การศึกษาเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* สาเหตุโรคของข้าวในประเทศไทย

Study on *Burkholderia gladioli* and *B. glumae*, Pathogens of Rice in Thailand

บุณยาพร ภาคภูมิ[1] และ ศิริพร ดอนเหนือ[1*]

Boonyaporn Parkpoom[1] and Siriporn Donnua[1*]

Abstract: *Burkholderia* spp. causes seedling blight and dirty panicle diseases of rice. Thai climate is suitable for occurrence of these diseases but rarely reported in Thailand. Total 49 isolates of bacteria were isolated from rice seeds. Colony on Nutrient Agar (NA) was white, fried-egg-like colony, entire margin and produced yellow pigment. Colonies were classified into two different size categories according to their diameter: type I, the average size was 1.16 micron and type II, the average size was 0.66 micron. Type II caused more severe disease than type I by induced leaf sheath blight with dark brown margin and panicle blight. Both types were classified into *Burkholderia* genus by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis. Identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) using gla-FW/ gla-RV primers which specific to *B. gladioli* showed positive to type I, when using glu-FW/glu-RV and BG1F/BG1R which specific to *B. glumae* showed positive to type II. Phylogenic tree analysis by UPGMA, type I was classified into *B. gladioli* group and type II was classified into *B. glumae* group when compared to bacteria nucleotide sequences in GenBank, NCBI database.

Keywords: Bacteria, Disease, Rice, Panicle Blight, Identification

บทคัดย่อ: *Burkholderia* spp. สาเหตุโรคกล้าไหม้และเมล็ดด่างของข้าว สภาพอากาศของไทยเหมาะต่อการเกิดโรคนี้แต่ยังมีข้อมูลอยู่น้อย จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากข้าวเมล็ดด่าง จำนวน 49 ไอโซเลท พบโคโลนีสีขาว กลม ขอบใสคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ สร้างสารสีเหลืองบนอาหาร Nutrient Agar (NA) จำแนกได้ 2 กลุ่มตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คือ type I ขนาดเฉลี่ย 1.16 ไมครอน type II ขนาดเฉลี่ย 0.66 ไมครอน type II ก่อโรครุนแรงกว่า type I โดยทำให้กาบใบไหม้ขอบแผลสีน้ำตาล และรวงไหม้ เมื่อวิเคราะห์ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ทั้งสองกลุ่มจัดอยู่ในจีนัส *Burkholderia* ตรวจระบุโดย Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ gla-FW/ gla-RV ที่จำเพาะต่อ *B. gladioli* ให้ผลบวกกับ type I ไพรเมอร์ glu-FW/glu-RV และ BG1F/BG1R ที่จำเพาะต่อ *B. glumae* ให้ผลบวกกับ type II วิเคราะห์ Phylogenic tree ด้วยวิธี UPGMA เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank, NCBI พบว่า type I จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. gladioli* และ type II จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. glumae*

คำสำคัญ: แบคทีเรีย, โรค, ข้าว, รวงไหม้, การระบุชนิด

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาวัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย 73140

[1]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Khamphaeng Saen, Kasetsart University, Khamphaeng Saen campus, Nakhonpathom province, Thailand, 73140

*Corresponding author: Siriporn Donnua, fagrspd@ku.ac.th

คำนำ

เชื้อ Burkholderia gladioli และ *B. glumae* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคเมล็ดด่างหรือโรครวงไหม้ (bacterial panicle blight) และต้นกล้าเน่าหรือต้นกล้าไหม้ (seedling rot หรือ seedling blight) ของข้าว ปัญหาการเกิดโรคเมล็ดด่างหรือโรครวงไหม้ของข้าว ส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวอย่างมากเนื่องจากทำให้ผลผลิตลดลงสูงถึง 70% (Mulaw *et al*., 2018) พบแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายมากในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะต่อการเกิดโรคแต่ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้อยู่น้อย (วันวิสาข์ และคณะ, 2560) เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* สามารถทำให้เกิดอาการรวงไหม้ของข้าว อาการกล้าเน่าในกระบะเพาะเมล็ดเน่า และกาบใบสีน้ำตาลของข้าว อาการหัวเน่าของแกลดิโอลัสและหอม รวมถึงอาการใบจุด และโรคเน่าในกล้วยไม้สกุลต่างๆ (ปิยรัตน์ และคณะ, 2553; วิชัย, 2560; สุภาภรณ์ และคณะ, 2562; Ura *et al*., 2006) เชื้อ *B. glumae* ยังจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน ทำให้เกิดต้นกล้าเน่า เมล็ดเน่า เมล็ดลีบ เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรครวงไหม้ของข้าว ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง และยังพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือ มะเขือเทศ งา พริก และพืชอื่นๆ อีกกว่า 20 ชนิด โดยพบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (วิชัย, 2560) ปานามา โคลอมเบีย เนปาล ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ ศรีลังกา จีน ไต้หวัน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ และกัมพูชา (วันวิสาข์ และคณะ, 2560) พื้นที่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา ลุยเซียน่า เทกซัสและอาร์คันซอ การระบาดของเชื้อ *B. glumae* อาศัยช่วงเวลากลางคืนที่มีอากาศอบอุ่น ความชื้นสูง หรือช่วงเวลาที่ฝนตกบ่อยเหมาะสมต่อการเกิดการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว และมักพบการระบาดหนักระยะข้าวออกรวง สามารถทำให้ดอกข้าวเป็นหมัน เมล็ดลีบ หากติดเมล็ดจะมีอาการด่าง น้ำหนักและอัตราการงอกของเมล็ดลดลง (Yuan, 2004) งานวิจัยนี้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากข้าวที่แสดงอาการเมล็ดด่าง ทดสอบการก่อโรค ตรวจระบุชนิดและจำแนกกลุ่มของเชื้อสาเหตุ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั้งในแง่คุณภาพและปริมาณผลผลิตของข้าวไทยในอนาคตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากเมล็ดข้าว

