed from the whole genome sequence. *Curr Microbiol.* 2018; 75(12): 1574-83.
98. Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ, Chulze SN. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol Res.* 2016; 192: 30-6.
99. Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci Rep.* 2015; 5: 12975.
100. Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in

2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2491.

101. Cain CC, Henry AT, Waldo RH, Casida LJ, Falkinham JO. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(9): 4139-41.

102. Fill TP, Pallini HF, Amaral LdS, Silva JVd, Bidóia DL, Peron F, et al. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. *J Braz Chem Soc.* 2016; 27(8): 1444-51.

103. El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bialy HA, Omara AMA. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sci.* 2015; 8(1): 36-48.

104. Naz S, Jabeen N, Sohail M, Ajaz Rasool S. Production and purification of pyocin from a soil associated *Pseudomonas aeruginosa* strain SA 188. *Pak J Agric Sci.* 2015; 52(4): 873-87.

105. Zhou L, Jiang H-X, Sun S, Yang D-D, Jin K-M, Zhang W, et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016; 32: 50.

106. Gionco B, Tavares ER, De Oliveira AG, Yamada-Ogatta SF, Do Carmo AO, Pereira UdP, et al. New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: A gene expression analysis. *Front Chem.* 2017; 5: 66.

107. Leifert C, Waites W. Bacterial growth in plant tissue culture media. *J Appl Microbiol.* 2008; 72(6): 460-6.

108. Orlikowska T, Nowak K, Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017; 128(3): 487-508.

109. Marino G, Doro Altan A, Biavati B. The effect of bacterial contamination on the growth and gas evolution of *in vitro* cultured apricot shoots. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 1996; 32(1): 51-6.

110. Lin L, Qiao Y-S, Ju Z-Y, Ma C-W, Liu Y-H, Zhou Y-J, et al. Isolation and

characterization of endophytic *Bacillus subtilis* Jaas ed1 antagonist of eggplant verticillium wilt. Biosci Biotechnol Biochem. 2009; 73(7): 1489-93.

111. มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์. การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33). นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, เทคโนโลยีชีวภาพ;2556.

112. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. Gen Appl Plant Physiology. 2005; 31(1-2): 105-24.

113. Roger AJ, Sandblom O, Doolittle WF, Philippe H. An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. Mol Biol Evol. 1999; 16(2): 218-33.

114. Song H, Wang P, Li C, Han S, Lopez-Baltazar J, Zhang X, et al. Identification of lipoxygenase (LOX) genes from legumes and their responses in wild type and cultivated peanut upon *Aspergillus flavus* infection. Sci Rep. 2016; 6: 35245.

115. Chen Z, Chen D, Chu W, Zhu D, Yan H, Xiang Y. Retention and molecular evolution of lipoxygenase genes in modern rosoid plants. Front Genet. 2016; 7: 176.

116. Arseneault T, Pieterse CMJ, Gérin-Ouellet M, Goyer C, Filion M. Long-term induction of defense gene expression in potato by *Pseudomonas* sp. LBUM223 and *Streptomyces scabies*. Phytopathology. 2014; 104(9): 926-32.

ภาคผนวก

1. Tryptone soya agar (TSA)

Tryptone	17	กรัม
Peptone	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นลง แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ (ไม่ต้องใส่ agar หากต้องการเตรียมอาหารเหลว)

2. Modified Tween B (mTMB) medium

Peptone	10	กรัม
H ₃ BO ₃	0.1	กรัม
KBr	10	กรัม
CaCl ₂	0.25	กรัม
Tween 80	10	มิลลิลิตร
Cephalexin*	65	มิลลิกรัม
5-fluorouracil*	12	มิลลิกรัม
Nystatin*	35	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

* ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15

นาที่ ตั้งทิ้งให้มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติมยาปฏิชีวนะ cephalixin, 5-fluorouracil และ nystatin ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ

3. Xanthomonad Differential (Xan-D) medium

Peptone	10	กรัม
KBr	10	กรัม
Tween 80	10	มิลลิลิตร
Skim milk**	10	กรัม
1.6% (w/v) bromothymol blue***	1.5	มิลลิลิตร
Cephalexin*	65	มิลลิกรัม
5-fluorouracil*	12	มิลลิกรัม
Nystatin*	35	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

