

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม และเมล็ดต่างของข้าวโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของกลุ่มยีน

Identification of Bacterial Pathogens Causing Panicle Blight and Dirty Panicle of Rice by Multilocus Sequence Analysis

วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ¹ จุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์^{2,3} สุจินต์ ภัทรภูวadol^{1,2,3} และ วิชัย โฆสิตรัตน^{1,2,3,*}
Wanwisa Pet-amphai¹, Jutatape Watcharachaiyakup^{2,3}, Sujin Patarapuwadol^{1,2,3}
and Wichai Kositratana^{1,2,3*}

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

รับเรื่อง: ธันวาคม 2559 Received: December 2016

รับตีพิมพ์: มกราคม 2560 Accepted: January 2017

* Corresponding author: agrwck@ku.ac.th

ABSTRACT: Forty-six isolates of putative panicle blight bacterium were collected during the years 2011–2013. All were Gram negative, rod-shaped ranging in size from 0.53–0.57x 2–2.5 µm, accumulated poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and formed gray-white colonies. The bacteria produced water-soluble pigment on King's medium B, required oxygen for growth, growth on pH 4, 8 and 9 media, 3% NaCl contained media and appeared as type A or type B colony on the selective medium (S-PG) for *Burkholderia glumae*. Positive for oxidase, gelatinase and negative for arginine dihydrolase, urease and starch hydrolysis were observed. Pathogenicity tests were performed by inoculation of bacterial suspension on two month-old rice seedlings. All of 46 isolates caused the sheath rot symptom. Comparative analysis of 16S rRNA sequences of these isolates grouped them into the genus *Burkholderia* with 45 isolates closely related to *B. glumae* and one isolate to *B. gladioli* group. This was confirmed by the species-specific PCR of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region. Due to the unavailability of bacterial type strain for DNA–DNA hybridization, polyphasic taxonomic study based on classical identification and multilocus sequencing analysis (MLSA) of 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* and *recA* were employed for bacterial identification. Results clearly indicated that bacteria isolates 1BGRE5-1, 1BGSP3-4, 1BGCR2-2, 2BGCN4-1, 2BGCN5-2, 3BGNP1-4, 3BGNP2-3, 3BGST 2-1, 3BGNY1-1 and 3BGNY2-4 which caused of bacterial panicle blight of rice were resembled of *B. glumae*.

Keywords: Rice disease, Bacterial panicle blight disease, *Burkholderia glumae*, Polyphasic identification, Multilocus sequence analysis

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 297–311

ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 297–311

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวจำนวน 46 ไอโซเลท ที่เก็บตัวอย่างในช่วงปี พ.ศ. 2554–2556 เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ท่อนสั้น ขนาดประมาณ $0.53\text{--}0.57 \times 2\text{--}2.5\ \mu\text{m}$ มีการสะสมของ Poly- β -hydroxybutyrate โคโลนีสีขาวออกเทา กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (stricky aerobe) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร YDC โคโลนีจะกลม นูน สีขาว ไม่สร้างเมือกเยิ้ม สร้างเอนไซม์ oxidase ไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescence pigment) แต่สร้างเม็ดสีที่ละลายน้ำ (water-soluble pigment) บนอาหาร King's B เจริญได้บนอาหารที่มี 3% NaCl และมี pH 4, 8 และ 9 ลักษณะโคโลนีบนอาหารจำเพาะ S-PG ที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Burkholderia glumae* พบว่ามีลักษณะโคโลนีทั้งแบบ Type A ลักษณะกลม นูน ขอบเรียบสีน้ำตาลอมแดง และ Type B โคโลนีสีม่วงสะท้อนแสงหรือตรงกลางมีสีม่วงแดง สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ใช้เจลาติน แต่ไม่ใช้ arginine urease และแบ่ง ซึ่งคล้ายคลึงกับคุณสมบัติของเชื้อ *Burkholderia* spp. เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มจีโนส เชื้อ *Burkholderia* และจำนวน 45 ไอโซเลท เกาะกลุ่มย่อยอยู่กับเชื้อ *B. glumae* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer ของเชื้อ *Burkholderia* พบว่า 45 ไอโซเลท ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ของ *B. glumae* และมีหนึ่งไอโซเลท คือ BGLCN ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ของ *B. gladioli* เนื่องจากในประเทศไทยไม่มีแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐาน

(type strain) ทางด้านโรคพืช เพื่อให้นำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบด้วยเทคนิค DNA–DNA hybridization ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จึงนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทตัวแทน ได้แก่ 1BGRE5–1, 1BGSP3–4, 1BGCR2–2, 2BGCN4–1, 2BGCN5–2, 3BGPN1–4, 3BGPN2–3, 3BGST2–1, 3BGNY1–1 และ 3BGNY2–4 มาศึกษาจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิม และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวมีคุณสมบัติเหมือนกับเชื้อ *B. glumae*

คำสำคัญ: โรคข้าว, แบคทีเรียโรครวงไหม้, *Burkholderia glumae*, การจัดจำแนก, Multilocus sequence analysis

