



รายงานการวิจัย

การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์
กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33)

Identification of molecular markers

linked to citrus canker resistance in Phichit lime (M33)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์
กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33)

Identification of molecular markers

linked to citrus canker resistance in Phichit lime (M33)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้จัดสรรงบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรุณาตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะ ปรับปรุงแก้ไข รายงานวิจัยนี้ ทำให้รายงานวิจัยนี้ถูกต้องและครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ นางสาวผ่องพรรณ ทรงวัฒนา ที่ได้ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจที่จะทำงานกับมะนาว และสนใจในโรคแคงเกอร์ และขอขอบคุณอย่างสูงสำหรับหยาดเหงื่อแรงกาย และสติปัญญาที่ ผ่องพรรณ ได้ทุ่มเทกับงานวิจัยนี้ อีกทั้งยังได้ช่วยสรุปผลการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัย ดำเนินการไปได้ดีและสำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ชนิดา กุประดิษฐ์ นายสุเมธ อิ่มสุนทรรักษา และ นางสาวดาราวรรณ ร่วมกุศล ผู้ช่วยวิจัยที่ได้ช่วยเตรียมตัวอย่าง และร่วมมือในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวผ่องพรรณ ทรงวัฒนา ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์ต้นฉบับร่างรายงานการวิจัยนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์

หัวหน้าโครงการ

กันยายน 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรค เป็นการช่วยให้นักพัฒนาสายพันธุ์ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายในพืชตระกูลส้มทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศไทย โดยศึกษาจากยีนในกลุ่ม Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) ในมะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตร (M33) และมะนาวน้ำหอม (พันธุ์พ่อ) เปรียบเทียบกับมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ คือมะนาวแป้น (พันธุ์แม่) ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จากการประเมินระดับความต้านทานของมะนาวพิจิตร เทียบกับมะนาวพันธุ์พ่อและแม่ โดยการปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC) บนใบ พบว่ามะนาวพิจิตร และมะนาวน้ำหอม มีลักษณะการต้านทานต่อโรคโดยเกิด hypersensitive response ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลของยีน *Pt9/Alu1*, *Pt14/Bfa1* และ *16R1-19/TruII* ว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวต้านทาน นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลนี้ยังพบในมะนาวต้านทานสายพันธุ์อื่น คือมะนาวพวง และมะนาวยักษ์ด้วย ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์นี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นตอนปรับปรุงพันธุ์ หรือใช้เพื่อตรวจสอบลักษณะต้านทานโรคก่อนปลูกได้

Abstract

The development of molecular markers for resistance characterization can help plant breeders to succeed in breeding program. This study aims to identify genes that are linked to canker resistance characteristic of resistance limes. Canker disease causes dramatic damage to citrus crops all over the world, including Thailand. In this study, the Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) genes of Phichit Lime (M33) and Nam Hom lime (Male parent) were screened using PCR amplification in combination with restriction enzymes digestion compared with Pan Lime (Female parent). The resistant evaluation of Phichit lime and its parents was performed by inoculation with *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (XAC) on young leaves. The hypersensitive response phenotype on M33 and Nam Hom (resistant lime) confirmed that the marker *Pt9/Alu1*, *Pt14/Bfa1* and *16R1-19/Tru1I* were closely linked with the citrus canker resistance genes. Moreover, these markers were also presented in other resistance limes tested including Puang Lime and Giant Lime. Therefore, these marker genes are useful for early selection of canker resistance phenotype in lime breeding program or to confirm canker resistance lime before planting in the plantation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การแยกเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สาเหตุโรคแคงเกอร์มะนาว	4
การปลูกเชื้อบนใบมะนาว	4
พืชที่ใช้ในการทดลอง	4
การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมะนาว	5
การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ด้วยวิธี PCR-RFLP	5
การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโน	6
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การแยกเชื้อและลักษณะการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวทดสอบ	9
การทดสอบลักษณะการเกิดโรคของสายพันธุ์มะนาวทดสอบ	10
เครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้การต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสมพิจิตร	11
การวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิคของเครื่องหมายโมเลกุล	18
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	21
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	26
เอกสารอ้างอิง	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับยีนและอุณหภูมิ (Ta) ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในขั้นตอน annealing ของแต่ละคู่ primers ที่จำเพาะเจาะจงต่อชุดยีน NBS-LRR ในพืชตระกูลส้ม	7
ตารางที่ 2 ข้อมูลของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของแต่ละเอ็นไซม์	8
ตารางที่ 3 ลักษณะการเข้าทำลายใบมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอและต้านทานโรคแคงเกอร์ด้วยเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน	11
ตารางที่ 4 ตารางสรุปการหาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนต้านทานโรค (Resistance gene candidates; RGCs) ในมะนาวทดสอบ (มะนาวแป้น, มะนาวน้ำหอม และมะนาวพิจิตร) จำนวน 12 ยีนร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดกัน	26
ตารางที่ 5 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> และ <i>BfaI</i> บนยีนต้านทาน (R_{pt9}) และยีนอ่อนแอ (r_{pt9})	27
ตารางที่ 6 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> และ <i>BfaI</i> บนยีนต้านทาน (R_{pt14}) และยีนอ่อนแอ (r_{pt14})	28
ตารางที่ 7 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>TruII</i> บนยีนต้านทาน (R_{pt14}) และยีนอ่อนแอ (r_{pt14})	29

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะ โคลอनीของเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> บนอาหาร NB	9
รูปที่ 2 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ <i>Pt9</i> NBS-LRR	12
รูปที่ 3 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> บนยีน R_{Pt9} และ r_{Pt9}	13
รูปที่ 4 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ <i>Pt14</i> NBS-LRR	14
รูปที่ 5 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>BfaI</i> บนยีน R_{Pt14} และ r_{Pt14}	15
รูปที่ 6 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ <i>16R1-19</i> NBS-LRR	16
รูปที่ 7 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>TruII</i> บนยีน $R_{16R1-19}$ และ $r_{16R1-19}$	17
รูปที่ 8 Phylogenetic tree ของโปรตีนต้านทาน <i>Pt9</i> , <i>Pt14</i> และ <i>16R1-19</i> NBS-LRR กับโปรตีนต้านทาน <i>Arabidopsis</i> RPS2, RPP5, tobacco N และ flax L	19
รูปที่ 9 ผลการทดสอบสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Specific amplification PCR	30
รูปที่ 10 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต้านทาน <i>Pt9</i>	31
รูปที่ 11 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต้านทาน <i>Pt14</i>	32
รูปที่ 12 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต้านทาน <i>16R1-19</i>	33



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะนาว (lime) เป็นผลไม้ในตระกูล Rutaceae สกุล citrus หรือสกุลเดียวกับส้ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus aurantifolia* Swingle มีถิ่นกำเนิดมาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะแถบเอเชีย สำหรับมะนาวในประเทศไทย พบว่าสามารถปลูกได้เกือบทั่วทุกภูมิภาครวมทั้งสิ้นประมาณ 116,000 ไร่ โดยปลูกมากในภาคกลาง (69,000) ประเทศไทยส่งออกมะนาวสดประมาณ 163,000 ตัน/ปี ทำรายได้ให้เกษตรกรถึงปีละ 6,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2008)

ปัจจุบันเกษตรกรประสบปัญหาเรื่องโรคมะนาวทำลายผลผลิต ซึ่งโรคที่สำคัญ และยังคงเป็นปัญหามากในปัจจุบันคือ โรคแคงเกอร์ (canker) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มทั่วทั้งเอเชียด้วยเช่นกัน ผลกระทบของโรคนี้คือทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลงเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อทั้งส่วนใบ ลำต้น และผลผ่านทางบาดแผล และ/หรือปากใบ ลักษณะทั่วไปของแผลจะเกิดจุดนูนฟูคล้ายฟองน้ำ มีน้ำจ้ำที่บริเวณขอบแผล (water-soaked) จากนั้นแผลจะเปลี่ยนเป็นลักษณะคล้ายสะเก็ดแผลสีน้ำตาล บางส่วนที่ถูกทำลายเช่น ใบ และผล จะเกิดรัศมีสีเหลืองล้อมแผล (chlorosis halo) การแพร่กระจายของโรคนี้สามารถแพร่ได้โดยอาศัยฝน และลม นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรคยังสามารถอาศัยอยู่รอดภายในแผลบนส่วนต่าง ๆ ของพืชได้เป็นเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณกิ่ง ซึ่งพบว่าสามารถอยู่รอดภายในเนื้อเยื่อเป็นเวลานานหลายปี (Graham et al., 2004) มะนาวสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยคือ มะนาวแป้น (*C. aurantifolia*) ซึ่งเป็นพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมปลูกอย่างแพร่หลายภายในประเทศ ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องหาวิธีป้องกัน และกำจัดการระบาดของโรคแคงเกอร์ วิธีที่นิยมใช้คือ การฉีดพ่นสารเคมีกลุ่มคอปเปอร์ หรือสารปฏิชีวนะในระยะเวลาที่เกิดการระบาด โดยเฉพาะระยะใบอ่อน (Leite, 2000) แต่ผลเสียของวิธีนี้คือ การเกิดความต้านทานของสารเคมีของเชื้อก่อโรคเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน และเกิดการสะสมของสารเคมีที่ดินทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (McManus and Stockwell, 2001)

ด้วยเหตุนี้ นักพัฒนาพันธุ์พืชจึงได้พยายามปรับปรุงสายพันธุ์พืชตระกูลส้ม เพื่อให้มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคนี้ โดยวิธีปรับปรุงสายพันธุ์แบบดั้งเดิม (Conventional breeding) หรือการผสมพันธุ์โดยใช้เกสรดอกระหว่างสายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรค และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่ตรงความต้องการของตลาด ปัจจุบันนักวิชาการศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตรได้ปรับปรุงสายพันธุ์มะนาวให้มีความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งรู้จักกันในชื่อมะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตร หรือ

M33 ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะนาวน้ำหอม (พันธุ์พ่อ) ซึ่งมีความต้านทานโรค และมะนาวพันธุ์เป็น (พันธุ์แม่) ซึ่งอ่อนแอต่อโรค ผลที่ได้คือ M33 มีความต้านทานต่อโรคและยังคงให้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณที่สูงสามารถนำมาปลูกทดแทนพันธุ์ที่อ่อนแอในปัจจุบันได้ (ณรงค์ และคณะ, 2003) แต่ข้อเสียของการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลาอันยาวนาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงในการดูแล และการคัดเลือกประชากรที่มีลักษณะที่ต้องการ ดังนั้นหากมีการหาเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) ที่สามารถบ่งชี้ลักษณะที่ต้องการได้ ขั้นตอนคัดเลือกประชากรในการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวจะสามารถลดเวลาลงอย่างมาก และอาจสามารถใช้เพื่อศึกษาการทำงานของลักษณะพิเศษที่สนใจได้ในอนาคตอีกด้วย

โดยธรรมชาติของพืชที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ นั้น จะมีระบบการป้องกันตัวเองภายใต้การทำงานของยีนที่เรียกว่า ยีนต้านทาน หรือ Resistance gene (R gene) ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยมากมาย เนื่องจากมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่าง ๆ และใช้เพื่อศึกษาให้เข้าใจถึงกลไกการทำงาน ระหว่างความสัมพันธ์ของระบบป้องกันตัวเองของพืช และเชื้อที่เข้าทำลายด้วย ส่วนมากการศึกษายีนที่แสดงลักษณะต้านทานโรค จะทำการศึกษาโดยเริ่มจากการหายีนที่ต้นแบบมาจากพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะความต้านทานกับกลุ่มเชื้อที่ใกล้เคียงกัน หรือ การหาเครื่องหมายโมเลกุลจากวิธีดูความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอ (Polymorphic DNA) ซึ่งวิธีดังกล่าวทำให้ได้มาซึ่งกลุ่มยีนที่ทำให้พืชมีความต้านทานโรค เช่นกลุ่ม Resistant genes (R) และ R gene candidates (RGC) (Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007; Zimmermann et al., 2006 and Manosalva et al., 2009) เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีน หรือกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชตระกูลส้มที่ทำหน้าที่ต้านทานโรคแคงเกอร์อย่างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคแคงเกอร์จึงยังเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย เพื่อศึกษายีนดังกล่าว และอาจเป็นประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์มะนาวให้ต้านทานโรคในอนาคต

ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มยีน RGC โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ (primer) จากยีนต้านทานอื่นในพืชต่างสายพันธุ์ เช่น ยีน RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) และ RPP5 (Noël et al., 1999) ใน *Arabidopsis* ยีน N ในยาสูบ (Whithum et al., 1994) และ ยีน L6 ในปอ (Lawrence et al., 1995) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากลุ่มยีนต้านทานในพืช สามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่มตามลักษณะของโครงสร้างโปรตีนที่ได้ ซึ่งเรียกโปรตีนดังกล่าวว่าโปรตีนต้านทาน (R protein) กลุ่ม R protein ที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม nucleotide binding side-lucine rich repeat (NBS-LRR) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ TIR-NBS-LRR (มีส่วนโดเมนที่คล้ายกับ *Drosophila* Toll และ mammalian Interleukin-1 receptors) และ non-TIR-NBS-LRR (Pan et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบส่วนที่เป็น conserved domains บน NSB โปรตีนได้แก่ kinase 1a (P-loop) kinase-2 kinase-3a และ hydrophobic amino acid GLPL

motifs (Traut, 1994) ดังนั้นส่วนเหล่านี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ primers เพื่อศึกษายีน RGCs ในพืชที่สนใจได้ เช่นเดียวกับการศึกษายีนต้านทานในมันฝรั่ง (Leister et al., 1996) ถั่วเหลือง (Yu et al., 1996) ข้าว (Mago et al., 1999) ข้าวสาลี (Seah et al., 2000) ฝ้าย (He et al., 2004) ทานตะวัน (Radwan et al., 2003; 2004; 2008) และถั่วลิสง (Radwan et al., 2010) สำหรับยีน RGCs ในกลุ่มของ NBS-LRR ของพืชตระกูลส้ม (*C. grandis* x *P. trifoliata*) ได้ถูกโคลนโดย Deng et al., 2000 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำยีนในกลุ่ม NBS-LRR ที่ได้จากพืชตระกูลส้มมาศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ต่อลักษณะการต้านทานแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสม M33 โดยวิธี PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) และเปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏกับมะนาวพันธุ์น้ำหอม (พันธุ์พ่อ) และมะนาวพันธุ์แป้น (พันธุ์แม่)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

หาเครื่องหมายโมเลกุล ที่บ่งชี้ลักษณะการต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ในมะนาวพันธุ์พิจิตร (M33) โดยใช้ specific NBS-LRR primers ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏกับมะนาวพันธุ์น้ำหอม (พันธุ์พ่อ) และมะนาวพันธุ์แป้น (พันธุ์แม่)

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

3.1 หาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะการต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ ในมะนาวพันธุ์พิจิตร โดยใช้ specific NBS-LRR primers ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏกับมะนาวพันธุ์น้ำหอม (พันธุ์พ่อ) และมะนาวพันธุ์แป้น (พันธุ์แม่)

3.2 ลักษณะการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากมะนาวพันธุ์พิจิตร จะนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากมะนาวสายพันธุ์น้ำหอมที่มีลักษณะการต้านทาน และพันธุ์แป้นที่อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ของประเทศไทย

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การใช้เทคนิค PCR ด้วย specific NBS-LRR primers ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง มะนาวสายพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยได้โดยการแสดงความแตกต่างของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เห็น

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์มะนาว

กลุ่มเก็บใบมะนาวที่แสดงอาการโรคแคงเกอร์จากสวนเกษตรกรจังหวัดสมุทรสาคร พิจิตร และ จังหวัดนครราชสีมา มาทำการแยกเชื้อสาเหตุให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate (OEPP/EPPO 2005) ก่อนการแยกเชื้อนำใบมะนาวที่แสดงอาการของโรคมารักษาทำความสะอาด และฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วยการแช่ใบในน้ำ 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปลอดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อตัดส่วนที่เป็นแผลออกเป็นชิ้นขนาด 1 ตร.ซม. จากนั้นบดชิ้นแผล และนำน้ำจากแผล (water-soak) มาฉีดลากลงบนอาหารกึ่งคัดเลือก KCD [NA medium ผสมสารปฏิชีวนะ Kasugamycin (16 µg/ml) Cephalexin (16 µg/ml) และ Daconil (12 µg/ml)] ก่อนนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อที่ดื้อบ่มเชื้ออุณหภูมิ 28°C เวลา 24-48 ชั่วโมง การยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่ได้จากการแยกเชื้อจากต่างแผล หรือต่างใบ ทำโดยสังเกตลักษณะทางสรีระวิทยาของโคโลนีบนอาหาร (colony morphology) การดิสสีย้อมแกรม การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ XAC01 และ XAC02 ที่จำเพาะเจาะจงกับ *X. axonopodis* pv. *citri* (Coletta-Filho, 2006) และการหาลำดับเบสบนยีน 16S rRNA

2. การปลูกเชื้อบนใบมะนาว

เชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ถูกนำมาปลูกเชื้อบนใบมะนาวด้วยวิธีป้ายสารละลายเชื้อปริมาณ 1 ml บนใบมะนาวที่อยู่บนต้น โดยครั้งหนึ่งของใบถูกทำแผลด้วยเข็มและผงซีไลท์ (Celite) ที่ได้ใบ และอีกครั้งใบไม่ได้ทำแผล จากนั้นนำถุงพลาสติกคลุมใบที่ปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 คืน และนำออกตอนเช้าของวันรุ่งขึ้นก่อนนำไปไว้ที่สภาวะแวดล้อมปกตินาน 2-3 สัปดาห์ เพื่อสังเกตลักษณะและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น สำหรับตัวแปลควบคุมใช้สารละลาย Sodium chloride 0.85% ที่ปลอดเชื้อป้ายบนใบเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ในการทดลองนี้ได้ทำการปลูกเชื้อบนใบมะนาวทั้งพันธุ์อ่อนแอ (มะนาวแป้น) และพันธุ์ต้านทาน (มะนาวพิจิตรและมะนาวน้ำหอม) เพื่อทดสอบลักษณะการต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ของแต่ละพันธุ์

3. พืชที่ใช้ในการทดลอง

มะนาวที่ใช้ในงานทดลองนี้ประกอบด้วยมะนาวพันธุ์เศรษฐกิจคือ มะนาวแป้น ซึ่งนำกิ่งพันธุ์มาจากสวนเกษตรกรจังหวัดสมุทรสาครจำนวน 13 ต้น มะนาวพันธุ์ต้านทานคือ มะนาวน้ำหอม จำนวน 6 ต้น และมะนาวพิจิตร (M33) จำนวน 7 ต้น ซึ่งได้กิ่งพันธุ์มาจากศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร

จังหวัดพิจิตร มะนาวทั้งสามพันธุ์ได้ถูกนำมาปลูกที่แปลงทดลองในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างใบมะนาวพิจิตรจากสวนเกษตรกร จ. สมุทรสาคร และ จ. ปราจีนบุรี จังหวัดละอย่างน้อย 4 ต้น เพื่อนำมาทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ สำหรับมะนาวด้านทานสายพันธุ์อื่นคือ มะนาวพวง และมะนาวยักษ์ ถูกนำมาทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้เพื่อยืนยันผลที่ได้เช่นกัน

4. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมะนาว

นำใบอ่อนมะนาวประมาณ 2 กรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นใส่สารสกัด CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl pH 8.0) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที ปริมาณ 720 μ l จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที ใส่ phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาณ 1 เท่าของปริมาณทั้งหมด และกลับหลอดไปนานาน 5-10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 x g นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนหลอดใส่หลอดใหม่ และเติม 3M sodium acetate ปริมาณ 1/10 เท่าของปริมาณทั้งหมด และ isoamyl alcohol ที่แช่เย็นปริมาณ 1 เท่าของปริมาณทั้งหมด กลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g นาน 10 นาที จากนั้นเทสารละลายออกให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาณ 300 μ l จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-Cl และ 1 mM EDTA; pH 8.0) ปริมาณ 50 μ l และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้นำไปทดสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis และ nanodrop-spectrophotometer

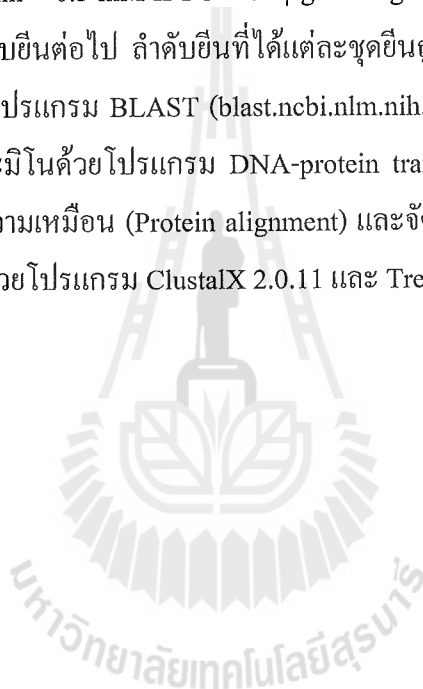
5. การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ด้วยวิธี PCR-RFLP

ดีเอ็นเอมะนาวแต่ละสายพันธุ์ถูกนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของชุดยีน NBS-LRR จำนวน 12 ยีน (ตารางที่ 1) ด้วยวิธี PCR ซึ่งปฏิกิริยารวมในปริมาตร 25 μ l ประกอบไปด้วย 1X reaction buffer (Promega GoTaq) 2.0 mM MgCl₂ 0.2 mM dNTPs เอนไซม์ *Taq* polymerase (Promega) ความเข้มข้น 1.25U และคู่ primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน NBS-LRR (ตารางที่ 1) ความเข้มข้น 0.2 μ M จากนั้นเติมดีเอ็นเอ 100-150 ng เพื่อทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 94°C ในขั้นตอน pre-denature นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ และ denature 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 47-67°C ขึ้นกับแต่ละคู่ primers แสดงไว้ (ตารางที่ 1) นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ ขั้นตอน last extension ที่ 72°C นาน 5 นาที จากนั้นนำผล PCR แต่ละปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis และส่องดูภายใต้แสง UV จากนั้นนำผล PCR แต่ละปฏิกิริยาปริมาณ 1 μ l มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดเฉพาะ *EcoRI* *TruI* *BfaI* *HinI* *AluI* หรือ *TaqI* (Fermentas Ltd.) ความ

เข้มข้น 1U ในปฏิกิริยารวมปริมาตร 10 μ l เพื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอ โดยบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของแต่ละเอ็นไซม์ (ตารางที่ 2) นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำผลจากการตัดด้วยเอ็นไซม์แต่ละชนิดมาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis และส่องดูภายใต้แสง UV

6. การหาลำดับเบส และการวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโน

นำผล PCR จากการเพิ่มจำนวนชุดยีนต้านทาน *Pt9 Pt14* และ *16R1-19* ของมะนาวแต่ละสายพันธุ์มาโคลนเข้า Promega pGEM T® -Easy Vector (Promega) และส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี electroporation จากนั้นนำเชื้อที่ถูกถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (LB medium + 20 μ g/ml ampicillin + 0.5 mM IPTG + 80 μ g/ml X-gal) เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อที่มีชุดยีนมาสกัดพลาสมิด และหาลำดับยีนต่อไป ลำดับยีนที่ได้แต่ละชุดยีนถูกนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก GenBank (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) ลำดับยีนทั้งสามยีนถูกนำมาแปลรหัสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNA-protein translator จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนแต่ละยีนมาเปรียบเทียบความเหมือน (Protein alignment) และจัดกลุ่มโปรตีน (Phylogenetic tree) ของแต่ละยีน และแต่ละพืชด้วยโปรแกรม ClustalX 2.0.11 และ TreeView X

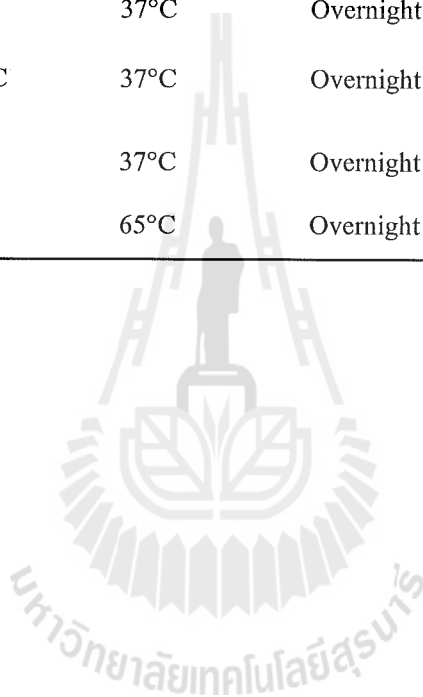


ตารางที่ 1 ลำดับยีนและอุณหภูมิ (Ta) ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในขั้นตอน annealing ของแต่ละคู่ primers ที่จำเพาะเจาะจงต่อชุดยีน NBS-LRR ในพืชตระกูลส้ม (Deng et al., 2000)

Primers name	Forward primers	Reverse primers	Ta (°C)
Pt6	GACTTGATCTCTCATGAATTTGAA	CACCGACATACCGTAGAACACC	59
Pt14	GACAATATCTCTTATCAGTTTGATG	GAGCTCAAAAATAACCATCTGTAG	47
11P31	TGCTCGGGAGGTCTACAATGACAG	CCTCCGCACITTTCCCATCAATCTT	63
Pt3	CCACAACAATGATGTCAAGAAATAA	GTCCCTTTTCAGCCTTAGAGTTAC	59
Pt7	TTACGGCGACAAAAGATGTCCAG	TCCCAACTTCTCCAATCCTTTATTA	49
Pt18	TAAGCATAAAATTCGATTTGTTGTG	TCCAACLTATTAICTGGCCTTAGAA	55
Pt8	ATTCGCGGAAAAGATGATTTTGA	ACACTCTTTTCGTACGGTTTCAG	55
Pt9	AGCTTCTTGGTGCACCAAATGGTT	CCCTTTAGCTACACTTCTGGCTAGTTCA	65
18P33	AAGTCAACAACAACCTCCGCTATCA	GGTTTCGGCTAGCTCTGGAAACT	67
Pt19	AGGAAAATTCAGAAAGCAAGCAAAAAG	ATCCGTACGCCACCTCTCTT	67
16R1-19	TCTGCAGTGAGGAGCATGATTTTGAT	ATGACACTGACGTGCCACATGCT	67
11P33	GCAAGCTGCAGGTTGTGGTGTTTA	AGGCCGACCTGGTTGAGTTTG	63

ตารางที่ 2 ข้อมูลของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของแต่ละเอนไซม์

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัด	อุณหภูมิทำปฏิกิริยา	เวลาบ่ม	บริษัทจำหน่าย
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	37°C	Overnight	Fermentas Ltd.
<i>Tru1I</i>	T↓TAA	65°C	Overnight	Fermentas Ltd.
<i>FspBI (BfaI)</i>	C↓TAG	37°C	Overnight	Fermentas Ltd.
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	37°C	Overnight	Fermentas Ltd.
<i>AluI</i>	AG↓CT	37°C	Overnight	Sib Enzyme Ltd.
<i>TaqI</i>	T↓CGA	65°C	Overnight	Sib Enzyme Ltd.

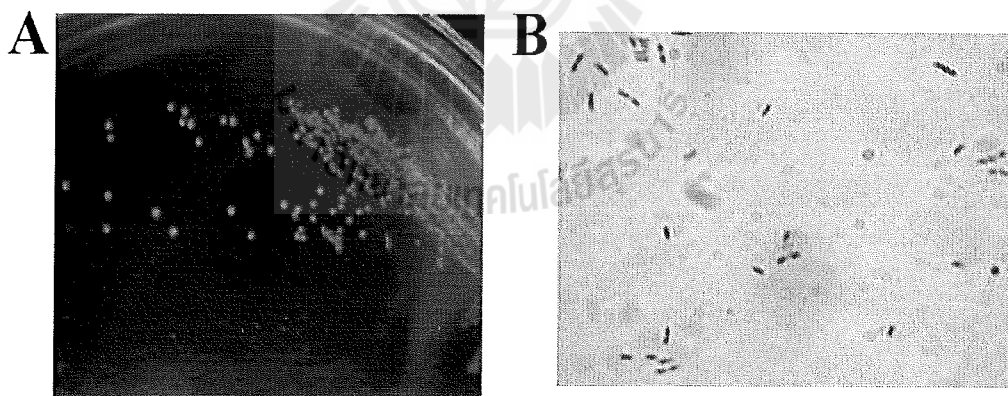


บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อและลักษณะการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวทดสอบ

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในมะนาวถูกแยกออกจากแผลบนใบมะนาวเป็น มะนาวน้ำหอม และ มะนาวพิจิตร ด้วยอาหาร KCD ได้จำนวน 19 ไอโซเลต เมื่อแต่ละไอโซเลตนำมาเลี้ยงบนอาหาร NB ทุก ไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีบน ม้านวาว กลม มีสีเหลืองอ่อน และมีขอบคมชัด เซลล์ติดสีแกรมลบ เมื่อส่อง ใต้กล้องเซลล์มีรูปร่างแบบท่อน (rod-shape) (รูปที่ 1) เคลื่อนที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ OEPP/EPPO (2005) ที่อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Xanthomonas* spp. ทุกไอโซเลตถูก ทดสอบเพื่อยืนยันสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Coletta-Filho 2006) และการหาลำดับเบสบนยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลต (เชื้อจาก จังหวัดสมุทรสาครจำนวน 10 ไอโซเลต และจังหวัดพิจิตร 2 ไอโซเลต) เป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (รูปที่ 9)



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร NB หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง (A) และ การติดสีแกรมลบของเซลล์ แสดงภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B)


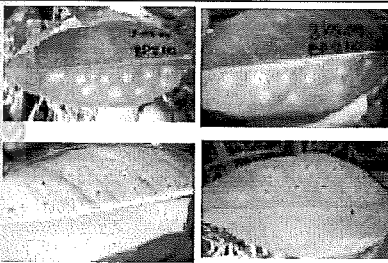
2. การทดสอบลักษณะการเกิดโรคของสายพันธุ์มะนาวทดสอบ

มะนาวแป้น น้ำหอม และพิจิตร ถูกทดสอบลักษณะการเกิดโรคโดยวิธีปลูกเชื้อบนใบที่มีแผลและไม่มีแผล โดยนำเชื้อที่ถูกยืนยันสายพันธุ์ (*X. axonopodis* pv. *citri*) ทั้ง 12 ไอโซเลต มาปลูกเชื้อบนใบมะนาวทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทดสอบทั้งหมดสามารถเข้าทำลายใบมะนาวทั้งสามสายพันธุ์ได้ แต่แสดงความรุนแรงของโรคต่างกันคือ แผลที่เกิดบนใบมะนาวแป้นมีลักษณะรุนแรงมากที่สุด โดยแสดงอาการของโรคตั้งแต่วันที่ 10 หลังการปลูกเชื้อ (ตารางที่ 3) เชื้อเข้าทำลายใบที่ทำแผลก่อนการปลูกเชื้อมากกว่าไม่ทำแผล ลักษณะอาการโรคที่เกิดเป็นลักษณะของโรคแคงเกอร์ที่รุนแรงคือ มีแผลนูนคล้ายฟองน้ำ (spongy or corky-like lesions) และน้ำน้ำ (water-soaked margin) บริเวณรอบแผลเป็นสีเหลืองในวงกว้าง (chlorotic halo) จากนั้นแผลจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังการปลูกเชื้อ 21 วัน ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบทั่วไปในพืชตระกูลส้มที่อ่อนแอต่อโรค โดยเฉพาะส้มสายพันธุ์ *C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle หรือ Key lime (Schubert and Sun, 2003) ซึ่งมะนาวแป้นในประเทศไทยได้จัดกลุ่มอยู่ในสายพันธุ์ดังกล่าวเช่นกัน สำหรับอาการของโรคบนใบมะนาวน้ำหอม และมะนาวพิจิตรพบช้า และมีความรุนแรงน้อยกว่ามะนาวแป้น โดยพบอาการของโรคบนใบหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน เชื้อแสดงการเข้าทำลายเฉพาะใบส่วนที่ทำแผลก่อนปลูกเชื้อเท่านั้น แผลมีขนาดเล็กเป็นสะเก็ดแห้งสีน้ำตาลไหม้ และแสดงการลุกลามในวงแคบ (ตารางที่ 3) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากขบวนการป้องกันการลุกลามของเชื้อก่อโรคที่พบในพืชด้านทาน

โดยทั่วไปพืชด้านทานจะมีกลไกป้องกันตนเองจากการเข้าลุกลามของเชื้อก่อโรค โดยอาศัยกระบวนการจดจำโมเลกุลองค์ประกอบของจุลินทรีย์ หรือ Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) เช่น flagellin หรือ lipopolysaccharides (LPS) โดยจะไปกระตุ้นกระบวนการ Basal defense response ผ่านการจดจำของโมเลกุลที่เป็นตัวรับบนผนังเซลล์ (extracellular receptors) กระบวนการดังกล่าวจะกระตุ้นให้พืชสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เพื่อจำกัดพื้นที่การเข้ารุกรานของเชื้อ (Chisholm et al. 2006; Reina-Pinto and Yephremov 2009) อย่างไรก็ตาม เชื้อก่อโรคพืชบางสายพันธุ์ เช่น *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถเข้าทำลายพืชได้รุนแรงและรวดเร็วกว่า เนื่องจากสร้างโปรตีน Avirulence factors (Avr) ซึ่งพืชอ่อนแอไม่สามารถจดจำโปรตีนดังกล่าวได้ ปัจจุบันมีรายงานมากมายเกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. (Ishihara et al., 2003; Gürlebeck et al., 2006) ในทางกลับกันพืชด้านทานมีกลไกจดจำโปรตีนดังกล่าว และกระตุ้นให้พืชเกิดกระบวนการ HR เพื่อลดการลุกลามของเชื้ออย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับที่พบในมะนาวพิจิตร และน้ำหอม โปรตีนชนิดนี้ส่วนมากเกี่ยวข้องกับ nucleotide binding side-leucine rich repeat (NBS-LRR) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนด้านทาน (resistance genes หรือ R genes) การจดจำระหว่าง Avr และ R genes เป็น

ความสัมพันธ์แบบ gene-for-gene model (Hammond-Kosack and Jones 1997; Desveaux 2006) ดังนั้นมะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตร และมะนาวน้ำหอม จึงอาจจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ โดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ HR หลังจากที่ถูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนใบ ดังรายงานในผลการทดลองข้างต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตรด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด โดยเปรียบเทียบกับมะนาวต้านทานสายพันธุ์ฟอ (มะนาวน้ำหอม) และแม่ (มะนาวแป้น)

ตารางที่ 3 ลักษณะการเข้าทำลายใบมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ และต้านทานโรคแคงเกอร์ด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน

ชื่อทดสอบ	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (จากงานทดลองนี้)	
พันธุ์พืช	สายพันธุ์อ่อนแอ (มะนาวแป้น)	สายพันธุ์ต้านทาน (มะนาวน้ำหอม และ ลูกผสมพิจิตร)
ลักษณะการต้านทานโรค	Basal defense	Basal defense and hypersensitive response (HR)
ลักษณะอาการของโรค	 <p>ผลพุ่มนริศมีวงกว้าง มีน้ำคาวบริเวณแผล ผล</p>	 <p>ขนาดเล็ก มีริศมีวงแคบ แผลแห้ง เป็นสะเก็ดสีน้ำตาล (dead cell response)</p>

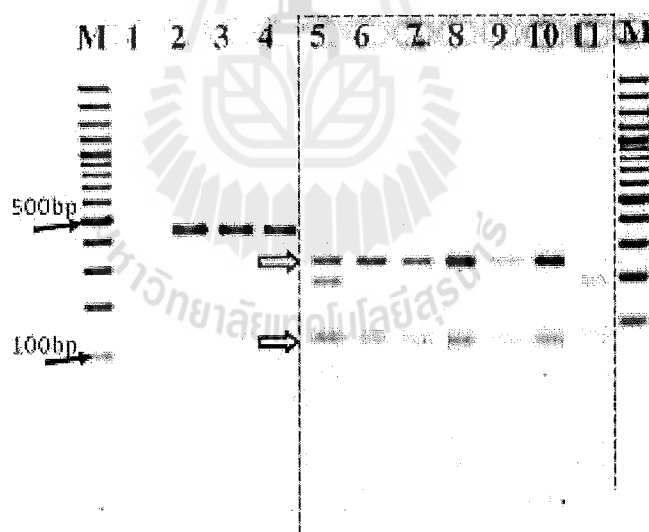
3. เครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้การต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสมพิจิตร

มะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตร และมะนาวสายพันธุ์ฟอ (มะนาวน้ำหอม) และแม่ (มะนาวแป้น) ถูกนำมาหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่

