

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดด้วยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีน

Identification of Stalk Rot Bacteria of Corn by Multilocus Sequence Analysis

อริษา จิตรติกรกุล¹ จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์^{2,3} สุจินต์ ภัทรภูวadol^{1,2,3} และ วิชัย โขสิตรัตน์^{1,2,3,*}
Arisa Jittikornkul¹, 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 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: สิงหาคม 2560 Accepted: August 2017

* Corresponding author: agrwck@ku.ac.th

ABSTRACT: Samples of bacterial stalk rot of corn were collected from Saraburi and Kanchanaburi provinces. The isolated bacteria were pathogenicity tested on corn seedlings of the varieties SM2678 and ST0390 by toothpick inoculating method. Eighteen bacterial isolates that fulfilled Koch's postulates on pathogenicity were further characterized by Gram's staining, physiological, biochemical testing, and by PCR with specific primer sets designed for *Dickeya* spp. Results revealed that all of 18 bacterial isolates were Gram negative, rod-shaped, 0.25–0.67 x 1.07–5.69 µm, occurred mostly alone or in pairs, but sometimes in short chains, motile, facultative anaerobic, can be grown at 36 °C, did not grow in 5% NaCl, produced catalase, gelatinase and indole, did not produce oxidase and urease, reduced nitrate, catabolized citrate, sucrose, lactose and D-(–)-arabinose, but not D-sorbitol, D-(+)-maltose and L-arginine. All these phenotypes indicated that the isolates resembled to *Dickeya* spp. Positive PCR detection with specific primer sets to *Dickeya* spp. were also obtained. Sequence comparative analysis of 16S rRNA and *recA* genes from four isolates, DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01 and DZ15KB05 grouped into *Dickeya* spp. Further investigation based on multilocus sequence analysis (MLSA) by using concatenated phylogenies produced from multiple loci of house-keeping genes, *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recA*, *recN* and *rpoB* these four bacterial isolates were resemble of *Dickeya zeae*.

Keywords: *Dickeya zeae*, *Erwinia chrysanthemi*, bacterial stalk rot, corn, 16S rRNA, multilocus sequence analysis

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดจาก จังหวัดสระบุรีและกาญจนบุรีมาแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนต้นกล้าข้าวโพด พันธุ์ SM2678 และ ST0390 ด้วยวิธี toothpick method นำแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท ที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคมาทดสอบการติดสีแบบแกรม คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี และตรวจสอบด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dickeya* spp. พบว่าทั้ง 18 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบเซลล์รูปร่างท่อนตรง ขนาด $0.25 - 0.67 \times 1.07 - 5.69$ ไมครอนส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ บางครั้งอาจต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เคลื่อนที่ได้ เป็นพวก facultative anaerobe เจริญได้ที่ 36 องศาเซลเซียสไม่เจริญในอาหารที่มี 5% NaCl สร้างเอนไซม์ catalase gelatinase และสร้าง indole ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และ urease ริดิวซ์ในเตรทได้ ใช้ citrate sucrose lactose และ D(-)-arabinose ได้แต่ไม่ใช้ D-sorbitol, D-(+)-maltose และ L-arginine สอดคล้องกับเชื้อ *Dickeya* spp. ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา PCR ต่อชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dickeya* spp. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *recA* ของเชื้อ ไอโซเลท DZ15SB01 DZ15SB06 DZ15KB01 และ DZ15KB05 ให้ผลการวิเคราะห์ว่าเชื้อทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Dickeya* spp. เช่นกัน เมื่อนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำคัญหลัก *dnaJ dnaX gyrB recA recN* และ *rpoB* ที่นำมาเชื่อมต่อกันทั้ง 6 ยีน วิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจำแนกได้ว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Dickeya zeae*

คำสำคัญ: *Dickeya zeae*, *Erwinia chrysanthemi*, โรคลำต้นเน่า, ข้าวโพด, 16S rRNA, multilocus sequence analysis

บทนำ

โรคลำต้นเน่าของข้าวโพดเกิดโรคได้จากเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิด จัดเป็นโรคที่สำคัญในประเทศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรค เช่นเชื้อ *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* (Koehler, 1960) *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Johnson *et al.*, 1949) และ *Dickeya zeae* (Sabet, 1954) อาการโดยทั่วไปลำต้นจะเป็นแผลฉ่ำน้ำ แผลสีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อภายในเน่าและ มีกลิ่นเหม็นลำต้นยุบตัวลงและบิดงอ กรวยยอดเหี่ยวและเน่าหลุดออกจากลำต้นได้ง่าย อาจเกิดกับส่วนลำต้น เปลือกหุ้มฝัก ก้านฝัก หรือโคนต้น (Juangbhanich, 1962; Myung *et al.*, 2010)

ในประเทศไทยสิริพงศ์ อินทรามะ และคณะ รายงานพบโรคยอดเน่า (bacterial top rot) ของข้าวโพดระบาดในไร่ทดลองผสมพันธุ์ข้าวโพด แผนกวิชาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ.2502 (Juangbhanich, 1962) ผลการศึกษาเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหาร ลักษณะทางสรีรวิทยา และความจำเพาะทางชีววิทยา (biological specialization) พบว่าคล้ายกับเชื้อ *Erwinia carotovora* f. sp. *Zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่า (bacterial stalk rot) ของข้าวโพดในประเทศอียิปต์ (Sabet, 1954) และจำแนกเชื้อดังกล่าวเป็น *E. carotovora* f. sp. *Zeae* (Juangbhanich, 1962) ต่อมา Prathuangwong *et al.* (2004) สำรวจโรคข้าวโพดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางระหว่างปี พ.ศ. 2545-2546 พบการระบาดของโรคลำต้นเน่าประมาณ 10% กับข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมจากต่างประเทศ ในสภาพอากาศที่ร้อนและชื้น และจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็น *Erwinia chrysanthemi* Samson *et al.* (2005) ศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) จำนวน 75 สายพันธุ์ที่แยกจากพืชอาศัยหลายชนิด รวมทั้งเชื้อ type strain ของ *Brenneria paradisiaca*

(CFBP 4178^T) และ *P. cyripedii* (CFBP3613^T) โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อ *P. chrysanthemi* จัดแยกกลุ่มออกจากจีโนม *Pectobacterium* และ *Brenneria* อย่างชัดเจน จึงเสนอเปลี่ยนชื่อกลุ่มเชื้อ *P. chrysanthemi* เป็นจีโนมใหม่คือ *Dickeya* และผลการศึกษาด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization ลักษณะทางพีโนไทป์ 121 ลักษณะ และจากคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา จึงจำแนก *Dickeya* ออกเป็น 6 สปีชีส์ ได้แก่ *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiacal* และ *D. zeae*