บทนำ

อาการกล้าเน่า กาบใบเน่า รวงไหม้ เมล็ดลีบ และเมล็ดต่างของข้าวเกิดได้จากเชื้อสาเหตุทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* มีรายงานว่าเป็นสาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวในประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 40% และพบว่าเกิดจากเชื้อ *B. glumae* ถึง 76% (Nandakumar et al., 2009) ปัจจุบันพบการแพร่ระบาดของเชื้อ *B. glumae* ในประเทศสหรัฐอเมริกา ปานามา โคลอมเบีย ศรีลังกา เนปาล ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ จีน ไต้หวัน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ กัมพูชา (CABI, 2014) แต่ยังไม่มียารักษาพบเชื้อนี้ในประเทศไทย แต่มีการคาดการณ์ว่าเชื้อนี้จะมีโอกาส

แพร่ระบาดได้อย่างมากในประเทศเขตร้อน และกึ่งร้อน เนื่องจากเชื้อนี้สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงประมาณ 30–35°C และเจริญได้ดีแม้ที่อุณหภูมิ 40°C จึงเป็นข้อกังวลว่าโรคนี้จะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการผลิตข้าวในอนาคต หากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้เชื้อเจริญแพร่ระบาดได้มากขึ้น และเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ผ่านทางเมล็ดพันธุ์ ซึ่งจะทำให้แพร่ระบาดได้กว้างขวางอย่างรวดเร็ว (Ham *et al.*, 2011) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรครวงไหมที่อาจเกิดจากเชื้อ *B. glumae* ในประเทศไทย อีกทั้งเชื่อกันว่ามีสถานภาพเป็นศัตรูพืชที่กักกัน (regulated pest) และเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 จึงต้องมีการศึกษาและจัดจำแนกที่มีความถูกต้อง การทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยผลของการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศต่อโรคอุบัติใหม่ และโรคอุบัติซ้ำของข้าวในประเทศไทย ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) โดยมุ่งเน้นตัวอย่างอาการรวงไหม และเมล็ดต่างของข้าว มาศึกษา และจำแนกเชื้อสาเหตุ เพื่อให้ทราบข้อมูลที่เป็นปัจจุบันเพื่อนำไปใช้วางแผนในการควบคุม ตรวจสอบ และเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างรวงข้าวที่แสดงอาการเมล็ดต่าง รวงไหม และในบางครั้งอาจสังเกตพบอาการกาบใบเน่าร่วมด้วย จากจังหวัดเชียงราย ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ ราชบุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี นครนายก นครปฐม ชัยนาท และนครศรีธรรมราช ในช่วงปี พ.ศ. 2554–2556 จังหวัดละ 5 แปลง และจากอาการกล้าเน่านอกเหนือแปลง

สำรวจจังหวัดชัยนาท นำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย และเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30°C เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวออกเทา กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ มาเลี้ยงบนอาหาร NA ทำซ้ำจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 46 ไอโซเลท (Table 1)

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคในต้นข้าวระยะกล้า และรวงข้าวระยะออกดอก

ทดสอบการเกิดโรคบนข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่พบเป็นโรครวงไหม นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปเจือจางในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็นเซลล์แขวนลอยเพื่อปรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic®, Instruments Inc., USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (2.7×10^8 CFU/ml) จากนั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าอายุ 2 เดือน ด้วยวิธีฉีด (injection) เชื้อปริมาณ 0.25 ml เข้าบริเวณกาบใบ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Yuan (2004) ส่วนการทดสอบการเกิดโรคในข้าวระยะออกดอกอายุประมาณ 3 เดือน โดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่ต้านทานต่อ rifampicin 250 ppm เป็นเชื้อทดสอบปลูกเชื้อด้วยวิธีฉีดพ่น (spraying) ปริมาตร 3 ml/รวง คลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Fory *et al.*, 2014) สังเกตลักษณะอาการที่เกิดขึ้น และแยกเชื้อมาตรวจสอบยืนยัน

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีบางประการ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหมบนอาหาร NA การย้อมสีแบบแกรม การเจริญบนอาหาร YDC การสร้างรงควัตถุเรืองแสง (fluorescence pigment) และเม็ดสีที่ละลายน้ำได้บนอาหาร King's B และการ

สะสม Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมี ได้แก่ การเจริญภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจน การสร้างเอนไซม์ oxidase การสร้างเอนไซม์ urease การใช้ arginine การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C การรีดิวซ์ไนเตรท การย่อยเจลาติน การย่อยแป้ง การเจริญบนอาหาร S-PG การเจริญในอาหารที่เติมเกลือ 3% การเจริญที่ pH 4 8 และ 9 ตามวิธีการของ Schaad *et al.* (2001) และ Zhu *et al.* (2008)

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีน 16S rRNA

นำโคลนของเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาเจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 200 μ l เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำน้ำต้มเซลล์ปริมาตร 1 μ l ใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นผสมกับสารทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (Nandakumar *et al.*, 2009) รายละเอียดดัง Table 2 แยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียบนฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายทางอินเทอร์เน็ต (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และศึกษาความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดอาการของโรครวงไหม้ที่มีการรายงานในต่างประเทศ ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี Neighbour-joining โดยคำนวณค่าความน่าเชื่อถือของ Phylogenetic tree ที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

การตรวจเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* เบื้องต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS)

เตรียมดีเอ็นเอทดสอบตามวิธีข้างต้น ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น 1 μ l ผสมกับสารทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อ *B. glumae* (Takeuchi *et al.*, 1997) และ *B. gladioli* (Furuya *et al.*, 2002) รายละเอียดดัง Table 2 เพื่อการตรวจสอบเชื้อเบื้องต้น

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อ *B. glumae*

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทตัวแทนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ ITS ของเชื้อ *B. glumae* (Takeuchi *et al.*, 1997) รายละเอียดดัง Table 2 แยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ สร้างดีเอ็นเอสายผสมโดยนำไปเชื่อมต่อกับ pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA) และย้ายพลาสมิดสายผสมดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยวิธี Heat shock ตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Blue–white screening จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษา และนำข้อมูลมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดโรครวงไหม้ข้าวที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) คำนวณความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (p-similarity) นำมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยคำนวณค่าความน่าเชื่อถือของ Phylogenetic tree ที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีน 16S rRNA, *atpD*, *glbB*, *lepA* และ *recA* ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA)

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวตัวแทนจากจังหวัดที่แยกเชื้อได้จำนวน 10

ไอโซเลท นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* โดยใช้ไพรเมอร์ดังรายละเอียด Table 2 ด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตรรวม 50 μ l จำนวน 2 ซ้ำ จากนั้นแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลมาศึกษาและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ *Burkholderia* spp. จำนวน 53 สายพันธุ์ จากการศึกษาโดย

Estrada-de los Santos *et al.* (2013) คำนวณความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (p-similarity) นำมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยตรวจสอบค่าความน่าเชื่อถือของ Phylogenetic tree จากค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

Table 1 The putative panicle blight bacterial isolates used in this study

No.	Isolate	Variety	Symptoms on plant isolated	Province	Month/Year isolated
1	1BGRE5-1	KDML105	Grain	Roi Et	NOV/2011
2	1BGSP1-1	RD31	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
3	1BGSP2-2	RD31	Grain	Suphan Buri	MAY/2012
4	1BGSP2-3	RD31	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
5	1BGSP2-4	RD31	Grain	Suphan Buri	MAY/2012
6	1BGSP3-2	Phitsanulok 2	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
7	1BGSP3-3	Phitsanulok 2	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
8	1BGSP3-4	Phitsanulok 2	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
9	1BGSP3-5	Phitsanulok 2	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
10	1BGSP3-6	Phitsanulok 2	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
11	1BGSP5-1	RD31	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
12	1BGSP5-2	RD31	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
13	1BGSP5-3	RD31	Leaf sheath	Suphan Buri	MAY/2012
14	1BGCR2-1	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
15	1BGCR2-2	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
16	1BGCR2-5	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
17	1BGCR2-7	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
18	1BGCR2-8	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
19	1BGCR2-10	Japonica rice	Grain	Chiang Rai	APR/2012
20	2BGCN4-1	RD41	Grain	Chai Nat	MAR/2013
21	2BGCN5-1	RD47	Grain	Chai Nat	MAR/2013
22	2BGCN5-2	RD47	Grain	Chai Nat	MAR/2013
23	2BGCN5-3	RD47	Grain	Chai Nat	MAR/2013
24	2BGCN5-4	RD47	Grain	Chai Nat	MAR/2013
25	2BGCN5-5	RD47	Grain	Chai Nat	MAR/2013

Table 1 Continue

No.	Isolate	Variety	Symptoms on plant isolated	Province	Month/Year isolated
26	3BGNP1-1	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
27	3BGNP1-2	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
28	3BGNP1-3	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
29	3BGNP1-4	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
30	3BGNP1-5	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
31	3BGNP1-6	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
32	3BGNP1-7	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
33	3BGNP2-1	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
34	3BGNP2-2	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
35	3BGNP2-3	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
36	3BGNP2-4	Suphan Buri 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
37	3BGNP5-1	Pathum Thani 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
38	3BGNP5-2	Pathum Thani 1	Grain	Nakhon Pathom	JUN/2013
39	3BGST2-1	Phitsanulok 2	Grain	Sukhothai	AUG/2013
40	3BGST2-3	Phitsanulok 2	Grain	Sukhothai	AUG/2013
41	3BGNY1-1	RD47	Grain	Nakhon Nayok	SEP/2013
42	3BGNY1-4	RD47	Grain	Nakhon Nayok	SEP/2013
43	3BGNY2-4	RD47	Grain	Nakhon Nayok	SEP/2013
44	3BGSP3-3	RD47	Grain	Suphan Buri	SEP/2013
45	3BGSP4-3	RD47	Grain	Suphan Buri	SEP/2013
46	BGLCN	KDML105	Seedling	Chai Nat	JUL/2013

Table 2 Primers used in this study for amplifying 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS), 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* and *recA* genes of the panicle blight bacteria of rice

