

การสำรวจเฝ้าระวังเฉพาะโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวในแหล่งปลูกข้าวที่สูงจังหวัด เชียงรายและการจำแนกสาเหตุ

Specific disease surveillance sheath brown rot of rice in highland rice plantation of Chiang Rai province and characterization of bacterial pathogen

พัชรา ชากักดี^{1,2}, นุจรินทร์ จังชันธ์^{3,4}, จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์^{1,2} และ สุจินต์ ภัทรภูวadol^{1,2,3*}

Patchara Chaphakdee^{1,2}, Nootjarin Jungkhun^{3,4}, Jutatape Watcharachaiyakup^{1,2}
and Sujin Patarapuwadol^{1,2,3*}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

⁴ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ 10900

⁴ Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900

บทคัดย่อ: ในปี พ.ศ. 2559 ได้ดำเนินการสำรวจเฝ้าระวังเฉพาะโรค เพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล และ
เมล็ดต่างของข้าวในพื้นที่ปลูกข้าวที่สูงของจังหวัดเชียงราย ใช้อาหาร King's medium B (KMB) เพื่อคัดเลือกเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas*
ที่เรืองแสง แยกเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 214 ไอโซเลท จากตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการของโรค จากนั้นคัดเลือกตัวแทนเชื้อจากทุก
แหล่งที่นำมาแยกเชื้อ จำนวน 77 ไอโซเลท ทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitivity reaction, HR) บนยาสูบ
พบ 8 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวก และตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของ
Pseudomonas fuscovaginae เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank
พบว่าเชื้อ 4 ไอโซเลท ได้แก่ 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 59PFCRMSO2-10 และ 59PFCRMU4-8 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ
P. fuscovaginae และทำให้เกิดโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลได้ การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหาร KMB บ่มที่
อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีมีสีขาวครีมทึบแสง ลักษณะกลม (circular) โค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร (convex) ขอบเรียบ
(entire) โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.3-0.8 มม. เรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจน
ในการเจริญ แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง (rod shape) หัวท้ายมน ขนาดความกว้าง 0.5-0.8 ไมครอน และยาว 1.9-3.3 ไมครอน เมื่อ
เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C โคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มม. สร้างเอนไซม์ oxidase
ย่อยเจลาติน ใช้อาร์จินิน และไม่รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่ใช้น้ำตาล sucrose arabinose trehalose 2-ketogluconate inositol
sorbitol และ adonitol ซึ่งเหมือนกับเชื้อ *P. fuscovaginae* ยกเว้นสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อนำมาจัดจำแนกด้วยวิธี
Multilocus sequencing analysis (MLSA) โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ housekeeping genes จำนวน 10 ยีน ที่นำมา
เชื่อมต่อกัน ดังนี้ *acsA aroE dnaE guaA gyrB mut ppsA pyrC recA* และ *rpoB* พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม
เดียวกันกับเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ IRRI 6609 IRRI 7007 และ S-E1 (ฟิลิปปินส์) โดยมีค่าความเหมือนมากกว่า 99% และยัง
พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อที่ศึกษามีความเหมือนกันของจีโนม กับของเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ IRRI 6609 ใน
ระดับที่มากกว่า 90% หลังการพบเชื้อและจำแนกเชื้อแล้วผู้วิจัยได้แจ้งให้กับกรมการข้าว และกรมวิชาการเกษตร เพื่อดำเนินการกำจัด
เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

คำสำคัญ: โรคข้าว; แบคทีเรียโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล; *Pseudomonas fuscovaginae*; Multilocus sequence analysis

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

ABSTRACT: In 2016, specific disease surveillance survey on bacterial pathogens associated with sheath brown rot and grain discoloration was conducted in highland rice plantation of Chiang Rai province. King's medium B (KMB) was used for specific bacterial isolation of *Pseudomonas fluorescens*. Two hundred and fourteen bacterial isolates with fluorescent pigmentation on KMB was obtained from diseased samples and seventy - seven isolates from representing the collecting districts were subjected for hypersensitivity reaction (HR) test in tobacco plants. Eight isolates were found to be HR positive, and they were detected by PCR using 16S rRNA primers specific to *P. fuscovaginae*. Results from subsequence cloning and nucleotide sequencing comparison of the 16S rRNA of these eight isolates to the GenBank database, four isolates namely 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 59PFCRMSO2-10 and 59PFCRMU4-8 were in the same cluster with *P. fuscovaginae*. These four isolates caused the sheath brown rot symptom on inoculated rice seedlings. After cultivated on KMB at 30°C for 48 hr, white cream to cream colour, opaque, circular, convex, entire, colonies size 0.3 to 0.8 mm in diameter with green fluorescent viewed under UV light were observed. They are aerobic, Gram-negative with rod-rounded end cells (0.5-0.8x1.9-3.3 µm). The incubation for four to five days at 28°C on Nutrient agar, induced white cream colonies with a diameter of 4-6 mm. The biochemical test result was positive for oxidase, gelatinase and arginine dehydrolase, but negative for sucrose, arabinose, trehalose, 2-ketogluconate, inositol, sorbitol and adonitol, and not reduce nitrate, which was similar to *P. fuscovaginae*, except that growth at 37°C was observed. Multilocus sequencing analysis (MLSA) of the concatenated nucleotides sequences of *acsA*, *aroE*, *dnaE*, *guaA*, *gyrB*, *mutL*, *ppsA*, *pyrC*, *recA* and *rpoB* housekeeping genes revealed these four isolates were similar to those of *P. fuscovaginae* Philippines strains, IRRI 6609 IRRI 7007 and S-E1, at the similarity level above 99%. Further confirmation was done by whole-genome nucleotides alignment against rice infecting *Pseudomonas* draft genomes which showed the similarity level above 90% to *P. fuscovaginae* IRRI 6609. The emergency action measures were immediately implemented to stop disease spread by The Rice Department and the Department of Agriculture (DOA) of Thailand. All rice plants in the infected areas were eradicated.