เนื่องจากโรคลำต้นเน่าเกิดได้จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดและยังขาดการศึกษาจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคที่พบในประเทศไทยที่ต่อเนื่องและเป็นปัจจุบัน เนื่องจากขาดเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (type strain) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดที่พบในประเทศไทยโดยใช้วิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำคัญหลัก (house-keeping gene) ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) ที่มีการใช้เปรียบเทียบแทนวิธี DNA-DNA hybridization เพื่อให้ทราบชนิดเชื้อที่ระบาดอยู่ในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการเกิดโรค
แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างข้าวโพดที่มีอาการแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาล เนื้อเยื่อลำต้นเน่าและ

มีกลิ่นเหม็น ลำต้นบิดงอและหักพับลง จากอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี และอำเภอบ่อพลอย จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่าตามความยาวของลำต้น บีบลำต้นและใช้ลูบปลดเชื้อและ bacterial ooze ลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร และเซลล์แขวนลอยมา cross streak บนอาหาร Nutrient agar (NA; beef extract 3 กรัม peptone 5 กรัม agar 15 กรัม และน้ำ 1 ลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้ลูบตะไคร่โคลนเดี่ยวเตรียมแขวนลอยในน้ำนำไป cross streak บนอาหาร NA ทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงนำเชื้อมาทดสอบการเกิดโรคโดยปลูกเชื้อบนต้นกล้าข้าวโพดหวานพันธุ์ SM2678 และ ST0390 อายุ 14 วัน ไอลิเลทละ 4 ต้นจำนวน 3 ซ้ำโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งฆ่าเชื้อเปียโคลนเชื้อที่เรียแล้วจิ้มเข้าที่ลำต้นระดับเหนือดินประมาณ 2 เซนติเมตร และปิดรอยแผลด้วยวาสลิน (Chanon *et al.*, 2007) ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์โดยคลุมต้นข้าวโพดด้วยพลาสติกใสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดดูออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อด้วย

น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ โดยศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ร่วมกับเชื้ออ้างอิง (reference strain) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (PCC) DOAC-B772 และ DOAC-B1596 และ *Dickeya zeae* (DZ) DOAC-B1181 และ DOAC-B2448 ที่ได้รับอนุเคราะห์จากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กรมวิชาการเกษตร (Table 1)

Table 1 Bacterial strains used in this study

Strain	Host	Location	Year	Source of reference
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (PCC)				
DOAC-B772	Corn	Chiang Mai province	1988	^{1/} DOAC
DOAC-B1596	Chinese radish	Nonthaburi province	2001	DOAC
<i>Dickeya zeae</i> (DZ)				
DOAC-B1181	Sweet corn	Saraburiprovince	1992	DOAC
DOAC-B2448	Dendrobium orchid	Pathum Thani province	2014	DOAC
DZ 18 isolates				
11 isolates				
DZ15SB01-11	Corn	Saraburiprovince	2015	This study
7 isolates				
DZ15KB01-07	Corn	Kanchanaburi province	2015	This study

^{1/} Department of Agriculture Collection, Ministry of Agriculture and Cooperatives

2. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA สังเกตและบันทึกลักษณะของโคโลนี ขนาด รูปร่าง และสี ตรวจสอบการติดสีแกรมการเคลื่อนที่คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการได้แก่ การเจริญในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนการเจริญที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส การเจริญบนอาหารที่มี 5% NaCl การสร้างเอนไซม์ catalase เอนไซม์ oxidase เอนไซม์ urease และเอนไซม์ gelatinase การสร้าง indoleการใช้ citrate D-sorbitol D-(+)-maltose monohydrate D-(-)-arabinose lactose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน การรีดิวิซ์ ไนเตรท และการย่อยแป้ง (Kositratana, 2006)

3. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dickeya* spp. จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ADE1/ ADE2 Df/ Dr Ech1/ Ech1' และ LF/ LR เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Czajkowski *et al.* (2009) กำหนดอุณหภูมิและเวลาในแต่ละปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 2 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene, UK)

4.การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *recA*

เลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำดับนำของข้าวโพดจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ DZ15SB01 และ DZ15SB06 เป็นตัวแทนเชื้อที่แยกจากจังหวัดสระบุรี เชื้อไอโซเลท DZ15KB01 และ DZ15KB05 จากจังหวัดกาญจนบุรี มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *recA* ร่วมกับเชื้ออ้างอิง DOAC-B772, DOAC-B1596, DOAC-B1181 และ DOAC-B2448 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกำหนดอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 2 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำมาเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy (Promega, USA) ด้วยเอนไซม์ DNA ligase ย้ายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock transformation คัดเลือกโคลนด้วยวิธี Blue-white screening ตรวจสอบการมีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13F-pUC(-40) (5'GTTTTCCAGTCACGAC-3') และ M13R-pUC(-26) (5'-CAGGAAACAGCTA TGAC-3') เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรียและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan) นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเปรียบเทียบแต่ละส่วนดีเอ็นเอกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) และจัดทำ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

5.การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recN* และ *rpoB* ของเชื้อดังกล่าวข้างต้นด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 2 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dnaJ*, *recN* และ *rpoB* ในรูปแบบของ PCR product ส่วนยีน *dnaX* และ *gyrB* ส่งในรูปแบบของโคลนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และ *recA* นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recA*, *recN* และ *rpoB* ที่ได้รับมาเชื่อมต่อกัน (concatenate) วิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกันโดยใช้ ClustalW และจัดทำ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