Gene	Primer	Sequence (5'–3')	Annealing Temp.	Product Size	Reference
16S rRNA	16SF 16SR	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGCTACCTTGTTACGACTT	60 °C	1,500 bp	Nandakumar <i>et al.</i> (2009)
<i>B. glumae</i> (ITS)	GL-13f GL-14r	ACACGGAACACCTGGGTA TCGCTCTCCCGAAGAGAT	60 °C	400 bp	Takeuchi <i>et al.</i> (1997)
<i>B. gladioli</i> (ITS)	GLA-f GLA-r	CGAGCTAATACCGCGAAA AGACTCGAGTCAACTGA	56 °C	300 bp	Furuya <i>et al.</i> (2002)

Table 2 Continue

Gene	Primer	Sequence (5'–3')	Annealing Temp.	Product Size	Reference
<i>atpD</i>	atpDwp-F atpDwp-R	AGTACTACTGCTTTGGTAGAAGGC CAGTTCGTCCATGCCACG	65 °C	1,156 bp	This study
<i>gltB</i>	gltBwp-F gltB-R	GACATCCCGCTC AAGGACG TGCGCACCGGCTGGATGAACG	65 °C	1,035 bp	This study Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2013)
<i>lepA</i>	lepA-F2 lepA-R	TGGTTCGACAACCTACGTCGG ATCAGCATGTCGACCTTCAC	60 °C	860 bp	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2013)
<i>recA</i>	BUR1 BUR2	GATCGARAAGCAGTTTCGGCAA TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT	66 °C	869 bp	Payne <i>et al.</i> (2005)

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การเก็บตัวอย่าง แยกเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการเมล็ดต่าง และกาบใบเน่า (Figure 1A และ Figure 1B) ในช่วงปี พ.ศ. 2554–2556 จากพื้นที่ปลูกข้าว 10 จังหวัด ๆ ละ 5 แปลง ในจังหวัดเชียงราย สุโขทัย นครนายก สุพรรณบุรี ชัยนาท ราชบุรี นครปฐม ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ และนครศรีธรรมราช สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังกล่าวข้างต้นที่คล้ายกับเชื้อ *Burkholderia* (Figure 1C) จำนวน 46 ไอโซเลท (Table 1) จากพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ที่นำมาแยกเชื้อ โดยแยกไม่พบเชื้อลักษณะดังกล่าวจากข้าวในจังหวัดบุรีรัมย์ ราชบุรี และนครศรีธรรมราช เมื่อทดสอบการเกิดโรคในข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 อายุ 2 เดือน โดยการปลูกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท ทำให้ต้นข้าวแสดงอาการกาบใบเน่า ใบเป็นแผลแห้งตายตามยาว ขอบแผลสีน้ำตาล ภายใน 14 วัน

(Figure 2A และ Figure 2B) และเมื่อปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทตัวแทน 1B GRE5–1 ที่ติดฉลากด้วย rifampicin 250 ppm ในระยะออกดอก พบว่าทำให้ต้นข้าวแสดงอาการเมล็ดต่าง เมล็ดลีบ และรวงไหม้ภายใน 4 วัน หลังการปลูกเชื้อ (Figure 2C และ Figure 2D) ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Nandakumar *et al.* (2009) และ Fory *et al.* (2014) ตามลำดับ

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีบางประการ

คุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *Burkholderia* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.53–0.57×2–2.5 μm มีการสะสมของ Poly- β -hydroxybutyrate โคโลนีบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง มีสีขาวออกเทา ขอบเรียบ กลม นูนเล็กน้อย สร้างวงใสรอบโคโลนี ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (stricky aerobe) ไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescence pigment) แต่สร้างเม็ดสีที่ละลายน้ำได้บนอาหาร King's B ซึ่งหากเป็นเชื้อ *Pseudomonas*

syringae pv. *syringae* หรือ *P. fuscovaginae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรครวงไหมได้ (Yuan, 2004) จะสร้างเม็ดสีเรืองแสงบนอาหารชนิดนี้ บนอาหาร YDC โคโลนีจะกลมมน สีขาว ไม่สร้างเมือกเยิ้ม สร้างเอนไซม์ oxidase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ urease และไม่ใช้ arginine บนอาหารจำเพาะ S-PG ที่ใช้ในการแยกเชื้อ *B. glumae* พบโคโลนีทั้งแบบ Type A

ลักษณะกลม มน ขอบเรียบสีน้ำตาลอมแดง และ Type B โคโลนีสีม่วง สะท้อนแสงหรือตรงกลางมีสีม่วงแดง สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ย่อยเจลาติน แต่ไม่ย่อยแป้ง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 °C ในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือ 3% และในอาหารที่มี pH 4, 8 และ 9 ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *Burkholderia* (Schaad et al., 2001; Zhu et al., 2008)



Figure 1 Symptoms of the panicle blight disease of rice under natural infected field conditions (A) Grain discoloration (B) Leaf sheath rot and (C) Colony morphology of isolated bacteria on a nutrient agar plate after 48 h incubation at room temperature