Keywords: rice disease; bacterial sheath brown rot disease; *Pseudomonas fuscovaginae*; MLSA

บทนำ

โรคกาบใบเน่าของข้าว (Rice sheath rot) ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 20-85% โดยมีสาเหตุโรคเป็นเชื้อรา *Sarocladium oryzae* ร่วมกับ *Fusarium fujikuroi* หรือสาเหตุของโรคอาจเกิดจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ซึ่งจะมีลักษณะอาการที่คล้ายกันทำให้ตรวจวินิจฉัยได้ยากถึงสาเหตุที่แท้จริงของโรค (Bigirimana et al., 2015) รวมทั้งในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมักพบเชื้อ *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii et al., 1976) Miyajima et al. 1983 ทำให้เกิดโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในพื้นที่ปลูกข้าวที่สูงที่มีอากาศเย็นชื้น โรคนี้รายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 ที่เกาะฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น (Tanii et al., 1976) ต่อมาพบการระบาดในแถบเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น จีน เกาหลี อินโดนีเซีย มาเลเซีย เนปาล ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (CABI, 2018) และในปี ค.ศ. 2010 มีการสำรวจพบเชือดังกล่าวในประเทศกัมพูชา (Cother et al., 2010) ซึ่งจากการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์และการค้าชายแดน อาจนำเชือดังกล่าวเข้าสู่ประเทศไทยได้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ประกาศกำหนดให้เชื้อ *P. fuscovaginae* เป็นสิ่งต้องห้าม (prohibited article) เนื่องจากเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550)

เชื้อ *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล จะพบมีอาการเริ่มแรกหลังจากเชื้อเข้าทำลายที่กาบใบจะเป็นแผลจุดดำขนาดเล็ก สีน้ำตาลปนเขียว ต่อมาจุดแผลเหล่านี้จะขยายเชื่อมต่อกันเป็นขีดยาวหรือเป็นแถบกว้าง มีสีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลเทา หากอาการโรครุนแรงปรากฏที่กาบใบของใบจริงจะทำให้ก้านชูรวงข้าวส่วนล่าง (lower rachis) แห่งตายมีสีน้ำตาล รวงข้าวอ่อนที่อยู่ภายในกาบใบที่เป็นโรคจะถูกเชื้อโรคเข้าทำลายด้วย โดยพบจุดแผลเริ่มต้นที่เมล็ดข้าวลักษณะดำน้ำตาลล้อมรอบด้วยสีเขียวของเนื้อเยื่อพืช และในที่สุดแผลนี้จะเปลี่ยนเป็นสีดำถึงสีน้ำตาลเทาหมดทุกเมล็ดในรวงข้าวทำให้เกิดลักษณะเมล็ดต่าง (Zeigler and Alvarez, 1987) โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลมักพบในพื้นที่สูงตั้งแต่ 1,300-2,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล และในสภาพอากาศเย็น (20-22°C) (Duveiller et al., 1990) ทำให้เกิดความเสียหายของผลผลิตข้าว พบว่าในอินโดนีเซียทำให้ผลผลิตลดลงถึง 72.2% (Razak

et al., 2009) ในพื้นที่การผลิตข้าวแอฟริกากลาง และมาดากัสการ์ พบการเกิดโรคที่รุนแรงทำให้สูญเสียผลผลิตทั้งหมดเกือบ 100% (Rott, 1987)

เชื้อ *P. fuscovaginae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อน หัวท้ายมน มีขนาด 0.5-0.8 x 2.0-3.5 ไมครอน เซลล์จะอยู่แบบเดี่ยว ๆ สร้างสารเรืองแสง (fluorescence pigment) บนอาหาร King's medium B (KMB) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 28°C แบคทีเรียจะหยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อปลูกเชื้อบนใบยาสูบทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน (hypersensitivity response, HR) ไม่ทำให้เกิดอาการเน่าและในมันฝรั่ง (Miyajima et al., 1983) การจัดจำแนกเชื้อ *Pseudomonas* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Yamamoto et al., 2000) และยีน *rpoB* (encoding the beta-subunit of RNA polymerase) พบว่า *P. fuscovaginae* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. asplenii* (Tayeb et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mulet et al. (2010) ที่จัดจำแนกเชื้อด้วยวิธี Multilocus Sequence Analysis (MLSA) ของยีน 16S rRNA *gyrB* *rpoB* และ *rpoD* และต่อมา Quibod et al. (2015) จัดจำแนกเชื้อด้วย MLSA โดยใช้ยีน *acsA* *aroE* *dnaE* *guaA* *gyrB* *mutL* *ppsA* *pyrC* *recA* และ *rpoB* พบว่าทำให้แยกเชื้อ *P. fuscovaginae* ออกจากเชื้อสปีชีส์อื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน

เนื่องจากเชื้อ *P. fuscovaginae* ทำความเสียหายต่อการผลิตข้าวที่รุนแรงดังกล่าวไว้ข้างต้น และในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพบเชื้อนี้ จึงจำเป็นที่ควรตรวจสอบเพื่อเฝ้าระวังต่อโรคนี้เป็นระยะ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความเหมาะสมต่อการเกิดโรคนี้ โดยในพื้นที่ปลูกข้าวในจังหวัดเชียงรายมีพื้นที่ปลูกข้าวนาปี จำนวนกว่า 1 ล้านไร่ มีสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่มีโอกาสเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคของพื้นที่ปลูกข้าวนาปีที่สูงจำนวนถึง 76,731 ไร่ (กรมการข้าว, 2555) ที่มีสภาพภูมิอากาศโดยเฉลี่ย 8 ปี (พ.ศ. 2551-2558) ในช่วงเดือนกันยายน-พฤศจิกายน เฉลี่ยที่ 25.3°C (อุณหภูมิสูงสุด 31.0°C อุณหภูมิต่ำสุด 21.2°C) มีปริมาณน้ำฝน 152.2 มม. และความชื้นสัมพัทธ์ 79.8% (สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดเชียงราย การติดต่อส่วนตัว) และยังมีสภาพอากาศเย็นในช่วงระยะข้าวแตกกอสูงสุดและออกรวง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสำรวจเฝ้าระวังเฉพาะโรค (specific disease surveillance) ต่อโรคคาบใบเน่าสีน้ำตาล และจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค ในพื้นที่ปลูกข้าวที่สูงของจังหวัดเชียงราย เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์ที่เป็นปัจจุบัน เพื่อให้สามารถนำมาวางแผนเฝ้าระวัง ป้องกันการระบาดของโรคนี้ได้โดยมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างรวงข้าวที่แสดงอาการเมล็ดต่าง และอาการกาบใบเน่าสีน้ำตาล ในพื้นที่ปลูกข้าวที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,300-2,000 เมตร และมีสภาพอุณหภูมิต่ำในจังหวัดเชียงราย ตามลักษณะอาการที่รายงานโดย Cother et al. (2010) สุ่มเก็บตัวอย่างครั้งแรกในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 ในอำเภอเวียงป่าเป้า แม่ฟ้าหลวง เวียงชัย แม่สรวย แม่ลาว เวียงเชียงรุ้ง และพาน และครั้งที่สองในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ในอำเภอเวียงป่าเป้า แม่ฟ้าหลวง แม่สรวย และเมือง แต่ละแปลงเก็บโดยใช้การสุ่มตัวอย่างแบบซิกแซก (W) ภายใน 1 ไร่ W สุ่มแต่ละจุดห่างกัน 30 ก้าว (นิรนาม, 2554) เก็บเฉพาะตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการโรคคาบใบเน่า และเมล็ดต่างจำนวนรวม 71 แปลง มาแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KMB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (Miyajima et al., 1983)

การคัดเลือกเชื้อด้วยปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนต้นยาสูบ (Hypersensitivity Response, HR)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร KMB ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อผสมลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเขย่าให้เข้ากัน ปรับค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic® 20 Thermo Scientific™, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้น้ำที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (1.3x10⁸ CFU/ml) ปลูกเชื้อโดยฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าด้านใต้ของใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) และประเมินลักษณะอาการหลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (Zafri et al., 2015)

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลปฏิกิริยา HR บวกบนใบยาสูบ มาคัดเลือกหาเชื้อเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ Pff3 (5'-AACGGGTGACTT GGTCAGG-3') และ PffR3 (5'-CTCCGAGATTACCCACAAGC-3') (Onasanya et al., 2010) ที่ออกแบบจากยีน 16S rRNA ของเชื้อ *P. fuscovaginae* ในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (Biometra®, Germany) ตามขั้นตอนดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 3 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เวลา 1 นาที extension 72°C เวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72°C เวลา 7 นาที จากนั้นแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE ประเทศมาเลเซีย และนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียบนฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) ด้วยโปรแกรม BLAST และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานโดยการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี Neighbour-joining คำนวณค่าความน่าเชื่อถือของ Phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 (Kumar et al., 2016)

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีบางประการ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรียบนอาหาร KMB การย้อมสีแบบแกรม การสร้างรงควัตถุเรืองแสง (fluorescence pigment) รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมีที่เป็นลักษณะของเชื้อ *P. fuscovaginae* (Miyajima et al., 1983) ได้แก่ การเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การสร้างเอนไซม์ oxidase การใช้ arginine การเจริญที่อุณหภูมิ 37°C การรีดิวซ์ไนเตรท การย่อยเจลาติน และการใช้น้ำตาล sucrose arabinose trehalose 2-ketogluconate inositol sorbitol และ adonitol ตามวิธีการทดสอบของ Schaad et al. (2001)

การทดสอบการเกิดโรคในต้นข้าว

นำแบคทีเรียที่ให้ผลปฏิกิริยา PCR เป็นบวกกับไพรเมอร์ Pff3/PffR3 และจากผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์แล้ว มาทดสอบการเกิดโรคโดยใช้ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ชะหนิ ซึ่งเป็นหนึ่งในพันธุ์ข้าวที่เป็นโรคและแยกเชื้อได้ ใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมตามวิธีข้างต้น ปลูกเชื้อบนต้นกล้าอายุ 40-50 วัน ด้วยวิธีฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 0.25 มล. เข้าบริเวณกาบใบตามวิธีการของ Zafri et al. (2015) ตรวจสอบลักษณะอาการหลังปลูกเชื้อ 14 วัน

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ housekeeping gene ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมกับเชื้ออ้างอิง

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำตาของข้าวจำนวน 4 ไอโซเลท มาสกัดจีโนมดีเอ็นเอโดยสกัดด้วย Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ขยายยีนส่วนของ housekeeping gene ของยีน *acsA aroE dnaE guaA gyrB mutL ppsA pyrC recA* และ *rpoB* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Vishuo Biomedical Pte. Ltd. และ Novogen Co. Ltd. ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน นำข้อมูลที่ได้มาศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับเชื้อ *Pseudomonas* spp. จำนวน 36 สายพันธุ์ ดังวิธีการของ Quibod et al. (2015) โดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโมเดล Maximum Likelihood (ML) วิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของ tree ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม RAxML (Silvestro and Michalak, 2010) และคำนวณค่าความเหมือนด้วยโมเดล Maximum composite Likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 (Kumar et al., 2016)

การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อตัวแทน 2 ไอโซเลท ได้แก่ 59PFCRMSO2-7 และ 59PFCRMSO2-8 โดยส่งจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ข้างต้นไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมด้วยแพลตฟอร์ม Illumina HiSeq กับบริษัท Novogen Co. Ltd. ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม FastQC นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดส่วนอะแดปเตอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำด้วยโปรแกรม Cutadapt และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมมาเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ IRR1 6609 ด้วยโปรแกรม Burrows-Wheeler Aligner (BWA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ในปี พ.ศ. 2559 ช่วงเดือนกันยายน-พฤศจิกายน จังหวัดเชียงราย มีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.1°C อุณหภูมิสูงสุด 31.3°C อุณหภูมิต่ำสุด 22.4°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80.7% และปริมาณฝน 166 มม. (ที่มา: สถานีอุตุนิยมวิทยา จังหวัดเชียงราย) เก็บตัวอย่างข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 16 พันธุ์ ได้แก่ สันป่าตอง 1 ข้าวญี่ปุ่น กข13 จะสีอิมเว จะสีเนเว จะสี อีโต พิษณุโลก 2 กข49 กข14 ปือโป๊ะลิ๊ะ ชิวแม่จัน ชะหนี่ กข6 กข15 และข้าวดอกมะลิ 105 ในพื้นที่ปลูกข้าวอำเภอเวียงป่าเป้า แม่ฟ้าหลวง เวียงชัย แม่สรวย เมือง แม่ลาว เวียงเชียงรุ้ง และพาน จังหวัดเชียงราย โดยพื้นที่เก็บตัวอย่างมีความสูงจากระดับน้ำทะเลระหว่าง 391-582 เมตร ที่เป็นพื้นที่ราบระหว่างหุบเขา และที่เป็นพื้นที่ราบบนเขาที่ระดับความสูง 619-1,033 เมตร จำนวน 350 ตัวอย่าง แสดงอาการเมล็ดต่างและกาบใบเน่าสีน้ำตาล (Figure 1A-B) ที่คล้ายกับลักษณะอาการที่มีรายงาน (Cothier et al., 2010) นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหาร KMB พบเชื้อที่มีโคโลนีเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต จำนวน 214 ไอโซเลท จากตัวอย่างอาการกาบใบเน่าจำนวน 11 ไอโซเลท และจากตัวอย่างรวงและเมล็ดต่างจำนวน 203 ไอโซเลท

การคัดเลือกเชื้อจากปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนต้นยาสูบ (Hypersensitivity Reaction, HR)

คัดเลือกเชื้อที่เรืองแสงบนอาหาร KMB โดยมีลักษณะเชื้อตามที่ Bigirimana et al. (2015) รายงานไว้ เพื่อใช้เป็นตัวแทนของแปลงที่มีการสำรวจจำนวน 77 ไอโซเลท พบว่าเชื้อ 8 ไอโซเลท ได้แก่ 59PFCRWC3-7 59PFCRWC3-9 และ 59PFCRWC3-10 จากอำเภอเวียงชัย แยกได้จากข้าว กข14 โดยไอโซเลท 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 และ 59PFCRMSO2-10 เก็บได้จากอำเภอแม่สรวย แยกจากข้าวปือโป๊ะลิ๊ะ ไอโซเลท 59PFCRMU2-9 และ 59PFCRMU4-8 แยกจากอำเภอเมือง ในข้าวชะหนี่ ที่ให้ผลปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันเป็นบวก โดยพบใบยาสูบมีลักษณะเป็นสีเหลืองถึงสีน้ำตาลในบริเวณที่ปลูกเชื้อ ภายใน 24 ชั่วโมง (Figure 1C)

การคัดเลือกเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อ 8 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ HR ในยาสูบ มาตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ Pff3/Pff3 ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อ *P. fuscovaginae* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะ 714 bp ได้ (Figure 1D) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับของเชื้อแบคทีเรียบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายทางอินเทอร์เน็ต (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่า 4 ไอโซเลท ได้แก่ 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 59PFCRMSO2-10 และ 59PFCRMU4-8 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ ICMP 11824 จากประเทศโคลัมเบียที่ค่าความเหมือน 97.78 97.78 97.62 และ 97.78% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท 59PFCRMU2-9 เหมือนกับเชื้อ *P. oleovorans* สายพันธุ์ PsS.48 ที่ค่าความเหมือน 95% เชื้อไอโซเลท 59PFCRWC3-7 59PFCRWC3-9 59PFCRWC3-10 เหมือนกับเชื้อ *P. parafulva* สายพันธุ์ PRS09-11288 ที่ค่าความเหมือน 99% และ *P. fulva* สายพันธุ์ YMC09/4/B4619 ที่ค่าความเหมือน 99% (Figure 2) จึงได้คัดเลือกเฉพาะเชื้อ จำนวน 4 ไอโซเลทที่เหมือนกับเชื้อ *P. fuscovaginae* มาใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