Table 2 Primers and DNA amplification conditions used in this study

Target	Product size (bp)	Primer	Sequence (5'-3')	PCR cycling condition	References
<i>Dickeya</i> spp. (<i>peIADE</i>)	420	ADE1	GATCAGAAAGCCCGCAGC CAGAT	2 min 94 °C, 30 x (30 s 94 °C, 2 min 72 °C, 2 min 72 °C), 2 min 72 °C	Nassar <i>et al.</i> (1996)
		ADE2	CTGTGGCCGATCAGGATGG TTTTGTCTGTGC		
<i>Dickeya</i> spp. (ITS)	133	Df	AGAGTCAAAGCGTCTTG	2 min 94 °C, 30 x (30 s 94 °C, 20 s 50 °C, 50 s 72 °C), 2 min 72 °C	Laurila <i>et al.</i> (2010)
		Dr	TTTCACCCACCGTCAGTC		
<i>Dickeya</i> spp. (ITS)	171	LF	TTCGTCTAGAGGCCAGGAC	2 min 94 °C, 30 x (30 s 94 °C, 20 s 50 °C, 50 s 72 °C), 2 min 72 °C	Li <i>et al.</i> (2011)
		LR	TCAGCTTGTCCGGATTGTT		
<i>Dickeya</i> spp. (<i>pell</i>)	600	Ech1 Ech1'	TGGCGCGTCAGGAAGTTTAT TCACCGGTCAGGGTGAAGTT	10 min 94 °C, 30 x (1 min 94 °C, 2 min 55 °C, 2 min 72 °C), 10 min 72 °C	Diallo <i>et al.</i> (2009)
16S rRNA	1,503	fD2	CCGAATTCGTGACAACAGA GTTTGATCATGGCTCAG	5 min 94 °C, 32 x (1 min 94 °C, 1 min 60 °C, 2 min 72 °C), 5 min 72 °C	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
		rP1	CCCGGGATCCAAGCTTACGG TTACCTTGTACGACTT		
recA	737	recAf recAr	GGTAAAGGGTCTATCATGCG CCTTACCATACATAATTTGGA	5 min 95 °C, 30 x (1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 2 min 72 °C), 5 min 72 °C	Waleron <i>et al.</i> (2002)
<i>dnaI</i>	672	<i>dnaJF</i> <i>dnaJR</i>	GATTTACGCTACAMCATGGA TTCACGCCRTCRAARAARY	4 min 94 °C, 30 x (15 s 94 °C, 1 min 50 °C, 45 s 72 °C), 5 min 72 °C	Nhung <i>et al.</i> (2007)
<i>dnaX</i>	536	<i>dnaXf</i> <i>dnaXr</i>	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG TCGACATCCARCGCYTTGAGATG	5 min 95 °C, 30 x (1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 2 min 72 °C), 5 min 72 °C	Slawiak <i>et al.</i> (2009)
<i>gyrB</i>	2,412	<i>gyrBf1</i>	ATGTCGAATTCTTATGACTCCTC	5 min 95 °C, 30 x (1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 2 min 72 °C), 7 min 72 °C	Zhang <i>et al.</i> (2014)
		<i>gyrBr1</i>	TCARATATCRATATTGCGYGCTTTC		
<i>recN</i>	832	recN22F	AGTAACTTCGCCATYGTGCGCGA	4 min 94 °C, 30 x (15 s 94 °C, 1 min 60 °C, 15 s 72 °C), 5 min 72 °C	Marrero <i>et al.</i> (2013)
<i>rpoB</i>	1,035	recN943R <i>rpoB</i> Dic-F <i>rpoB</i> CM31b-R	AYRTGRTGYTTGCGTGCCA GAAGTCGACGATATCGACC CCTGAACAACACGCTCGGA	4 min 94 °C, 30 x (15 s 94 °C, 1 min 55 °C, 15 s 72 °C), 5 min 72 °C	This study Brady <i>et al.</i> (2008)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 18 ไอโซเลท ทำให้ต้นกล้าข้าวโพดอายุ 14 วัน แสดงอาการโรค ลำต้นเน่าภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อ เริ่มจากมีอาการ แผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาล ต่อมาเนื้อเยื่อลำต้นเน่าและยุบตัวลง ต้นที่มีอาการรุนแรงลำต้นจะหักล้มลงภายใน 2-6 วัน เป็นแบคทีเรียที่แยกจากอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี 11 ไอโซเลท และอำเภอบ่อพลอย จังหวัดกาญจนบุรี 7 ไอโซเลทโดยที่กรรมวิธีควบคุมลบ (negative control) คือ ต้นที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อไม่ทำให้ต้นกล้าข้าวโพดปรากฏอาการโรค (Figure 1) เช่นเดียวกับต้นที่ปลูกเชื้ออ้างอิง PCCDOAC-B1596 ที่แยกจากผักกาดหัว เชื้ออ้างอิง PCC DOAC-B772 และ DZ DOAC-B1181 ที่แยกจากข้าวโพด และเชื้ออ้างอิง DZDOAC-B2448 ที่แยกจากกล้วยไม้สกุลหวายก็ไม่ทำให้ต้นกล้าข้าวโพดเกิดโรคเช่นกัน

2. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาทาง สรีรวิทยาและชีวเคมี

เชื้อทั้ง 18 ไอโซเลทบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ โค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร (convex) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.9-1.5 มิลลิเมตร โคโลนีมีขาวทึบแสง ขอบโคโลนีโปร่งแสงเล็กน้อย ต่อมาโคโลนีขยายขนาดใหญ่ขึ้น รูปร่างกลมหรือค่อนข้างรี สีขาวครีมทึบแสงเจริญสูงจากผิวหน้าเล็กน้อย (raised) ไม่โค้งนูนเหมือนช่วงแรก และอาจพบลักษณะเป็นปุ่มตรงกลาง (umbonate) ขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (undulate) (Figure 2) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปท่อนตรง หัวท้ายมนขนาด 0.25-0.67 x 1.07-5.69 ไมครอน ส่วนมากพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ และอาจพบต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มี ออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria)

เจริญได้ที่ 36 องศาเซลเซียสไม่เจริญในอาหารที่มี 5% NaCl สร้างเอนไซม์ catalase และ gelatinase ได้ แต่ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และ urease รีดิวซ์ไนเตรท และผลิต indole ได้ ใช้ citrate ได้ ผลิตกรดจาก sucrose D-(-)-arabinose และ lactose แต่ไม่ผลิตกรดจาก D-sorbitol และ (+)-maltose monohydrate ไม่ย่อย L-arginine และแป้ง (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Dickeya* (Brenner *et al.*, 2005; Samson *et al.*, 2005)

3. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกจากโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดเชื้ออ้างอิง DZDOAC-B1181 และ DOAC-B2448 ให้ผลบวกเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dickeya* spp. ไพรเมอร์ ADE1/ADE2 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pelADE* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 420 bp (Figure 3 A) สอดคล้องกับรายงานของ Nassar *et al.* (1996) ไพรเมอร์ Df/ Dr เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 133 bp (Figure 3 B) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Laurila *et al.* (2010) ในการตรวจสอบ *Dickeya* spp. ที่แยกจากมันฝรั่งและน้ำจากแหล่งน้ำในประเทศฟินแลนด์ไพรเมอร์ Ech1/ Ech1' ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pell* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 600 bp (Figure 3 C) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Diallo *et al.* (2009) ในการตรวจสอบเชื้อ *Dickeya* spp. สาเหตุโรคเน่าและของมันฝรั่ง และไพรเมอร์ LF/ LR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 171 bp (Figure 3D) สอดคล้องกับการทดลองของ Li *et al.* (2011) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ดังกล่าวจากบริเวณ 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Dickeya* sp. สาเหตุโรคเน่าและของต้นกล้วยในขณะ ที่เชื้ออ้างอิง PCCDOAC-B772 และ DOAC-B1596 ให้ผลลบในปฏิกิริยา การตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ ADE1/ADE2 Df/ Dr และ Ech1/ Ech1' ส่วนผลการ

ตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ LF/ LR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ PCCDOAC-B772 และ DOAC-B1596 ได้ขนาดความยาวมากกว่า (ประมาณ 200 bp) โดยที่ Li *et al.* (2011) รายงานว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน ITS ของเชื้อ PCC ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อนุรักษ์หรือจำนวนเชื้อที่ทดสอบไม่ครอบคลุมพอ

4. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ขนาด 1,503 bp ของตัวแทนเชื้อจากจังหวัดสระบุรี ไอโซเลท DZ15SB01 และ DZ15SB06 และตัวแทนเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรี ไอโซเลท DZ15KB01 และ DZ15KB05 เชื้ออ้างอิง PCC DOAC-B1596 DOAC-B772 และเชื้ออ้างอิง DZ DOAC-B1181 DOAC-B2448 กับข้อมูลในฐาน NCBI ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าไอโซเลท DZ15SB01, DZ15KB06 และ DZ15KB01 มีความเหมือน *Dickeya* spp. 97–99% และเหมือน *Pectobacterium* spp. 97% ในขณะที่ไอโซเลท DZ15KB01 มีความเหมือน *Dickeya* spp. 98–99% และเหมือน *Pectobacterium* spp. 98% ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining พบว่าเชื้อไอโซเลท DZ15SB01 DZ15KB06 DZ15KB01 DZ15KB05 DOAC-B1181 และ DOAC-B2448 มีความใกล้เคียงกับ *D. zeae* Ech586 *D. zeae* NCPPB2538^T และ *D. chrysanthemi* NCPPB 516^T (Figure 4) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกจากฟีโลเดนดรอน (*Philodendron* sp.) ข้าวโพด (*Zea mays*) และวายุเล่ (*Parthenium argentatum*) ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท DOAC-B772 ใกล้เคียงกับไอโซเลท DOAC-B1596 ที่แยกจากผักกาดหัว และ PCC21 ที่แยกจากกะหล่ำ ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ไม่สามารถจัดกลุ่มแยกแต่ละสปีชีส์ได้เนื่องจากมีความเหมือนกันของยีน 16S rRNA ที่สูงมากในเชื้อกลุ่มนี้ (Czajkowski *et al.*, 2009)

5. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*

การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของยีน *recA* ขนาด 737 bp พบว่าแต่ละสปีชีส์ของ *Dickeya* แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ซึ่ง strain ของ *D. zeae* แยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ strain NCPPB 2538^T MK19 NCPPB 3532 และ Ech586 ที่แยกจากข้าวโพด แม่น้ำ มั่นฝรั่ง และฟีโลเดนดรอน ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ strain CSL RW192 และ NCPPB 3531 ที่แยกจากแม่น้ำและม่นฝรั่ง strain EC1 และ DZ2Q ที่แยกจากข้าวโดยเชื้อไอโซเลท DZ15SB01 DZ15SB06 DZ15KB01 DZ15KB05 เชื้ออ้างอิง DZ DOAC-B1181 และ DOAC-B2448 อยู่ในกลุ่มที่ 2 นี้ (Figure 5) สอดคล้องกับรายงานของ (Parkinson *et al.*, 2009) ที่ยีน *recA* สามารถแยกความแตกต่างของ *Dickeya* spp. ออกจากกันได้ในระดับสปีชีส์และต่ำกว่าสปีชีส์ (subspecies) และยังคงจำแนก *D. zeae* ออกเป็น 2 กลุ่มย่อยส่วนเชื้ออ้างอิง PCCDOAC-B772 และ DOAC-B1596 อยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum* จากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic ของยีน *recA* จำแนกได้ว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01 และ DZ15KB05 เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในยีน *Dickeya*

6. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไอโซเลท DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01 DZ15KB05 เชื้ออ้างอิง PCC, DOAC-B1596, DOAC-B772 และเชื้ออ้างอิง DZ, DOAC-B1181, DOAC-B2448 ด้วยวิธี MLSA ซึ่งประกอบด้วยยีน *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recA*, *recN* และ *rpoB* เชื่อมต่อกันได้ 6,224 bp ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อไอโซเลท DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01 และ DZ15KB05 มีความเหมือนกันภายใน 4 ไอโซเลท 99.93%–99.99% เชื้อไอโซเลท

DZ15SB01 DZ15SB06 และ DZ15KB01 มีความเหมือน *D. zeae* 2538^T ซึ่งเป็น type strain 99.78% และเชื้อไอโซเลท DZ15KB05 มีความเหมือน *D. zeae* 2538^T 99.80% เมื่อวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining พบว่าจำแนก *Dickeya* spp. ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ *D. zeae*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* (subsp. *Dadantii* และ subsp. *dieffenbachiae*), *D. dianthicola*, *D. paradisiaca* และ *D. solani* โดยเชื้อสปิซิสเดียวกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แบคทีเรียไอโซเลท DZ15SB01, DZ15SB06 DZ15KB01 และ DZ15KB05 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้ออ้างอิง DZDOAC-B1181 และ DOAC-B2448 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกจากข้าวโพดและกล้วยไม้สกุลหวายตามลำดับ ทั้ง 6 ไอโซเลทอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *D. zeae* ยืนยันด้วยค่า bootstrap 100% จากผลการวิเคราะห์ MLSA ยังจำแนกเชื้อ *D. zeae* Ech586 ซึ่งแยกจากฟิโล

เดนดรอนออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ส่วนเชื้ออ้างอิง PCC, DOAC-B772 ที่แยกจากข้าวโพด และ DOAC-B1596 ที่แยกจากผักกาดหัว จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum* (Figure 6) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Marrero *et al.* (2013) ได้ใช้เทคนิค MLSA ของยีนสำคัญหลัก 4 ชนิด คือ *dnaA*, *dnaJ*, *dnaX* และ *recN* เชื่อมต่อกัน สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *D. zeae*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae* และ *D. paradisiaca* ออกจากกันได้ และการศึกษาใน (Figure 6) ยังให้ผลการจำแนกเชื้อ Ech586, Ech703 และ Ech1591 เป็นเชื้อ *D. zeae*, Ech586, *D. paradisiaca*, Ech703 และ *D. chrysanthemi*, Ech1591 ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่รายงานก่อนหน้านี้ (Marrero *et al.*, 2013) โดยเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดทั้ง 4 ไอโซเลทที่นำมาศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *D. zeae*