จำเพาะเจาะจงกับยีนที่สร้างโปรตีน NBS-LRR ใน *Citrus* และ *Poncirus* (Deng et al. 2000) จำนวน 12 คู่ ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิด (ตารางที่ 4) ผลการทดลองพบว่ายีนที่ทำหน้าที่สร้าง NBS-LRR จำนวน 3 ยีน เมื่อร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างกัน จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคในมะนาวลูกผสมพิจิตร และมะนาวน้ำหอมคือ ยีน *Pt9/Alu1*, *Pt9/Bfa1*, *Pt14/Bfa1* และ *16R1-19/Tru1I* (ตารางที่ 5-7) โดยยีนดังกล่าวให้ความสัมพันธ์กับลักษณะการเกิด HR หลังจากที่ถูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนใบแล้ว 14 วัน

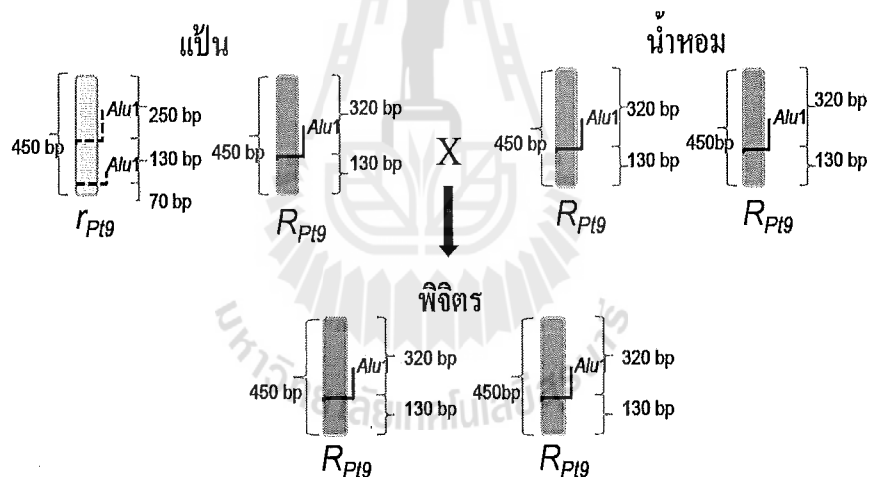
3.1 เครื่องหมายโมเลกุล *Pt9/Alu1*

ยีน *Pt9* NBS-LRR ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 พันธุ์ มีขนาด 450 bp (รูปที่ 2 lane 2-4) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu1* พบว่า *Pt9* NBS-LRR ในมะนาวลูกผสมพิจิตร และมะนาวต้านทานพันธุ์น้ำหอมแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 320 และ 130 bp (รูปที่ 2 lane 6 และ 9) ในขณะที่มะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ (แป้น) แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 ขนาดคือ 320 bp 130 bp และ 250 bp (รูปที่ 2 lane 5)



รูปที่ 2 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ *Pt9* NBS-LRR ในมะนาวลูกผสมพิจิตร และสายพันธุ์พ่อและแม่ (มะนาวน้ำหอมและแป้น); M: 100 bp marker; Lane 1: negative control; Lane 2-4: PCR product ของยีน *Pt9* ในมะนาวแป้น, น้ำหอม และพิจิตร, ผลการตัดยีน *Pt9* ด้วย *Alu1* ของมะนาวแป้น (lane 5), มะนาวน้ำหอม (lane 6), มะนาวพิจิตร จาก จ.พิจิตร (lane 7), มะนาวพิจิตร จาก จ.สมุทรสาคร (lane 8), มะนาวพิจิตร จาก จ. ปรำจันบุรี (lane 9) และมะนาวต้านทานสายพันธุ์พวง (lane 10) และมะนาวพันธุ์ยักษ์ (lane 11)

เนื่องจากมะนาวมีโครโมโซมแบบ diploid ($2n$) คือมียีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมแบบเป็นคู่อัลลีล ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า คู่อัลลีลของมะนาวพันธุ์เป็นประกอบไปด้วยยีน $Pt9$ NBS-LRR บนอัลลีลหนึ่งที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ $AluI$ เหมือนกับยีน $Pt9$ NBS-LRR ในมะนาวด้านทานพิจิตร และน้ำหอม โดยให้จีโนมเอ็นเอขนาด 320 และ 130 bp แต่ $Pt9$ NBS-LRR อีกอัลลีลหนึ่งมีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงให้แถบดีเอ็นเอต่างไปจากผลของมะนาวด้านทานพันธุ์พิจิตร และน้ำหอม (รูปที่ 3) จากผลดังกล่าวจึงสันนิษฐานได้ว่ามะนาวด้านทานพันธุ์พิจิตร และน้ำหอม มียีนควบคุมลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์แบบ RR_{Pt9} คือมียีนเด่นที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์เหมือนกันบนคู่อัลลีล ในขณะที่มะนาวเป็นมียีนควบคุมการแสดงออกแบบ Rr_{Pt9} ซึ่งประกอบด้วย ยีนเด่น R_{Pt9} ที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์เหมือนยีนในมะนาวด้านทาน และ ยีนด้อย r_{Pt9} ที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ที่ไม่เหมือนมะนาวด้านทาน ดังที่อธิบายในรูปที่ 3 นอกจากนี้ยีน RR_{Pt9} ยังพบในมะนาวด้านทานสายพันธุ์อื่นด้วยคือ มะนาวพวง และมะนาวยักษ์ (รูปที่ 2 lane 10 และ 11)



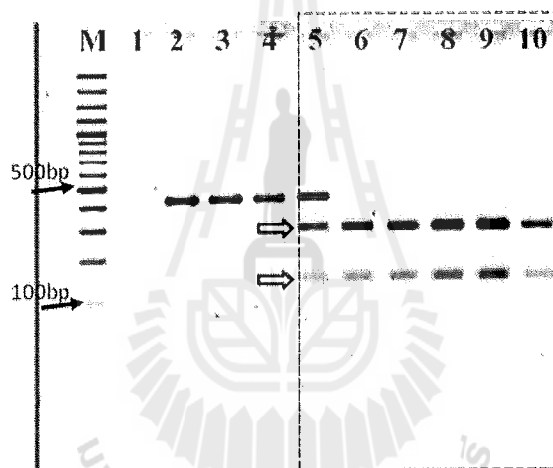
รูปที่ 3 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ $AluI$ บนยีน R_{Pt9} และ r_{Pt9} ในมะนาวสายพันธุ์เป็น น้ำหอม และพิจิตร เมื่อมะนาวน้ำหอมที่มียีน Rr_{Pt9} ถูกผสมกับมะนาวน้ำหอมที่มียีนด้านทาน RR_{Pt9} จะได้ลูกผสมสายพันธุ์พิจิตรที่มียีนด้านทาน RR_{Pt9}

ยีน $Pt9$ NBS-LRR ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันผลการทดลองของเครื่องหมายโมเลกุล $Pt9/AluI$ พบว่าลำดับเบสของยีน $Pt9$ NBS-LRR มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ $AluI$ ที่ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น นอกจากนี้ยังมี

ตำแหน่งตัดบนตำแหน่งอื่นที่ให้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดสั้น ซึ่งไม่สามารถแสดงผลบนเจลในขั้นตอน gel electrophoresis ได้ (ตารางที่ 5)

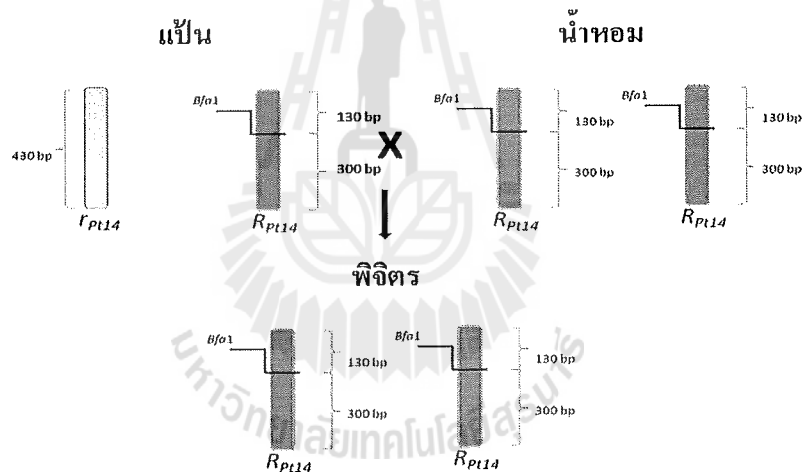
3.2 เครื่องหมายยีน *Pt14/Bfa1*

ยีน *Pt14* NBS-LRR ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 พันธุ์ มีขนาด 430 bp (รูปที่ 4 lane 2-4) เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *Bfa1* พบว่า *Pt14* NBS-LRR ในมะนาวลูกผสมพิจิตร และมะนาวด้านทานพันธุ์น้ำหอม แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 300 และ 130 bp (รูปที่ 4 lane 6 และ 9) ในขณะที่มะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ (เป็น) แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 ขนาดคือ 430 bp 300 bp และ 130 bp (รูปที่ 4 lane 5)



รูปที่ 4 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะด้านทานโรคแคงเกอร์ *Pt14* NBS-LRR ในมะนาวลูกผสมพิจิตร และสายพันธุ์พ่อและแม่ (มะนาวน้ำหอมและเป็น); M: 100 bp marker; Lane 1: negative control; Lane 2-4: PCR product ของยีน *Pt14* ในมะนาวเป็น น้ำหอม และพิจิตร ผลการตัดยีน *Pt14* ด้วย *Bfa1* ของมะนาวเป็น (lane 5), มะนาวน้ำหอม (lane 6), มะนาวพิจิตร จาก จ.พิจิตร (lane 7), มะนาวพิจิตร จาก จ.สมุทรสาคร (lane 8), มะนาวพิจิตร จาก จ.ปราจีนบุรี (lane 9) และมะนาวด้านทานสายพันธุ์พวง (lane 10)

ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า คู่อัลลีลของมะนาวอ่อนแอฟันธุ์เป็น ประกอบไปด้วยยีน *Pt14* NBS-LRR บนอัลลีลหนึ่ง ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *BfaI* ที่เหมือนกับ ยีน *Pt14* NBS-LRR ในมะนาวด้านทานพิจิตร และน้ำหอม แต่ *Pt9* NBS-LRR อีกอัลลีลหนึ่ง ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *BfaI* ดังนั้นจึงให้แถบดีเอ็นเอต่างไปจากผลของมะนาวด้านทานพันธุ์พิจิตร และน้ำหอม (รูปที่ 4 lane 5-9) จากผลการทดลองจึงสันนิษฐานได้ว่ามะนาวด้านทานพันธุ์พิจิตร และน้ำหอม มียีนควบคุมลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์แบบ RR_{Pt14} คือมียีนเด่นที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์เหมือนกันบนคู่อัลลีล ในขณะที่มะนาวเป็นมียีนควบคุมการแสดงออกแบบ Rr_{Pt14} ซึ่งประกอบด้วยยีนเด่น R_{Pt14} ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์เหมือนยีนในมะนาวด้านทาน และยีนด้อย r_{Pt14} ที่ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เหมือนกับมะนาวด้านทานดังที่อธิบายในรูปที่ 4 นอกจากนี้ยีน RR_{Pt14} ยังพบในมะนาวด้านทานสายพันธุ์อื่นด้วยคือ มะนาวพวง (รูปที่ 5 lane 10)

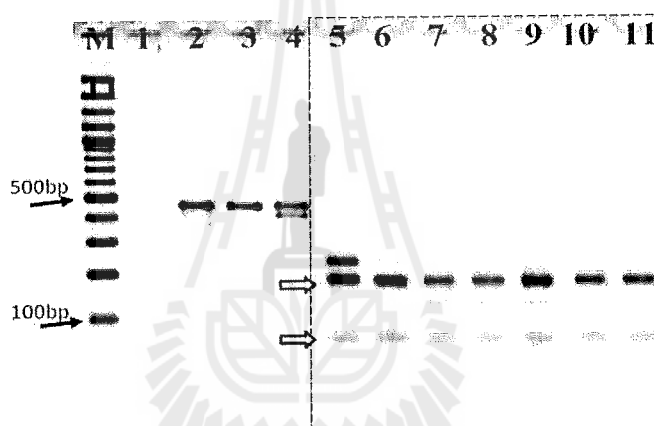


รูปที่ 5 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BfaI* บนยีน R_{Pt14} และ r_{Pt14} ในมะนาวสายพันธุ์เป็น น้ำหอม และพิจิตร เมื่อมะนาวน้ำหอมที่มียีน Rr_{Pt14} ถูกผสมกับมะนาวน้ำหอมที่มียีนด้านทาน RR_{Pt14} จะได้ลูกผสมสายพันธุ์พิจิตรที่มียีนด้านทาน RR_{Pt14}

ยีน *Pt14* NBS-LRR ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 พันธุ์ ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส และอะมิโน-เอซิกด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันผลการทดลองของเครื่องหมายโมเลกุล *Pt14/BfaI* พบว่าลำดับเบสของยีน *Pt14* NBS-LRR มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *BfaI* ที่ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น (ตารางที่ 6)

3.3 เครื่องหมายยีน *16R1-19/TruII*

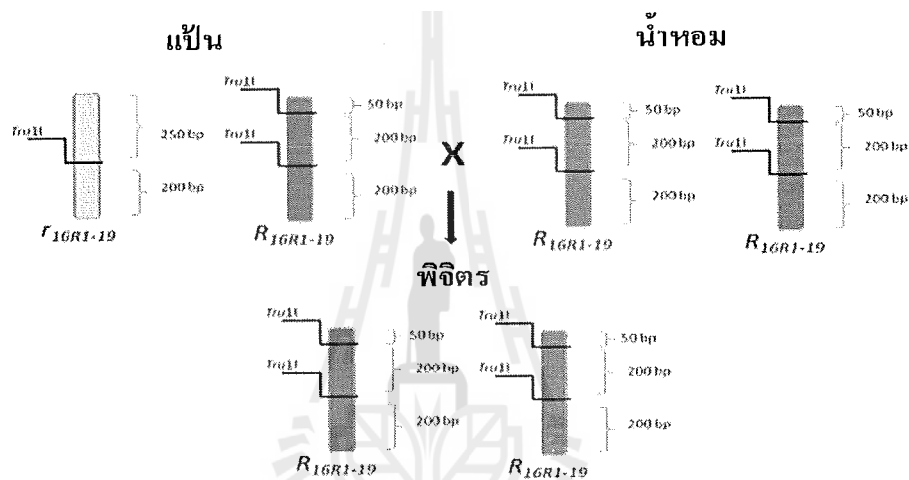
ผลการเพิ่มจำนวนยีน *16R1-19* NBS-LRR ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 พันธุ์ พบว่ามะนาวเป็น และมะนาวน้ำหอมแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp (รูปที่ 6 lane 2 และ 3) ในขณะที่มะนาวลูกผสมพิจิตร แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 450 และ 420 bp (รูปที่ 6 lane 4) ถึงแม้ว่าจะปรับวิธีการในขั้นตอน PCR แล้วก็ ยังแสดงผลเหมือนเดิมทุกวิธีการ อย่างไรก็ตามเมื่อนำยีน *16R1-19* NBS-LRR มาตัดด้วยเอ็นไซม์ *TruII* พบว่า *16R1-19* NBS-LRR ในมะนาวลูกผสมพิจิตร และมะนาวด้านทานพันธุ์น้ำหอมแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาด 200 และ 50 bp (รูปที่ 6 lane 6 และ 9) ในขณะที่มะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ (แป้น) แสดงแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 ขนาด คือ 250 bp 200 bp และ 50 bp (รูปที่ 6 lane 5)



รูปที่ 6 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะด้านทานโรคแคงเกอร์ *16R1-19* NBS-LRR ในมะนาว ลูกผสมพิจิตร และสายพันธุ์พ่อและแม่ (มะนาวน้ำหอมและแป้น); M: 100 bp marker; Lane 1: negative control; Lane 2-4: PCR product ของยีน *16R1-19* ในมะนาวแป้น, น้ำหอม และพิจิตร, ผลการตัดยีน *16R1-19* ด้วย *TruII* ของมะนาวแป้น (lane 5), มะนาวน้ำหอม (lane 6), มะนาว พิจิตร จาก จ.พิจิตร (lane 7), มะนาวพิจิตร จาก จ.สมุทรสาคร (lane 8), มะนาวพิจิตร จาก จ. ปราจีนบุรี (lane 9); มะนาวด้านทานสายพันธุ์ฟวง (lane 10) และสายพันธุ์ยักษ์ (Lane 11)

ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า คู่อัลลีลของมะนาวอ่อนแอพันธุ์แป้นประกอบไปด้วยยีน *16R1-19* NBS-LRR บนอัลลีลหนึ่งที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *TruII* ที่เหมือนกับ ยีน *16R1-19* NBS-LRR ในมะนาวด้านทานพิจิตร และน้ำหอม ที่ให้ผลการตัดได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 200 (2 ชิ้น) และ 50 bp แต่ *16R1-19* NBS-LRR อีกอัลลีลหนึ่งมีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ *TruII* ที่ให้ชิ้นดีเอ็นเอ

ขนาด 250 และ 200 bp (รูปที่ 7) จากผลการทดลองจึงสันนิษฐานได้ว่ามะนาวด้านทานพันธุ์พิจิตร และ น้ำหอม มียีนควบคุมลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์แบบ $RR_{16R1-19}$ คือมียีนเด่นที่มีตำแหน่งตัดของ เอ็นไซม์เหมือนกันบนคู่อัลลีล ในขณะที่มะนาวแป้นมียีนควบคุมการแสดงออกแบบ $Rr_{16R1-19}$ ซึ่ง ประกอบด้วยยีนเด่น $R_{16R1-19}$ ที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์เหมือนยีนในมะนาวด้านทาน และยีนด้อย $r_{16R1-19}$ ที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ที่ต่างกับมะนาวด้านทาน ดังที่อธิบายในรูปที่ 7 นอกจากนี้ยีน $RR_{16R1-19}$ ยังพบ ในมะนาวด้านทานสายพันธุ์อื่นด้วยคือ มะนาวพวง และมะนาวยักษ์ (รูปที่ 5 lane 10 และ 11)



รูปที่ 7 ภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Tru*II บนยีน $R_{16R1-19}$ และ $r_{16R1-19}$ ในมะนาวสายพันธุ์แป้น น้ำหอม และพิจิตร เมื่อมะนาวน้ำหอมที่มียีน $Rr_{16R1-19}$ ถูกผสมกับมะนาวน้ำหอมที่มียีนด้านทาน $RR_{16R1-19}$ จะได้ลูกผสมสายพันธุ์พิจิตรที่มียีนด้านทาน $RR_{16R1-19}$