แยกเชื้อแบคทีเรียจากเมล็ดข้าวที่แสดงอาการด่าง เมล็ดลีบ และจากต้นกล้าที่เพิ่งงอกจากเมล็ดที่มีอาการกล้าข้าวเน่าหรือกล้าไหม้แผลสีน้ำตาล โดยดัดแปลงวิธีจาก Ruiz *et al*., (2003) Schaad *et al*., (2001) และ Yuan (2004) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ปทุมธานี นครปฐม ร้อยเอ็ดและสิงห์บุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2556-2562 นำมาฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดด้วย 70 % แอลกอฮอล์ จากนั้นบดเมล็ดหรือต้นกล้าในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไป spread plate บนอาหาร sucrose-phosphate-glutamate (S-PG) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีม่วงย้ายลงอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ย้ายเลี้ยงใน nutrient broth (NB) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส

ทดสอบการก่อโรคบนหอมหัวใหญ่ ข้าวในระยะกล้าและระยะออกรวง

ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคตามหลัก Koch's postulation ดัดแปลงวิธีจาก Keith *et al*., (2005) Nandakumar *et al*., (2009) และ Yuan (2004) เลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 49 ไอโซเลท บนอาหาร NB เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ OD_{600nm} เท่ากับ 0.2 ปลูกเชื้อลงบนกาบหอมหัวใหญ่ซึ่งมีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *B. glumae* และ *B. gladioli* เช่นเดียวกับในข้าว (Keith *et al*., 2005) ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70 % แอลกอฮอล์

ทำแผลโดยใช้ไม้จิ้มฟัน แล้วหยดเซลล์แขวนลอยลงบนจุดที่ทำแผลปริมาตร 50 ไมโคลิตร ต่อหอม 1 ชิ้น กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น วางบนกระดาษกรองชื้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตอาการทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลและถ่ายภาพเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนเซลล์แขวนลอย ทำการปลูกเชื้อลงบนข้าวโดยดัดแปลงวิธีจาก Nandakumar *et al*., (2009) และ Yuan (2004) ใช้เชื้อตัวแทน type I (K16-09-16) และ type II (K29WS07-006) โดยฉีดเข้ากาบใบข้าว อายุ 1 เดือน ใช้เชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ต้น กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ คลุมด้วยถุงพลาสติกนาน 12 ชั่วโมง แล้วเอาถุงออก ทำกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ สังเกตอาการทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า ปลูกเชื้อบนเมล็ดด้วยวิธีการฉีดพ่นบนรวงข้าวระยะดอกบาน อายุประมาณ 3 เดือน ใช้เชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อรวง จำนวน 3 รวงต่อต้น ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คลุมด้วยถุงพลาสติกนาน 12 ชั่วโมง แล้วเอาถุงออก สังเกตอาการทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม แยกเชื้อจากเมล็ดบนรวงที่ปลูกเชื้อโดยสุ่มมา 5 รวง จากทั้งหมด 9 รวง ต่อกรรมวิธี แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันเชื้ออีกครั้ง

การตรวจสอบด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี การย้อมสีแบบแกรม การเจริญบนอาหารที่มี 3% NaCl การเจริญบนอาหารที่ค่า pH 4 pH 8 pH 9 และการย่อยเจลาติน ตามวิธีการของ Schaad *et al*., (2001) การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และการใช้ arginine ตามวิธีการของ Schaad *et al*., (2001) และ Ura *et al*., (2006) และการสร้างเอนไซม์ urease ตามวิธีการของ วันวิสาข์ และคณะ (2560)

การตรวจระบุชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี MALDI-TOF MS

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตัวแทน จำนวน 8 แบ่งเป็น Type I จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ NK009-02-02, NK001-04-01, NK018-05-02 และ K16-09-16 และ type II จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MPWS, BP02-004, NK010-05-03 และ K29WS2.4 (accession KX213522.1) ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ type II โดยเลี้ยงบนอาหาร Yeast extract–Malt extract (YM) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นส่งตัวอย่างไปที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ดังขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก Kajiwara (2016)

การตรวจระบุชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ และวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ gla-FW (5'- CTGCGCCT-GGTGGTGAAG-3')/ gla-RV (5'-CCGTCCCGCTG-CGGAATA-3') ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. gladioli* (Maeda *et al*., 2006) ไพรเมอร์ glu-FW (5'-GAAGTGTC-GCCGATGGAG-3')/ glu-RV (5'-CCTTCAC-CGACAGCACGCAT-3') และไพรเมอร์ BG1F (5'-CCGCGCTGTTCATGAGGGATAA-3')/ BG1R (5'-CGGGCGGAACGACGGTAAGT-3') ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. glumae* (Maeda *et al*., 2006) ใช้ชุดปฏิกิริยา TP1000 ExcelTag (Smobio, Taiwan) ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Taq buffer 2.5 ไมโครลิตร 25mM dNTP (Toyobo, Japan) 1 ไมโครลิตร DNA template 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 20 mM gla-FW และ 20 mM gla-RV อย่างละ 1 ไมโครลิตร เพื่อตรวจเชื้อ *B. gladioli* ไพรเมอร์ 20 mM glu-FW/ 20 mM glu-RV และ 20 mM BG1F/ 20 mM BG1R อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เพื่อตรวจเชื้อ *B. glumae* 1.25 U ExcelTag DNA Polymerase

(Smobio, Taiwan) 0.25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย dH_2O ให้ได้ 25 ไมโครลิตร ใช้เชื้อไอโซเลท K29WS2.4 accession KX213522.1 เป็น positive control ต่อ *B. glumae* และ dH_2O เป็น negative control ทำปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อด้วย ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำ PCR product ที่ได้ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis บน 1.5% agarose ใน 0.5X TBE buffer และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany) วิธีตามขั้นตอนที่แนะนำโดยบริษัท แล้วส่ง PCR product เชื้อแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 10 ไอโซเลท ไปยังบริษัท Solgent Sequencing Service (ประเทศเกาหลี) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเป็นเชื้อ type I จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ NK001-04-01, NK009-02-02, NK018-05-02, K16-09-02 และ K16-09-16 และ type II จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ K29WS07-001, MPWS, BP02-004, BP02-007 และ NK010-05-03 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มา edit & align แล้วนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม MEGA X จากการคำนวณ bootstrap 1,200 ครั้ง เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ยีน DNA gyrase subunit B (gyrB) ของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank, NCBI ได้แก่ เชื้อ *B. glumae* (KX6384030.1, KX213522.1 และ MF139560), *B. plantarii* (AB190645.1, AB190654 และ AB190657.1) *B. gladioli* (AB239178.1, AB220902.1, AB220893), *Pesudomonas fuscovaginae* (FN554185.1), *Acidovorax avence* (EU024200.1), *Xanthomanas oryzae* pv. *oryzae* (MH560799.1) และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* (MF248714.1)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากข้าว

แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีม่วง กลม นูน มันวาว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ S-PG (Figure 1 A, D) ได้จำนวน 49 ไอโซเลท ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อ *B. glumae* type B ที่รายงานโดย วันวิสาข์ และคณะ (2560) Schaad *et al*., (2001) และ Yuan (2004) ว่า type A มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีน้ำตาลอมแดง และ type B โคโลนีสีม่วง สะท้อนแสงหรือตรงกลางมีสีแดง และเมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหาร NA พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว กลมขอบใสคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ สร้างสารสีเหลืองบนผิวหน้าอาหาร (Figure 1 B, C) โดยพบโคโลนีแตกต่างกัน 2 แบบ แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คือ type I ขนาดเฉลี่ย 1.16 ไมครอน มีจำนวน 32 ไอโซเลท (Table 1, Figure 1 E) ซึ่งมีขนาดใหญ่และนูนกว่า type II ที่มีขนาดเฉลี่ย 0.66 ไมครอน จำนวน 17 ไอโซเลท (Table 1, Figure 1 F) ซึ่งยังไม่พบรายงานว่าเชื้อ *B. gladioli* มีโคโลนีขนาดใหญ่กว่า *B. glumae* บนอาหาร NA จากผลการแยกเชื้อพบโคโลนีที่มีขนาดแตกต่างกันทำให้สามารถแยกเชื้อ *B. gladioli* ได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่า มองเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่มีเชื้ออื่นขึ้นปะปน จะทำให้พลาดโอกาสในการเลือกโคโลนีขนาดเล็กของเชื้อ *B. glumae* มาตรวจวิเคราะห์ได้

ทดสอบการก่อโรคบนหอมหัวใหญ่ ข้าวในระยะกล้าและระยะออกรวง

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 49 ไอโซเลท บนกาบหอม หลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน ทุกไอโซเลทก่อให้เกิดอาการฉ่ำน้ำบริเวณแผลที่ทำการปลูกเชื้อ หลังจากปลูกเชื้อ 3-7 วัน บริเวณแผลขยายใหญ่มีกลิ่นเหม็น แผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เน่า มีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย ในขณะที่ชุดควบคุมเมื่อปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่าไม่แสดงอาการเน่า