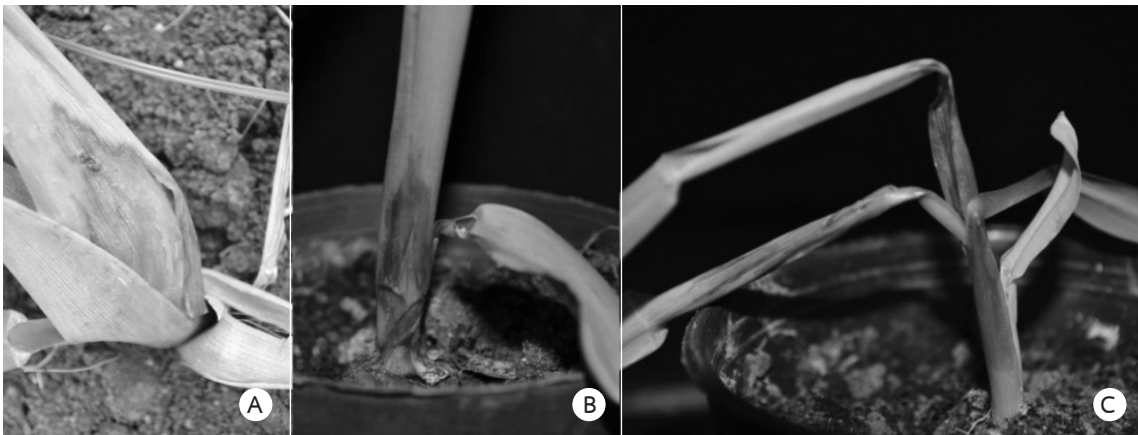


Figure 1 Symptoms of corn stalk rot: (A) on natural infected field corn, (B–C) artificial inoculation on corn seedlings, 2 days post inoculation

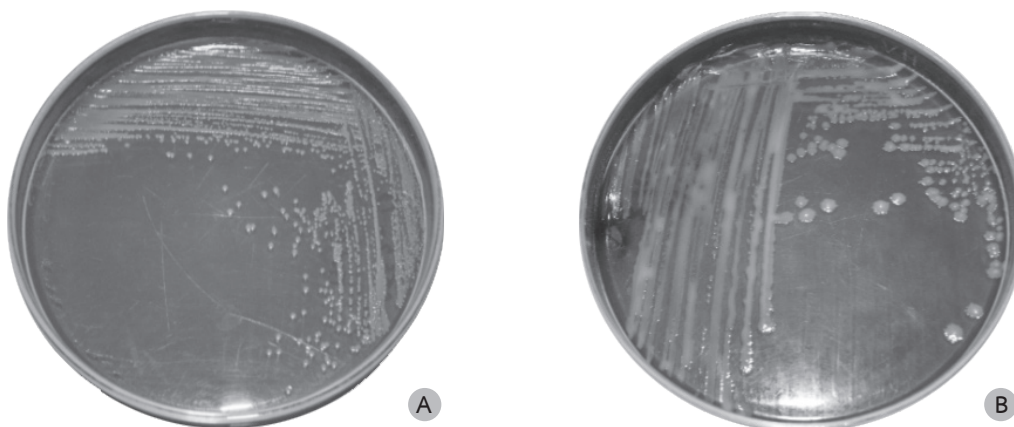


Figure 2 Colony characterization of stalk rot bacteria of corn on NA medium: (A) twenty four hours, (B) forty eight hours after incubation at 30 °C

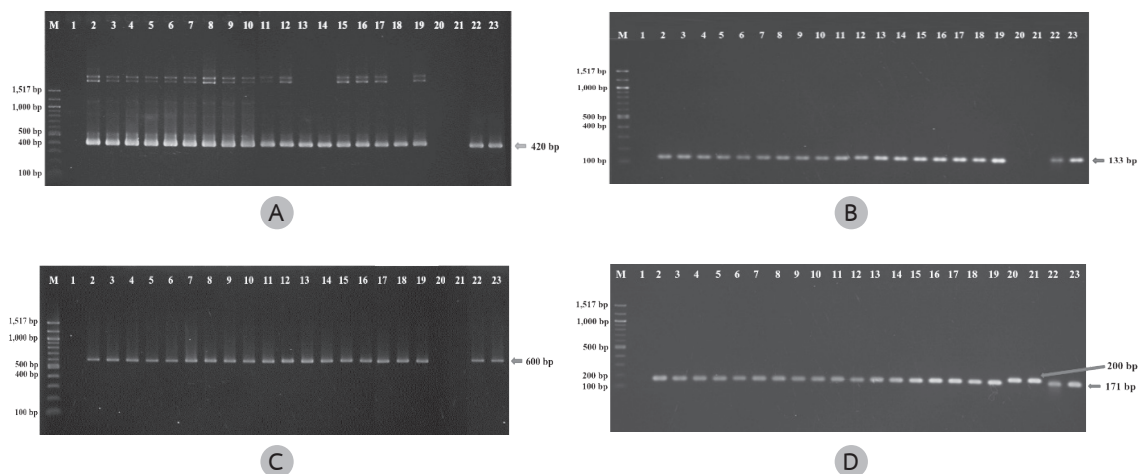


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products for detection of *Dickeya* spp., M = 100 bp DNA Ladder, lane 1 = dH₂O (non-template), lane 2-19 = bacteria causing corn stalk rot, lane 20-21 = *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* DOAC-B1596 and DOAC-B772 (negative control), respectively, lane 22-23 = *D. zea* DOAC-B1181 and DOAC-B2448 (positive control), respectively: (A) PCR-amplified products using the primers ADE1/ ADE2, (B) PCR-amplified products using the primers Df/ Dr, (C) PCR-amplified products using the primers Ech1/ Ech1', (D) PCR-amplified products using the primers LF/ LR

Table 3 Comparison of morphological, physiological and biochemical characteristics of 18 isolates of bacteria causing corn stalk rot(DZ) with *Dickeya* spp., *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* and *Enterobacter cloacae* subsp. *Dissolvens*

No. Isolate	Gram's staining	Cell shape	Cell size (µm)	Motility	Oxygen relationship	Growth at 36 °C	5% NaCl tolerance	Catalase test	Oxidase test	Gelatin liquefaction	Urease Production	Indole Production	Nitrate reduction	L-arginine	Starch hydrolase	Citrate utilization	D-sorbitol	Carbon source utilization			
																		D-(+)-maltose	D(-)-arabinose	Lactose	Sucrose
1. ^{1/18} isolates of DZ	negative	rod	0.39-0.43 x 1.30-3.04	^{2/4}	^{3/4} FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
2. ^{1/DOAC-B772}	negative	rod	0.32-0.42 x 1.27-3.01	+	FA	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
3. ^{1/DOAC-B1596}	negative	rod	0.30-0.42 x 1.25-3.00	+	FA	+	-/+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
4. ^{1/DOAC-B1181}	negative	rod	0.37-0.42 x 1.29-3.02	+	FA	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
5. ^{1/DOAC-B2448}	negative	rod	0.35-0.35 x 1.31-3.02	+	FA	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
6. ^{4/Dickeya aquatic}	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	ND	+	-	ND	+	+	+	-	ND	ND	-	ND	-	ND	
7. ^{5/D. chrysanthem}	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
8. ^{5/D. dadantii} subsp. <i>Dadantii</i>	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
9. ^{5/D. dadantii} subsp. <i>dieffenbachiae</i>	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
10. ^{5/D. dianthicola}	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
11. ^{7/D. fangzhongdai}	negative	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	
12. ^{5/D. paradisiaca}	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
13. ^{8/D. solani}	negative	rod	ND	+	FA	+	-	+	-	ND	ND	+	ND	-	ND	ND	-	+	+	ND	
14. ^{5/D. zeae}	negative	rod	0.50-1.00 x 1.00-3.00	+	FA	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
15. ^{9/Acidovorax avenae} subsp. <i>avenae</i>	negative	rod	0.20-1.20 x 0.80-5.00	+	AE	+	ND	ND	+	ND	ND	+	+	-	+	+	-	-	+	+	
16. ^{10/Enterobacter cloacae} subsp. <i>dissolvens</i>	negative	rod	0.60-1.00 x 1.20-3.00	+	FA	ND	ND	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