ยีน $16R1-19$ NBS-LRR ขนาด 450 bp ในมะนาวทดสอบทั้ง 3 พันธุ์ ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันผลการทดลองของเครื่องหมายโมเลกุล $16R1-19/Tru$ II พบว่าลำดับเบสของยีน $16R1-19$ NBS-LRR มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *Tru*II ที่ให้ผลสอดคล้องกับผลการแสดงแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลในข้างต้น (ตารางที่ 7) สำหรับยีน $16R1-19$ NBS-LRR ขนาด 420 bp ที่พบเฉพาะในมะนาวพิจิตรได้ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี sequencing เช่นกัน แต่พบว่าเมื่อนำยีนดังกล่าวมาแปลรหัสให้เป็นลำดับของโปรตีน มีตำแหน่งรหัสที่เป็น stop codon อยู่หลายตำแหน่ง ดังนั้นยีน $16R1-19$ NBS-LRR ขนาด 420 bp ในมะนาวพิจิตร อาจไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์

แต่แถบดีเอ็นเอนี้อาจสามารถใช้เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์เฉพาะสำหรับมะนาวพิจิตรได้ เนื่องจากไม่พบในมะนาวสายพันธุ์อื่นเลย

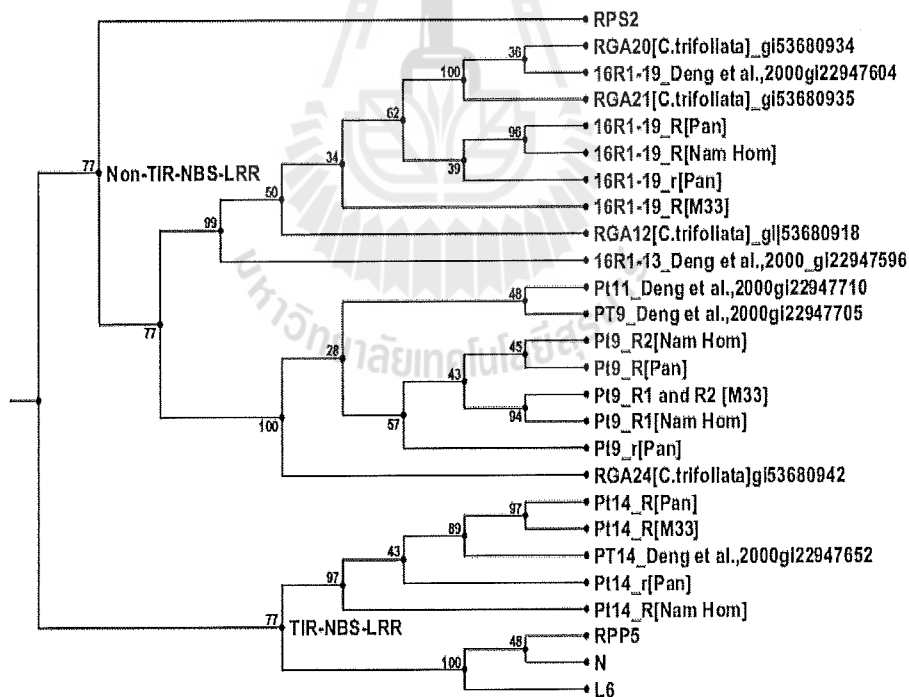
อย่างไรก็ตาม ผลการหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ในมะนาวด้านทานแคงเกอร์นี้ สามารถค้นพบเครื่องหมายโมเลกุล *Pt9/AluI*, *Pt14/BfaI* และ *16R1-19/TruII* ที่สามารถใช้เพื่อบ่งชี้ลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้ และสามารถใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มะนาวในอนาคตได้อีกด้วย

4. การวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิกของเครื่องหมายโมเลกุล

ยีน *Pt9*, *Pt14* และ *16R1-19* NBS-LRR ถูกนำมาแปลรหัสโดยวิธี Translation ด้วย Translation tool (<http://web.expasy.org/translate/>) ให้เป็นลำดับอะมิโนเอซิกที่ไม่มีตำแหน่งของ stop condon แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย BLASTX program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งพบว่าโปรตีน *Pt9*, *Pt14* และ *16R1-19* NBS-LRR มีความคล้ายกับโปรตีนด้านทานในงานทดลองที่ผ่านมามากกว่า 90 % คือ โปรตีน *Pt9* มีลำดับอะมิโนเอซิกคล้ายกับโปรตีนด้านทาน *C. grandis* x *P. trifoliata* *Pt9*, *Pt11* (Deng et al., 2000) และ *C. triloliata* RGA 24 (Shen et al., 2004) โปรตีน *Pt14* มีความคล้ายกับ *C. grandis* x *P. trifoliata* *Pt14* (Deng et al., 2000) และโปรตีน *16R1-19* มีลำดับอะมิโนเอซิกคล้ายกับ *C. grandis* x *P. trifoliata* *16R1-19*, *16R1-13* (Deng et al., 2000) และโปรตีนด้านทานจาก *C. triloliata* ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน RGA 12, RGA 20 และ RGA 21 (Shen et al., 2004)

นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์ด้วย Multiple alignment พบว่าโปรตีน *Pt9*, *Pt14* และ *16R1-19* NBS-LRR จากการทดลองนี้ และโปรตีนที่คล้ายกันในงานทดลองอื่นมีส่วนของลำดับอะมิโนเอซิกที่คล้ายกับ Resistance protein ของ *Arabidopsis* RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994), RPP5 (Noël et al., 1999), tobacco N (Witham et al., 1994) และ flax L6 (Lawrence et al., 1995) ซึ่งส่วนที่คล้ายส่วนมากเป็นตำแหน่งของ NBS motifs (kinase-2 and kinase-3a) (รูปที่ 10-12) จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับ NBS domain บนโปรตีนด้านทานโรคในกลุ่ม NBS-LRR จากพืชของ Deng et al., 2000 และ Meyers et al., 1999 พบว่าโปรตีนด้านทานกลุ่ม NBS-LRR สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยคือ โปรตีนที่เป็น TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) และ non-TIR groups โดยลำดับอะมิโนเอซิกบนตำแหน่ง NBS motifs (kinase-2 and kinase-3a) จะเป็นตัวบ่งชี้ชนิดของโปรตีน โปรตีนที่ถูกศึกษา และถูกจำแนกประเภทไว้ในงานวิจัยที่ผ่านมาคือ โปรตีน N และ L6 จัดอยู่ใน TIR group ในขณะที่ RPS2 ถูกจัดอยู่ใน non-TIR group โปรตีนด้านทานจากการทดลองนี้พบว่า *Pt9* และ *16R1-19* NBS-LRR จัดว่าเป็นโปรตีนกลุ่ม non-TIR เนื่องจากพบ Tryptophan residues (W) บนตำแหน่งสุดท้ายของ kinase 2 motif (รูปที่ 10

และ 12) ซึ่งมักพบใน non-TIR-LRR class proteins เช่น โปรตีนด้านทานของ *Arabidopsis* RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) สำหรับโปรตีน Pt14 NBS-LRR ในงานทดลองนี้สามารถจัดเป็นโปรตีน TIR group เนื่องจากพบ Aspartic acid residue (D) บนตำแหน่งสุดท้ายของ kinase 2 motif (รูปที่ 11) ซึ่งมักพบใน TIR-LRR class proteins เช่น โปรตีน tobacco N (Witham et al., 1994) และ flax L6 (Lawrence et al., 1995) นอกจากนี้เมื่อนำโปรตีนทั้งหมดจากงานทดลองนี้ และโปรตีนที่คล้ายกันมาวิเคราะห์โดยการทำ Phylogenetic tree กับโปรตีนด้านทาน *Arabidopsis* RPS2, RPP5, tobacco N และ flax L6 พบว่าโปรตีน Pt9, 16R1-19 และโปรตีนที่คล้ายกันจากงานทดลองอื่น ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีน *Arabidopsis* RPS2 ซึ่งเป็นโปรตีนด้านทานประเภท non-TIR-LRR class proteins ในขณะที่โปรตีน Pt14 และโปรตีนที่คล้ายกันถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีน tobacco N และ flax L6 ซึ่งเป็นโปรตีนประเภท TIR-LRR class proteins (รูปที่ 8) ดังนั้นผลการวิเคราะห์นี้จึงสามารถยืนยันผลการจำแนกประเภทของโปรตีนด้านทานในงานทดลองนี้ได้



รูปที่ 8 Phylogenetic tree ของโปรตีนด้านทาน Pt9, Pt14 และ 16R1-19 NBS-LRR กับโปรตีนด้านทาน *Arabidopsis* RPS2, RPP5, tobacco N และ flax L6

จากการวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิกของโปรตีนด้านทาน Pt9, Pt14 และ 16R1-19 NBS-LRR ของมะนาวสายพันธุ์ด้านทาน (มะนาวน้ำหอม และพิจิตร) และสายพันธุ์อ่อนแอ (มะนาวแป้น) พบว่ามีตำแหน่งของอะมิโนเอซิกบางตำแหน่งบนอัลลิล R และ r ที่บ่งชี้การแสดงออกลักษณะด้านทานโรคในมะนาวดังนี้

โปรตีน R_{pt9} ในมะนาวด้านทาน และมะนาวอ่อนแอ พบว่าตำแหน่งของ alanine (A) และ lysine (K) บน kinase-3a motif ของ R_{pt9} ถูกแทนที่ด้วย valine (V) และ glutamate (E) บนโปรตีน r_{pt9} ตามลำดับ

โปรตีน R_{pt14} ในมะนาวด้านทาน และมะนาวอ่อนแอ พบว่าตำแหน่งของ threonine (T) บน kinase-3a motif ของ R_{pt14} ถูกแทนที่ด้วย asparagine (N) บนโปรตีน r_{pt14}

โปรตีน $R_{16R1-19}$ ในมะนาวด้านทาน และมะนาวอ่อนแอ พบว่าตำแหน่งของ leucine (L) และ arginine (R) ของโปรตีน $R_{16R1-19}$ ถูกแทนที่ด้วย methionine (M) และ serine (S) บนโปรตีน $r_{16R1-19}$ ตามลำดับ ซึ่งลำดับอะมิโนเอซิกที่เปลี่ยนไปเหล่านี้อาจมีผลทำให้โปรตีนด้านทาน r_{pt9} , r_{pt14} และ $r_{16R1-19}$ ไม่ทำงานบนมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ เช่นมะนาวแป้น อย่างไรก็ตามการศึกษาการทำงานของยีน หรือโปรตีนด้านทานที่ค้นพบในงานวิจัยนี้ ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของลักษณะด้านทานโรคแคงเกอร์ เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของยีน และโปรตีนดังกล่าวกับลักษณะด้านทานโรคต่อไป



บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล บ่งชี้ลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์ต้านทานคือ มะนาวลูกผสมพันธุ์พิจิตร และมะนาวน้ำหอม พบว่ายีน *Pt9*, *Pt14* และ *16R1-19* ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ *AluI*, *BfaI* และ *TruI* ตามลำดับ สามารถแสดงเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ต่อลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ได้ ซึ่งยีนทั้งสามนี้ในมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ (มะนาวแป้น) มีลำดับดีเอ็นเอที่ต่างจากพันธุ์ต้านทาน ดังนั้นเมื่อนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์จะให้ผลต่างจากพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานนี้ ยังปรากฏในมะนาวต้านทานสายพันธุ์อื่นในประเทศไทยคือ มะนาวพวง และมะนาวยักษ์ ดังนั้นยีน *Pt9/AluI*, *Pt14/BfaI* และ *16R1-19/TruI* จึงสามารถใช้เพื่อบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวต้านทานบางพันธุ์ในประเทศไทยได้ และสามารถใช้ในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแคงเกอร์ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ได้ ซึ่งจะช่วยให้นักพัฒนาสายพันธุ์ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอย่างมาก งานวิจัยนี้ยังพบเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้จำเพาะต่อสายพันธุ์พิจิตรด้วยคือ *16R1-19/TruI* ซึ่งให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในมะนาวสายพันธุ์อื่น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบสายพันธุ์

จากการวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิกของแต่ละยีนที่พบทั้งในมะนาวต้านทาน และมะนาวพันธุ์อ่อนแอ พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนต้านทานที่พบในพืชตระกูลส้มสายพันธุ์อื่น และมีองค์ประกอบของโปรตีนที่สำคัญคล้ายกับโปรตีนต้านทานในพืชชนิดอื่นด้วย ดังนั้นโปรตีน *Pt9*, *Pt14* และ *16R1-19* ในมะนาวต้านทานจึงอาจมีหน้าที่เป็นโปรตีนต้านทานในเซลล์ เพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ อย่างไรก็ตามโปรตีนต้านทานนี้ในมะนาวสายพันธุ์อ่อนแอ (r_{pt9} , r_{pt14} และ $r_{16R1-19}$) อาจไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากลำดับอะมิโนเอซิกบางตำแหน่งแตกต่างไปจาก R_{pt9} , R_{pt14} และ $R_{16R1-19}$ การศึกษาบทบาทการทำงานของโปรตีนต้านทาน R_{pt9} , R_{pt14} และ $R_{16R1-19}$ ในมะนาวต้านทานจึงต้องมีการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

- Bent, A.F., Kundel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. and Staskawicz, B.J. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science**. 265: 1856–1860.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**. 124: 803–814.
- Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C.A., Moore, G.A., and Gmitter Jr. F.G. (2000). Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance gene candidate sequences in citrus. **Theor. Appl. Genet.** 101: 814-822.
- Desveaux, D., Singer, A.U., and Dangl, J.L., (2006) Type III effector proteins: doppelgangers of bacterial virulence. **Curr. Opin. Plant Biol.** 9:376–382.
- Coletta- Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A. de. Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung, J.S. and Machadoet, M.A. (2006). 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.** 100: 279-285.
- EPPO/EPPO. (2005). Diagnostic: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **OEPP/EPPO Bulletin** 35: 271-273.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J. and Achor, D.S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol. Plant Pathol.** 5: 1-15.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **J. Plant Physiol.** 163: 233-255.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** 48: 575-607.
- Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. (2007). Resistance genes (*R* genes) in plants. **In: Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a0020119]

- He, L., Du, C., Covalada, L., Xu, Z., Robinson, A.F., Yu, J.Z., Kohel, R.J., and Zhang, H.B. (2004). Cloning, characterization, and evolution of the NBS–LRR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Mol. Plant Microbe Interact.** 17: 1234–1241.
- Ishihara, H., Ponciano, G., Leach, J.E., Tsuyumu, S., (2003) Functional analysis of the 30 end of *avrBs3/pthA* genes from two *Xanthomonas species*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 63: 329–338.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G. (1995). The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. **Plant Cell** 7: 1195–1206.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. (1996). A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nat Genet.** 14: 421–429.
- Leite, R.P. Jr. (2000). Control studies in Brazil. Processing of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce, FL [On-line]. Available : <http://doacs.state.fl.us/canker>
- Mago, R., Nair, S., and Mohan, M. (1999). Resistance gene analogues from rice, cloning, sequencing and mapping. **Theor. Appl. Genet.** 99: 50–57.
- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., and Young, N.D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant J.** 20: 317–332.
- McManus, P.S. and Stockwell, V.O. (2001). Antibiotic use for plant disease management in the United States. **Plant Health Progress** doi: 10.1094/PHP-2001-0327-01RV.
- Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G.L. and Ausubel, F.M. (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. **Cell** 78: 1089–1099.
- Manosalva, P.M., Davidson, R.M., Liu, B., Zhu, B., Hulbert, S.H., Leung, H., and Leach, J.E. (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease in rice, **Plant Physiol.** 149: 286-296.

- Noël, L., Moores, T.L., Van der Biezen, E.A., Parniske, M., Daniels, M.J., Parker, J.E. and Jones, J.D.G. (1999) Pronounced intra specific haplotype divergence at the *RPP5* complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 11: 2099-2111.
- Pan, Q.L., Wendel, J. and Fluhr, R. (2000) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **J. Mol. Evol.** 50: 203-213.
- Radwan O.E., Ahmed T.A. and Knapp S.J. (2010). Phylogenetic analyses of peanut resistance gene candidates and screening of different genotypes for polymorphic markers. **Saudi J. Biol. Sci.** 17: 43–49.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Nicolas, P., and Mouzeyar, S. (2004). Development of PCR markers for the P15/P18 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. **Theor. Appl. Genet.** 109: 176–185.
- Radwan, O.E., Bouzidi, M.F., Vear, F., Philippon, J., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., and Mouzeyar, S. (2003). Identification of nonTIR-NBS-LRR markers linked to P15/P18 locus for resistance to downy mildew in sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 106: 1438–1446.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmore, R.W., and Knapp, S.J. (2008). Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. **Mol. Genet. Genomics.** 280: 111–125.
- Reina-Pinto, J.J. and Yephremov, A. (2009). Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiol. Biochem.** 47: 540-549.
- Schubert, T.S. and Sun, X. (2003). Bacterial citrus canker. **Plant Pathol. Circ.** No. 377. FL. Dept. of agriculture & Cons. Svcs. Division of plant Industry. 6 p.
- Seah, S., Spielmeier, W., Jahier, J., Sivasithamparam, K., and Lagudah, E.S. (2000). Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat. **Mol. Plant. Microbe. Interact.** 3: 334–341.