* ผ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

** ละลายในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที

*** ละลาย bromothymol blue 24 มิลลิกรัมในเอทานอล 1.5 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ผสมรวมกับสารละลาย skim milk อีก 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1.6% (w/v) bromothymol blue ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมยาปฏิชีวนะ cephalixin, 5-fluorouracil และ nystatin ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ ซึ่งค่าพีเอชสุดท้ายของอาหารเท่ากับ 6.5

4. Pikovskaya's (PVK) agar

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2^*$	5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใช้น้ำกลั่นล้างอุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ เข้าด้วยกัน โดยเติม $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นลำดับสุดท้าย ปริมาณเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอช ด้วย hydrochloric acid (HCl) หรือ sodium hydroxide (NaOH) ให้มีค่าเท่ากับ 7 บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นลง แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ

5. Chrome Azurol-S (CAS) agar

5.1 Blue dye solution

CAS*	0.06	กรัม
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^{**}$	0.0027	กรัม
HDTMA***	0.073	กรัม

* ละลาย CAS ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

**ละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

*** ละลาย HDTMA ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

นำสารละลาย CAS ผสมรวมกับสารละลาย HDTMA จากนั้นเติมสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เกิดเป็นสารละลายสีฟ้า บรรจุใส่ภาชนะ (ควรเป็นพลาสติก) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

5.2 MM9 solution

KH_2PO_4	15	กรัม
NaCl	25	กรัม
NH_4Cl	50	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ

5.3 MM9/PIPES agar

MM9 (หัวข้อ 5.2)	100	มิลลิลิตร
PIPES*	32.24	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	750	มิลลิลิตร

* หาก PIPES ไม่ละลายต้องปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 5-6.8 ด้วย HCl หรือ NaOH

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 850 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

5.4 Mixture solution

20% Glucose	10	มิลลิลิตร
Casamino acid	30	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อสารละลายทั้ง 2 ด้วยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ใช้น้ำกลั่นล้างอุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด นำ MM9/PIPES agar (หัวข้อ 5.3) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ผสมรวมกับ blue dye solution (หัวข้อ 5.1) ที่มีอุณหภูมิลดลงเช่นกัน จากนั้นเติม 20% glucose และ casamino acid (หัวข้อ 5.4) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ

6. Dworkin and Foster (DF) salt medium

KH_2PO_4	15	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Gluconate	2	กรัม
Na_2HPO_4	6	กรัม
Glucose	2	กรัม
Citric acid	2	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11.2	มิลลิกรัม
H_3BO_3	10	มิลลิกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	78.22	ไมโครกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	124.6	ไมโครกรัม
MoO_3	10	ไมโครกรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^*$	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

* เติม ACC แทน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ สำหรับการทดสอบการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase หรือไม่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ สำหรับการทดสอบการตรึงไนโตรเจน

ใช้น้ำกลั่นล้างอุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชด้วย NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 7.2 บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ

7. Murashige & Skoog (MS) medium

MS basal medium	4.41	กรัม
Sucrose	30	กรัม
Agar	8	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชด้วย NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

8. Super optimal broth with catabolite repression (SOC) medium

Peptone	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.585	กรัม
KCl	0.186	กรัม
2 M Mg solution*	10	มิลลิลิตร
1% Glucose*	10	มิลลิลิตร
น้ำกรอง	980	มิลลิลิตร

* ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 980 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นลง เติม 2 M Mg solution และ 1% glucose

9. Luria-Bertani agar (LBA)

Tryptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชด้วย NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 7 บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นลง แล้วเทใส่ภาชนะที่ต้องการ