^{1/}= This study, ^{2/4} + = positive, - = negative, ND = No data, ^{3/4}FA = Facultative anaerobic, AE = Aerobic, ^{4/}Parkinson et al. (2014), ^{5/}Brenner et al. (2005) and Samson et al. (2005), ^{6/}positive 75%, 20% and 17% for *D. chrysanthem* bv. *chrysanthem*, *D. chrysanthem* bv. *partheniand*, *D. paradisiaca*, respectively (Samson et al., 2005), ^{7/}Tian et al. (2016), ^{8/}Parkinson et al. (2014), vander Wolf et al. (2014), ^{9/}Jones et al. (2001), ^{10/}Brenner et al. (2005)

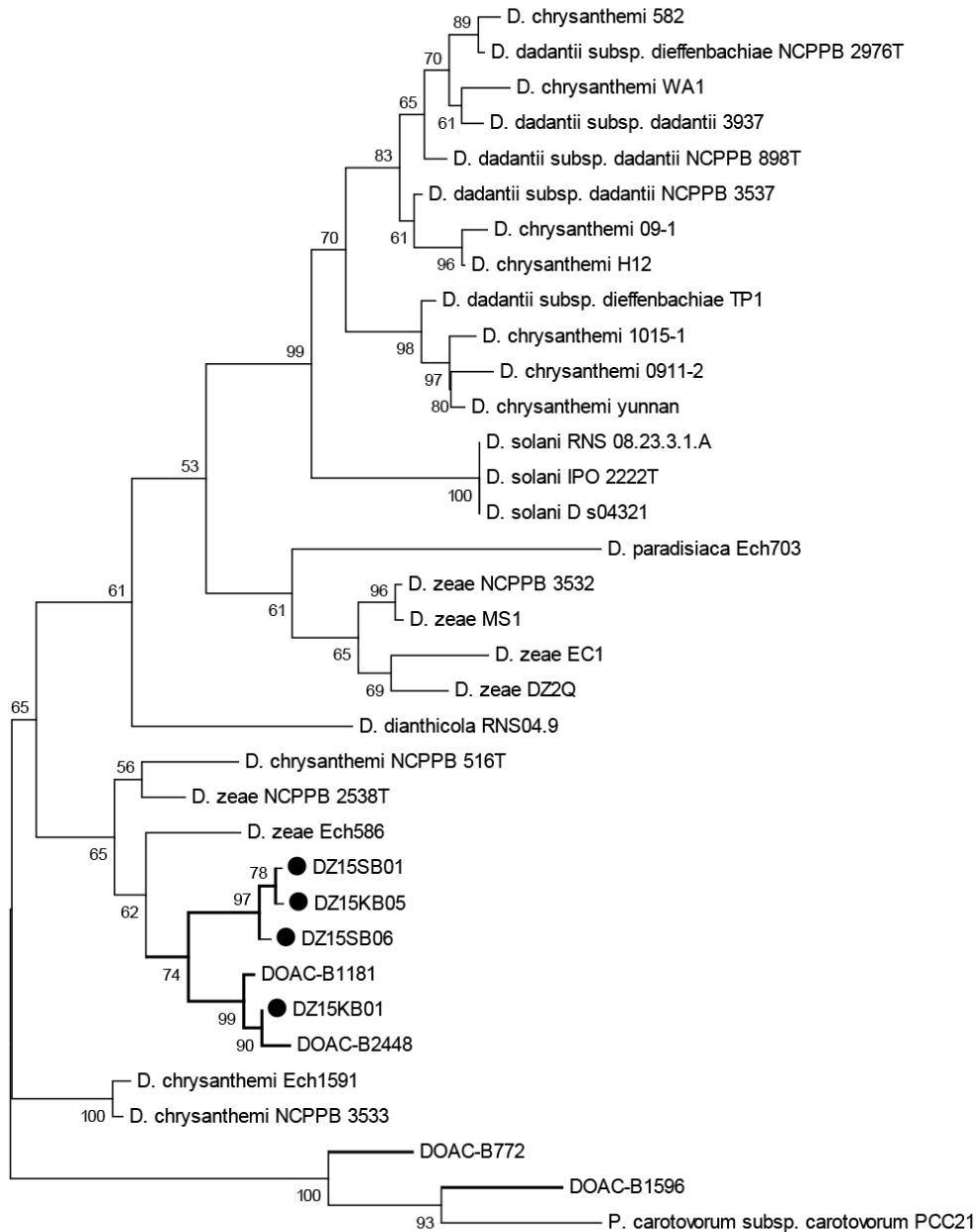


Figure 4 Phylogenetic tree of the 16S rRNA sequences of isolates DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01, DZ15KB05 (•), DOAC-B772, DOAC-B1596, DOAC-B1181, DOAC-B2448 and reference strains of *Dickeya* spp. Confidence values on the branches were obtained for 1,000 bootstrap replicates with MEGA 6.06 software

