

การสำรวจและตรวจเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *Burkholderia gladioli*  
สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวในประเทศไทย ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล  
Survey and Molecular Detection of *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli*,  
the Cause of Bacterial Panicle Blight of Rice in Thailand

อริษา จิตรติกรกุล<sup>1,\*</sup> พยอรม โคเบลล์<sup>2</sup> ไอลดา ชุมแสง<sup>2</sup> ศุภลักษณ์กษณา สอนคองนอก<sup>2</sup> คนึงนิจ ศรีวิสัย<sup>3</sup>  
อังคณา กันทาจันทร์<sup>3</sup> กิตติพงษ์ ศรีม่วง<sup>4</sup> พชชนัน ชัยวิริยะพงศ์<sup>4</sup>  
สมศักดิ์ ลีลากุล<sup>1</sup> พิภูล ลีลากุล<sup>1</sup> สุนิตา ปาวะรี<sup>1</sup> ธีรดา หวังสมบุญดี<sup>5</sup>  
Arisa Jittikornkul<sup>1,\*</sup> Payorm Cobelli<sup>2</sup> Ilada Choomsang<sup>2</sup> Suphalaksana Sonkhongnok<sup>2</sup>  
Kanuengnij Srivirai<sup>3</sup> Angkana Kantachan<sup>3</sup> Kittipong Srimuang<sup>4</sup> Potchanan Chaiwiryapong<sup>4</sup>  
Somsak Leelagud<sup>1</sup> Phikul Leelagud<sup>1</sup> Sunita Pawaree<sup>1</sup> Teerada Wangsomboondee<sup>5</sup>

### Abstract

Bacterial panicle blight disease is caused by *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. In outbreak areas, *B. glumae* decreases rice yield by up to 75%. This study aims to conduct an epidemic survey of the bacterial panicle blight disease in Thailand and identify bacteria causing the disease. From 2019 to 2023, 225 rice fields were surveyed throughout 38 provinces. Rice seeds, leaf sheaths and leaf blades with symptoms of bacterial panicle blight disease were collected, and bacteria were isolated on nutrient agar (NA) media. *B. glumae* and *B. gladioli* were detected using the polymerase chain reaction (PCR) method with 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer (16S-23S rDNA ITS)-specific primers. One hundred and eighteen bacterial isolates from 38 rice fields in 16 provinces (Central, Northeastern and Southern), including the three International Rainfed Lowland Rice Observational Nurseries (IRLRONs) in Ubon Ratchathani, Sakon Nakhon and Nong Khai Rice Research Centers, were tested positive for *B. glumae*. Bacterial identification was validated by 16S-23S rDNA ITS nucleotide sequence analysis, biochemical testing and whole genome sequence analysis which identified three isolates (BG19NPT-03, BG22PNA-49 and BG23SSK04-20) as *B. glumae* with average nucleotide identity (ANI) of 99.87, 99.94 and 99.66%, respectively. Additionally, three bacterial isolates from three rice fields in two provinces of Northeastern were tested positive for *B. gladioli* using PCR and biochemical testing. Furthermore, pathogenicity tests on the rice KDML105 variety were observed for confirmation of the disease-causing agent. Systemic symptoms indicated rice leaf sheaths and blades began to decay, appearing brown or gray rot with dark brown or reddish-brown margins, unfilled grains, grain discoloration becoming strawed, and transverse brown rot of lemma and palea. The symptoms of artificial

Received: October 22, 2023/Revised: May 15, 2024/Accepted: May 20, 2024

\* corresponding author E-mail: arisa.j@rice.mail.go.th

<sup>1</sup> ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทร. 0-4534-4104

Ubon Ratchathani Rice Research Center, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4104

<sup>2</sup> กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-7892

Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-7892

<sup>3</sup> ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000 โทร. 0-4271-1471

Sakon Nakhon Rice Research Center, Mueang, Sakon Nakhon 47000 Tel. 0-4271-1471

<sup>4</sup> ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี อ.บ้านสร้าง จ.ปราจีนบุรี 25150 โทร. 0-3727-1232

Prachinburi Rice Research Center, Bansang, Prachin Buri 25150 Tel. 0-3727-1232

<sup>5</sup> ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-5476

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok Tel. 0-2218-5476

inoculation resembled the appearance of a natural infection in rice fields. Emergency action measures were immediately possessed to prevent the spread of the foreign strains of *B. glumae* by the three Rice Research Centers and the Department of Agriculture. All rice plants were eradicated from the three International Rainfed Lowland Rice Observational Nurseries areas.

**Keywords:** rice, bacterial panicle blight disease, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli*, rice disease survey, bacterial identification

## บทคัดย่อ

โรครวงไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* ในพื้นที่ที่พบการระบาดของรุนแรง เชื้อ *B. glumae* ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงร้อยละ 75 งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ของข้าวในประเทศไทย และจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยสำรวจโรครวงไหม้ในแปลงนาข้าว ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 รวม 225 แปลง ใน 38 จังหวัด เก็บตัวอย่างเมล็ด กาบใบ และใบข้าวที่แสดงอาการโรครวงไหม้มาแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เมื่อตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (พีซีอาร์) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของเชื้อ *B. glumae* และ *B. gladioli* พบเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 118 ไอโซเลท จาก 38 แปลง ใน 16 จังหวัด (ภาคกลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้) รวมทั้งในแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวนาข้าวไร่ระหว่างประเทศที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สกลนคร และหนองคาย ให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. glumae* ซึ่งสอดคล้องกับผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ITS ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของแบคทีเรียไอโซเลท BG19NPT-03, BG22PNA-49 และ BG23SSK04-20 จำแนกเป็นเชื้อ *B. glumae* มีค่ามาตรฐานที่ใช้จำแนกชนิด (species) แบคทีเรีย (ANI) ร้อยละ 99.80 99.94 และ 99.66 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท จาก 3 แปลง ในสองจังหวัด ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. gladioli* เมื่อตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์และคุณสมบัติทางชีวเคมี การพิสูจน์เชื้อสาเหตุโรคบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า เชื้อแบคทีเรียทำให้ต้นข้าวแสดงอาการกาบใบและใบเน่าเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม หรือสีน้ำตาลแดง เมล็ดลีบเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าว โดยกลีบดอกเน่าเป็นสีน้ำตาลตามแนวขวาง เหมือนกับอาการของโรครวงไหม้ที่พบในสภาพธรรมชาติ เพื่อดำเนินมาตรการฉุกเฉินในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์จากต่างประเทศ ตามมาตรฐานสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชระหว่างประเทศได้รายงานผลการตรวจวินิจฉัยไปยังศูนย์วิจัยข้าวทั้ง 3 แห่ง และกรมวิชาการเกษตร และได้ดำเนินการกำจัดข้าวทั้งหมดในแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวต่างประเทศทั้ง 3 แห่งแล้ว