- Shen, M., Deng, X., Guo, W., and Xu, Q. 2004. Citrus resistance gene analogs [unpublished]. Horticulture, National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement of Huazhong Agriculture University, Hongshan County, Wuhan, Hubei 430070, P.R. China.
- Traut, T.W. (1994). Review: The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. **Eur. J. Biochem.** 222: 9-19.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. **Cell** 78: 1101–1115.
- Yu, Y.G., Buss, G.R., Maroof, M.A. (1996). Isolation of the super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 11751–11756.
- Zimmerman, G., Baumlein, H., Mock, H-P., Himmelbach, A. and Schweizer, P. (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley, regulation and function in basal host resistance, **Plant Physiol.** 142, 181-192.
- ณรงค์ แดงเปี่ยม นรินทร์ พูลเพิ่ม ดวงพร อมัตริ์ตนะ และ ชำรง ช่วยเจริญ (2003). การผสมพันธุ์มะนาวเพื่อต้านทานโรคแคงเกอร์. ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร สถาบันวิจัยพืชสวน. รหัสทะเบียนวิจัย 39 16 300 003: 16-35.
- สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร (2007) [On-line]. Available: <http://www.oac.go.th/>

ภาคผนวก
ตาราง และรูปภาพผลการทดลอง

ตารางที่ 4 ตารางสรุปการหาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนต้านทานโรค (Resistance gene candidates; RGCs) ในมะนาวทดสอบ (มะนาวแป้น, มะนาวน้ำหอม และมะนาวพิจิตร) จำนวน 12 ยีน ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดกัน

ยีน	Amplicon	ผลการตัดด้วยเอ็นไซม์					
		<i>EcoRI</i>	<i>Tru1I</i>	<i>BfaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>
<i>Pt3</i>	√ ^a	X ^b	√	X	X	√	√
<i>Pt6</i>	√	X	√	X	X	X	X
<i>Pt7</i>	XX	- ^d	-	-	-	-	-
<i>Pt8</i>	√	X	X	X	√	X	√
<i>Pt9</i>	√	X	√	*** ^c	√	***	X
<i>Pt14</i>	√	X	X	***	√	√	√
<i>Pt18</i>	√	X	X	X	X	X	√
<i>Pt19</i>	√	X	√	√	√	√	√
11P31	√	X	√	X	X	√	X
11P33	XX	-	-	-	-	-	-
18P33	√	X	√	√	√	√	√
16R1-19	√	X	***	√	√	X	X

^a √: สามารถเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ได้ทั้ง 3 พันธุ์ทดสอบ และตัดด้วยเอ็นไซม์ชนิดนั้นได้

^b X: สามารถเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ได้ทั้ง 3 พันธุ์ทดสอบ แต่ไม่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ชนิดนั้นได้

XX ไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ได้ทั้ง 3 พันธุ์ทดสอบ แต่ไม่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ชนิดนั้นได้

^c***: ลักษณะแถบดีเอ็นเอสามารถบ่งชี้ลักษณะด้านการต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคของมะนาวทดสอบได้

^d-: ไม่ได้ดำเนินการในงานทดลองนี้

ตารางที่ 5 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* บนยีนต้นทาง (R_{ps}) และยีนอ่อนแอ (r_{ps}) ในมะนาวสายพันธุ์แป้น น้ำหอม และพีจิตร หลังจากวิเคราะห์ลำดับเอ็นเอ และแสดงชิ้นส่วนเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล หลังจากการทำ gel electrophoresis

ชื่อยีน	ชนิดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	<i>R</i> clones	ขนาดชิ้นยีน (bp)	ตำแหน่งตัวของเอ็นไซม์	ขนาดชิ้นส่วนยีน (bp) ^a	ขนาดดีเอ็นเอที่แสดงบน agarose gel ^b
P19	<i>AluI</i> (รูปที่ 2)	Pan-r	446	493, 316, 66, 3	250, 123, 63, 7, 3	250
		Pan-R	446		313, 126, 7, 3	313
		Nam Hom-R1	443	439, 316, 3	313, 120, 7, 3	313
		Nam Hom-R2	446	439, 316, 3	313, 123, 7, 3	120, 123
		M33-R1 and -R2	443		313, 120, 7, 3	313
					439, 316, 3	

a: ตัวเลขขีดเส้นใต้แสดงสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์แล้วแสดงให้เห็นแถบบนเจลเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1% gel electrophoresis

b: แถบดีเอ็นเอที่แสดงบน 1% agarose gel (100 โวลต์ 30 นาที)

ตารางที่ 6 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BfaI* บนยีนต้านทาน (R_{p14}) และยีนอ่อนแอ (r_{p14}) ในเมฆาสาสายพันธุ์เป็น น้ำหอม และพิจิตร หลั่งจาก
 วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล หลังจากการทำ gel electrophoresis

ชื่อยีน	ชนิดเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ	R clones	ขนาดชิ้นยีน (bp)	ตำแหน่งตัวของ เอ็นไซม์	ขนาดชิ้นส่วนยีน (bp) ^a	ขนาดดีเอ็นเอที่แสดงบน agarose gel ^b
Pt14	<i>BfaI</i> (รูปที่ 4)	Pan-r	426	None ^c	426	426
		Pan-R	426	288	288, 138	288 138
		Nam Hom-R1	425	288	288, 137	288
		Nam Hom-R2	426	288	288, 138	138, 137
		M33-R1 and -R2	426	288	288, 138	288
				288		138

a. ตัวเลขขีดเส้นใต้แสดงสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์แล้วแสดงให้เห็นแถบบนเจลเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1% gel electrophoresis

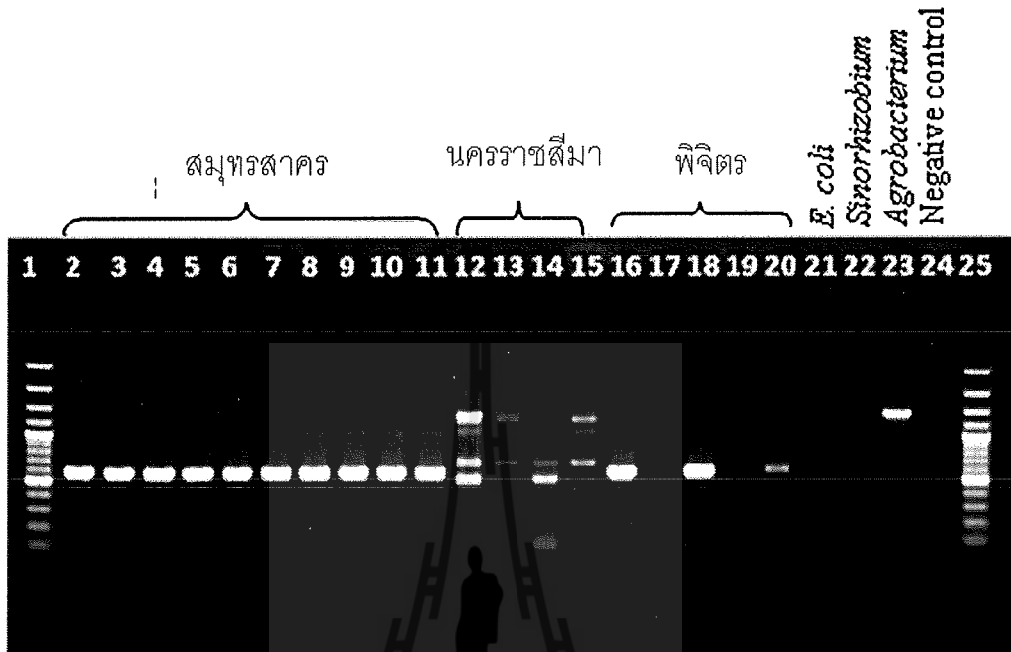
b. แถบดีเอ็นเอที่แสดงบน 1% agarose gel (100 โวลต์ 30 นาที)

ตารางที่ 7 ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *TruII* บนยีนต้านทาน (*R_{16R1-19}*) ในมะนาวสายพันธุ์เป็น น้ำหอม และพิจิตร หลังจากวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลหลังจากการทำ gel electrophoresis

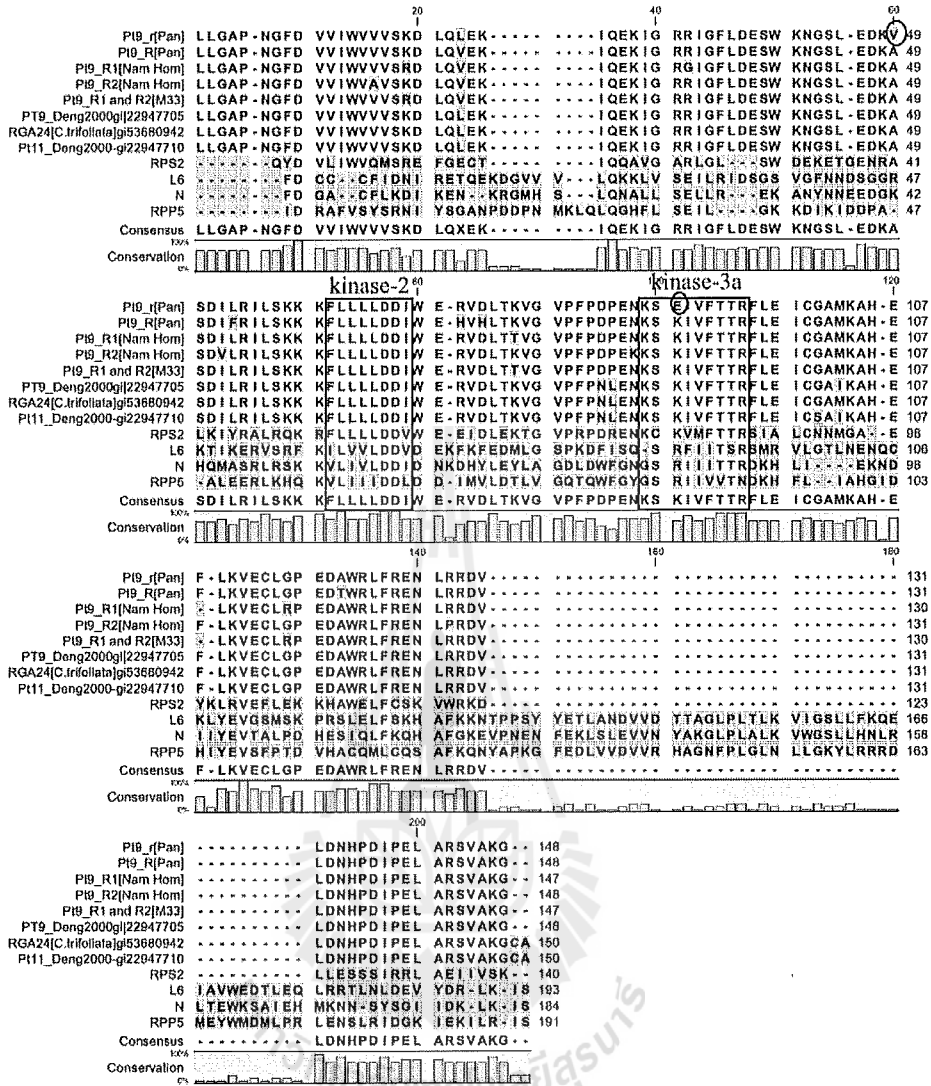
ชื่อยีน	ชนิดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	R clones	ขนาดชิ้นยีน (bp)	ตำแหน่งตัวของเอ็นไซม์	ขนาดชิ้นส่วนยีน (bp) ^a	ขนาดดีเอ็นเอที่แสดงบน agarose gel ^b
16R1-19		Pan-r	455	401, 223	223, 178, 54	223
		Pan-R	452		178, 163, 54, 57	178, 163
	<i>TruII</i>	Nam Hom-R1 and -R2	455	163, 220, 398	178, 166, 54, 57	178, 166
				166, 220, 401		57, 54
		M33-R1 and -R2	452	163, 220, 398	178, 163, 54, 57	178, 163
						54, 57

a: ตัวเลขขีดเส้นใต้แสดงสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์แล้วแสดงให้เห็นแถบบนเจลเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1% gel electrophoresis

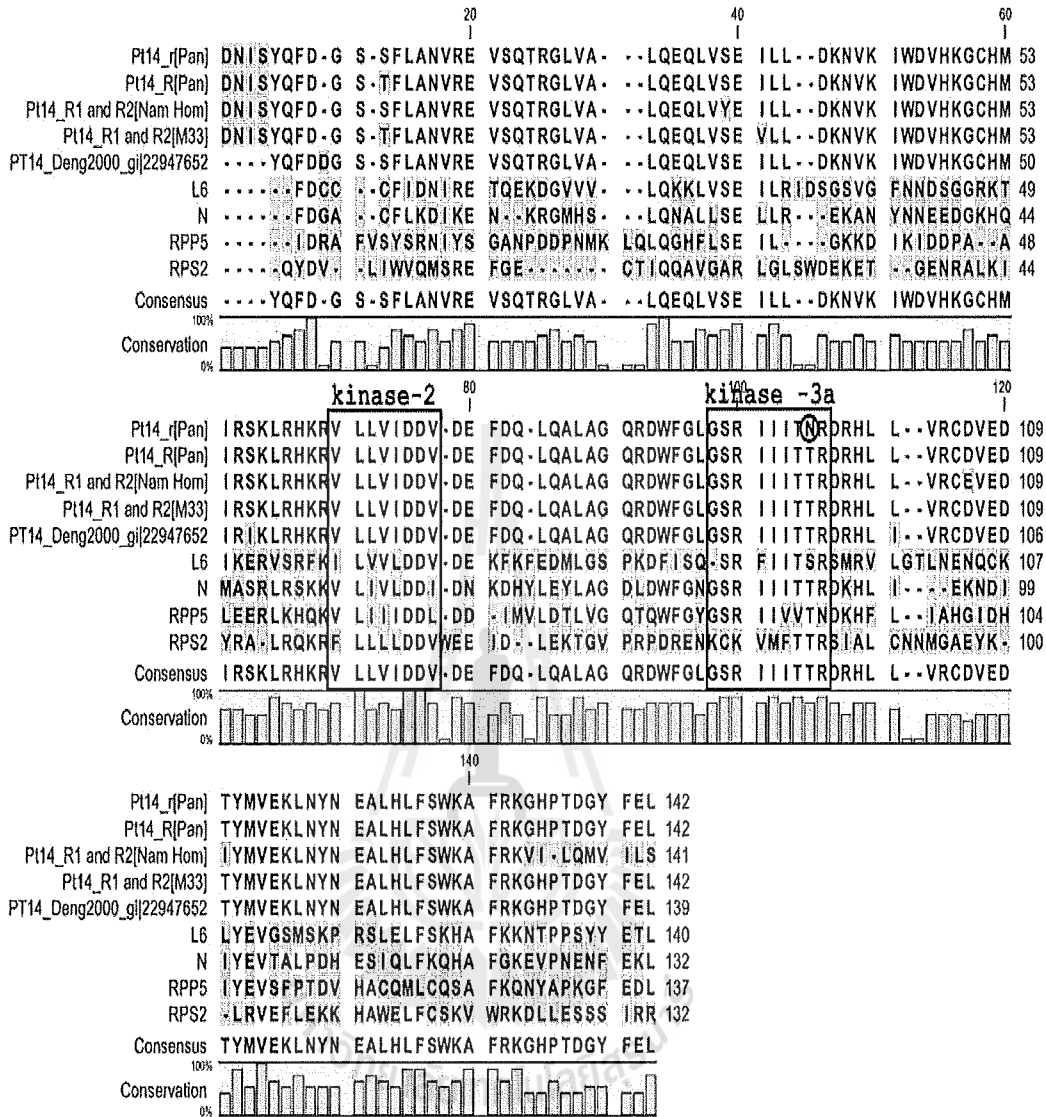
b: แถบดีเอ็นเอที่แสดงบน 1% agarose gel (100 โวลต์ 30 นาที)



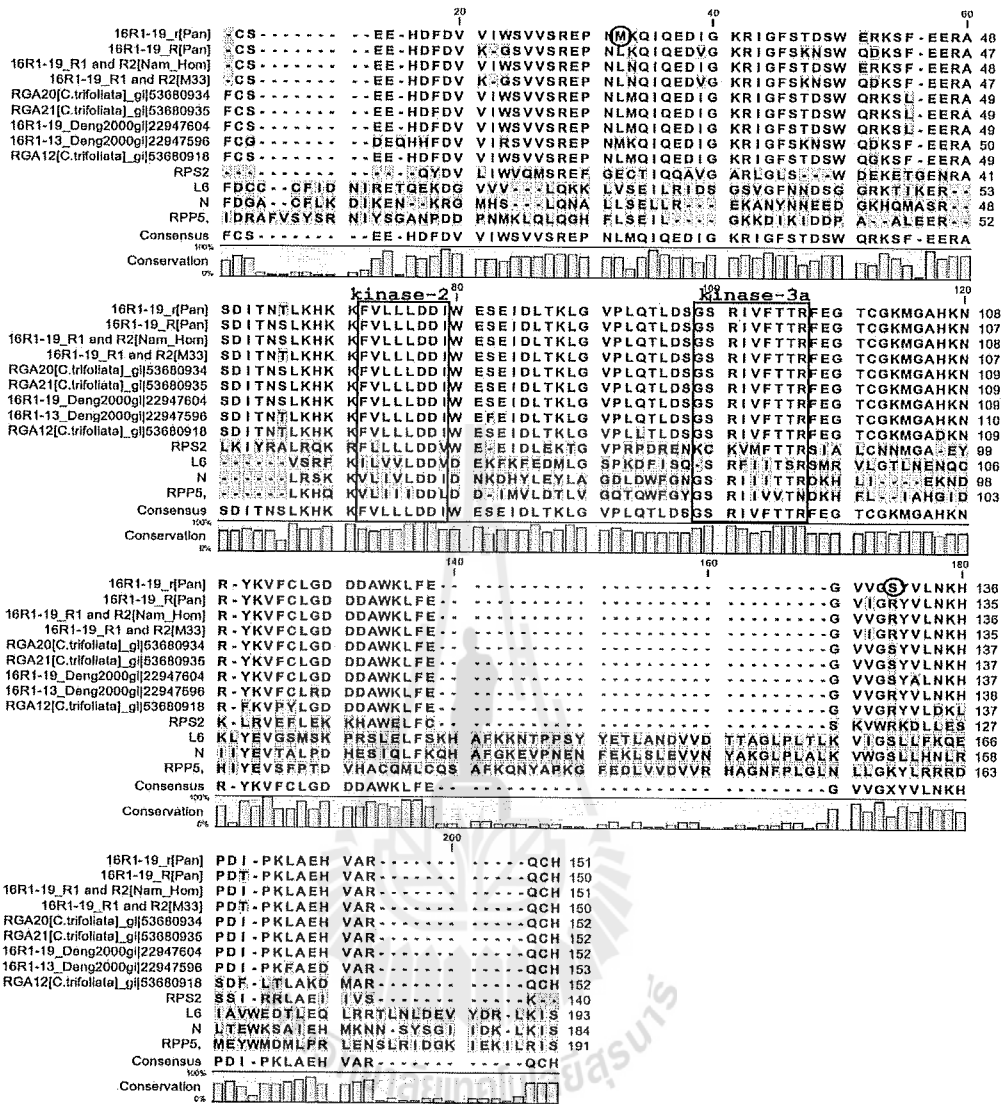
รูปที่ 9 ผลการทดสอบสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค Specific amplification PCR ด้วยไพรเมอร์ XAC01 และ XAC02 (Coletta-Filho, 2006) ช่องที่ 1 และ 25 คือ 100 bp marker; ช่องที่ 2-11 แสดง PCR product ของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จาก จ.สมุทรสาคร; ช่องที่ 12-15 แสดงผลของเชื้อจาก จ. นครราชสีมา; ช่องที่ 16-20 แสดงผลของเชื้อจาก จ.พิจิตร; ช่องที่ 21-23 แสดงผลของเชื้อสายพันธุ์อื่น คือ *E. coli*, *Sinorhizobium* และ *Agrobacterium* ตามลำดับ; ช่องที่ 24 คือ negative control