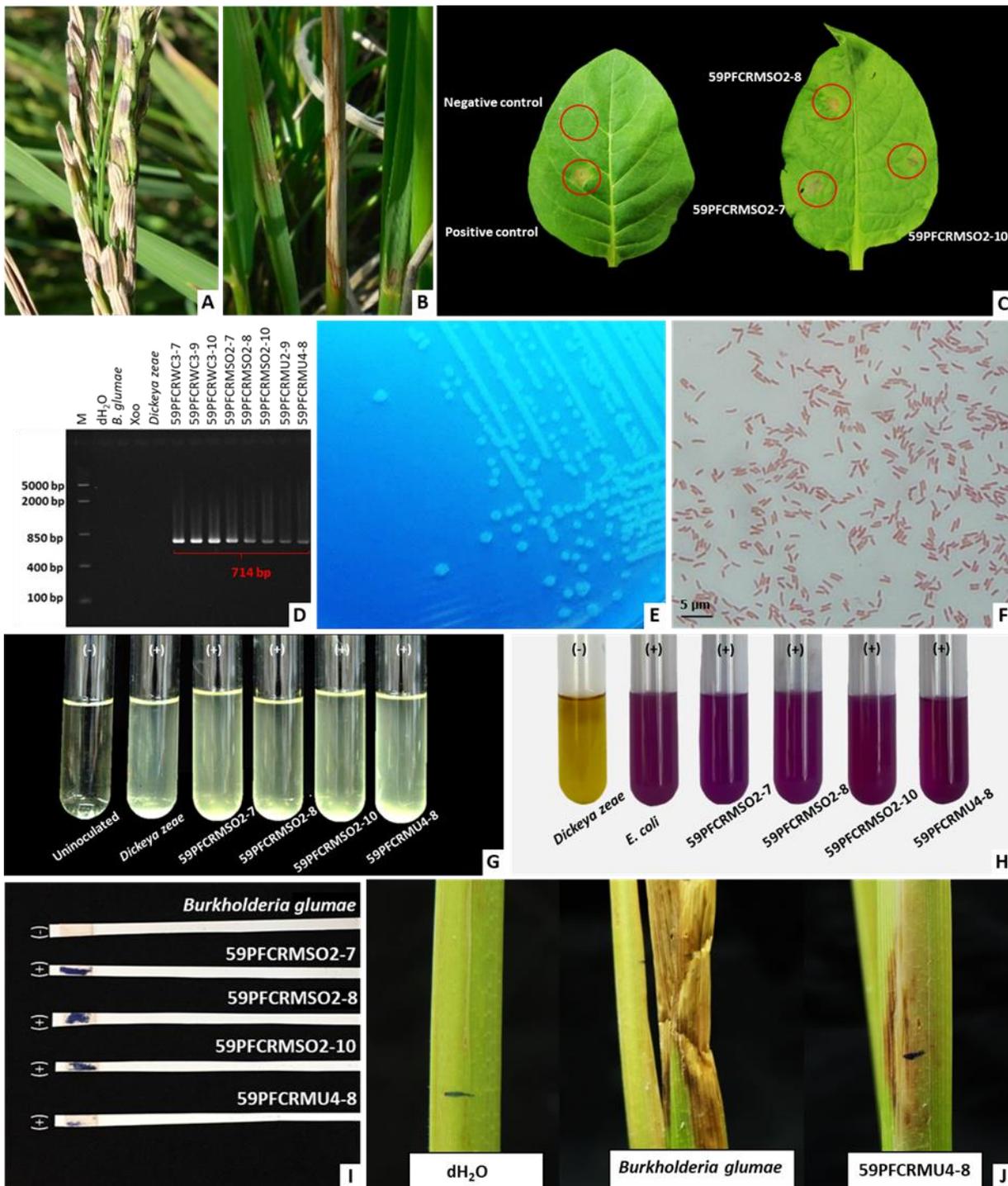


Figure 1 Symptoms and polyphasic study of bacteria causing sheath brown rot collected from Chiang Rai province (A-B) Symptoms of sheath brown rot and grain discoloration of rice (C) Hypersensitive response on tobacco leaves after inoculated 24 h (D) Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using specific primers Pff3/Pfr3 (E) colony on KMB under UV light (F) Gram's stain (G) Growth at 37°C (H) Arginine dehydrolase (I) Oxidase test (J) Symptoms of the sheath brown rot disease of rice plant 14 days after inoculation

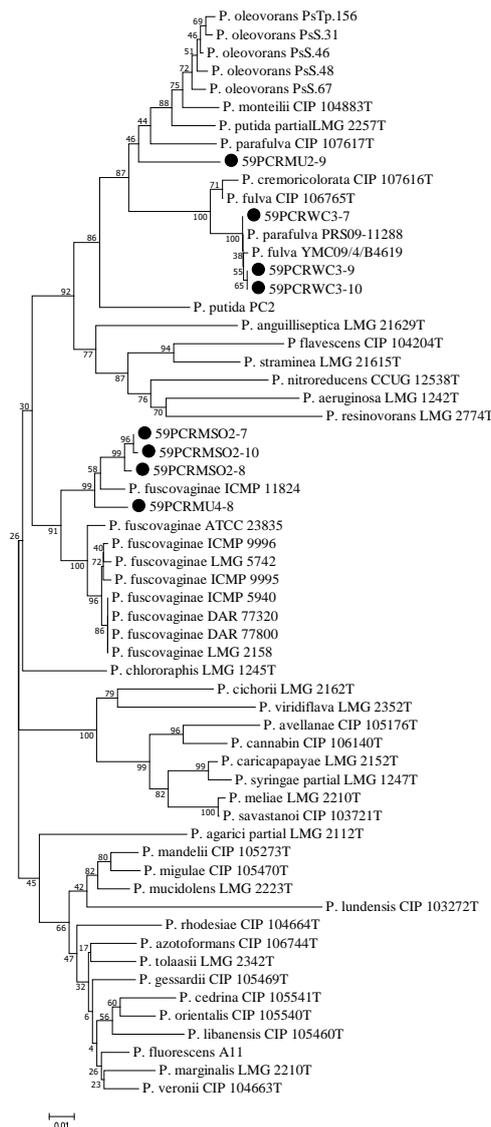


Figure 2 Phylogenetic analysis base on the alignment of 714 nucleotide PCR amplified of 16S rRNA DNA using Pff3/Pfr3 primers of eight bacterial isolates (black circle) isolated from sheath brown rot of rice in Chiang Rai province against GenBank database of related *Pseudomonas* species Neighbour-joining tree were reconstructed using MEGA 7 with 1000 replications bootstrapping