**คำสำคัญ:** ข้าว โรครวงไหม้ เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli* การสำรวจโรคข้าว การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

## คำนำ

โรครวงไหม้ของข้าว (bacterial panicle blight disease) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค 2 ชนิด ในกลุ่ม Betaproteobacteria คือ *Burkholderia glumae* (Kurita and Tabei 1967) Urakami *et al.* 1994 (syn. *Pseudomonas glumae*) และ *B. gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993 (syn. *P. gladioli*) โรคนี้พบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น โดยทำให้ข้าวแสดงอาการเมล็ดเน่า เมล็ดต่าง และกล้าเน่า (Goto and Ohata, 1956) ต่อมาพบการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวทั่วโลก ทั้งในทวีปเอเชีย อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และแอฟริกา โดยพบเข้าทำลาย

ข้าวตั้งแต่ระยะกล้า แตกกอ จนถึงออกรวง และทำความเสียหายมากที่รัฐลุยเซียนา รัฐอาร์คันซอ รัฐเทกซัส และรัฐมิสซิสซิปปี ทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา ทำให้ดอกข้าวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีฟางข้าว ต่อมากลายเป็นสีเทา ดอกเป็นหมัน จึงเรียกอาการที่พบนี้ว่า “โรครวงไหม้ (panicle blight)” (Groth *et al.*, 1991)

ปัจจุบันโรครวงไหม้เป็นโรคข้าวที่สำคัญในหลายประเทศ ที่ประเทศศรีลังกาและอินโดนีเซีย ต้นข้าวที่ติดเชื้อ *B. glumae* แสดงอาการเมล็ดลีบและเมล็ดต่างเป็นแถบสีน้ำตาลตามแนวขวางของเมล็ด ทำให้เมล็ดข้าวลีบ ผลผลิตเสียหายร้อยละ 75 (Morita and Dhanapala, 1990;

Syahri *et al.*, 2019) ปี ค.ศ. 1998 ข้าวที่ปลูกในประเทศเกาหลีใต้ เกิดอาการเมล็ดเน่าสาเหตุจากเชื้อ *B. glumae* ร้อยละ 69.2 (Lee, 2016) ในรัฐปีนัง ประเทศมาเลเซีย ข้าวพันธุ์พื้นเมืองแสดงอาการของโรครวงไหม้ คือ ช่อดอกข้าวมีสีฟาง บริเวณฐานกลีบดอกมีสีน้ำตาลเข้ม รวงข้าวที่ขึ้นเนื่องจากมีเมล็ดลีบจำนวนมาก และทำให้ผลผลิตข้าวลดลงร้อยละ 50 (Ramachandran *et al.*, 2021) ปี ค.ศ. 1995 และ 1998 โรครวงไหม้ทำให้ผลผลิตข้าวในรัฐลุยเซียนา สหรัฐอเมริกา เสียหายร้อยละ 40 (Nandakumar *et al.*, 2009) และการระบาดของเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์รุนแรง ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงร้อยละ 50-75 (Karki *et al.*, 2012)

เชื้อ *B. glumae* นอกจากเป็นสาเหตุโรคข้าวแล้วยังทำให้เกิดอาการเหี่ยวในพืชอื่น อีกกว่า 20 ชนิด เช่น มะเขือเทศ งา มะเขือ พริก เป็นต้น (Jeong *et al.*, 2003) โดยเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง จะสร้างสารที่เป็นพิษต่อพืช (phytotoxin) คือ สาร toxoflavin ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบ quorum-sensing (QS) ของแบคทีเรีย (Chen *et al.*, 2012) ไปยับยั้งการเจริญของรากและต้นกล้าข้าว ทำให้เมล็ดข้าวเน่าเป็นแถบสีน้ำตาล (Iiyama *et al.*, 1995)

สาเหตุโรครวงไหม้ที่มีรายงานจากหลายประเทศเกิดจากเชื้อ *B. glumae* แต่ที่ญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา นอกจากเชื้อ *B. glumae* แล้ว ยังมีเชื้อ *B. gladioli* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot disease) ของกล้วยไม้ (Chuenchitt *et al.*, 1983) ทำให้ข้าวแสดงอาการโรครวงไหม้ได้เช่นกัน แต่เชื้อ *B. glumae* จะก่อโรครุนแรงกว่า *B. gladioli* (บุญยาพร และศิริพร, 2562; Nandakumar *et al.*, 2009) โรครวงไหม้ที่พบในสหรัฐอเมริกา ประมาณร้อยละ 75 เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จึงทำให้โรคนี้ระบาดรุนแรงและเป็นโรคที่สำคัญของข้าวในสหรัฐอเมริกา (Nandakumar *et al.*, 2009)

สำหรับประเทศไทย เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* มีสถานภาพเป็นศัตรูต่างประเทศ และเป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง “กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550” จากการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชโดยกลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* เป็นศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงในระดับสูงที่จะติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่นำเข้ามาจากประเทศที่มีการระบาดของโรครวงไหม้ สามารถแพร่ระบาดและตั้งรกรากถาวรได้ในประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวในทุกภูมิภาค มีการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรคนี้ จึงมีความเสี่ยงที่จะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ (ณัฐพร และคณะ, 2557)

ต้นข้าวจะเกิดโรครวงไหม้รุนแรงในช่วงที่มีอุณหภูมิสูงและมีฝนตกชุกต่อเนื่องกันนาน โดยเฉพาะในระยะแทงช่อดอกและระยะดอกบาน อย่างไรก็ตาม หากสภาพแวดล้อมที่ฝนตกชุกแต่อุณหภูมิต่ำ โรครวงไหม้จะไม่รุนแรง (Cha *et al.*, 2001) ในนาข้าวที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป อุณหภูมิระหว่าง 20-35 องศาเซลเซียส เป็นสภาพแวดล้อมที่สามารถเกิดโรครวงไหม้ได้ดี (Echeverri-Rico *et al.*, 2021; Syahri *et al.*, 2019; Tsushima, 1996) เชื้อ *B. glumae* เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่หลากหลาย ทั้งนี้เชื้อ *B. glumae* ทั้งสายพันธุ์รุนแรงและสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงอาจเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40-50 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อ *B. gladioli* นั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป โดยอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเหมาะสมสำหรับ เชื้อ *B. gladioli* (Nandakumar *et al.*, 2009) นอกจากนี้ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูงและการให้น้ำระบบชลประทานจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรครวงไหม้ของข้าวได้มากเช่นกัน (Wamishe *et al.*, 2015)