เมื่อปลูกเชื้อบนกาบใบข้าวโดยใช้เชื้อไอโซเลท K16-09-16 เป็นตัวแทน type I พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 1 วัน กาบใบบริเวณที่ปลูกเชื้อมีอาการฉ่ำน้ำ หลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน กาบใบเริ่มแสดงอาการไหม้แผลมีสีขาวเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาล หลังจากการปลูกเชื้อ 3-4 วัน แผลขยายเพิ่มมากขึ้น ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม หลังจากการปลูกเชื้อ 5-7 วัน แผลไม่ขยาย ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มสามารถมองเห็นได้ชัดเจน (Figure 1 G) และเมื่อปลูกเชื้อไอโซเลท K29WS07-006 ที่เป็นตัวแทน type II หลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน พบแผลเริ่มแสดงอาการไหม้สีขาวเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาล หลังจากการปลูกเชื้อ 3-7 วันแผลขยายใหญ่ขึ้น ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ และลุกลามไปยังใบ (Figure 1 H) ซึ่งก่อให้เกิดอาการรุนแรงกว่าเชื้อ type I ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมเมื่อปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่าไม่แสดงอาการ (Figure 1 I)

เมื่อปลูกเชื้อบนรวงข้าวในระยะดอกบานโดยใช้เชื้อไอโซเลท K16-09-16 เป็นตัวแทนเชื้อ type I พบว่าข้าวแสดงอาการเมล็ดด่าง แผลสีขาวเทา ขอบแผลสีน้ำตาล หลังจากปลูกเชื้อ 3-4 วัน และที่ 7 วัน ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น เห็นขอบเขตได้ชัดเจน (Figure 1 J) เมื่อปลูกเชื้อไอโซเลท K29WS07-006 เป็นตัวแทนเชื้อ type II พบว่าข้าวแสดงอาการเมล็ดด่างและลีบ ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม รวงชี้ตั้งขึ้น (Figure 1 K) ซึ่งก่อให้เกิดโรครุนแรงกว่าเชื้อ type I เช่นเดียวกับการก่อโรคในหอม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมเมื่อปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่าไม่แสดงอาการ (Figure 1 L)

แยกเชื้อจากเมล็ดที่ปลูกเชื้ออีกครั้งและตรวจสอบด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันผล พบว่าเชื้อที่แยกจากเมล็ดของกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อไอโซเลท K29WS07-006 จากทั้ง 5 รวง ระบุได้ว่าเป็นเชื้อเป็นเชื้อ *B. glumae* (Figure 2 B) ส่วน เชื้อที่แยกได้จากเมล็ดของกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อไอโซเลท K16-09-16 จากทั้ง 5 รวง ระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *B. gladioli* (Figure 2 C)

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของวันวิสาข์ และคณะ (2560) ที่ทดสอบปลูกเชื้อที่แยกได้จากเมล็ดข้าวที่แสดงอาการเมล็ดด่าง กาบใบเน่า ด้วยวิธีการฉีดเข้ากาบใบข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 พบว่าต้นกล้าข้าวแสดงอาการกาบใบเน่า ใบเป็นแผลแห้งตายตามยาว ขอบแผลสีน้ำตาล และเมื่อปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 1BGRE5-1 เป็นตัวแทนที่แยกได้จากข้าวแสดงอาการเมล็ดด่างลงพบข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 พบว่าเมล็ดมีอาการด่างเปลี่ยนสีหรือมีสีน้ำตาลเข้มบริเวณฐาน บางรวงมีลักษณะตั้งตรง เมล็ดลีบ และเริ่มแห้งตาย นอกจากนี้สอดคล้องกับรายงานการทดสอบฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* บนข้าวในระยะดอกบานพบว่าทำให้เกิดอาการเมล็ดด่าง เมล็ดลีบ และรวงไหม้ ขอบแผลสีน้ำตาลแดงและกลางแผลไหม้มีสีเทา ทั้งยังทำให้เปลือกและเมล็ดเน่า และพบว่าก่อให้เกิดโรคในหอมหัวใหญ่โดยทำให้หอมแสดงอาการช้ำ เน่า มีกลิ่นเหม็น (Kato *et al*., 2013; Nandakumar *et al*., 2009; Yuan 2004)

การตรวจสอบด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ (Table 2) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 49 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารเจริญบนอาหารที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยเจลาตินเช่นเดียวกับรายงานของวันวิสาข์ และคณะ (2560) และ Schaad *et al*., (2001) และบนอาหารที่มี 3% NaCl และไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 4 และ pH 9 เช่นเดียวกับรายงานของวันวิสาข์ และคณะ (2560) และ Ura *et al*., (2006) นอกจากนี้พบว่าผลการทดสอบการใช้ arginine สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการจัดกลุ่มตามขนาดโคโลนีบนอาหาร NA และสอดคล้องกับรายงานของ Schaad *et al*., (2001) ที่กล่าวว่าเชื้อ *B. gladioli* ไม่ใช้ arginine ส่วนเชื้อ *B. glumae* สามารถใช้ arginine โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล แต่พบว่าการเจริญที่ pH 8 และการสร้างเอนไซม์ urease ไม่สอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มตามขนาดโคโลนี แต่เชื้อ type I ให้ผลการทดสอบเหมือนกันทุกไอโซเลท ส่วนเชื้อ type II