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีบางประการ

เชื้อไอโซเลท 59PCRMSO2-7 59PCRMSO2-8 59PCRMSO2-10 และ 59PCRMSO2-8 พบการเจริญบนอาหาร KMB อายุ 48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีกลม (circular) โค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร (convex) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย ประมาณ 0.3-0.8 มม. โคโลนีสีขาวครีมทึบแสง เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 มม. จากการทดสอบทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง (rod shape) หัวท้ายมน ขนาดความกว้าง 0.5-0.8 ไมครอน และยาว 1.9-3.3 ไมครอน ส่วนมากพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ อาจพบต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobe) สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescence pigment) สร้างเอนไซม์ oxidase ย่อยเจลาติน ไม่ใช่ arginine ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สร้างสาร Levan จากน้ำตาล sucrose ไม่ใช้น้ำตาล 2-

ketogluconate inositol sorbitol และ adonitol ดังตาราง **Table 1** และ **Figure 1E-I** สอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *P. fuscovaginae* (Miyajima et al., 1983) ยกเว้นที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่ใช้น้ำตาล arabinose และ trehalose ซึ่งต่างไปจากรายงานของ Miyajima et al., (1983) ที่พบว่าเชื้อไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37°C และเชื้อใช้น้ำตาล arabinose และ trehalose อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Duveiller et al., (1988) พบว่าเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์จากญี่ปุ่น และสาธารณรัฐบุรุนดี 2 สายพันธุ์ที่ทดสอบ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่ใช้น้ำตาล arabinose ส่วนการใช้น้ำตาล trehalose พบรายงานทั้งบวกและลบ (Schaad et al., 2001)

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of four bacterial isolates of sheath brown rot disease from Chiang Rai province compare to *Pseudomonas fuscovaginae* NCPPB 3085^T (LMG 2158)

Test	59PFCRMSO2-7	59PFCRMSO2-8	59PFCRMSO2-10	59PFCRMU4-8	^{1/} <i>P. fuscovaginae</i> NCPPB 3085 ^T (LMG 2158)
Fluoresce on King's medium B	+	+	+	+	+
Gram' s strain	negative	negative	negative	negative	negative
Shape	rod shape	rod shape	rod shape	rod shape	rod shape
Size (µm)	0.5-0.7 x 1.9-2.9	0.6-0.7 x 2.1-3.3	0.6-0.8 x 2.1-2.9	0.5-0.6 x 2.1-3.1	0.5-0.8 x 2.0-3.5
O ₂ relationship	aerobe	aerobe	aerobe	aerobe	aerobe
Growth at 37°C	+	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
Denitrification	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Levan formation from sucrose	-	-	-	-	-
Utilization of:					
Arabinose	-	-	-	-	+
Trehalose	-	-	-	-	+
2-Ketogluconate	-	-	-	+	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-
HR in tobacco plants	+	+	+	+	+

^{1/} Miyajima et al. (1983)

การทดสอบการเกิดโรคในต้นข้าว

พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 59PFCRMSO2-10 และ 59PFCRMU4-8 ทำให้ต้นข้าวแสดงอาการจุดแผลน้ำ สีสีเขียวเข้มจนถึงน้ำตาล ภายใน 14 วัน ลักษณะอาการมีความคล้ายคลึงกับการทดสอบการเกิดโรคที่รายงานโดย Zafri et al. (2015) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการ (น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธีควบคุมบวกคือ *Burkholderia glumae* สายพันธุ์ 1BGRE5-1 แสดงอาการกาบใบเน่าเป็นแผลสีน้ำตาล (Figure 1J) เมื่อนำต้นที่แสดงอาการมาแยกเชื้อบนอาหาร KMB พบเชื้อสีขาวครีมที่เรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และให้ปฏิกิริยาบวกในการตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ PFF3/PFR3

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ housekeeping gene ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมกับเชื้ออ้างอิง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acsA aroE dnaE guaA gyrB mutL ppsA pyrC recA* และ *rpoB* ที่เชื่อมต่อกันยาว 20,728 bp ของเชื้อ 4 ไอโซเลท คือ 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 59PFCRMSO2-10 และ 59PFCRMU4-8 กับของจากเชื้อ *Pseudomonas* spp. จำนวน 36 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ *P. fuscovaginae* ในกลุ่มสายพันธุ์ IRRI 6609 IRRI 7007 และ S-E1 จากประเทศฟิลิปปินส์ ที่ค่าความเหมือนในช่วง 99.94-99.99% และยังสามารถคล่องกับการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic tree (Figure 3) ที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Quibod et al. (2015) ที่พบว่าเชื้อ *P. fuscovaginae* แยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสายพันธุ์จากประเทศฟิลิปปินส์ (IRRI 6609 IRRI 7007 และ S-E1) และกลุ่มสายพันธุ์จากมาดากัสการ์ (UPB0736) จีน (CB98818) ญี่ปุ่น (ICMP 5940) และออสเตรเลีย (DAR 77795 และ DAR 77800) และด้วยวิธี MLSA ยังสามารถจัดแยกเชื้อออกเป็นสปีชีส์ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากประเทศไทยไม่มีแหล่งเก็บเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน (type strain) เพื่อนำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานของการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ housekeeping gene ด้วยวิธี MLSA จึงเป็นทางเลือกที่สามารถนำมาใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรีย และจากผลวิเคราะห์เบื้องต้นของข้อมูลจาก Whole genome sequencing ของเชื้อ 2 ไอโซเลท คือ 59PFCRMSO2-7 และ 59PFCRMSO2-8 พบว่ามีความเหมือนของจีโนมกับเชื้อ *P. fuscovaginae* IRRI 6609 จากฟิลิปปินส์ ที่ 93.86 และ 90.3% ตามลำดับ