เชื้อ *B. glumae* สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ ทำให้โรคแพร่ระบาดได้กว้างและรวดเร็ว ในทางปฏิบัติจึงควบคุมและป้องกันกำจัดโรคได้ยาก (Ham *et al.*, 2011; Uyematsu *et al.*, 1976) โดยเชื้อจะเจริญอยู่บริเวณผิว (epidermis) และระหว่างเซลล์พาราเรคิมมา (parenchymatous intercellular space) ของเมล็ดข้าว (Hikichi, 1993) เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในรากข้าวได้โดยไม่ทำให้ข้าวแสดงอาการ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะตั้งท้องเชื้อจะแพร่กระจายไปยังลำต้นและใบ ลามไปถึงรวง และเพิ่มปริมาณเชื้ออย่างรวดเร็วเพื่อเข้าทำลายดอกย่อย (Fory *et al.*, 2014)

คำแนะนำการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ได้แก่ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 53.8%, คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์+ คอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ไตรเบสิด คอปเปอร์ซัลเฟต และ สารปฏิชีวนะ ได้แก่ กรดออกซาลิก การใช้แบคทีเรีย ปฏิบัคซ์ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* sp. เป็นต้น รวมทั้งการใช้ bacteriophage ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรค และการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ช่วยลดปริมาณเชื้อ แบคทีเรียที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ (Zhou *et al.*, 2019)

Shew และคณะ (2019) คาดการณ์ว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อการเกิดโรครวงไหม้และทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายมากยิ่งขึ้น หากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 ปี จะทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ร้อยละ 51 โดยเฉพาะในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้น สูงต่อเนื่องกัน 2 วันขึ้นไป จะส่งผลให้โรครวงไหม้ระบาด รุนแรงจนกลายเป็นโรคที่สำคัญของข้าวได้ในอนาคต

ประเทศไทยเคยมีรายงานพบโรครวงไหม้ของข้าว ในจังหวัดสุโขทัย เชียงราย ราชบุรี สุพรรณบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี นครปฐม ปทุมธานี นครนายก ร้อยเอ็ด และ กาฬสินธุ์ (บุญยาพร และศิริพร, 2562; วันวิสาข์ และคณะ, 2560; ศิริพร, 2559; Jungkhun *et al.*, 2022) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการระบาดหรือรายงาน ความเสียหายจากโรครวงไหม้ของข้าว โรคเมล็ดด่าง หรือ โรคกล้าเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทย ทำให้ ไม่ทราบข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการวางแผนป้องกันกำจัด โรคหากมีการระบาดรุนแรงและกระจายเป็นพื้นที่กว้างใน อนาคต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการแพร่ ระบาดของโรครวงไหม้ในแหล่งปลูกข้าวในประเทศไทย และจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เพื่อจำกัด ขอบเขตการระบาด และหาแนวทางควบคุมโรคในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การสำรวจโรครวงไหม้ของข้าว

สำรวจแปลงนาข้าวทั่วทุกภาค ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึง ออกรวง ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 ในภาคกลาง ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ (Table 1) โดย บันทึกรายชื่อข้อมูลเกษตรกร สถานที่สำรวจ (ที่ตั้งและพิกัด GPS)

วันที่สำรวจ พันธุ์ข้าว ลักษณะอาการโรค ประเมินการเกิด โรค (disease incidence) และระดับความรุนแรงของโรค (disease severity) ระยะการเจริญเติบโตของข้าว ตั้งแต่ ระยะกล้าจนถึงแตกกอตามวิธีการของ Yuan (2004) และ ระยะออกรวงตามวิธีการของ Karki (2010) โดยการเก็บ ตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการคล้ายโรครวงไหม้ ระยะข้าวแตก กอ กาบใบและใบข้าวหน้าเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา ขอบแผล สีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลแดง (Kim *et al.*, 2014; Nandakumar *et al.*, 2009) ระยะข้าวออกรวง ดอกข้าว เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีฟางข้าว เมล็ดลีบและเมล็ด ต่างเป็นแถบสีน้ำตาลตามแนวขวางของเมล็ด (Groth *et al.*, 1991; Morita and Dhanapala, 1990) นำมาแยกเชื้อ ในห้องปฏิบัติการ

### 2. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli*

นำตัวอย่างข้าว ได้แก่ ใบ กาบใบ และเมล็ด ที่แสดง อาการคล้ายโรครวงไหม้ มาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยฆ่าเชื้อที่ผิวพืชในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และซับตัวอย่างพืช ให้แห้งด้วยกระดาษที่แห้งแล้ว (ดัดแปลงจาก Mulaw *et al.*, 2018) ตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นขนาดเล็กๆ ประมาณ 2x2 มิลลิเมตร หากตัวอย่างเป็นเมล็ดข้าว ใช้ 1-5 เมล็ด ต่อตัวอย่าง โดยข้าว 1 ต้น หรือ 1 รวง นับเป็น 1 ตัวอย่าง บดตัวอย่างพอละเอียดในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ตะน้ำแช่ตัวอย่างมา cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวเทาหรือขาวครีม กลม นูน เล็กน้อย มันวาว ขอบเรียบ (วันวิสาข์ และคณะ 2560; ศิริพร 2559; Mulaw *et al.*, 2018) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

บันทึกลักษณะโคโลนีที่พบ เช่น สี รูปทรง ขนาด พร้อมทั้งทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานวิทยาของเซลล์ แบคทีเรียด้วย 3% potassium hydroxide (3% KOH) และ ย้อมสีเซลลล์แบคทีเรียแบบแกรม ตรวจสอบภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายรวม 1,000 เท่า และเก็บรักษา เชื้อแบคทีเรียในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส (วิชัย, 2549)