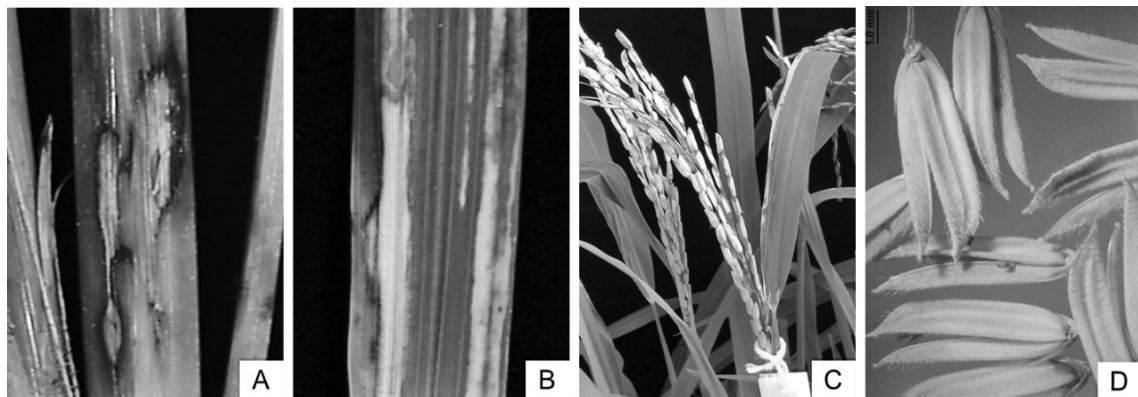


Figure 2 Symptoms of the panicle blight disease of rice by artificial inoculation with the isolated bacteria, 1BGR5-1 (A-B) Sheath rot and leaf turning necrotic 14 days after inoculation on two month-old rice seedlings stage and (C-D) Panicle blight, grain discoloration and lack of grain filling 4 days after inoculation on flowering stage

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีน 16S rRNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลท ความยาว 1,318 bp เปรียบเทียบกับของเชื้อแบคทีเรียบนฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายทางอินเทอร์เน็ต (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าเชื้อทั้ง 46 ไอโซเลทเหมือนกับเชื้อ *Burkholderia* เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคมะเร็งใหม่ของข้าวในต่างประเทศบนฐานข้อมูล Genbank รวม 15 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ 45 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันกับเชื้อ *B. glumae* ส่วนอีกหนึ่งไอโซเลทคือ BGLCN จัดอยู่ในกลุ่มย่อยอยู่กับเชื้อ *B. gladioli*

การตรวจเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* เบื้องต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS)

เชื้อสาเหตุโรคมะเร็งใหม่ของข้าวจำนวน 46 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 45 ไอโซเลท สามารถเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ ITS ของเชื้อ *B. glumae* ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 bp (Figure 3A) ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) ยกเว้นไอโซเลท BGLCN และเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. gladioli* พบว่ามีเพียงหนึ่งไอโซเลท คือ BGLCN สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 300 bp ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Furuya *et al.* (2002) (Figure 3B) ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นของการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคว่าอาจเป็นเชื้อ *B. glumae*

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อ *B. glumae*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S–23S rDNA internal transcribed spacer ของเชื้อตัวแทน 1BGRE5–1 ความยาว 395 bp มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียบนฐานข้อมูล Genbank ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบอยู่ห่างจากบริเวณตำแหน่ง +146 bp และ –10 bp ของ 16S rRNA และ 23S rRNA ตามลำดับ อ้างอิงตามเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ BGR1 (CP001503) โดยพบว่าเชื้อ 1BGRE5–1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ BJG3 จากประเทศญี่ปุ่น สูงสุด 100% กับสายพันธุ์ BGR1 จากประเทศเกาหลีใต้ 99.73% และสายพันธุ์ MAFF301169^T จากประเทศญี่ปุ่น 99.73% และเมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. glumae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบ (Figure 4) ให้ผลที่สอดคล้องกับ Saylor *et al.* (2006) ซึ่งใช้วิธีนี้ศึกษาเชื้อ *B. glumae* จำนวน 6 ไอโซเลทที่พบในมลรัฐอาคันซอ กับ 1 ไอโซเลทจากประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับที่สูงกว่า 99.5% ของเชื้อ *B. glumae* ซึ่งให้ผลที่สนับสนุนในการใช้วิธีนี้ เพื่อจำแนกเชื้อ *B. glumae* ที่ถูกต้องและแม่นยำได้ (Takeuchi *et al.*, 1997)

การวิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีน 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA)

สืบเนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐาน (type strain) ที่จะนำมาใช้เปรียบเทียบด้วยเทคนิค DNA–DNA hybridization ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ (species) จากการศึกษาก่อนของ Maiden *et al.* (1998) ใช้เทคนิค Multilocus sequence

analysis เป็นครั้งแรกในการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อ *Neirreria manigitidis* พบให้ผลสอดคล้องกับเทคนิค DNA–DNA hybridization และต่อมามีการนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ เช่น เชื้อสาเหตุโรคพืช *Xanthomonas* spp. (Young *et al.*, 2008) และในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ลงไป ของเชื้อ *B. cepacia* complex Taxon K (Vanlaerae *et al.*, 2009) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการใช้เทคนิค DNA–DNA hybridization และใช้เป็นทางเลือกในการจำแนกเชื้อเมื่อไม่มีเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (Maiden *et al.*, 1998) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* ของเชื้อตัวแทนจาก 7 จังหวัด ที่แยกเชื้อได้ จำนวน 10 ไอโซเลท คือ 1BGRE5–1, 1BGSP3–4, 1BGCR2–2, 2BGCN4–1, 2BGCN5–2, 3BGPN1–4, 3BGPN2–3, 3BGST2–1, 3BGNY1–1 และ 3BGNY2–4 นำมาเชื่อมต่อกันเป็นความยาว 4,500 bp ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ *Burkholderia* และจีนัสใกล้เคียงจำนวน 53 สายพันธุ์ในฐานข้อมูล GenBank