Quibod et al. (2015) พบว่า *P. fuscovaginae* มีจีโนมที่ยืดหยุ่น (flexible genomes) มีความหลากหลายของโครงสร้างและหน้าที่บ่งบอกถึงการปรับตัวของ *P. fuscovaginae* เพื่อดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และมีการแลกเปลี่ยนยีนบ่อยครั้งผ่านการ insertions และ deletions ข้อมูลเหล่านี้ได้ศึกษาจากการวิเคราะห์ secretome ระหว่างการปลูกเชื้อในข้าว ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถในการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของเชื้อ *P. fuscovaginae* จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่พบในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกันของจีโนม เกิดจากการปรับตัวของเชื้อให้สามารถเจริญ และเข้าทำลายข้าวในนิเวศน์ที่แตกต่าง ในขณะที่ Cottyn et al. (1996) รายงานการพบเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ IRRI 6609 และ IRRI 7007 ที่แยกได้จากกาบใบข้าว ในเดือนธันวาคมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 20°C ซึ่งต่างจากการพบเชื้อ 4 ไอโซเลท ในจังหวัดเชียงราย ได้แก่ไอโซเลท 59PFCRMSO2-7 59PFCRMSO2-8 และ 59PFCRMSO2-10 ที่พบในตำบลป่าแดด อำเภอแม่สรวย ที่ละติจูด 19.723254 ลองจิจูด 99.401117 ที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเล 1,031 เมตร และไอโซเลท 59PFCRMU4-8 ที่พบในตำบลแม่ยาว อำเภอเมืองเชียงราย ที่ละติจูด 20.01333 ลองจิจูด 99.68444 ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 767 เมตร ในช่วงเดือนกันยายน-พฤศจิกายน ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.1°C มีอุณหภูมิสูงสุด 31.3°C อุณหภูมิต่ำสุด 22.4°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80.7% และปริมาณฝน 166 มม. แสดงถึงความสามารถในการปรับตัวของเชื้อ *P. fuscovaginae* ต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างได้

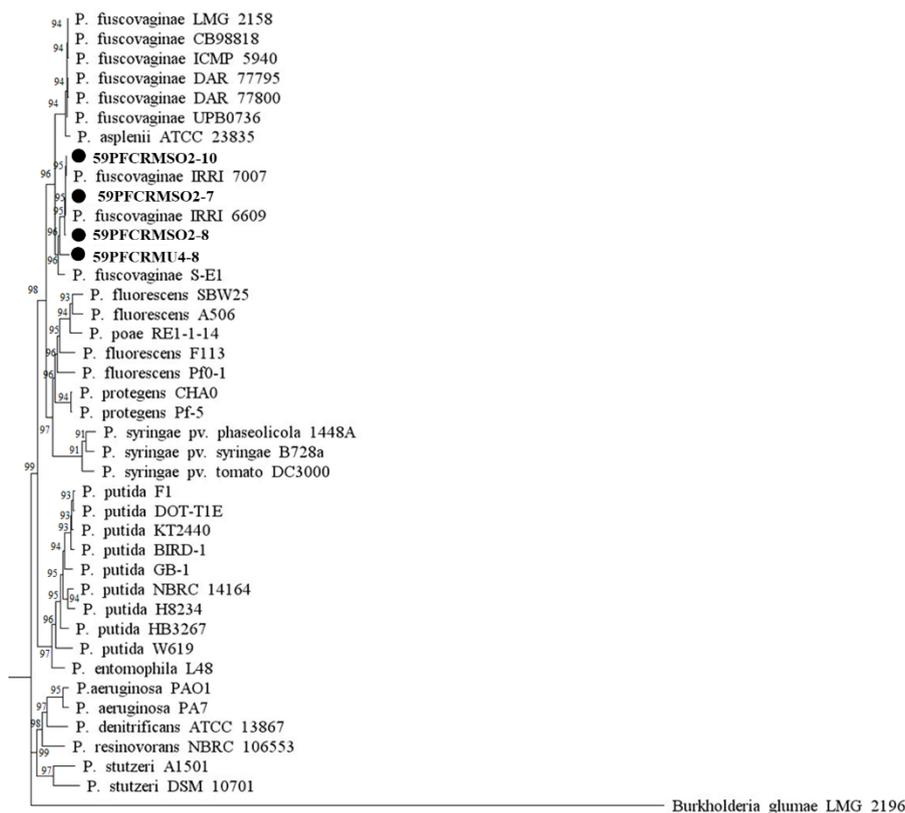


Figure 3 Phylogenetic tree of four bacterial isolates of sheath brown rot of rice (black circle) and closely related *Pseudomonas* species using 20,728 bp concatenated nucleotides of housekeeping *acsA aroE dnaE guaA gyrB mutL ppsA pyrC recA* and *rpoB* genes. Maximum likelihood was used to infer the phylogenetic relationship with bootstrap of 1,000 using the RAxML software