### 3. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยโดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จำนวน 1 โคโลนีแขวนลอยในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 500 ไมโครลิตร บ่มให้เซลล์กระจายด้วย vortex mixture นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วพักไว้บนน้ำแข็งหรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส (อิริษา และคณะ, 2560) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x GoTaq<sup>®</sup> master mix ไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ (คู่ไพรเมอร์ GL-13f; 5'-ACACGGAA CACCTGGGTA-3'/GL-14r; 5'-TCGCTCTCCCGAA GAGAT-3' และคู่ไพรเมอร์ GLA-f; 5'-CGAGCTAATAC CGCGAAA-3'/GLA-r; 5'-AGACTCGAGTCAACTGA-3') ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของเชื้อ *B. glumae* (395 bp) และ *B. gladioli* (300 bp) ตามลำดับ (Furuya *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 1997) และดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Thermal cycler

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดด้วย agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 1xTBE ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Bio-Print-Gel Documentation Imaging พร้อมบันทึกภาพ

### 4. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้

จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางพันธุกรรม ดังนี้

4.1 คุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ด้วยแผ่นทดสอบสำเร็จรูป Microbiology Bactident<sup>®</sup> Oxidase (Merck, Germany) โดยขีด (streak) โคโลนีแบคทีเรียบนแผ่นทดสอบแล้วตรวจสอบผลการเปลี่ยนสีภายใน 1 นาที และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API<sup>®</sup> 20 NE (BioMérieux, France)

4.2 วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S-23S

rDNA ITS เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ดังข้อ 3. แล้วนำส่งดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ได้แก่ BG19NPT-01 BG19NPT-03, BG19NPT-05, BG19NPT-07 และ BG19NPT-11 จากจังหวัดนครปฐม และ BG19CNT-11.3 จากจังหวัดชัยนาท เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* spp. ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรครวงไหม้ และเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็น out group ซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูล NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information; Madison, USA) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยโมเดล Kimura 2-parameter ด้วยโปรแกรม MEGA 11

4.3 วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole-genome sequencing) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวที่ปลูกในภูมิภาคต่างๆ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BG19NPT-03 BG22PNA-49 และ BG23SSK04-20 เป็นตัวแทนเชื้อจากภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ ซึ่งงานทดลองนี้ยังไม่พบเชื้อสาเหตุโรครวงไหม้ที่แยกได้จากภาคเหนือ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยคอลัมน์สำเร็จรูป Presto<sup>™</sup> Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วยวิธีอิลลูมินา (Illumina dye sequencing) และจัดเรียงสายลำดับดีเอ็นเอแบบ *De novo* assembly

### 5. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

นำตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรครวงไหม้ในข้าว

พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่พบอาการโรครวงใหม่ระดับรุนแรงในแปลงนาเกษตรกรรมที่จังหวัดพังงา จึงคาดว่าน่าจะเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรครวงใหม่ เตรียมต้นข้าวทดสอบโดยฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (Glandorf *et al.*, 1992)

ปลูกข้าวในกระถางจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น ในสภาพโรงเรือนทดลอง เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density (OD)) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ( $2.7 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร) (วันวิสาข์ และคณะ, 2560) ปลูกเชื้อด้วยวิธีฉีดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเข้าที่กาบใบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อต้น (Yuan, 2004) ในข้าว ระยะกล้า (อายุ 30 วัน) และระยะแตกกอ (อายุ 60 วัน) ส่วนระยะออกดอก หลังจากข้าวแทงช่อดอก ฟันเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียผสม tween-20 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อรวง (วันวิสาข์ และคณะ, 2560) โดยชุดควบคุม (negative control) ฉีดหรือพ่นด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อผสม tween-20 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ คลุมด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เกิดการพัฒนาของโรคได้ดียิ่งขึ้น

ประเมินปฏิกริยาการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อข้าวที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียแสดงอาการโรค ประเมินการเกิดโรค (disease incidence) และระดับความรุนแรงของโรค (disease severity) ระยะกล้าถึงแตกกอตามวิธีการของ Yuan (2004) และระยะออกรวง ตามวิธีการของ Karki (2010) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย (re-isolation) จากใบ กาบใบ และเมล็ดข้าว ที่แสดงอาการโรครวงใหม่ แล้วนำมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้ง (re-inoculation) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธีการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulate)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การสำรวจโรครวงใหม่ของข้าว

ผลการสำรวจแปลงนาข้าว 38 จังหวัด ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 รวม 255 แปลง (Table 1) พบข้าวแสดงอาการคล้ายโรครวงใหม่ จำนวน 100 แปลง จาก 27 จังหวัด ในระยะแตกกอ ตั้งท้อง และออกรวง โดยพบการ

เกิดโรคร้อยละ 1-30 ของพื้นที่แปลง และระดับความรุนแรง ตั้งแต่ระดับ 1-9 ซึ่งระดับ 9 เป็นระดับความรุนแรงสูงสุดของโรครวงใหม่ คือ ข้าว 1 รวง มีเมล็ดแสดงอาการโรครวงใหม่มากกว่า ร้อยละ 80 ขึ้นไป โดยยังไม่พบอาการในระยะกล้า

ฤดูนาปี 2565 สำรวจแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวนาปีฝนระหว่างประเทศ (International Rainfed Lowland Rice Observational Nursery-IRLON) ข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (International Rice Research Institute (IRRI)) สาธารณรัฐฟิลิปปินส์ ที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร พบอาการโรครวงใหม่ในข้าวพันธุ์ Entno SV1790 ระยะแตกกอและตั้งท้อง พันธุ์ SV0534 ระยะตั้งท้อง พันธุ์ กข59 ระยะแตกกอ และ กข12 ระยะตั้งท้อง โดยต้นข้าวแสดงอาการกาบใบเน่าสีน้ำตาลเข้ม ใบข้าวปรากฏแผลเนื้อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาล ขยายยาวจากโคนไปยังปลายใบ ขอบแผลเป็นคลื่นและมีสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลแดง (Fig. 1A-1B) ซึ่งเป็นครั้งแรกที่ตรวจพบอาการโรครวงใหม่ที่กาบใบและใบข้าวระยะแตกกอในประเทศไทย เนื่องจากที่ผ่านมาพบโรครวงใหม่ระยะออกรวง โดยแสดงอาการโรคที่เมล็ดและกาบใบบริเวณใกล้รวงข้าวที่เป็นโรค (บุญยาพร และศิริพร 2562; วันวิสาข์ และคณะ 2560; ศิริพร 2559; Jungkhun *et al.*, 2022)