พบว่าเชื้อ 1BGRE5–1, 1BGSP3–4, 1BGCR2–2, 2BGCN4–1, 2BGCN5–2, 3BGPN1–4, 3BGPN2–3, 3BGST2–1, 3BGNY1–1 และ 3BGNY2–4 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ BGR1(เกาหลีใต้) และ *B. glumae* สายพันธุ์ LMG2196^T (ญี่ปุ่น) 99.80–100% (Table 3) เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree พบว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. glumae* โดยมีค่า Bootstrap สนับสนุน 100% (Figure 5) เช่นเดียวกับที่ Estrada–de los Santos *et al.* (2013) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *Burkholderia* มากกว่า 60 สปีชีส์ จำนวน 77 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Multilocus sequence analysis (MLSA) โดยใช้ Housekeeping gene จำนวน 4 ยีน (*atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* ร่วมกับ 16S rRNA) พบว่าสามารถใช้แยกเชื้อเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่ม A ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่พบทั่วไปในสภาพแวดล้อม และกลุ่ม B ประกอบด้วยเชื้อที่จัดเป็นสาเหตุโรค และยังสามารถแยกเชื้อออกเป็นสปีชีส์ต่าง ๆ อย่างชัดเจนได้

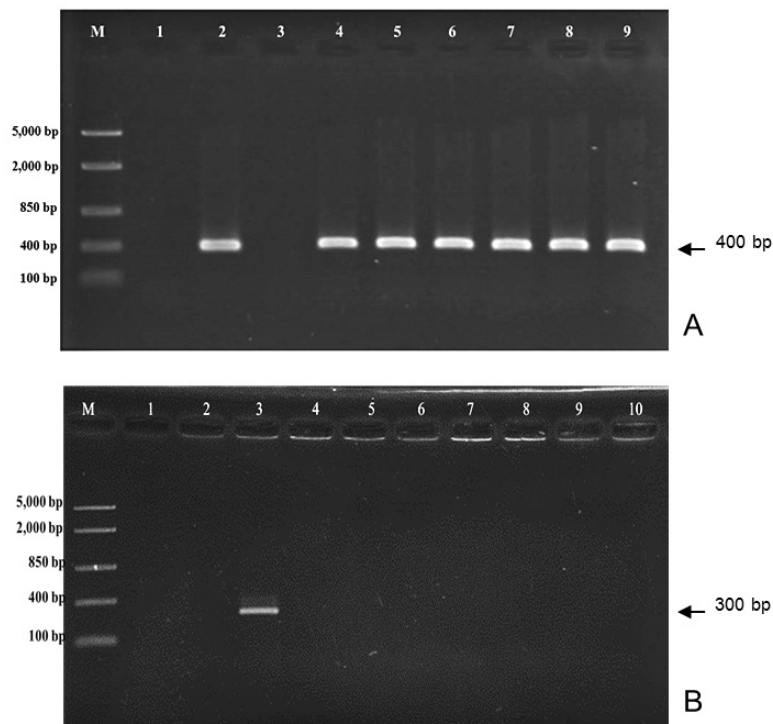


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using primers (A) GL-13f and GL-14r and (B) GLA-f and GLA-r, M: FastRuler™ Middle Range DNA Ladder, 1: dH₂O, 2-9: bacterial isolated from panicle blight disease and 3: BGLCN

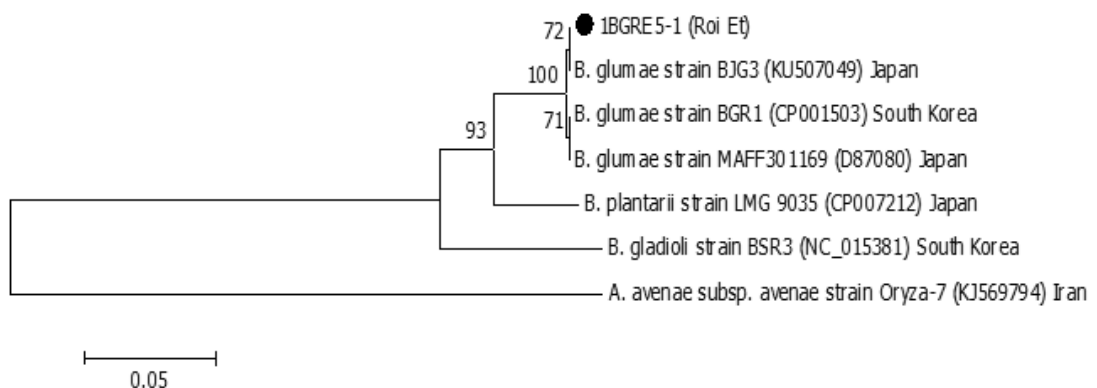


Figure 4 Neighbour-joining phylogenetic tree of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences of isolate 1BGRE5-1 and reference strains of bacterial causing panicle blight disease symptoms. A bootstrap analysis was performed with 1000 repetitions with MEGA 6.06 software