สรุป

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KMB แยกได้จากข้าวแสดงอาการกาบใบเน่า และเมล็ดต่าง จากข้าวที่สูงในจังหวัดเชียงราย จำนวน 77 ไอลโซเลท พบ 8 ไอลโซเลท ให้ผลเป็นบวกในปฏิกิริยา HR ในยาสูบ ตรวจหาเชื้อได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pff3/Pfr3 ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของเชื้อ *P. fuscovaginae* และผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามี 4 ไอลโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *P. fuscovaginae* (ICMP 11824) และทำให้เกิดโรครากใบเน่าในข้าวทดสอบที่ปลูกเชื้อ เชื้อมีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางกายภาพ และชีวเคมีเบื้องต้นคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. fuscovaginae* ยกเว้นเชื้อนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่ใช้น้ำตาล arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน การวิเคราะห์ MLSA ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจาก housekeeping gene ของยีน *acsA aroE dnaE guaA gyrB mutL ppsA pyrC recA* และ *rpoB* ที่นำมาเรียงต่อกันความยาว 20,728 bp พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ *P. fuscovaginae* สายพันธุ์ IRRi 6609, IRRi 7007 และ S-E1 จากประเทศฟิลิปปินส์ ที่ค่าความเหมือนในช่วง 99.94-99.99% และผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อที่คัดเลือกมาศึกษาจำนวน 2 ไอลโซเลท พบว่าเหมือนกับจีโนมของเชื้อ *P. fuscovaginae* IRRi 6609 จากประเทศฟิลิปปินส์ในระดับที่สูงกว่า 90% ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครากใบเน่าสีน้ำตาลและเมล็ดต่าง ที่พบในข้าวที่สูง จังหวัดเชียงราย จึงจำแนกเชื้อได้เป็น *P. fuscovaginae* หลังการพบเชื้อและจำแนกเชื้อแล้วผู้วิจัยได้แจ้งให้กับกรมการข้าวและกรมวิชาการเกษตร เพื่อดำเนินการควบคุมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือวิจัยและงบประมาณประจำปี 2560 ภายใต้โครงการ “การจัดจำแนกและการตรวจเชื้อโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas fuscovaginae*” รหัสโครงการ AG-BIO/60-006-001 จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2555. เทคโนโลยีการปลูกข้าวไร่อย่างยั่งยืน. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.
- นิรนาม. 2554. การวางแผนวิธีการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง. แหล่งข้อมูล: <http://aciarc.gov.au/files/node/8516/MN119c%20Part%203.pdf>. ค้นเมื่อ 1 ตุลาคม 2559.
- ราชกิจจานุเบกษา. 2550. กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550. แหล่งข้อมูล: <http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2550/E/066/4.PDF>. ค้นเมื่อ 29 มกราคม 2563.
- Bigirimana, V.D.P., G.K. Hua, O.I. Nyamangyoku, and M. Hofte. 2015. Rice sheath rot: an emerging ubiquitous destructive disease complex. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-16.
- CABI. 2018. *Pseudomonas fuscovaginae* (sheath brown rot). Available: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44957>. Accessed Oct. 16, 2019.
- Cother, E. J., D.H. Noble, R.J. Van De Ven, V. Lanoiselet, G. Ash, N. Vuthy, P. Visarto, and B. Stodart. 2010. Bacterial pathogens of rice in the Kingdom of Cambodia and description of a new pathogen causing a serious sheath rot disease. *Plant Pathology*. 59: 944-953.
- Cottyn, B., M. F. Van Outryve, M.T. Cerez, M.D. Cleene, J. Swings, and T.W. Mew. 1996. Bacterial diseases of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Disease*. 80: 438-445.
- Duveiller, E., K. Miyajima, F. Snacken, A. Autrique, and H. Maraite. 1988. Characterization of *Pseudomonas fuscovaginae* and differentiation from other fluorescent *Pseudomonads* occurring on rice in Burundi. *Journal of Phytopathology*. 122: 97-107.
- Duveiller, E., J.L. Notteghem, P. Rott, F. Snacken, and H. Maraite. 1990. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Malagasy. *International Journal of Pest Management*. 36: 151-153.
- Kumar S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.
- Miyajima, K., A. Tanii, and T. Akita. 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 33: 656-657.
- Zafri, M., K. Sijam, R. Ismail, M. Hashim, E. Hata, and D. Zulperi. 2015. Phenotypic characterization and molecular identification of Malaysian *Pseudomonas fuscovaginae* isolated from rice plants. *Asian Journal of Plant Pathology*. 9: 112-123.
- Mulet, M., J. Lalucat, and E.G. Valdes. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*. 12: 1513-1530.

- Onasanya, A., A. Basso, E. Somado, E.R. Gasore, F.E. Nwilene, I. Ingelbrecht, J. Lamo, K. Wydra, M.M. Ekperigin, M. Langa, O. Oyelakin, Y. Sere, S. Winter, and R.O. Onasanya. 2010. Development of a combined molecular diagnostic and DNA fingerprinting technique for rice bacteria pathogens in Africa. *Biotechnology*. 9: 89-105.
- Quibod, I.L., G. Grande, E.G. Oreiro, F.H. Borja, G.S. Dossa, R. Mauleon, C.V. Cruz, and R. Oliva. 2015. Rice-infecting *Pseudomonas* genomes are highly accessorized and harbor multiple putative virulence mechanisms to cause sheath brown rot. *PLOS ONE*. 10: 1-25.
- Razak, A., N. Zainudin, S. Sidiq, N. Ismail, N. Mohamad, and B. Salleh. 2009. Sheath brown rot disease of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the Peninsular Malaysia. *Journal of Plant Protection Research*. 49: 244-249.
- Rott, P. 1987. Brown rot (*Pseudomonas fuscovaginae*) of the leaf sheath of rice in Madagascar. Available: <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19881157248>. Accessed Oct. 16, 2019.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edition. APS Press, Minnesota.
- Silvestro, D., and I. Michalak. 2010. Raxmlgui: A graphical front-end for raxml. *Organisms Diversity and Evolution*. 12: 1-3.
- Tanii, A., K. Miyajima, and T. Akita. 1976. The sheath brown rot disease of rice plant and its causal bacterium, *Pseudomonas fuscovaginae*. *Phytopathological Society of Japan*. 42: 540-548.
- Tayeb, L.A., E. Ageron, F. Grimont, and P.A.D. Grimont. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Journal of Microbiology*. 156: 763-773.
- Yamamoto, S., H. Kasai, D.L. Arnold, R.W. Jackson, A. Vivian, and S. Harayama. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Journal of Microbiology*. 146: 2385-2394.
- Zeigler, R.S., and E. Alvarez. 1987. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Disease*. 71: 592-597.