ระยะออกรวง พบอาการโรครวงใหม่ในข้าวหลากหลายพันธุ์ ทั้งในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ รวมทั้งข้าวพันธุ์ SV1151 ที่นำเข้ามาจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ เพื่อปลูกศึกษาพันธุ์ในฤดูนาปี 2565 ที่ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร โดยพบข้าวแสดงอาการเมล็ดเน่า เมล็ดต่าง ปลายเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าวหรือสีน้ำตาล ตรงกลางเมล็ดเป็นสีน้ำตาลเข้มตามแนวขวาง และบางครั้งพบข้าวเมล็ดลีบ (Fig. 1C) รวมทั้งพบอาการกาบใบเน่าเป็นสีน้ำตาล อาการลุกลามไปตามขอบใบและเส้นกลางใบ (Fig. 1D) คล้ายกับในระยะแตกกอ

ระยะออกรวง เป็นระยะที่สำรวจพบโรครวงใหม่มากที่สุด สามารถสังเกตอาการโรคได้ง่าย เนื่องจากต้นข้าวแสดงอาการที่รวง ซึ่งส่วนมากเมล็ดจะลีบและชูรวงขึ้น ไม่นิยมรวงเหมือนต้นข้าวปกติ ส่วนระยะแตกกอหรือตั้งท้อง

Table 1 Rice bacterial panicle blight (BPB) disease survey in Thailand, 2019-2023

No.	Province	Year	No. of surveys	No. of symptoms	Pathogen detected		Symptoms
					No. of fields detected bacteria <sup>1/</sup>	Infected rice varieties	
<b>Central</b>							
1	Nakhon Pathom	2019	1	1	<i>B. glumae</i> = 1	RD41	seed rot
		2023	2	1	<i>B. glumae</i> = 1	RD62	seed rot
2	Chachoengsao	2019	5	0	-	-	-
		2020	8	0	-	-	-
		2023	4	4	-	-	-
3	Nakhon Nayok	2019	3	0	-	-	-
4	Prachin Buri	2020	2	0	-	-	-
		2023	2	2	-	-	-
5	Saraburi	2019	4	0	-	-	-
6	Lop Buri	2019	1	0	-	-	-
7	Nakhon Sawan	2019	11	0	-	-	-
		2020	5	0	-	-	-
8	Uthai Thani	2019	8	0	-	-	-
9	Chai Nat	2019	15	7	<i>B. glumae</i> = 1	RD43	seed rot
		2023	10	10	<i>B. glumae</i> = 7	RD79, RD85, RD95, CNT1	seed rot
10	Phra Nakhon Si Ayutthaya	2019	6	1	-	-	-
		2023	2	2	-	-	-
11	Sing Buri	2023	1	1	-	-	-
12	Suphan Buri	2023	1	1	-	-	-
<b>Northeastern</b>							
13	Nong Khai	2021	2	0	-	-	-

Table 1 (cont.)

No.	Province	Year	No. of		Pathogen detected	Symptoms
			surveys	No. of BPB symptoms		
			No. of fields detected bacteria <sup>17</sup>		Infected rice varieties	
14	Udon Thani	2021	2	0	-	-
15	Khon Kaen	2021	2	0	-	-
		2023	7	1	-	-
16	Nakhon Ratchasima	2021	2	0	-	-
		2023	6	3	<i>B. glumae</i> = 3	KDML105 seed, flag leaf and leaf sheath rot
17	Roi Et	2021	2	0	-	-
		2023	4	2	<i>B. glumae</i> = 2	KDML105 seed, flag leaf and leaf sheath rot
18	Sakon Nakhon	2021	1	0	-	-
		2022	1	1	<i>B. glumae</i> = 1	RD12, SV0534 leaf and leaf sheath rot
19	Si Sa Ket	2022	2	0	-	-
		2023	4	2	<i>B. glumae</i> = 2	PTT1, CNT1 seed and flag leaf sheath rot
20	Ubon Ratchathani	2022	13	1	<i>B. glumae</i> = 1	RD59, SV1790 leaf and leaf sheath rot
		2023	10	10	<i>B. glumae</i> = 5	Nan 59, KDML105 seed rot
21	Mukdahan	2022	6	1	-	TN1 leaf and leaf sheath rot
		2023	17	6	<i>B. gladioli</i> = 2	Gam seed rot
22	Kalasin	2023	8	6	<i>B. glumae</i> = 1	unknown seed rot
23	Yasothon	2023	5	5	<i>B. glumae</i> = 1	RD47 seed and flag leaf sheath rot
24	Buri Ram	2023	4	2	<i>B. glumae</i> = 2	RD15 seed rot
25	Surin	2023	4	2	<i>B. glumae</i> = 2	RD15 seed rot
26	Maha Sarakham	2023	2	1	<i>B. gladioli</i> = 1	unknown seed, flag leaf and leaf sheath rot
27	Loei	2023	1	1	<i>B. glumae</i> = 1	unknown seed rot



Table 1 (cont.)

No.	Province	Year	No. of surveys	No. of BPB symptoms	Pathogen detected		Symptoms
					No. of fields detected bacteria <sup>1/</sup>	Infected rice varieties	
<b>Northern</b>							
28	Chiang Rai	2020	7	0	-	-	-
		2023	5	5	-	-	-
29	Chiang Mai	2023	9	9	-	-	-
30	Sukhothai	2023	3	3	-	-	-
<b>Southern</b>							
31	Phattalung	2019	7	0	-	-	-
		2022	3	0	-	-	-
		2023	3	3	<i>B. glumae</i> = 3	RD29, RD95, Jasmin	seed rot
32	Trang	2021	1	-	-	-	-
		2022	3	0	-	-	-
33	Satun	2022	1	0	-	-	-
34	Prachuap Khiri Khan	2022	1	0	-	-	-
35	Phang Nga	2022	8	1	<i>B. glumae</i> = 1	KDML105	seed, leaf, and leaf sheath rot
36	Krabi	2022	3	0	-	-	-
37	Surat Thani	2023	3	3	<i>B. glumae</i> = 1	Hom Puang	seed, flag leaf and leaf sheath rot
38	Nakhon Si Thammarat	2023	2	2	<i>B. glumae</i> = 1	RD79	seed rot
<b>Total</b>			255	100	<i>B. glumae</i> = 38, <i>B. gladioli</i> = 3		