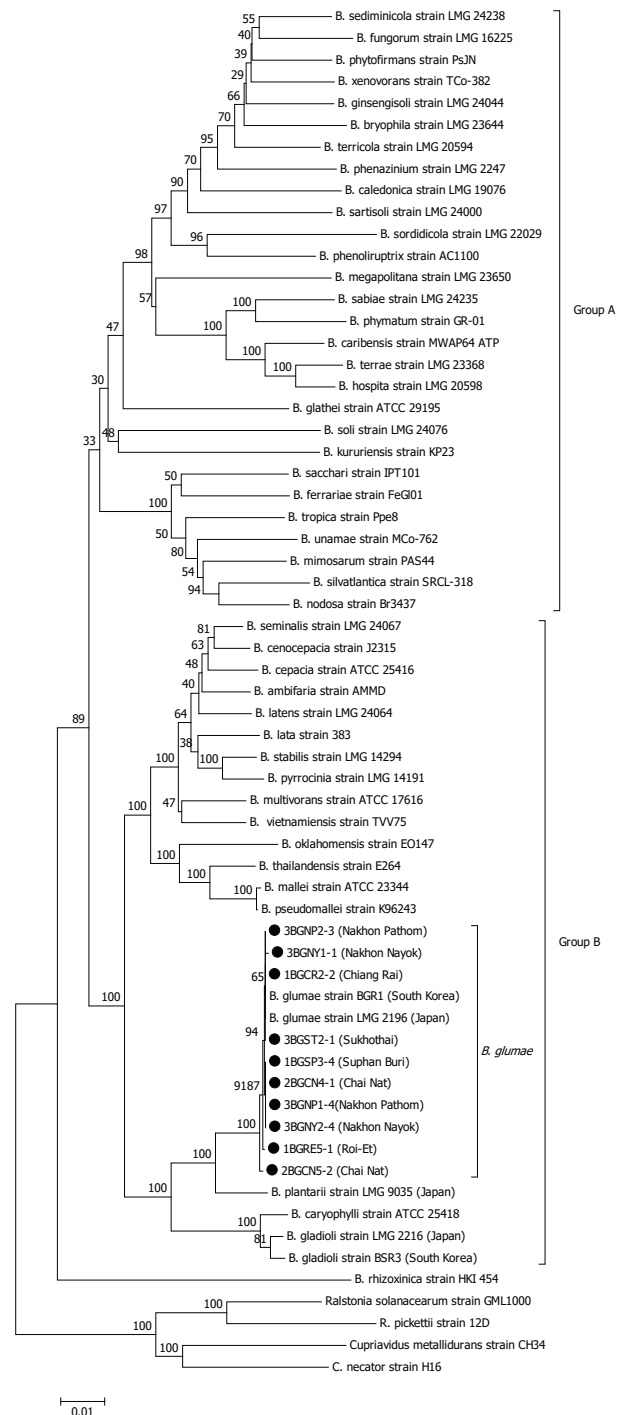


Figure 5 Neighbour-joining phylogenetic tree of the *atpD-gltB-lepA-recA-16S* rRNA genes, showing the relationships of 10 isolates with of the isolated panicle blight bacteria (●) and *Burkholderia* species. A bootstrap analysis was performed with 1000 repetitions with MEGA 6.06 software

Table 3 Sequence identity matrix (%) showing nucleotide sequence similarity between 10 isolates of the isolated panicle blight bacteria (7–16) and reference strains of *Burkholderia* spp.

No.	strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>B. glumae</i> LMG 2196 [†]																
2	<i>B. glumae</i> BGR1	100.00															
3	<i>B. gladioli</i> LMG 2216 [†]	95.51	95.51														
4	<i>B. gladioli</i> BSR3	95.55	95.55	99.39													
5	<i>B. plantarii</i> LMG 9035 [†]	97.69	97.69	95.51	95.51												
6	<i>B. caryophylli</i> ATCC 25418 [†]	94.97	94.97	99.12	98.56	94.86											
7	1BGR5-1 (Roi-Et)	99.91	99.91	95.55	95.60	97.73	95.01										
8	1BGSP3-4 (Suphan Buri)	99.96	99.96	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91									
9	1BGR2-2 (Chiang Rai)	100.00	100.00	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	99.96								
10	2BGCN4-1 (Chai Nat)	99.96	99.96	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	100.00	99.96							
11	2BGCN5-2 (Chai Nat)	99.80	99.80	95.55	95.60	97.75	95.01	99.80	99.80	99.80	99.80						
12	3BGNP1-4 (Nakhon Pathom)	99.96	99.96	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	100.00	99.96	100.00	99.80					
13	3BGNP2-3 (Nakhon Pathom)	100.00	100.00	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	99.96	100.00	99.96	99.80	99.96				
14	3BGST2-1 (Sukhothai)	100.00	100.00	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	99.96	100.00	99.96	99.80	99.96	100.00			
15	3BGNY1-1 (Nakhon Nayok)	99.93	99.93	95.44	95.49	97.62	94.90	99.84	99.89	99.93	99.89	99.73	99.89	99.93	99.93		
16	3BGNY2-4 (Nakhon Nayok)	99.96	99.96	95.51	95.55	97.69	94.97	99.91	100.00	99.96	100.00	99.80	100.00	99.96	99.96	99.89	