รูปที่ 10 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนด้านทาน P๑ ในมะนาวสายพันธุ์แป้น (Pt๑_r[Pan] และ Pt๑_R[Pan]) น้ำหอม (Pt๑_R1[Nam Hom] และ Pt๑_R2[Nam Hom]) และพีจิตร์ (Pt๑_R1 and R2[M33]) เทียบกับ โปรตีนด้านทานจาก *C. grandis* x *P. trifoliata* Pt๑, Pt11 (Deng et al., 2000), *C. triloliata* RGA 24 (Shen et al., 2004), RPP5 (Noel et al., 1999), tobacco N (Witham et al., 1994), *Arabidopsis* RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) และ flax L6 (Lawrence et al., 1995) กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่ง Consensus kinase-2 และ kinase-3a motifs และวงกลมแสดงตำแหน่งอะมิโนแอซิคบนโปรตีน P๑-r[Pan] ในแป้นที่แตกต่างจากโปรตีนด้านทานในกลุ่ม Non-TIR-NBS-LRR



รูปที่ 11 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีนด้านทาน Pt14 ในมะนาวสายพันธุ์แป้น (Pt14_r[Pan] และ Pt14_R[Pan]) น้ำหอม (Pt14_R1 and R2[Nam Hom]) และพีจีตร (Pt14_R1 and R2[M33]) เทียบกับ โปรตีนด้านทานจาก *C. grandis* x *P. trifoliata* Pt14 (Deng et al., 2000), RPP5 (Noel et al., 1999), tobacco N (Witham et al., 1994), *Arabidopsis* RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) และ flax L6 (Lawrence et al., 1995) กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่ง Consensus kinase-2 และ kinase-3a motifs และวงกลมแสดงตำแหน่งอะมิโนแอซิคบนโปรตีน Pt14-r[Pan] ในแป้นที่แตกต่างจาก โปรตีนด้านทานในกลุ่ม TIR-NBS-LRR



รูปที่ 12 ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนด้านทาน 16R1-19 ในมะนาวสายพันธุ์แป้น (16R1-19_r[Pan] และ Pt14_r[Pan]) น้ำหอม (16R1-19_R1 and R2[Nam Hom]) และพีจิตร (16R1-19_R1 and R2[M33]) เทียบกับโปรตีนด้านทานจาก *C. grandis* x *P. trifoliata* 16R1-19, 16R1-13 (Deng et al., 2000), *C. triloliata* RGA 12 RGA 20, RGA21(Shen et al., 2004), RPP5 (Noel et al., 1999), tobacco N (Witham et al., 1994), *Arabidopsis* RPS2 (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) และ flax L6 (Lawrence et al., 1995) กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่ง Consensus kinase-2 และ kinase-3a motifs และวงกลมแสดงตำแหน่งอะมิโนแอซิคบนโปรตีน 16R1-19-r[Pan] ในพื้นที่แตกต่างจากโปรตีนด้านทานในกลุ่ม Non-TIR-NBS-LRR

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(3) 1-7 doi: 10.5376/mp.2011.02.0003

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (Oral presentation). Citrus Canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Resistance Gene Analogous (16R1-19/*Tru11*) in Thai Hybrid Lime (M33). Proceeding of the 3rd Graduate conference Suranaree University of Technology 21-23 November 2010

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (oral presentation). Resistance gene analogous (14/*Bfa1*) linked to citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) resistance in Thai hybrid lime (M33). Proceeding of the 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology at Pattaya, Thailand 4-6 October 2010 pp 12-16





Comparison Between Serological And Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)

Pongpan Songwattana ^{1✉}, Mariena Ketudat-Cairns ^{1,2✉}

1. School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

2. Embryo and Stem cell Research Center, Suranaree University of Technology (SUT), 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

✉ Corresponding author; ketudat@sut.ac.th; ✉ Authors

Molecular Pathogens 2011, Vol 2 No 3 DOI: 10.5376/mp.2011.02.0003

Received: 25 May, 2011

Accepted: 21 Jun., 2011

Published: 01 Jul., 2011

This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Preferred citation for this article as:

Songwattana and Ketudat-Cairns, 2011, Comparison between serological and molecular detection of citrus canker pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), Molecular Pathogens, Vol.2 No.3 (doi: 10.5376/mp.2011.02.0003)

Abstract The specificity and sensitivity of serological and molecular tools for the detection of citrus canker pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; *Xac*) were investigated and compared. Virulence *Xac* BP210 was used as antigen for antisera production. The sensitivity of 1:2,000 diluted antisera were at 10^6 CFU/mL for live cell and 10^5 CFU/mL for dead cells. The cross-reaction of the antisera was observed only with *X. campestris* pv. *vesicatoria* but not other *Xanthomonas* nor other unrelated bacteria tested. Molecular tool was performed using specific primer to the *rpf* gene on *Xac*. The PCR amplification indicated that, all *Xac* isolates amplified a product of 581 bp which was not seen in other *Xanthomonas* sp. and unrelated bacteria tested. The sensitivity of these specific primers was down to at least 1 cell which was effective to detect the pathogen in both infected symptomatic and asymptomatic lime tissues. The serological tool was able to detect the pathogen only on infected leaves of day 4 post inoculation when the symptoms were already detected by eye. The serological tool can be used to detect and quantify the present of *Xac* to study the disease development on symptomatic tissues.

Keywords Serological tool; Citrus canker; Antiserum; Pathogen detection

Background

Citrus canker is one of the serious diseases in citrus and some citrus relatives. This disease has been caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) bacteria or *Xac* pathotype A (*Xac*-A) which is the most wide spread pathogen in Asia and other citrus growing areas (Verniere et al., 1998). Most commercial citrus including Mexican lime, grapefruits and commercial lime in Thailand (Pan lime) are susceptible host for *Xac*. This pathogen can infect leaves, twigs and fruits through stomata and wounds (Graham et. al., 2004). Moreover, this disease directly reduce fruit quality and quantity of yield by defoliation, blemished fruit, premature fruit drop, die-back of twigs and general debilitation of the tree (Das, 2003). Normally, the pathogenic bacteria can survive from one crop season to the next as latent infection in propagation organs or epiphytic populations on plant surfaces. The equipments for harvesting are also the cause of disease spread (Graham et al., 2000). Therefore, the method

for their early detection is necessary. Currently, many methods have been developed and are available in laboratories. Polymerase chain reaction (PCR) method is a high sensitive detection method (Cubero et al., 2001) but, it requires laboratory equipments and specialized training. In contrast, immunodiagnostic test kit is an easy method to use at the site where disease is suspected. It does not require neither special equipment nor training to perform the detection. The immunodiagnostic test is based on the ability of an antibody to recognize and bind to a specific antigen, a substance associated with the plant pathogen. This method is known as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In this study the specificity and sensitivity of serological and molecular tools for the detection of citrus canker pathogen (*X. axonopodis* pv. *citri*) were investigated and compared.

1 Results and discussions

1.1 Bacteria isolation and pathogenicity test

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) was isolated



from lesion lime leaves. Total of nineteen bacterial isolates were isolated from three different regions in Thailand; Banpaew, Samut Sakhon, Nakhon Ratchasima and Phichit. All bacterial isolates were initially selected on KCD semi-selective medium. The Gram stain indicated that, all isolates were Gram-negative rod bacteria (data not shown). The bacterial isolates were also confirmed the strain by *Xac* specific primers (Coletla-Filho, 2006). The PCR results indicated that, 12 (included 10 isolated from Samut Sakhon (BP102, BP104, BP105, BP107, BP109, BP201, BP202, BP203, BP205 and BP210) and 2 isolates from Phichit (PJ01 and PJ03) contained the 581 bp *Xac* regulation

of pathogenicity factors (*rpf*) gene fragments which encoded pathogenicity effector protein (Coletla-Filho, 2006). But this gene was not detected in samples from Nakhon Ratchasima (K01, K02, SUT02 and SUT06) and unrelated bacteria such as *E. coli*, *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* that were used as negative control (Figure 1). These primers were also not able to produce specific PCR product from *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *glycine*, *X. oryzae* pv. *oryzae* template (Figure 2). Non-target DNA bands were detected in isolated from Nakhon Ratchasima and some from Phichit (Figure 1).

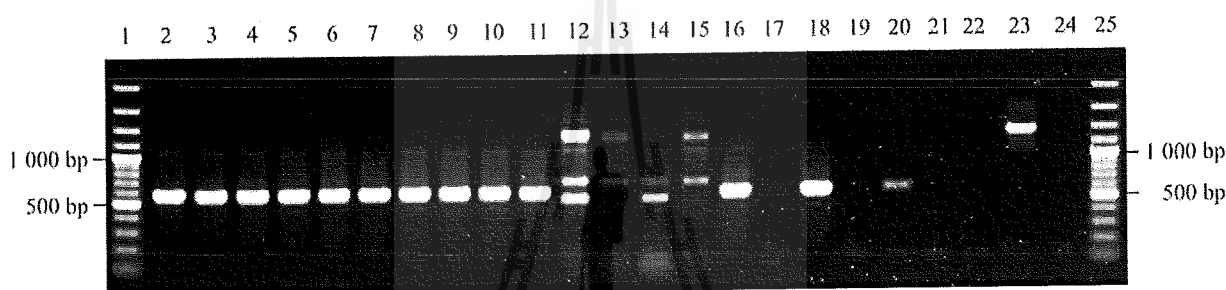


Figure 1 Specific amplification of *Xac* target (581 bp fragment) using XAC01 and XAC02 specific primers

Note: Lanes 1 and 25: 100 bp DNA ladder (NEB); Lanes 2~11: Bacterial isolated from Samut Sakhon (BP); Lanes 12~15: Nakhon Ratchasima (SUT02, 06 and K01, 02); Lanes 16~20: Phichit (PJ01~05); Lanes 21~23: Unrelated bacteria consist of *E. coli*, *Sinorhizobium* and *Agrobacterium*, respectively; Lane 24: Water control

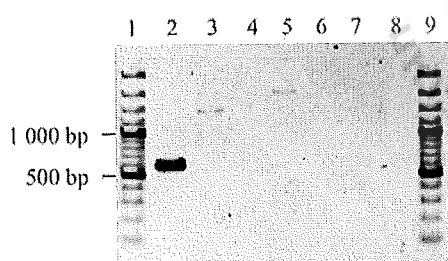


Figure 2 Specific amplification of *Xac* target by PCR. Lane 1 and 9: 100 bp marker (NEB); Lane 2: *X. axonopodis* pv. *citri* (BP210); Lane 3: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; Lane 4: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; Lane 5: *X. campestris* pv. *campestris*; Lane 6: *X. axonopodis* pv. *glycine*; Lane 7: *X. oryzae* pv. *oryzae*, respectively; Lane 8: negative control.

The bacterial isolates were inoculated to both susceptible (Pan) and resistance limes (Nam Hom and M33) for pathogenicity test. Ten bacterial isolates from Samut Sakhon and 2 isolates from Phichit could infect both susceptible and resistance lime tested.

These 12 pathogenic bacteria should be *Xanthomonas* species since the *Xac* specific genes product were observed and they can infect limes. The lesion caused by isolated BP104 and BP210 on both susceptible (Pan) and resistance limes (Nam Hom and M33) slowly turned brown after 3 week post-infection. The BP104 and BP210 isolates seem to be virulence pathogenic bacteria. These two virulence pathogenic bacteria were identified by 16S rRNA gene sequencing. The accession number HQ875739 and HQ875740 were obtained. The 16S rRNA gene sequences confirmed that both strains were *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). In this experiment, *Xac* BP210 isolate was used as bacterial antigen for further antibody production.

1.2 Serological studies

1.2.1 Determination of antiserum titer

Antisera were raised from dead cells of *Xac* BP210 in two New Zealand white rabbits. The titer of *Xac*

Molecular Pathogens

MP2011, Vol.2, No.3 <http://mp.sophiapublisher.com>



BP210 antisera were determined by indirect ELISA. Serial dilutions of the antisera up to 1:16,000 were reacted with dead and live cells of *Xac* BP210 at 10^4 – 10^6 CFU/mL. The suspension of *E.coli* at 10^5 CFU/mL and pre-immune sera were used as negative control. The results showed that, 1:4,000 or lower dilutions of both antisera were able to detected dead cells of *Xac* at 10^5 CFU/mL or more. Whereas, 1:2,000 diluted antiserum were reactive against live cells of 10^6 CFU/mL and dead cells at 10^5 CFU/mL or more. The highly concentrate antiserum (1:1,000

dilution) strongly reacted against both live and dead cells (10^5 CFU/mL) of *Xac*. However, antiserum 1 showed stronger reaction than antiserum 2 (Table 1). These results indicated that, at least 1:2,000 dilution of these antisera were able to detected dead cell of *Xac* at 10^5 CFU/mL and live cells at 10^6 CFU/mL. Nevertheless, dead cells of bacteria showed stronger reaction with antisera than live cells. Since these antisera were produced from injection with heat killed cells which might have broken some cells.

Table 1 ELISA for antiserum 1 and antiserum 2 titer test

Antiserum dilution	Cell status	<i>Xac</i> (CFU/mL)	Antiserum 1		Antiserum 2	
			A ₄₀₅	Reaction	A ₄₀₅	Reaction
1:1,000	Live	10^6	0.25	+ ^a	0.20	+
		10^5	0.20	+	0.18	+
		10^4	0.01	- ^b	0.12	-
	Dead	10^6	0.74	+	0.69	+
		10^5	0.24	+	0.22	+
		10^4	0.12	-	0.14	-
1:2,000	Live	10^6	0.20	+	0.18	+
		10^5	0.15	-	0.12	-
		10^4	0.10	-	0.11	-
	Dead	10^6	0.75	+	0.64	+
		10^5	0.21	+	0.18	+
		10^4	0.11	-	0.12	-
1:4,000	Live	10^6	0.16	-	0.12	-
		10^5	0.12	-	0.11	-
		10^4	0.09	-	0.11	-
	Dead	10^6	0.67	+	0.61	+
		10^5	0.19	+	0.16	-
		10^4	0.11	-	0.11	-
1:8,000	Live	10^6	0.12	-	0.10	-
		10^5	0.11	-	0.10	-
		10^4	0.09	-	0.10	-
	Dead	10^6	0.53	+	0.51	+
		10^5	0.17	-	0.14	-
		10^4	0.10	-	0.10	-
1:16,000	Live	10^6	0.10	-	0.09	-
		10^5	0.10	-	0.09	-
		10^4	0.09	-	0.09	-
	Dead	10^6	0.43	+	0.43	+
		10^5	0.16	-	0.13	-
		10^4	0.11	-	0.09	-

Note: Different antisera dilutions were used to detect live and dead cells of different concentrations of *Xac* suspension; Pre-immune serum reaction and *E. coli* at 10^5 CFU/mL was used as negative control; 100 μ L of the cells were used in each well; ^a: The positive result (+) was indicated when A₄₀₅ was greater than twice of the negative control; ^b: The negative reaction (-) was indicated when A₄₀₅ was lower than twice of the negative control



1.2.2 Sensitivity of *X. axonopodis* pv. *citri* detection

Antiserum 1 and antiserum 2 at the dilution of 1:2,000 were tested for the sensitivity with live and dead cells of BP210 at different concentrations (10^3 ~ 10^8 CFU/mL). The positive result is the number which is at least double the reaction intensity of negative control (10^6 CFU/mL of *E. coli* and pre-immune serum reaction). The bacterial suspension of live cells at 10^6 CFU/mL and dead cells at 10^5 CFU/mL showed positive reaction in ELISA (Table 2). Stronger reaction can be observed with the increase of bacterial densities in both antisera tested. Both antisera have the sensitivity of detection at 10^6 CFU/mL for live cell

and 10^5 CFU/mL for dead cells. The sensitivity of ELISA for *X. axonopodis* pv. *citri* (Jin et al. 2001), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (de Leon et al., 2008), *C. michiganensis* subsp. *Sepedonicus* and *Erwinia amylovora* (Kokoskova and Mraz, 2008) have also been reported to be at the level of 10^5 ~ 10^6 CFU/mL. The detection efficiency of ELISA is limited by the level of the pathogen population and dependent upon the immunological properties of the antiserum used. The antisera produced in this study have the sensitivity as high as those produced in other reports.

Table 2 Sensitivity of ELISA in detecting live and dead cells of *Xac* BP210

Antiserum	Cell status	<i>Xac</i> BP210 antigen (CFU/mL)						
		10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	<i>E. coli</i> 10^6
Antiserum 1 (1:2,000)	Live	1.30	0.69	0.23	0.15	0.10	0.10	0.09
	Dead	1.99	1.63	0.74	0.21	0.12	0.10	0.09
Antiserum 2 (1:2,000)	Live	0.54	0.47	0.18	0.12	0.10	0.10	0.09
	Dead	0.80	0.76	0.63	0.18	0.10	0.10	0.09

Note: The A_{405} is shown; 100 μ L of the cells were used in each well

1.2.3 Cross-reaction of antiserum to other *Xanthomonas* sp.

Antisera dilutions (1:1,000 and 1:2,000) were tested for the cross-reactivity against live cells of other five *Xanthomonas* sp. and *E. coli* at 10^6 CFU/mL. The results in Table 3 showed that, dilution of 1:1,000 antisera strongly cross-react against *X. axonopodis* pv.

vesicatoria and weakly reacted against *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *campestris*. While, more diluted antisera (1:2,000) cross-reacted with only *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* but not with others *Xanthomonas* (Table 3). These results suggested that, antisera diluted to 1:2,000 are the suitable condition for detection of lived target bacteria of at least

Table 3 Sensitivity of ELISA in detecting live and dead cells of *Xac* BP210

Bacterial strain tested (10^6 CFU/mL)	Diluted antiserum			
	Antiserum 1		Antiserum 2	
	(1:1,000) (%)	(1:2,000) (%)	(1:1,000) (%)	(1:2,000) (%)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (BP210) (Positive control)	100 ^a	100	100	100
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	100	91	80	85
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	33	0	39	0
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	47	0	27	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycine</i>	0	0	0	0
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (Negative control)	0	0	0	0

Note: a: $\{[A_{405}$ of each *Xanthomonas* species - A_{405} of negative control] / [A_{405} of positive control - A_{405} negative control]} \times 100



10^6 CFU/mL or 10^5 cell/well. Although, these antisera showed cross-reactivity with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* but this bacterium does not infect citrus plant. They only infect tomato and *Capsicum* pathogen (Mirik and Aysan, 2009). Therefore, the cross-reaction detection should not be of alarm. The antigenic molecules from the normal cell surface components are often including in polyclonal antibodies (or antiserum). This mixing of antibodies has multiple specificities and cross-reactivities with unrelated bacteria species. This study attempt to diluted multiple specific antibodies and retain dominant antibodies which showed acceptable specificity for a given pathogen.