ให้ผลที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Urakami *et al*., (1994) และ Vandamme et al. (1997) ที่กล่าวว่าเชื้อ *B. glumae* มีการเจริญเติบโตได้ 21-79% ที่ pH 8 แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Schaad *et al*., (2001) และ Urakami et al. (1994) ที่กล่าวว่าเชื้อ *B. gladioli* สามารถเจริญเติบโตที่ pH 8 และไม่สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าเชื้อ *B. gladioli* มีทั้งสร้างและไม่สร้างเอนไซม์ urease ส่วนรายงานของวันวิสาข์ และคณะ (2560) กล่าวว่าเชื้อ *B. glumae* ไม่สร้างเอนไซม์ urease

การตรวจระบุชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ผลการวิเคราะห์ MALDI-TOF MS พบว่าตัวอย่างแบคทีเรีย type I ทั้ง 4 ไอโซเลท ระบุว่าเป็น เชื้อ *B. gladioli* ส่วนตัวอย่างแบคทีเรีย type II ได้แก่ NK010-05-03 และ K29WS2.4 ระบุว่าเป็นเชื้อ *B. gladioli* ส่วน MPWS และ BP02-004 ระบุเพียงว่าเป็นเชื้อ *Burkholdria* sp. ซึ่งอาจเนื่องจากว่าไม่มีข้อมูลของเชื้อ *B. glumae* ในฐานข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบ จึงสามารถระบุได้เพียงระดับจีนัส แต่สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อดังกล่าวไม่ใช่เชื้อ *B. gladioli* แต่จากการรายงานของ Kajiwara (2016) ที่วิเคราะห์ MALDI-TOF MS เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากเมล็ดข้าว ได้แก่ B. glumae และ *B. gladioli* pv. *gladioli* พบว่าสามารถระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

Table 1 Characterization of 49 isolates by colony morphology on NA.

Province (variety, year)	Isolate	Colony morphology on NA
Kalasin (RD 16, 2019)	K16-09-01 to K16-09-16 (16 isolates)	**Type I**; white, fried-egg-like colony, entire margin, produce yellow pigment and the average size was 1.16 micron (32 isolates)
Nakhon Pathom (KDML 105, 2017)	NK001-04-01, NK001-04-02, NK001-05-01, NK001-05-02, NK002-03-02, NK002-05-01, NK009-02-02, NK009-03-01 to NK009-03-03, NK009-05-01 to NK009-05-03 and NK018-05-01 to NK018-05-03 (16 isolates)	
Roi Et (KDML 105, 2013-2014)	K29WS07-001, K29WS07-004 to K29WS07-006 and MPWS (5 isolates)	**Type II**; white, fried-egg-like colony, entire margin, produce yellow pigment and the average size was 0.66 micron (17 isolates)
Pathum Thani (unknown, 2017)	BP02-001, BP02-004, BP02-005 and BP02-007 (4 isolates)	
Nakhon Pathom (KDML 105, 2017)	NK010-05-01 to NK010-05-03 (3 isolates)	
Sing Buri (unknown, 2019)	SBR05-001 to SBR05-005 (5 isolates)	

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of total 49 isolates from rice seeds.

Isolate	Growth condition					Gram's stain	Arginine dihydrolase	Urease test	Gelatin hydrolysis
	40 °C	3% NaCl	pH 4	pH 8	pH 9				
BP02-001, BP02-004, BP02-005, BP02-007, K29WS07-001, K29WS07-004 to K29WS07-006, MPWS, NK010-05-01 to NK010-05-03, SBR05-001 to SBR05-005 (17 isolates)	+	-	-	-	-	-	+	-	+
K16-09-01 to K16-09-09, K16-09-12 to K16-09-16, NK001-05-02, NK009-02-02, NK009-03-03. NK009-05-02 (18 isolates)	+	-	-	+	-	-	-	+	+
K16-09-10, K16-09-11, NK009-05-01, NK018-05-01 to NK018-05-03 (6 isolates)	+	-	-	+	-	-	-	-	+
NK001-04-01, NK001-04-02, NK002-03-02, NK002-05-01, NK009-05-03 (5 isolates)	+	-	-	-	-	-	-	+	+
NK001-05-01, NK009-03-01, NK009-03-02 (3 isolates)	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Remark: + = positive, - = negative