<sup>1/</sup>Bacteria detected by PCR technique

CNT1 = Chai Nat 1, KDML105 = Khao Dawk Mali 105, PTT1 = Pathum Thani 1

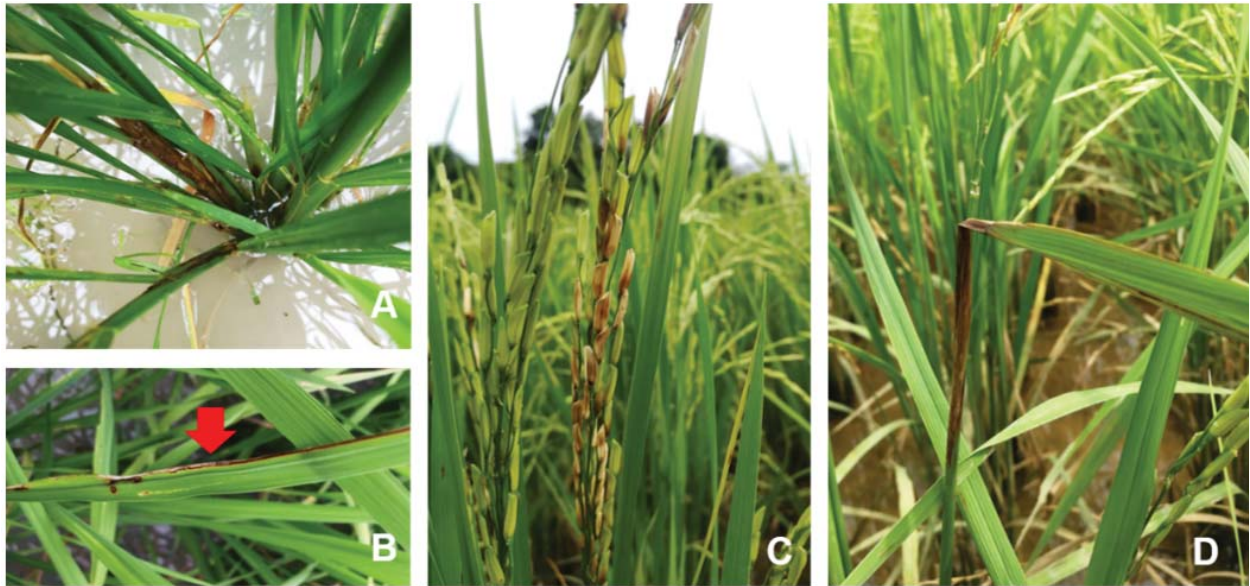


Fig. 1 Symptoms of the bacterial panicle blight disease in the rice fields: A-B = dark brown lesion at the booting stage; C = seed discoloration turns straw-color with dark brown or reddish-brown transverse on the glumes; and D = symptom on rice leaf sheath at the heading stage

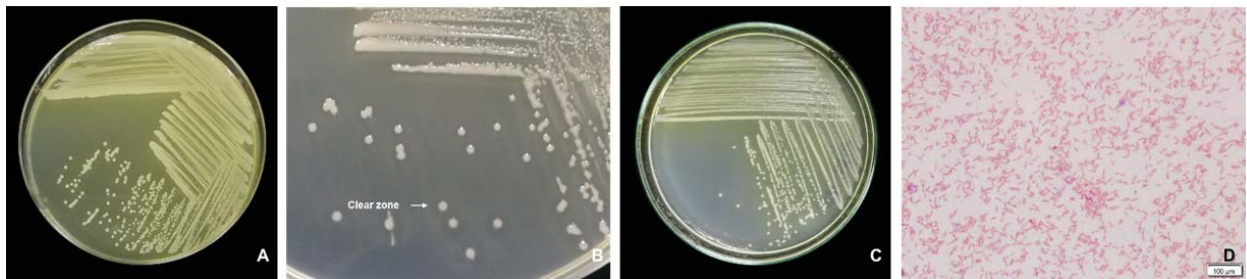


Fig. 2 *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* morphological characteristics: A = *B. glumae* isolate BG22UBN-4.1 colonies on nutrient agar (NA) at 2 old days; B = clear zone around bacterial colonies of *B. glumae* isolate BG23SSK04-22; C = *B. gladioli* isolate BG23MDH15-03 on NA medium at 2 old days; and D = Gram-negative rod shape of *B. glumae* isolate BG22UBN-4.1

ต้นข้าวจะแสดงอาการที่ใบและกาบใบ หากต้นข้าวแตกกอหนาแน่นก็จะสังเกตเห็นอาการได้ยาก

## 2. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli*

ตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการคล้ายโรครวงไหม้จำนวน 663 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหาร NA สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีลักษณะคล้ายเชื้อ *Burkholderia* spp. จำนวน 262 ไอโซเลท คือ โคโลนีสีขาวเทา กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.1-2.3 มิลลิเมตร เมื่อเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง มีเชื้อ 121 ไอโซเลท สร้างสาร toxoflavin ซึ่งมีสีเหลืองใส

บนอาหาร NA (Fig. 2A-2C) ซึ่งสารสีเหลืองใส เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค (virulence factor) ของแบคทีเรียที่เรียกว่า *Burkholderia* spp. สาเหตุโรคพืช อย่างไรก็ตาม นอกจากเชื้อ *B. glumae* แล้ว เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *B. gladioli* และ *B. plantarii* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงสามารถสร้างสาร toxoflavin ได้เช่นกัน โดยสังเกตได้จากสารสีเหลือง หรือสีเขียว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Chen *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2003; Yuan 2004) ซึ่งใน 121 ไอโซเลทนี้ มี 63 ไอโซเลท ที่มีวงใส (clear zone) รอบโคโลนี (Fig. 2B) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียด้วย 3% KOH และย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย

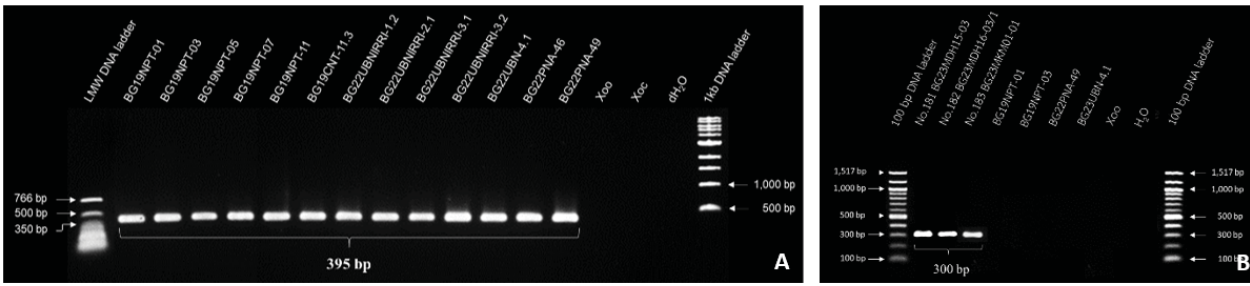


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products using the primers GL-13f/GL-14r for detection of *Burkholderia glumae* (395 bp) (A) and primers GLA-f/GLA-r for detection of *B. gladioli* (300 bp) (B) that negative control as Xoo = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* BB2022UBN-22, Xoc = *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS2018-1, and distilled water (dH<sub>2</sub>O)

แบบแกรมของตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย 16 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และย้อมติดสีแดงของ safranin-o (Fig. 2D) ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียแกรมลบ หากเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะย้อมติดสีม่วงของ crystal violet

**3. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์**

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 262 ไอโซเลท จาก 100 แปลง มาตรวจสอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ GL-13f และ GL-14r ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของเชื้อ *B. glumae* พบว่า เชื้อแบคทีเรีย 118 ไอโซเลท ที่สร้างสาร toxoflavin ปรากฏเป็นสีเหลืองใสบนอาหาร สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 395 bp (Fig. 3A) สอดคล้องกับการศึกษาของ Takeuchi และคณะ (1997) โดยเป็นเชื้อที่แยกจากระยะแตกกอตั้งท้อง และออกรวง ในข้าวพันธุ์ กข12 กข15 กข29 กข41 กข43 กข47 กข59 กข62 กข79 กข85 กข95 ขาวดอกมะลิ 105 ชัยนาท 1 ไทซุงเนทีฟ 1 ปทุมธานี 1 น่าน 59 จัสมินหอมพวง และข้าวไม่ทราบชื่อพันธุ์จากแปลงนาเกษตรกรจังหวัดนครปฐม ชัยนาท นครราชสีมา ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ อุบลราชธานี กาฬสินธุ์ ยโสธร บุรีรัมย์ สุรินทร์ เลย พัทลุง พังงา สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช รวมทั้งตรวจพบเชื้อ *B. glumae* ในข้าวที่นำเข้ามาจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ สาธารณรัฐฟิลิปปินส์ คือ ข้าวพันธุ์ SV0534 SV1151 และ SV1790 ซึ่งนำเข้ามาเพื่อปลูกศึกษาพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร รวม 38 แปลง (Table 1)

การตรวจด้วยไพรเมอร์ GLA-f และ GLA-r ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของเชื้อ *B. gladioli* พบ

เชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท สร้างสาร toxoflavin แต่ไม่มีวงใสรอบโคโลนี สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 300 bp (Fig. 3B) สอดคล้องกับการศึกษาของ Furuya และคณะ (2002) โดยเป็นตัวอย่างข้าวระยะออกรวงจากแปลงนาเกษตรกรจังหวัดมุกดาหาร และมหาสารคาม รวม 3 แปลง (Table 1)

สำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่นำเข้ามาจากประเทศฟิลิปปินส์ เพื่อการศึกษาวิจัยนั้น จะมีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ณ จุดนำเข้า หรือกลุ่มวิจัยการกักกันพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการตามชนิดของศัตรูพืช ซึ่งการตรวจเชื้อแบคทีเรียจะดำเนินการโดย (1) สุ่มแยกเชื้อจากเมล็ดข้าวโดยตรง แล้วนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ไปจำแนกชนิดต่อไป และ (2) ปลูกข้าวระยะกล้า หากสังเกตพบอาการผิดปกติบนใบข้าว จะเก็บใบข้าวไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วตรวจสอบกลับด้วยวิธี Koch's postulates หากพบว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคจะนำไปจำแนกชนิดต่อไป (ณัฐพร และคณะ, 2559) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวที่นำเข้าโดยการสุ่มตัวอย่างตรวจตามระบบมาตรฐาน แต่ไม่ใช่ทุกเมล็ดจะได้รับการตรวจสอบ ดังนั้น จึงมีโอกาสที่จะมีเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงใหม่เข้ามา (ณัฐพร และคณะ, 2557)

เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ *B. glumae* ในแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวต่างประเทศที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีและสกลนคร เพื่อดำเนินมาตรการฉุกเฉินในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสายพันธุ์จากต่างประเทศ ได้รายงานผลการตรวจวินิจฉัยให้กับผู้รับผิดชอบแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวต่างประเทศทั้ง 2 แห่ง รวมถึงแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวต่าง

Table 2 Biochemical reactions of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* to compare type strains tested in API® 20 NE

No.	Isolates	Gram	API® 20 NE results																	Oxidase			
			NO <sub>3</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI		MLT	CIT	PAC
<b><i>B. glumae</i></b>																							
1	BG23UBN-4.1	-	-/+	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+/-	-	-	
2	BG23KSN05-62	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
3	BG23YST04-01	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
4	BG23RET01-110.1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
5	BG23SSK04-20	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
6	BG22PNA-49	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
7	BG19NPT-03	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
8	BG19NPT-11	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
9	BG23NPT-05	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
10	BG23CNT-05	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
11	BG23SNI03-14	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
13	BG23PTL01-08	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
14	BG23PTL03-04	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<b><i>B. gladioli</i></b>																							
15	BG23MDH15-03	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	-
16	BG23MDH16-03/1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

NO<sub>3</sub> = potassium nitrate, TRP = L-tryptophane, GLU = D-glucose (fermentation), ADH = L-arginine, URE = urea, ESC = esculin ferric citrate, GEL = gelatin (bovine origin), PNG = 4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, GLU = D-glucose (assimilation), ARA = L-arabinose, MNE = D-mannose, MAN = D-mannitol, NAG = N-acetyl-glucosamine, MAL = D-maltose, GNT = potassium gluconate, CAP = capric acid, ADI = adipic acid, MLT = malic acid, CIT = trisodium citrate, PAC = phenylacetic acid