10. Salkowski reagent

0.5 M FeCl_3	2	มิลลิลิตร
35% Perchloric acid	100	มิลลิลิตร

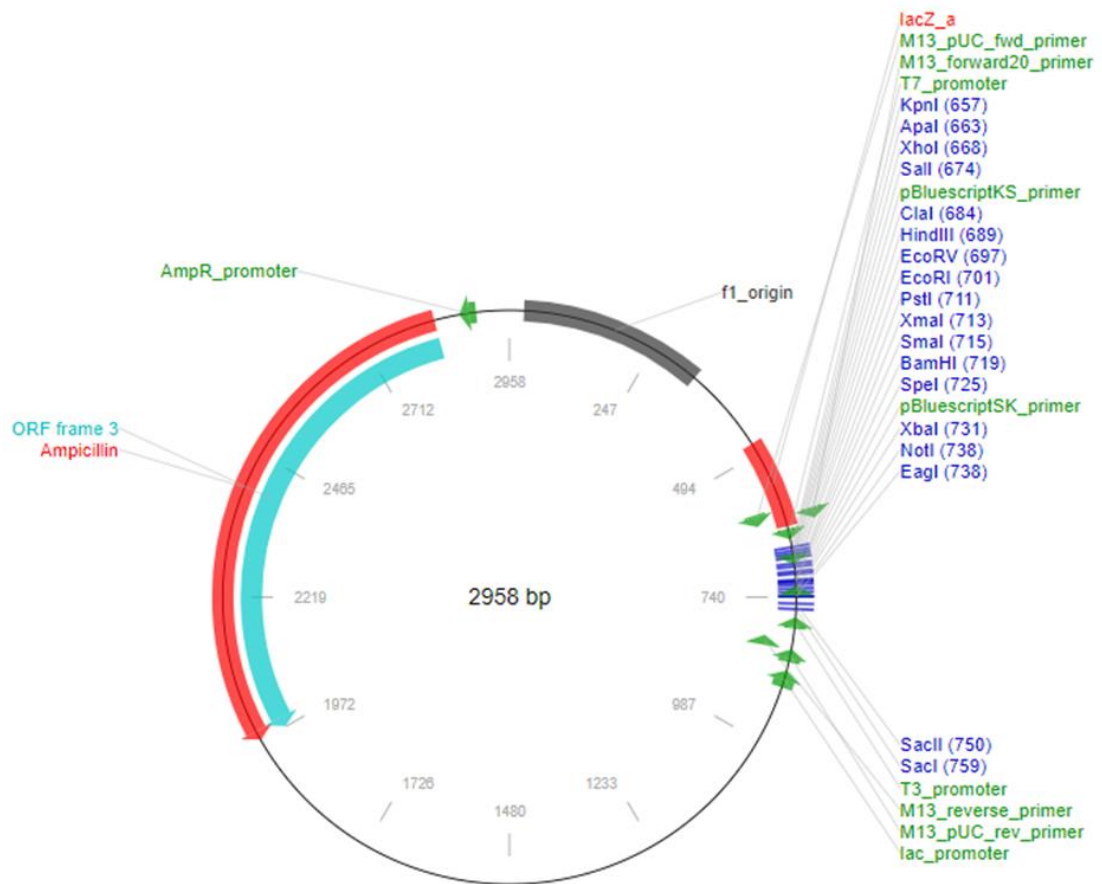
ผสมส่วนประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน บรรจุลงภาชนะ และห่อด้วยฟรอยเพื่อป้องกันแสงแดด

11. 0.5% Picric acid solution

Picric acid	0.5	กรัม
2% Sodium carbonate	100	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน บรรจุลงภาชนะ และห่อด้วยฟรอยเพื่อป้องกันแสงแดด

12. pBluescript SK (-) map



แผนที่ของพลาสมิด pBluescript SK (-) ที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับ
กลไกการต้านทานโรคในจีโนมของมะนาวแป้น

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐริดา สูดย้ง
วัน เดือน ปี เกิด	24 กันยายน 2536
สถานที่เกิด	สมุทรปราการ
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2562 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	132/17 ม.8 ซ.มังกร ถ.เทพารักษ์ ต.เทพารักษ์ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
ผลงานตีพิมพ์	- Sudyoung N, Tokuyama S, Krajangsang S, Pringsulaka O, Sarawaneeyaruk S. Bacterial antagonists and their cell-free cultures efficiently suppress canker disease in citrus lime. J Plant Dis Prot. (In Press) - Sudyoung N, Tokuyama S, Krajangsang S, Pringsulaka O, Yeesin P, Koto R, Sarawaneeyaruk S. Plant defense-related gene expression analysis of canker- infected lime seedling. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. (In Press)
รางวัลที่ได้รับ	- ทุนพัฒนาศักยภาพทางวิชาการ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 และ 2561 - ทุนฝึกประสบการณ์ทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดย Shizuoka University - ทุนการศึกษานับสนุนการเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานของนิสิตบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย (GRAD-S-3-62) โดยนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการ "2019 5th International Conference on Biotechnology and Agriculture Engineering (ICBAE 2019)" ณ เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น - รางวัลการนำเสนอผลงานแบบดีเยี่ยม (Best oral presentation) จากงานประชุมวิชาการ "2019 International Conference on Resources and Environmental Research (ICRER 2019)" ณ เมืองชิงเต่า ประเทศจีน