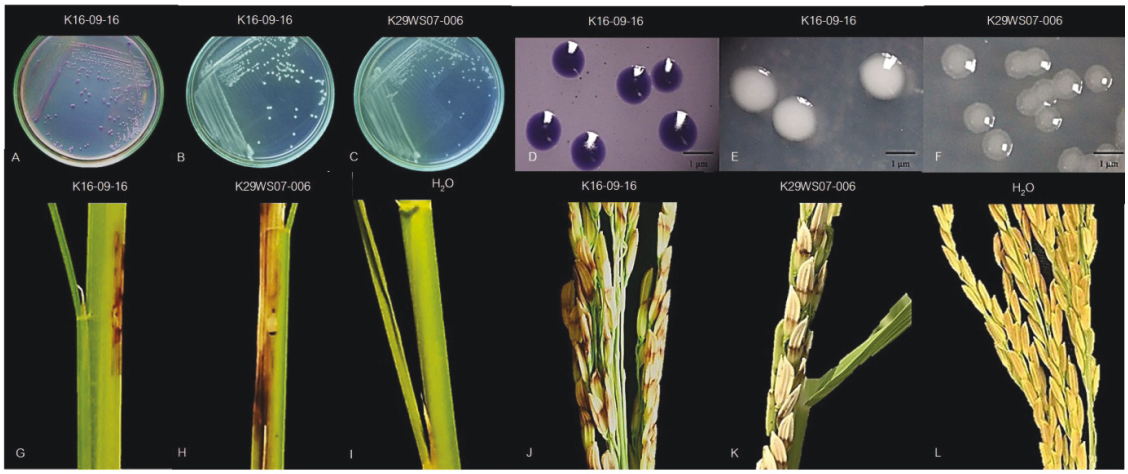

Figure 1 Colony morphology of K16-09-16 and K29WS07-006 isolates, each isolate was streaked and incubated at room temperature for two days; K16-09-16 on SP-G agar (A,D), K16-09-16 (B,E) and K29WS07-006 (C,F) on Nutrient agar. Sheath blight symptom on rice leaf sheath 7 days after inoculation on three month-old seedlings stage (G-H) compared to control (I). Panicle blight with seed discoloration and fertile seeds 7 days after inoculation on flowering stage (J-K) compared to control (L).

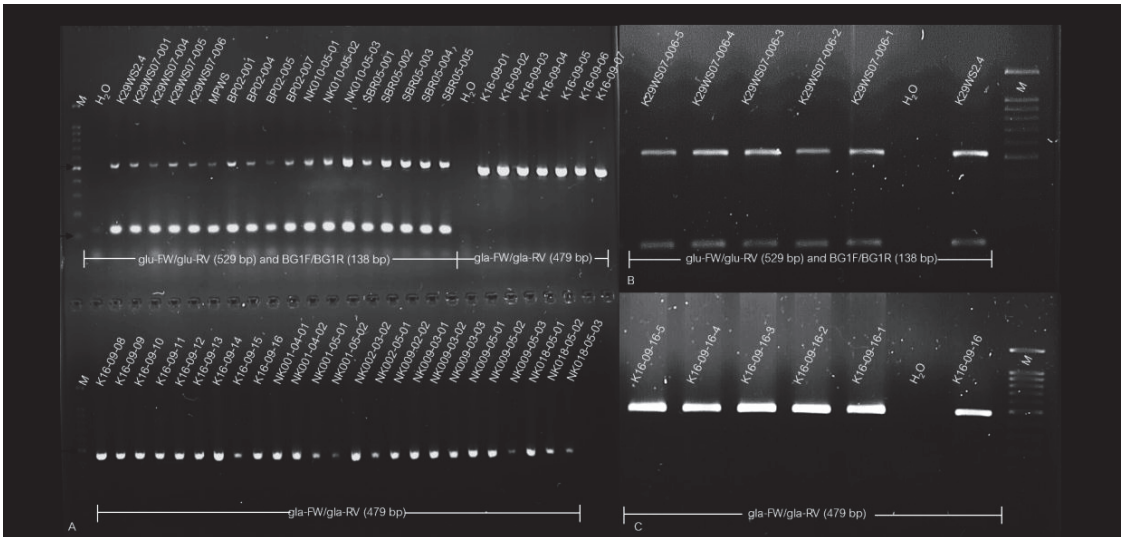

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of total 49 isolates amplified using primers; glu-FW/glu-RV, BG1F/BG1R and gla-FW/gla-RV: M= ExcelBandTM 100 bp DNA Ladder (Smobio, Taiwan), dH2O (Negative control), K29WS2.4 (Positive control of B. glumae) (A), PCR products of re-isolated bacteria after inoculated on rice; K29WS07-006 (B) and K16-09-16 (C)

การตรวจระบุชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ และวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ glu-FW/glu-RV และ BG1F/BG1R ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. glumae* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 529 bp และ 138 bp 2 แถบ ได้แก่เชื้อแบคทีเรีย type II ทั้ง 17 ไอโซเลท และเมื่อใช้ไพรเมอร์ gla-FW/ gla-RV ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. gladioli* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 479 bp แถบเดียว ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย type I ทั้ง 32 ไอโซเลท (Figure 2 A) โดยสามารถจัดกลุ่มได้สอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มด้วยขนาดโคโลนีและผลทดสอบการใช้ arginine และ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Maeda *et al*., (2006) ที่ตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค multiplex-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ glu-FW/glu-RV เพื่อใช้จำแนกเชื้อ *B. glumae* โดยเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 529 bp และใช้ไพรเมอร์ gla-FW/gla-RV ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. gladioli* เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 479 bp โดยสามารถจำแนก *B. glumae* และ *B. gladioli* สาเหตุโรคในเมล็ดข้าวได้ และรายงานของ Mulaw *et al*., (2018) ที่ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Burkholderia* spp. โดยใช้คู่ไพรเมอร์ glu-FW/glu-RV เพื่อเพิ่มปริมาณ ยีน gyrB ขนาด 529 bp ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. glumae*

จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนพบว่าเชื้อ type I ได้แก่ ไอโซเลท NK009-02-02, K16-09-16, K16-09-02, NK001-04-01 และ NK018-05-02 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. gladioli* (accession AB239178.1, AB220893 และ AB220902.1) โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มที่ 100 % เชื้อ type II ได้แก่ ไอโซเลท BP02-007, MPWS, K29WS07-001, NK010-05-03 และ BP02-004 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. glumae* (accession MF139560, KX638430.1 และKX213522.1) โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มที่ 95 % และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *B. plantarii* (accession AB190657.1, AB190645.1 และ AB190654) สอดคล้องกับรายงานของ Maeda *et al*., (2006) กล่าวว่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *B. plantarii* *B. glumae*

และ *B. gladioli* ของยีน *gyrB* และ *rpoD* มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยเชื้อ *B. glumae* MAFF 301169T และ *B. plantarii* MAFF 301723T มีความเหมือนกันที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 96.2% ส่วนแบคทีเรียที่ซึ่งจัดกลุ่มแยกจากทั้ง 2 กลุ่มนี้ชัดเจน ได้แก่ *Pesudomonas fuscovaginae* (FN554185.1), *Acidovorax avence* (EU024200.1), *Xanthomanas oryzae* pv. *oryzae* (MH560799.1) และ *X. oryzae* pv. oryzicola (MF248714.1) ตามลำดับ (Figure 3)

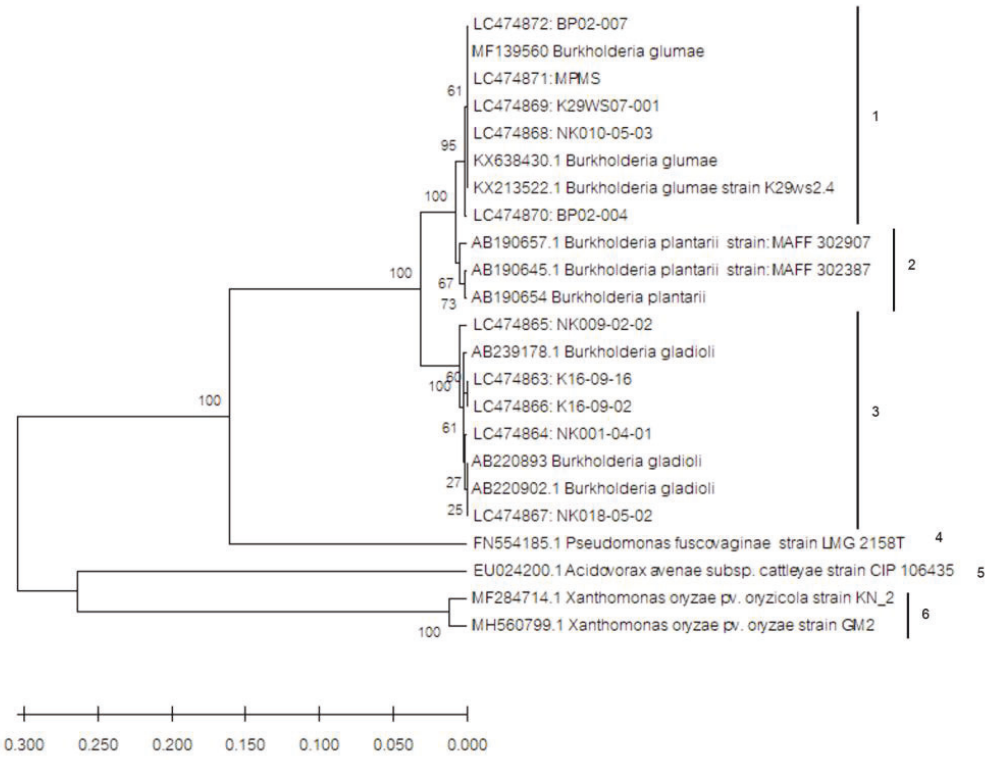

Figure 3 UPGMA phylogenetic tree was computed from the gyrB gene sequences of 10 isolates from rice seeds and thirteen reference strains from GenBank, NCBI. A bootstrap analysis was performed with 1,200 repetitions with MEGA X software.