Many studies reported that, the ELISA sensitivity 10^5 ~ 10^6 CFU/mL is sufficient for identification of bacteria pathogens from symptomatic plants and colonies on selective media (Jin et al., 2001; Alvarez, 2004; de Leon et al., 2008; Kokoskova and Mraz, 2008). However, boiling the bacteria samples could improve the sensitivity of detection. Several previous reports have mention that using extraction buffer containing EDTA and lysozyme to removed cell surface component could improve the sensitivity of ELISA detection (Jones et al., 1997, Alvarez, 2004). However, EDTA was not used in this study but the sensitivity of detection was still high.

1.2.4 Detach leaf assay

Different concentrations of canker bacteria (10^7 , 10^6 and 10^5 CFU/mL) were inoculated to Pan lime leaves using detach leaf assay. The pathogen on the infected leaves was detected by ELISA method every 2 days post inoculation. The results showed that, infected leaves on the first day of inoculation (day zero) showed negative reactions in ELISA test whether the bacterial cells were killed by heat treatment or not (Table 4). The inoculation of this experiment were 20 μ L of bacterial suspensions dropped on each area. Thus, bacteria populations on the leaves were 10^5 , 10^4 and 10^3 cells on the inoculated leaves area. The sensitivity of the ELISA (10^5 CFU/mL or 10^4 cells/well for dead cells) should be sufficient for detection of dead cells. However, protein or other polysaccharide molecules from the leaf may interfered with the bacteria binding to the plate therefore, low detection of target bacteria

were observed.

Infected leaves on day two showed positive reaction when the leaves were inoculated with 10^5 cells. Consequently, infected leaves 4 days post inoculation showed positive reaction with all bacteria concentration (10^5 , 10^4 and 10^3 cells) whether the cells were boiled or not. The boiled bacteria (dead cell) from infected leaves showed higher reaction in ELISA test than lived cells. These results were in accordance with the results of antibody titer and sensitivity test (Table 1 and Table 2). After day 4 post inoculation, symptoms on the infected areas were observed as slightly raised blister-like lesions. Thus, these results indicated that, ELISA assay is a well-established method for identification of bacterial pathogens from symptomatic plants. However, enrichment techniques can enhance ability of pathogen detection (Jin et al., 2001) on natural samples but more time is needed for the culturing period.

1.2.5 Molecular detection of *Xac* from canker lesions

Canker pathogen on symptom and non-symptom plant materials (leaf and twig) in infected areas were detected by PCR amplification using *Xac* specific primers. The results showed that, the *Xac* specific PCR products were detect in all samples of symptom plant materials and some non-symptom plant materials (Table 5).

These specific primers were also used to detect canker pathogen on infected leaves from the detach leaf experiment. The results showed that, canker pathogen were detected by these specific primers on the first day of inoculation while ELISA was unable (Table 4). The amplification assay using specific primers have been reported to detect at low pathogen population (10^2 ~ 10^3 CFU/mL) (Cubero et al., 2001, Cubero and Graham, 2002, Coletla-Filho 2006, Park et al., 2006, Golmohammadi et al., 2007, de Leon et al., 2008). The sensitivity of PCR amplification of this study showed very high sensitivity at 10^3 CFU/mL or 1 cell in the PCR reaction (Figure 3). Moreover, this methodology showed no cross-reactivity with other Xanthonomas species (Figure 2). However, PCR method required laboratory equipment, special reagents and skill to perform.



Table 4 ELISA detection of bacteria on infected leaf using detached leaf assay

Day after inoculation	Initial bacteria density (CFU)	Replication						PCR detection (XAC specific primers)
		Living cell			Dead cell			
		1	2	3	1	2	3	
0	10 ⁵	-	-	-	-	-	-	+
	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	+
	10 ³	-	-	-	-	-	-	+
2	10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	+
	10 ³	-	-	-	-	-	-	+
4	10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁴	-	+	+	+	+	+	+
	10 ³	-	+	+	+	+	+	+
6	10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+
8	10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+
10	10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+

a: The positive result (+) was indicated when A₄₀₅ was greater than twice of the negative control (-)

Table 5 *Xac* specific amplification of canker pathogen from symptom and non-symptom plant materials

Day after inoculation	No. of plants in plant status		PCR detection(%) ^a	
	Symptom	Non-symptom	Symptom	Non-symptom
Plant materials	10	10	100%	40%
Leaf	6	6	100%	33%

Note: a: [number of sample that can be detect by *Xac* primers/total samples tested] × 100

2 Conclusion

The sensitivity and specificity of serological and molecular tools have been investigated. The molecular tool is more effective than serological tool due to the high sensitivity (at least 1 cell) and specificity. Therefore, molecular detection able to detect the present of pathogen in infected leaf even before the appearance of symptom. However, serological test from this study was not inferior to other reports and

sufficient for pathogen detection from symptomatic tissue.

3 Materials and Methods

3.1 Isolation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*)

Infected lime leaves from three different regions in Thailand; Samut Sakhon, Nakhon Ratchasima and Phichit which are about 300~500 km apart were used in this study. Different *Xac* isolates were isolated from

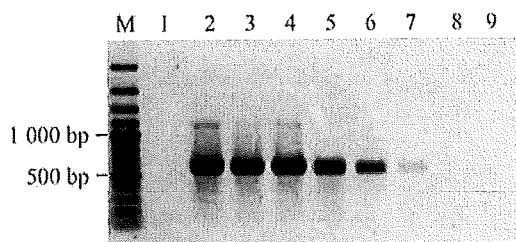


Figure 3 *Xac* specific PCR amplification from a tenfold dilution series of *X. axonopodis* pv. *citri* cultured cells. M: 100 bp marker (NEB); Lane 1: negative control; Lanes 2-7: 10^5 cells, 10^4 cells, 10^3 cells, 10^2 cells, 10^1 cells and 1 cell; lanes 8-9: <1 cell respectively.

infected lime leaves tissue by commonly used methods (OEPP/EPPO, 2005). Briefly, the infected leaves were washed with sterile water and surface sterilize by soaked in 1% sodium hypochlorite for 3 min. Then, the lesions were rinsed in sterile water several times and excised with scalpel. *Xac* isolates were initially selected by streaked the water-soak tissue from the lesion margins on sterile semi-selective media (KCD medium, nutrient agar (NA) supplemented with Kasugamycin (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Cephalexin (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Daconil (Chlorothalonil) (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) prior to enrichment on NA media without antibiotics. The bacteria were grown at 28°C for 24-48 h. The bacterial colonies were collected for Gram staining and further used for pathogenicity tests.

Other *Xanthomonas* strains include *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *glycine*, *X. oryzae* pv. *Oryzae* obtained from Chulabhorn Research Institute (CRI, Thailand) were used as negative control in strain identification and cross-reaction tests.

3.2 Specific primers identification and 16S rRNA gene sequencing

Single colony of *Xac* isolates and other *Xanthomonas* strains were resuspended in 1 mL DI-water and boiled for 10 min. Then, the suspensions were used as template for PCR reaction, with specific XAC01 and XAC02 primers for *Xac* identification (Coletta-Filho, 2006). The PCR reactions were performed with 50 μL reaction mixture, containing 1 μL of boiled cell suspension, 1X reaction buffer (Promega GoTaq), 1.5 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$

primers (XAC01: 5'CGC CAT CCC CAC CAC CAC CAC GAC'3, XAC02: 5'AAC CGC TCA ATG CCA TCC ACT TCA'3), 1.25U *Taq* DNA polymerase (Promega). Unrelated bacterial DNA included *Escherichia coli*, *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* were also subjected to PCR reaction as negative control. PCR conditions were as followed; An initial cycle of 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 60°C for 45 s, and 72°C for 45 s, with a final step of 72°C for 5 min. The PCR products were observed under UV light after electrophoresis through 1.0% (w/v) agarose gels and stained with ethidium bromide.

The full length 16S rRNA gene of *Xac* isolates BP104 and BP210 were sequenced by Macrogen (Korea) (<http://dna.macrogen.com/eng/>). The sequence results were applied to BLAST program for gene comparison with data in the GenBank (NCBI).

3.3 Pathogenicity test

3.3.1 Plant samples

M33 hybrid limes (highly resistant to canker) were from Phichit horticulture research center, Samut Sakorn and Prachinburi (Thailand), Nam Hom limes (highly resistant to canker) were from Phichit horticulture research center and Pan limes (susceptible to canker) were from Samut Sakorn. These lime plants were planted in the test field at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

3.3.2 *Xac* Inoculation on resistance and susceptible limes

Half of the M33, Nam Hom and Pan limes leaves were wounded with needles and celite, the other halves were not wounded (healthy). 1 mL of the bacterial isolate suspension (10^8 CFU/mL) was sprayed on the leaves. The plants were then covered with plastic bags overnight. In the morning, the bags were removed and the plants were left in natural condition for 2-3 weeks. The virulent canker disease apparent on each leaf was evaluated.

3.4 Serological studies

3.4.1 Preparation of antigen

Antigen was prepared from the cells of *Xac* isolate BP210. The bacterial cells were enriched on NB



(nutrient broth) at 28°C for 48 h. The bacterial cells were collected by low-speed centrifugation (4,200 xg) and washed once in sterile 0.85% NaCl. The bacterial suspension was adjusted spectrophotometrically to A₆₀₀ 0.2 (about 10⁸ CFU/mL) and heated to 85°C for 15 min. The killed cell suspension was used as antigen for antiserum production.

3.4.2 Antiserum production

Antiserum against *Xac* (BP210) was prepared using two New Zealand white female rabbits. 1 mL of antigen mixed with Freund's complete adjuvant (1:1 v/v) was immunized to each rabbit by subcutaneous injection on the first day. Then, 1 mL of antigen (mixed with Freund's incomplete adjuvant (1:1 v/v)) was injected subcutaneously 7 day later. After that, 1 mL of bacterial antigen without adjuvant was injected intravenous on day 14 and day 21. One week after the last injection, the blood was drawn from the central ear artery then kept in refrigerator overnight. The antiserum was clarified by centrifugation at 3,000 xg for 15 min at 4°C and stored at -80°C for future use. This antiserum was used for indirect ELISA assay for the antibody titer, the sensitivity and the cross reaction of the antiserum. The pre-immune serum was bleed before immunization to use as negative control in the ELISA assay. Absorbance values of at least double of the control were considered positive (OEPP/EPPO, 2005).

3.4.3 Indirect ELISA assay

The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as described by Alvarez et al. (1991). The bacterial concentrations were adjusted from 10³~10⁸ CFU/mL in 0.05 mol/L carbonate coating buffer (0.015 mol/L Na₂CO₃, 0.035 mol/L NaHCO₃, 0.003 mol/L NaN₃; pH 9.6). Half volume of each diluted bacterial suspension were treated at 85°C for 15 min to kill the cells and used as dead cells antigen. 100 µL of each diluted bacterial suspensions (both live and dead cells antigen) were coated in microtiter plate well at 4°C overnight. The plate was washed three times with phosphate buffer saline+0.05% Tween20 (PBST) and 200 µL of 2% skim milk were added and incubated for 1 h at 37°C. Then, the plates were washed as mentioned earlier and 100 µL of diluted antiserum were added to the wells. The ELISA plates were incubated at 37°C for 1 h then,

three times washing were performed. Goat anti-rabbit gamma globulin conjugated to alkaline phosphatase (whole molecule, enzymatic activity 1 mg/mL) obtained from Sigma Chem. Co St Louis, Mo (Production#F0382) was diluted to 1:10,000 and 100 µL was added in each well, followed by 1 hour incubation at 37°C. The wells were repeatedly washed and 100 µL of enzyme substrate (1 mg/mL p-Nitrophenyl-phosphate (PNPP) in 10 mmol/L Diethanolamine; Thermo Scientific#34047) were added in each well. The reaction were stopped by adding equal volume of 0.75 mol/L NaOH and the O.D. at 405 nm were measured after 15-30 min incubation in the dark at room temperature. The live and dead cells of *E. coli* (10⁶ CFU/mL) and pre-immune serum were used as negative control.

3.4.4 Antibody titer and sensitivity tests

The antiserum was diluted to different dilution (1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000 and 1:1,600 v/v) in conjugate buffer (2% polyvinyl pyrrolidone (PVP)+2% oval albumin in PBST) and tested with both live and dead cells of bacterial antigen (10⁴~10⁸ CFU/mL) by indirect ELISA assay to test the titer of the antiserum. For sensitivity testing, the 1:2,000 (v/v) diluted antiserum was used to test both live and dead cells of bacterial antigen (10³~10⁸ CFU/mL *Xac* BP210) by indirect ELISA assay as described above. All experiments were done in duplicated and repeated at least 3 different times.

3.4.5 Cross-reaction test

The antiserum was diluted to 1:2,000 (v/v) and used to test the cross reactivity with other *Xanthomonas* bacteria at the concentration of 10⁶ CFU/mL by indirect ELISA assay as described above. The percent of cross-reaction was calculated by; {[A405 of each *Xanthomonas* species-A405 of negative control] / [A405 of positive control-A405 negative control]} × 100.

3.5 Detached leaf assay

3.5.1 *Xac* inoculation

Full expanded young leaves of lime were washed in running tap water and surface sterilized in 1% sodium hypochlorite for 1~4 min. The leaves were aseptically rinsed thoroughly with sterile distilled water. Each leaf was divided into 4 parts for treatment separation,



included 10^5 , 10^6 and 10^7 CFU/mL infected parts and one uninfected part. Each part of the leaf was wounded by puncturing with a small needle, through the lower surface (5 needle punctured wounds per part). Each wounded leaf was placed on 1% water agar in a Petri dish, with the back of the leaf up. 20 μ L of the different diluted bacterial suspension (10^5 – 10^7 CFU/mL *Xac* BP210) were dropped on each part of the wounded leaf. The part of uninfected leaf, 20 μ L of sterile 0.85% NaCl was dropped to use as negative control. The infected leaves were maintained in an incubator at 28°C.

3.5.2 Serological detection of *Xac* in inoculated lime tissues

The canker pathogen on each part of the infected leaf was detected by ELISA method. The leaf was aseptically cut and each part of the infected leaf was ground in 150 μ L coating buffer. 100 μ L of leaf extract was coated in one microtiter plate well and incubated at 4°C overnight before detection with 1:2000 (v/v) diluted antiserum as mention above.

3.6 Molecular studies using specific primers

The sensitivity of PCR amplification was performed with *Xac* isolate BP210 in tenfold dilution series (10^8 – 10^1 CFU/mL in 0.85% NaCl). 1 μ L of each dilution was used as template in the PCR reaction. The detection of *Xac* in inoculated lime tissue was also performed in *Xac* specific PCR amplification as described above.

3.7 Canker detection from field samples

Symptom and non-symptom plant materials (leaf and twig) from Pan, Nam Hom and M33 limes were taken from the field and washed in 25 mL 0.85% NaCl and shaken for 30 min. Then, the plant material was removed, and the washing solution was boiled for 10 min. 1 μ L of the boiled washing solution were used as template for specific primers (XAC01 and XAC02) amplification. The PCR condition was performed as described above. The *Xac* BP210 isolate was used as positive control. The detection results of inoculated tissue were demonstrated as percentage (% detection), calculated by; [number of sample that can be detect by *Xac* primers/total samples tested] \times 100.

Author contributions

PS carried out all experiments as her M.Sc. Thesis work. She also drafted the manuscript. MKC was the PI of the lab. She conceived the study, participated in the experimental design, coordinated, drafted and edited the manuscript. Both authors have read and proved the final manuscript.

Acknowledgments

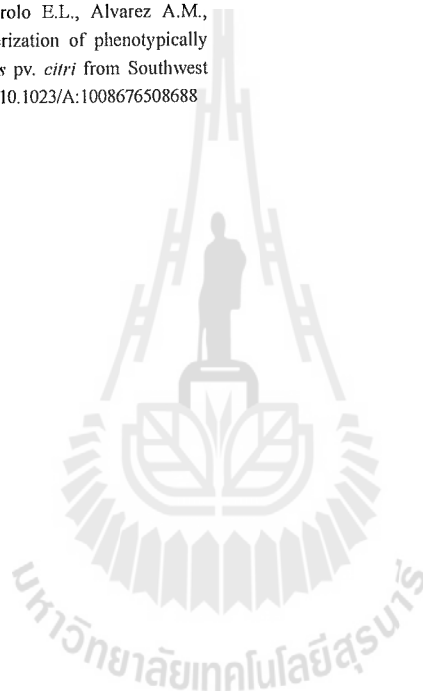
S. Loprasert (CRI) is thanks for the *Xanthomonas* reference strains. PS was supported by SUT scholarship. This research was funded by SUT Research and Development Fund.