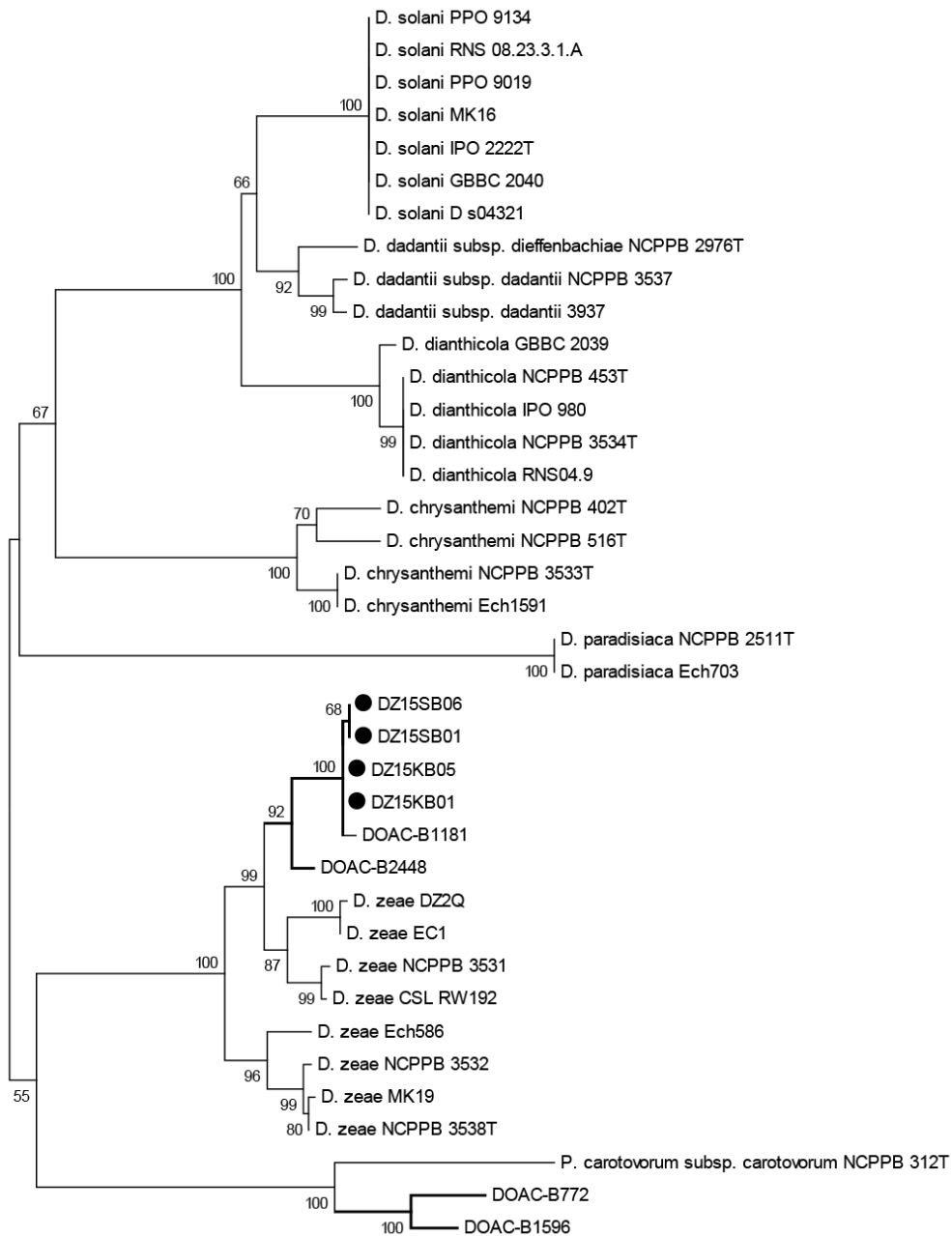


Figure 5 Phylogenetic tree of the *recA* sequences of isolates DZ15SB01 DZ15SB06, DZ15KB01, DZ15KB05 (•), DOAC-B772, DOAC-B1596, DOAC-B1181, DOAC-B2448 and reference strains of *Dickeya* spp. Confidence values on the branches were obtained for 1,000 bootstrap replicates with MEGA 6.06 software

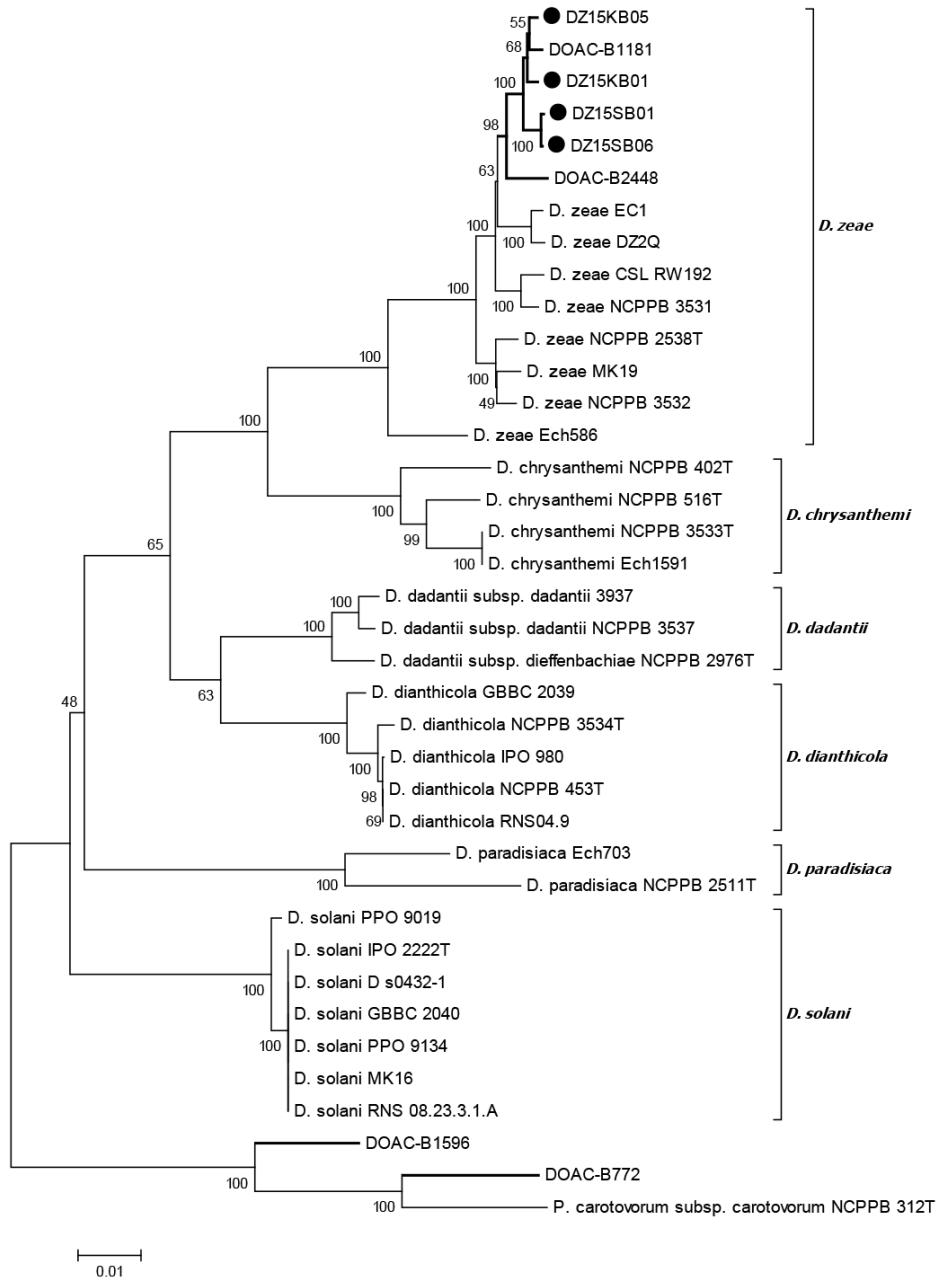


Figure 6 Phylogenetic tree of stalk rot bacteria (•) and *Dickeya* spp. based on comparative analysis with multilocus sequences of the concatenated sequences of *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recA*, *recN* and *rpo B* genes by Neighbour-joining method. Confidence values on the branches were obtained for 1,000 bootstrap replicates with MEGA 6.06 software