สรุป

แยกเชื้อแบคทีเรียจากข้าวที่แสดงอาการเมล็ดด่างได้ทั้งสิ้น 49 ไอโซเลท จำแนกลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA ได้ 2 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คือ type I ขนาดเฉลี่ย 1.16 ไมครอน และ type II ขนาดเฉลี่ย 0.66 ไมครอน โดยทั้ง 2 กลุ่มก่อโรคในข้าว โดยทำให้เกิดแผลไหม้ ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มบนกาบใบ และก่อให้เกิดอาการเมล็ดด่างบนรวงข้าวหรืออาการรวงไหม้ นอกจากนี้ก่อให้เกิดอาการเน่าบนหอมหัวใหญ่ได้เช่นเดียวกัน แต่พบว่า type I ก่อให้เกิดโรครุนแรงน้อยกว่า type II การทดสอบทางชีวเคมีที่สามารถจำแนก 2 กลุ่ม ออกจากกันชัดเจน คือการใช้ arginine โดยเชื้อ *B. gladioli* ไม่สามารถใช้ arginine ส่วนเชื้อ *B. glumae* สามารถใช้ arginine ได้เมื่อวิเคราะห์ MALDI-TOF MS ทั้งสองกลุ่ม จัดอยู่ในจีนัส *Burkholderia* โดยสามารถระบุได้แม่นยำเฉพาะเชื้อ type I ที่เป็นเชื้อ *B. gladioli* เมื่อตรวจระบุชนิดด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ

กับสปีชีส์เชื้อ พบว่า type I จำแนกเป็นเชื้อ *B. gladioli* ส่วน type II จำแนกเป็นเชื้อ *B. glumae* จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *gyrB* เปรียบเทียบกับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank, NCBI พบว่า type I จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. gladioli* ส่วน type II จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *B. glumae* จากผลงานวิจัยนี้สามารถยืนยันได้ว่าพบเชื้อ *B. gladioli* และ *B. glumae* ในประเทศไทยที่ก่อโรคบนกาบใบข้าวและเมล็ดบนรวงข้าว ทั้งนี้การจำแนกชนิดเชื้อที่มีความแม่นยำจะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดที่อาจจะเกิดขึ้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั้งในแง่คุณภาพและปริมาณผลผลิตข้าวของไทยได้

คำขอบคุณ

ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) กับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ภายใต้โครงการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของข้าวในประเทศไทย สัญญาเลขที่ MRG5680124 ขอขอบคุณ รศ.ดร.วิชัย โฆสิตรัตน นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สุรีย์พร บัวอาจ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2553. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย น. 2413-2437. ในรายงาน ความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2551 สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วิชัย โฆสิตรัตน. 2560. แบคทีเรียก่อโรคพืช. สมาคมนักโรคพืชไทย. กรุงเทพมหานคร. 242 หน้า.

วันวิสาข์ เพร็ชอำไพ จุฑาเทพ วัชรไชยคปต์ สุจินต์ ภัทรภูวดล และ วิชัย โฆสิตรัตน. 2560. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้และเมล็ดด่างของข้าวโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของกลุ่มยีน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 48: 297-311.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง กิตติยา ทองจันทร์ และ ภูษณิศา เชษฐาพงศ์. 2562. โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของกล้วยไม้สกลม็อคคาร่าและการควบคุม. แก่นเกษตร 47 (ฉบับพิเศษ 1): 1665-1672.

Kato, T., T. Morohoshi, S. Tsushima and T. Ikeda. 2013. Phenotypic characterization of colony morphological mutants of *Burkholderia glumae* that emerged during subculture. Journal of General Plant Pathology 79(4): 249-259.

Kajiwara, H. 2016. Direct detection of the plant pathogens *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, and *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* in infected rice seedlings using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods 120:1-5.

Keith, L. M., K.T. Sewake and F.T. Zee. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. Plant Disease 89: 1273-1278.

Maeda, Y. H. Shinohara, A. Kiba, K. Ohnishi, N. Furuya, Y. Kawamura, T. Ezaki, P. Vandamme, S. Tsushima and Y. Hikichi. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1031-1038.

Mulaw, T., Y. Wamishe and Y. Jia. 2018. Characterization and in plant detection of bacteria that cause bacterial panicle blight of rice. Research Journal of Plant Pathology 1(1):1-5.

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 bacterial panicle blight in rice in the southern United States. Plant Disease 93(9): 896-905.

Ruiz, C. R., J. C. Lara, M. I. Jimenez-FeijoÓ and J. M. Cevallos. 2018. Interaction of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* in symptom development in rice seeds and seedlings. Canadian Journal of Plant Pathology. 40(3): 347-357.

Schaad, N.W., J.B.Jone and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathogical Society. Minnesota., USA. 373 p.

Ura, H., N. Furuya, K. Iiyama, M. Hidaka, K. Tsuchiya and N. Matsuyama. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. Journal of General Plant Pathology 72(2): 98–103.

Urakami, T., C. I. Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K. Suzuki and M. Komagata. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 44(2): 235-245.

Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters and J. R. W. Govan. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47(4): 1188-1200.

Yuan, X. 2004. Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisana. M.S. Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 103 p.