References

- Alvarez A.M., 2004, Integrated approaches for detection of plant pathogen bacteria and diagnosis of bacterial diseases, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 339-366 doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140329 PMID:15283670
- Alvarez A.M. Benediet A.A., Mizumoto C.Y., Pollard L.W., and Civerolo E.L., 1991, Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. pv. citrumelo* with monoclonal antibodies, *Phytopathol.*, 81: 857-865 doi:10.1094/Phyto-81-857
- Coletta-Filho H.D., Takita M.A., Souza A.A., de Neto J.R., Destefano S.A.L., Hartung J.S. and Machadoet M.A., 2006, 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.*, 100(2): 279-285 doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02787.x PMID:16430504
- Cubero J., Graham J.H., and Gottwald T.R., 2001, Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6): 2849-2852 doi:10.1128/AEM.67.6.2849-2852.2001 PMID:11375206 PMID:92950
- Cubero J., and Graham J.H., 2002, 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.*, 68(3): 1257-1264 doi:10.1128/AEM.68.3.1257-1264.2002 PMID:11872476 PMID:123760
- Das A.K., 2003, Citrus canker - a review, *J. Appl. Hort.*, 5(1): 52-60
- EPPO/EPPO, 2005, Diagnostic: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*., *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 35: 271-273
- Golmohammadi M., Cubero J., Peñalver J., Quesada J.M., López M.M., and Llop P., 2007, Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods, *J. Appl. Microbiol.*, 103(6): 2309-2315 doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03484.x PMID:18045415
- Graham J.H., Gottwald T.R., Cubero J. and Achor D.S., 2004, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker, *Mol. Plant Pathol.*, 5(1): 1-15 doi:10.1046/j.1364-3703.2004.00197.x PMID:20565577
- Graham J.H., Gottwald T.R., Riley T.D., Cubero J. and Drouillard D.L., 2000, Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (*Xcc*) on various surfaces and chemical control of Asiatic Citrus Canker (ACC), *Processing of the International Citrus Canker Research Workshop*, June 20-22, 2000, Ft. Pierce, Florida, pp.7
- Jin K.S., Kang I.B., Ko K.I., Lee E.S., Heo J.Y., Kang Y.K., and Kim B.K., 2001, Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on citrus fruits using Enzyme-Linked Immunosorbent assay, *J. Plant Pathol.*, 17(1): 62-66
- Jones J.B., Somodi G.C., and Scott J.W., 1997, Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in leaf tissue, *J. Appl. Microbiol.*, 83(4): 397-401 doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00251.x PMID:9351221
- Kokoskova B., and Mraz I., 2008, Reliability of diagnostic techniques for



- Erwinia amylovora* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*, *Zemdirbyste-Agr.*, 95(3): 270-276
- de Leon L., Rodriguez A., Lopez M.M. and Siverio F., 2008, Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds, *J. Appl. Microbiol.*, 104(3): 776-786 doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03595.x PMID:17927739
- Mirik M. and Aysan Y., 2009, Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seed in Turkey, *J. Plant Pathol.*, 91(2): 433-436
- Park D.S., Hyun J.W., Park Y.J., Kim J.S., Kang H.W., Hahn J.H. and Go S.J., 2006, Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences, *Microbiol. Research*, 161(2): 145-149 doi:10.1016/j.micres.2005.07.005 PMID:16427518
- Verniere C., Hartung J.S., Pruvost O.P., Civerolo E.L., Alvarez A.M., Maestri P. and Luisetti J., 1998, Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia, *Eur. J. Plant Pathol.*, 104(5): 477-487 doi:10.1023/A:1008676508688



Reasons to publish in BioPublisher A BioScience Publishing Platform

- ★ Peer review quickly and professionally
- ☆ Publish online immediately upon acceptance
- ★ Deposit permanently and track easily
- ☆ Access free and open around the world
- ★ Disseminate multilingual available

Submit your manuscript at: <http://bio.sophiapublisher.com>

**Citrus Canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Resistance Gene
Analogous (16R1-19/*Tru*II) in Thai Hybrid Lime (M33)**

Songwattana, P and Ketudat-Cairns, M¹

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,

Suranaree University of Technology, 111 University Ave,

Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

¹ E-Mail: ketudat@sut.ac.th

Abstract

Citrus canker disease is a serious disease in citrus growing areas, including lime plantation in Thailand. Hybrid lime, M33 (Pan lime x Nam Hom lime) was developed for canker resistance. In this study, the citrus canker resistance (R) marker genes within M33 and its parents were screened by utilizing the Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) genes using PCR amplification in combination with restriction enzymes. The resistance evaluation of hybrid lime and its parents were performed by inoculation with citrus canker (*X. axonopodis* pv. *citri*) on young leaves. The hypersensitive response phenotype on hybrid lime and Nam Hom (resistance lime) confirmed that the marker 16R1-19/*Tru*II was closely linked with the citrus canker resistance gene. Furthermore, this marker gene was also found in other resistance lime (Puang). The sequence analysis indicated that, the 16R1-19 gene contained *Tru*II cutting site. The predicted 16R1-19 protein can be classified to non-TIR-NBS-LRR subfamily and belongs to resistance gene from *C. Trifoliata* (*RGC20* and *RGC21*), *C. Grandis* x *Poncirus trifoliata* (*16R1-19* and *16R1-13*) and *Arabidopsis* (*RPS2*).

Keywords: citrus canker resistance gene analogous lime M33 *X. axonopodis* pv. *citri*

ยีน 16R1-19/*Tru1I* ในมะนาวลูกผสม (M33) ที่ต้านทานโรคแคงเกอร์ ในประเทศไทย

ผ่องพรรณ ทรงวัฒนา และ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์¹
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ.มหาวิทยาลัย
ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
¹E-Mail: ketudat@sut.ac.th

บทคัดย่อ

โรคแคงเกอร์เป็น โรคที่สำคัญในพื้นที่ปลูกมะนาวในประเทศไทย มะนาวลูกผสม (M33) ได้ถูกปรับปรุงโดยศูนย์วิจัยพืชสวนพิชิตจากการผสม ระหว่างมะนาวแป้นและมะนาวน้ำหอมให้มีความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาขึ้นที่เกี่ยวข้องต่อความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสม (M33) เปรียบเทียบกับมะนาวพันธุ์พ่อและแม่ โดยเริ่มศึกษาในกลุ่มยีน Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการประเมินระดับความต้านทานของ M33 เทียบกับมะนาวแป้น (พันธุ์แม่) และมะนาวน้ำหอม (พันธุ์พ่อ) โดยการปลูกถ่ายเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ (*X. axonopodis* pv. *citri*) บนใบ พบว่า M33 และมะนาวน้ำหอม มีลักษณะการต้านทานต่อโรคโดยเกิด hypersensitive response ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลของยีน 16R1-19/*Tru1I* ว่ามีความเกี่ยวข้องต่อลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาว นอกจากนี้ ยีน 16R1-19/*Tru1I* ยังถูกพบในมะนาวพันธุ์ต้านทานอื่นด้วย (มะนาวพวง) จากการวิเคราะห์ลำดับยีนและกรดอะมิโนของ 16R1-19 พบว่ามีตำแหน่งตัด *Tru1I* บนยีน โปรตีน 16R1-19 จัดอยู่ในกลุ่ม non-TIR-NBS-LRR ซึ่งมีความใกล้เคียงกับยีนต้านทานใน *C. Trifoliata* (RGC20 and RGC21), *C. Grandis* x *Poncirus trifoliata* (16R1-19 and 16R1-13) และ *Arabidopsis* (RPS2)

คำสำคัญ: โรคแคงเกอร์ ยีนต้านทาน มะนาว M33 *X. axonopodis* pv. *citri*

Resistance Gene Analogous (*Pt14/Bfa1*) Linked to Citrus Canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Resistance in Thai Hybrid Lime (M33)

Pongpan Songwattana and Mariena Ketudat-Cairns*

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology
111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Abstract

Citrus canker disease is a serious disease in citrus growing areas, including lime plantation in Thailand. Hybrid lime, M33 (Pan lime x Nam Hom lime) have been developed for canker resistance. In this study, the citrus canker resistance (*R*) marker genes within M33 were screened by utilizing the Nucleotide binding site (NBS) and Leucine-rich repeat (LRR) genes using PCR amplification in combination with restriction enzyme compared with their parents. The resistance evaluation of hybrid lime and their parents were performed by inoculation with citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) on young leaves. The hypersensitive response phenotype on hybrid lime and Nam Hom (resistance lime) confirmed that the marker *Pt14/Bfa1* was closely linked with the citrus canker resistance gene. Furthermore, this marker gene was also founded in other resistance lime (Puang).

Keywords: citrus canker, resistance gene analogous, lime, M33, *X. axonopodis* pv. *Citri*

1. Introduction

Citrus canker (CC) is a serious disease in citrus plants and some citrus relatives, including lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Thailand. It is caused by *X. axonopodis* pv. *citri* bacteria which is globally distributed. Moreover, this disease caused losses in yield and quality annually [1]. Thus, eradication strategies of this disease were rapidly operated in infected areas by removed and destroyed all residential trees, nursery plants and commercial citrus [2]. Most limes are susceptible host for CC including Mexican lime, grapefruits and commercial lime in Thailand (Pan lime). However, some non commercial limes are resistant to this disease. Therefore, plant breeding is an alternative way that can be used to improve commercial favorable crop species to be disease resistance plant.

Resistance lime with commercially favor fruits has been successfully developed from Phichit research center (Thailand) by conventional breeding. This new resistance lime, name Phichit lime or M33 was crossed between canker susceptible Pan lime (female) and canker resistant Namhom lime (male) [3]. The breeding method was difficult, time consuming and high cost.

The development of molecular markers to identify the genes linked to the disease resistance characteristics would be helpful for further development of more resistant lime. This methodology can facilitate indirect selection of resistance plants and reduce the time required to

*Corresponding author: Tel: 66-44-224355 Fax: 66-44-224154
E-mail: ketudat@sut.ac.th, Ham0836@hotmail.com

identify resistance breeding line or segregating lines in the future. Generally, the activation of plant defense to pathogen attacks is often conferred by resistance (R) protein that controlled by R genes. These genes play important roles in improvement of crop species in the plant breeding programs and lead to understand the plant-pathogen interactions. However, the inheritance of citrus canker resistance trait is unclear, the biochemical mechanism and the number of gene loci controlling this resistance have yet to be determined.

An approach under consideration is cloning R gene analogous (RCAs), from the resistant relative which includes cloning and screening diversity of RGAs, followed by functional tests of co-segregating candidates in transgenic plant and their expression [4- 6]. Recently, many RGA sequences have been served as molecular makers for genetic mapping and molecular cloning of plant R genes for their tightly linkage or co-segregating with known disease resistant loci. The resistance (R) gene have been isolated and classified in to several classes based on the structure of their predicted protein products. The largest R gene class in plant genome is the NBS-LRR class. It comprises of P-loop, kinase-2 α , kinase-3 α and hydrophobic domain or GLPL motifs while LRR domains play an important role in protein-protein interaction [7]. Currently, a larger number of NBS-LRR genes have been cloned from different plant species using PCR base method with degenerate primers designed from the conserved domains. Deng *et al.* [8] have cloned and classified several NBS-LRR classes of RGAs sequences from citrus plant.

In this study, 12 specific primer pairs of citrus NBS-LRR class RGAs [8] were used to amplify the RGAs genes in combination with restriction enzyme to screen for canker resistance marker in hybrid lime (M33) compare with their parents.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial isolation

Xanthomonas were isolated from infected lime leaves tissue by commonly used methods [9]. Lesions were excised with a scalpel, washed with sterile water and soaked for 3 min in 10% sodium hypochlorite for surface sterilization. Then, rinsed in sterile water several times and sectioned. The bacterial isolated were initially selected by streaked water-soak tissue from the lesion margin on sterile semi-selective media (KCD medium, containing nutrient agar (NA) supplemented with Kasugamycin (16 μ g/ml), Cephalixin (16 μ g/ml) and Daconil (12 μ g/ml) before enriched on NA medium.

2.2 Plant samples

M33 (highly resistance to canker) lime were from Phichit research center, Samut Sakhon and Prachinburi (Thailand), Nam Hom (highly resistance to canker) was from Phichit research center and Pan lime (susceptible to canker) was from Samut Sakhon. These lime trees were planted in the test field at Suranaree University of Technology, Nakorn Ratchasima, Thailand.

2.3 Canker pathogen inoculation

The phenotype evaluation of the resistance and susceptible lime were performed by leaf inoculation. Lime leaves of M33, Nam Hom and Pan limes were sprayed with isolated bacterial suspension (10^8 CFU/ml) on leaves wounded with a needle and celite on half of the leaves. The other halves of the leaves (healthy) were also sprayed with the bacteria. The plants were then covered with plastic bag overnight. Then, leave in natural condition for 2-3 weeks. The virulent and characteristics of canker disease apparent on each lime cultivar were evaluated.

2.4 DNA isolation

Genomic DNA was isolated from young leaflets using the modified 2.0% (W/V) cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol [10]. Briefly, 2 grams of grounded leaf were added to 720 μ l of warm (65°C) CTAB extraction buffer (2% (w/v) CTAB, 1.4M NaCl, 20 mM, EDTA, 100 mM Tris-Cl; pH 8.0) and incubated at 60°C for 30 min with occasional gentle swirling. Then, 1 V of phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) was added to the samples and rocked gently to mix for 5-10 min. The top aqueous layer was transferred to a new tube after centrifugation at 16,000 x g for 10 min. Then, genomic DNA was precipitated by added 1/10 V of 3M sodium acetate followed by 1 V of cool isoamyl alcohol and mix gently. DNA pellet was collected after centrifugation and washed with 300 μ l of 70% ethanol. Then, DNA pellet was dried and resuspended in 50 μ l TE buffer (100 mM Tris-Cl and 1 mM EDTA; pH 8.0) and stored at -20°C. The quality and concentration of DNA were checked by agarose gel electrophoresis and nanodrop-spectrophotometer, respectively.

2.5 PCR amplification combination with restriction enzymes

Resistance gene analogous were screened by PCR amplification using 12 specific primers from Deng *et al.* [8] within individual lime cultivars (Pan, Nam Hom and M33). The PCR amplifications were performed in 25 μ l reaction volume; containing 10 mM Tris-Cl pH8.3, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M primers, 1.25U of *Taq* polymerase (Promega) and 100~150 ng genomic DNA. The initial denaturation was done at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 47 -67°C (depended on primers) and 30 min at 72°C. The final step was performed at 72°C for 5 min for the last extension. Five μ l of the PCR products were digested by 1U *Bfal* in 10 μ l reaction volume and incubated at 37°C for overnight. The PCR products and their digested products were separated on 2% agarose gels, visualized by staining with ethidium bromide and UV illumination.

3. Results and Discussion

3.1 Response to *X. axonopodis* pv. *citri* inoculation

M33 and its parents (Pan and Nam Hom) were inoculated with citrus canker bacteria on leaves. Blushed-like lesions surrounded by chlorotic halo with water-soaked were seen on Pan leaves both wounded and without wounded (Fig 1a). Whereas, the lesions on M33 and Nam Hom infected leaves were smaller and turned brown within 2 weeks post infection (Fig 1b) which is the characteristic of hypersensitive response of resistance lime.

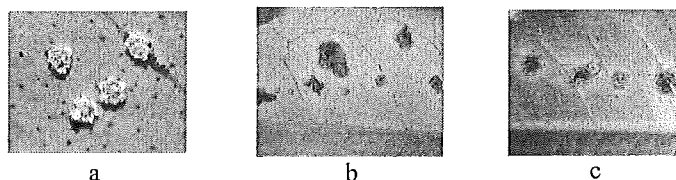


Figure 1. Canker lesion phenotype after infection with *X. axonopodis* pv. *citri*; normal canker lesions on Pan leaves (a), and hypersensitive response on M33 (b) and Nam Hom (c) infected leaves.

3.2 Citrus canker resistance gene analogous discovery

The hybrid lime (M33) and its parents (Pan and Nam Hom) were screened using 12 NBS-LRR genes specific primers in combination with restriction enzymes. The results indicated that, three specific primers with different restriction enzyme combination were closely linked to canker resistance gene within M33 and Nam Hom limes. One of this, *Pt14* NBS-LRR gene combination with *Bfa1* showed 2 bands links with the canker resistance of M33 and Nam Hom limes (Fig. 2 lane 6-9). The PCR products of *Pt14* amplification were 450 bp in all lime cultivars (Fig. 2 lane 2-4). After the PCR products were digested with *Bfa1*, 2 smaller bands of 300 and 150 bp were seen from DNA of M33 and Nam Hom limes (Fig. 2 lane 6-9) indicating that the *Pt14* bands were completely digested with *Bfa1*. These results correspond with the resistance phenotype (hypersensitive respond) of M33 and Nam Hom limes after inoculation with *Xanthomonas*. Whereas, the results of *Pt14* gene from Pan lime followed by *Bfa1* digestion showed 3 bands of 450 bp, 300 bp and 150 bp (Fig. 2 lane 5). These results indicated that, the *Pt14* amplicon from Pan lime only one allele can be digested with *Bfa1* and the other allele does not contain the *Bfa1* restriction site. Since citrus plant are diploid (2n), these results can assumed that, R_{Pt14} gene on the chromosomes of M33 and Nam Hom genomes should be two dominant *R* gene (RR_{Pt14}) that can be completely digested by *Bfa1* enzyme. Whereas, R_{Pt14} gene on Pan lime chromosomes should be one dominant *R* gene (R_{Pt14}) and one recessive *r* gene (r_{Pt14}) that cannot be digested with *Bfa1* (Fig. 3). This RR_{Pt14} gene was also founded on other resistance lime (Puang) (Fig. 2 lane 10) which confirmed the result from M33 and Nam Hom that the *Pt14/Bfa1* genotype is linked to the *Xanthomonas* resistant phenotype in lime.



Figure 2. *Pt14/Bfa1* marker gene screened on M33 and their parents (Pan and Nam Hom); M: 100 bp marker; Lane 1: negative control; Lane 2-4: PCR product of *Pt14* from Pan, Nam Hom and M33, Lane 5-10: *Bfa1* digestion of *Pt14* from Pan (5), Nam Hom (6), M33 from Phichit (7), M33 from Samut Sakhon (8), M33 from Prachinburi (9) and Puang resistant lime (10).

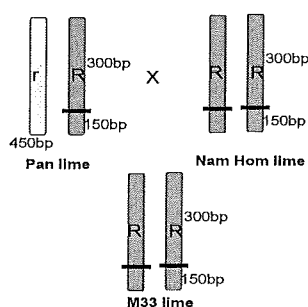


Figure 3. R_{Pt14} gene map on Pan, Nam Hom and M33 chromosomes; *r* bar refer to r_{Pt14} gene without *Bfa1* restriction site, *R* bar refer to R_{Pt14} gene with *Bfa1* restriction site (black line). Rr_{Pt14} of Pan crossing with RR_{Pt14} of Nam Hom, resulted in RR_{Pt14} on M33 genome.

4. Conclusions

The resistance phenotype evaluation confirmed that, the marker *Pt14/Bfa1* was closely linked to the citrus canker resistance gene in M33 and Nam Hom lime. This *R* gene was founded as two dominant genes on resistance lime (*RR_{Pt14}*). Whereas, Pan lime only single *R* gene (*R_{Pt14}*) were found which give sensitive phenotype on lime. The *RR_{Pt14}* genotype was also observed in Puang lime which is another resistance lime.

5. Acknowledgements

This research was supported by SUT-NRCT grant. OROG-SUT scholarship program is acknowledged.

References

- [1] Verniere, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Alvarez, A.M. and Maestri, P., **1998**. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 477–487.
- [2] Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J. and Achor, D.S., **2004**. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular of Plant Pathology*, 5, 1-15.
- [3] Dangpium, N., Poonperm, N., Amutruttana, D. and Chuoyjarearn, T., **2003**. Lime breeding for resistance to canker disease, *Horticulture research center of Phichit, Institutes of Horticulture Research Center*.
- [4] Hammond-Kosack, K.E. and Kanyuka, K., **2007**. Resistance genes (*R genes*) in plants. *Encyclopedia of Life Science* [On-line], Available: <http://www.els.net>
- [5] Zimmerman, G., Baumlcin, H., Mock, H-P., Himmelbach, A. and Schweizer, P., **2006**. The multigene family encoding germin-like proteins of baley, regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiology*, 142, 181-192.
- [6] Manosalva, P.M., Davidson, R.M., Liu, B., Zhu, B., Hulbert, S.H. and Leung, H., **2009**. A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease in rice. *Plant Physiology*, 149, 286-296.
- [7] McHale, L., Tan, X., Koehl, P. and Michelmore, R.W., **2006**. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7, 1-11.
- [8] Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C. and Weber, C.A., **2000**. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance gene candidate sequences in citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 814–822.
- [9] EPPO/EPPO, **2005**. Diagnostic: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [On-line]. Available: <http://www.doacs.state.fl.us/pi/canker/maps.htm>
- [10] Cheng, YJ., Guo, WW., Yi, HL., Pang, XM. and Deng, X., **2003** An Efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 177a–177g.