สรุป

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวที่แสดงอาการกล้าเน่า กาบใบเน่า เมล็ดต่าง และรวงไหม้ จำนวน 46 ไอโซเลท เมื่อนำทดสอบการเกิดโรคตามหลักการพิสูจน์โรคของ Koch พบว่าทั้ง 46 ไอโซเลท เป็นเชื้อสาเหตุของโรคทำให้เกิดอาการกาบใบเน่า ใบเป็นแผลแห้งตาย เมล็ดต่าง เมล็ดลีบ และรวงไหม้ โดยเชื้อทั้ง 46 ไอโซเลท มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีเบื้องต้นคล้ายคลึงกับเชื้อ *Burkholderia* รวมถึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึงกับเชื้อ *Burkholderia* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า 45 ไอโซเลทให้ปฏิกิริยาบวกกับไพรเมอร์ของ *B. glumae* และหนึ่งไอโซเลทคือ BGLCN ให้ปฏิกิริยาบวกกับไพรเมอร์ของ *B. gladioli* และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA, *atpD*, *gltB*, *lepA* และ *recA* ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) ของเชื้อไอโซเลท 1BGR5-1, 1BGSP3-4, 1BGR2-2, 2BGCN4-1, 2BGCN5-2, 3BGNP1-4, 3BGNP2-3, 3BGST2-1, 3BGNY1-1 และ 3BGNY2-4 ให้ผล

ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับของเชื้อ *B. glumae* ซึ่งควรที่จะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. glumae* ที่เป็น type strain เพื่อการยืนยันผลการจำแนกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้โปรแกรม “ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยในอนาคต” ในโครงการผลของการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศต่อโรคอุบัติใหม่ และโรคอุบัติซ้ำของข้าวในประเทศไทย ประจำปีงบประมาณ 2555–2557 โครงการสำรวจเผ่าระวังเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *Pseudomonas fuscovaginae* สาเหตุโรคอุบัติใหม่ในข้าว ประจำปีงบประมาณ 2559 และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559

เอกสารอ้างอิง

- CABI. 2014. *Burkholderia glumae* (bacterial grain rot). Available Source: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/44964>, October 15, 2016.
- Estrada-de los Santos, P., P. Vinuesa, L. Martinez-Aguilar, A.M. Hirsch and J. Caballero-Mellado. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr. Microbiol.* 67: 51–60.
- Fory, P.A., L. Triplett, C. Ballen, J.F. Abello, J. Duitama, M.G. Aricapa, G.A. Prado, F. Correa, J. Hamilton, J.E. Leach, J. Tohme and G.M. Mosquera. 2014. Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathology*. 104: 436–444.
- Furuya, N., H. Ura, K. Iiyama, M.M. Tsumoto, M. Takeshita and Y. Takanami. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S–23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 220–224.
- Ham, J.H., R.A. Melanson and M.C. Rush. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice. *Mol. Plant Pathol.* 12: 329–339.
- Maiden, M.J.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russel, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtam and B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within population of pathogenic microorganisms. p. 3140–3145. *In* Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America, USA.
- Nandakumar, R., A.K.M. Shahjahan, X.L. Yuan, E.R. Dickstein, D.E. Groth, C.A. Clark, R.D. Cartwright and M.C. Rush. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacteria panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Dis.* 93: 896–905.
- Payne, G.W., P. Vandamme, S.H. Morgan, J.J. LiPuma, T. Coenye, A.J. Weightman, T.H. Jones and E. Mahenthiralingam. 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3917–3927.
- Sayler, R.J., R.D. Cartwright and Y. Yang. 2006. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a new emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant Dis.* 90: 603–610.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and G.H. Lacy. 2001. *In* N.W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun, eds. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society. Minnesota., USA.
- Takeuchi, T., H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S–23S rDNA spacer region. *Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho.* 63: 455–462.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.

- Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E.D. Brandt, J.J. Lipuma, E. Manhenthiralingam, D.P. Speert, C. Dowson and P. Vandamme. 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 102-111.
- Young, J.M., D.C. Park, H.M. Shearman and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 31: 366-377.
- Yuan, X. 2004. Identification of Bacterial Pathogens Causing Panicle Blight of Rice in Louisiana. MS Thesis, Louisiana State University, USA.
- Zhu, B., M.M. Lou, Y. Huai, G.L. Xie, J.Y. Lou and L.H. Xu. 2008. Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. Rice Sci. 16: 145-149.