สรุป

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดที่พบในจังหวัดสระบุรีและกาญจนบุรีจำนวน 18 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีสอดคล้องกับคุณสมบัติของแบคทีเรียจิ้นส์ *Dickeya* ผลการศึกษาโดยเทคนิค PCR ด้วยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dickeya* spp. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *recA* ของเชื้อไอโซเลท DZ15SB01, DZ15SB06, DZ15KB01 และ DZ15KB05 จัดกลุ่มเชื้อนี้อยู่ในเชื้อ *Dickeya* spp. เมื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) ของยีน *dnaX*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *recN* และ *rpoB* ที่เชื่อมต่อกันยาว 6,224 bp ให้ผลการจำแนกเป็นเชื้อ *D. zeae* ดังที่เคยมีรายงานในประเทศเกาหลีใต้

(Myung *et al.*, 2010) และเม็กซิโก (Martinez-Cisneros *et al.*, 2014) ดังนั้นการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MLSA โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนสำคัญหลัก ให้ผลในการจำแนกเชื้อที่น่าเชื่อถือได้ ถึงแม้จะไม่สามารถนำเชื้อแบคทีเรีย type strain มาใช้ศึกษาเปรียบเทียบในการทดลองนี้ก็ตาม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้โครงการ “เครื่องมือนวัตกรรมและแพลตฟอร์มเพื่อการคัดเลือกพันธุ์ผักต้านทานโรค” ปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

- Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter, M. Vancanneyt, J. Swings and T. Coutinho. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 447–460.
- Brenner, D.J. and J.J. Farmer III. 2005. Family I. Enterobacteriaceae, pp. 587–850. *In* D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity, eds. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.* Springer, New York, USA.
- Chan-on, P., S. Kasem, P. Jutawantana and S. Prathuangwong. 2007. Characterization and development of inoculation technique of *Erwinia chrysanthemi* caused bacterial stalk rot of sweet corn, p. 655–662. *In* Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference: Plants Kasetsart University, Bangkok, Thailand (in Thai)
- Czajkowski, R., G.J. Grabe and J.M. van der Wolf. 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 263–275.

- Diallo, S., X. Latour, A. Groboillot, B. Smadja, P. Copin, N. Orange, M.G.J. Feuilloley and S. Chevalier. 2009. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 349–354.
- Johnson, A.G., A. Robert and L. Cash. 1949. Bacterial leaf blight and stalk rot of corn. *J. Agric. Res.* 78: 719–732.
- Jones, J.B., R.D. Gitaitis and N.W. Schaad. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*, pp. 121–138. In N.W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun, eds. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Juangbhanich, P. 1962. Morphological, Cultural and Physiological Characteristics of Corn Top-Rot Bacteria. B.Agr. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)
- Koehler, B. 1960. Corns Stalk Rots in Illinois: University of Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin No. 658. 90 p.
- Kositratana, W. 2006. *Plant Pathogenic Bacteria: Laboratory*. 2nd edition. Faculty of Agriculture at Kampaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. (in Thai)
- Laurila, J., A. Hannukkala, J. Nykyri, M. Pasanen, V. Hélias, L. Garland and M. Pirhonen. 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.* 126: 249–262.
- Li, P., B. Lin, H. Shen and X. Pu. 2011. Species-specific detection of *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in infected banana tissues, soil and water. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 16774–16780.
- Marrero, G., K.L. Schneider, D.M. Jenkins and A.M. Alvarez. 2013. Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3524–3539.
- Martinez-Cisneros, B.A., G. Juarez-Lopez, N. Valencia-Torres, E. Duran-Peralta and M. Mezzalama. 2014. First report of bacterial stalk rot of maize caused by *Dickeya zeae* in Mexico. *Plant Dis.* 98: 1267.
- Myung, I.S., I.H. Jeong, S.Y. Moon, W.G. Kim, S.W. Lee, Y.K. Shim and D.S. Ra. 2010. First report of bacterial stalk rot of sweet corn caused by *Dickeya zeae* in Korea. *New Dis. Rep.* 22: 15.
- Nassar, A., A. Darrasse, M. Lemattre, A. Kotoujansky, C. Dervin, R. Vedel and Y. Bertheau. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isoenzyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2228–2235.

- Nhung, P.H., K. Ohkusu, N. Mishima, M. Noda, M.M. Shah, X. Sun, M. Hayashi and T. Ezaki. 2007. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on *dnaJ* sequences. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 153-161.
- Parkinson, N., D. Stead, J. Bew, J. Heeney, L. Tsrer (Lahkim) and J. Elphinstone. 2009. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of *recA* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2388-2393.
- Parkinson, N., P. DeVos, M. Pirhonen and J. Elphinstone. 2014. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2264-2266.
- Prathuangwong, S., P. Jutawantana, K. Ketsuwan and S. Kasem. 2004. An outbreak of new bacterial diseases of corn in Thailand, p.249-262. *In Proceedings of Kasetsart University Corn and Sorghum Research Program Workshop, Phra Nakhon Si Ayutthaya.* (in Thai)
- Sabet, K.A. 1954. A new bacterial disease of maize in Egypt. *Emp. J. Exp. Agr.* 22: 65-67.
- Samson, R., J.B. Legendre, R. Christen, M.F.L. Saux, W. Achouak and L. Gardan. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1415-1427.
- Slawiak, M., J.R.C.M. van Beckhoven, A.G.C.L. Speksnijder, R. Czajkowski, G. Grabe and J.M. van der Wolf. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 245-261.
- 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.
- Tian, Y., Y. Zhao, X. Yuan, J. Yi, J. Fan, Z. Xu, B. Hu, S. De Boer and X. Li. 2016. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2831-2835.
- van der Wolf, J.M., E.H. Nijhuis, M.J. Kowalewska, G.S. Saddler, N. Parkinson, J.G. Elphinstone, L. Pritchard, I.K. Toth, E. Lojkowska, M. Potrykus, M. Waleron, P. de Vos, I. Cleenwerck, M. Pirhonen, L. Garland, V. He´lias, J.F. Pothier, V. Pflüger, B. Duffy, L. Tsrer and S. Manulis. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 768-774.

- Waleron, M., K. Waleron, A.J. Podhajska and E. Lojkowska. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 148: 583–595.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
- Zhang, J., H. Shen, X. Pu and B. Lin. 2014. Identification of *Dickeya zeae* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China. *Plant Dis.* 98: 436–442.