- = negative, + = positive

ประเทศศูนย์วิจัยข้าวหนองคาย ซึ่งนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวชุดเดียวกัน และกรมวิชาการเกษตร ซึ่งได้ดำเนินการกำจัดข้าวทั้งหมดในแปลงศึกษาพันธุ์ข้าวต่างประเทศทั้ง 3 แห่งเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

#### 4. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้

4.1 คุณสมบัติทางชีวเคมี การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ด้วยแผ่นตรวจสอบสำเร็จรูป Microbiology Bactident® Oxidase (Merck, Germany) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยแผ่นตรวจสอบสำเร็จรูป เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API® 20 NE (BioMérieux, France) ให้ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย 16 ไอโซเลท สอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *Burkholderia* spp. (Table 2)

4.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ITS ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ได้แก่ BG19NPT-01, BG19NPT-03, BG19NPT-05, BG19NPT-07, BG19NPT-11 และ BG19CNT-11.3

จำแนกเป็นเชื้อ *B. glumae* (Fig. 4) สอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยจัดกลุ่มอยู่กับ *B. glumae* MAFF301169 ซึ่งเป็น type strain และ *B. glumae* 1BGRE5-1 ไอโซเลทที่แยกจากจังหวัดร้อยเอ็ด ซึ่งรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (วันวิสาข์ และคณะ, 2560) มีค่า %identity 99.97-100% แยกกลุ่มออกจากเชื้อ *Burkholderia* อื่นๆ อย่างชัดเจน

4.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole-genome sequencing) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวในภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ไอโซเลท BG19NPT-03, BG22PNA-49 และ BG23SSK04-20 ตามลำดับ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท มีค่า average nucleotide identity (ANI) ตรงกับเชื้อ *B. glumae* ร้อยละ 99.87 99.94 และ 99.66 ตามลำดับ (Table 3) ซึ่งค่า ANI เป็นหนึ่งในค่ามาตรฐานที่ใช้จำแนกชนิด (species) แบคทีเรีย โดยกำหนดให้แบคทีเรียที่มีค่า ANI ตั้งแต่ร้อยละ 94 ขึ้นไป เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีค่า GC content 68.19, 68.14 และ 68.37 mol% ใกล้เคียงกับค่า GC content ของ *B. glumae* สายพันธุ์

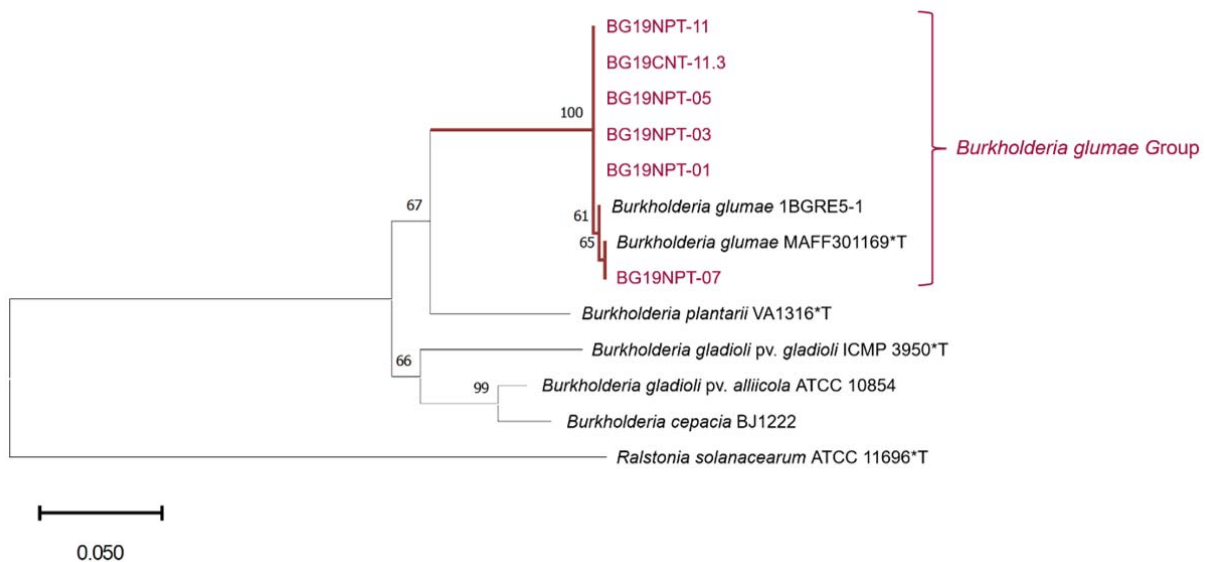


Fig. 4 Phylogenetic analysis of *Burkholderia* spp. 13 strains/isolates and *Ralstonia solanacearum* (out-group) (\*T = type strains of species) was inferred using the neighbor-joining method based on the alignment of a total of 415 positions in the final dataset of the 16S-23S internal transcribed spacer region. The numbers above lines represent bootstrap values from 1,000 replicates with MEGA 11 software.

Table 3 Genome features and statistics of the sequenced and assembled *Burkholderia glumae* genomes

Feature	BG19NPT-03	BG22PNA-49	BG23SSK04-20
No. of contigs	279	284	180
Total contig bases	6,712,253	6,772,404	6,556,713
N50 (bp)	50,347	46,041	74,821
GC content (mol%)	68.19	68.14	68.37
Estimated genome size	6,654,625	7,237,816	6,343,151
Gene5,902	5,868	5,712	
CDS 5,830	5,791	5,634	
No. of tRNA	67	71	73
No. of rRNA	4	5	4
No. of tmRNA	1	1	1
Average nucleotide identity (ANI) (%)	99.87	99.94	99.66

N50: A N50 means that half of all bases reside in a contig of this size or longer

ANI: % of relatedness at whole-genome level

LMG 2196 ซึ่งเป็น type strain คือ 68.20 mol% ดังนั้นจึงจำแนกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *B. glumae*

สำหรับเชื้อไอโซเลท BG19NPT-03 จากจังหวัดนครปฐม และ BG23SSK04-20 จากจังหวัดศรีสะเกษ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ BD 21g สาเหตุโรคข้าวในประเทศบังคลาเทศ มากที่สุด มีค่า ANI ร้อยละ 99.87 และ 99.66 ตามลำดับ รองลงมาคือ *B. glumae* 60BGCRMSO31-5 สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวในจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย มีค่า ANI ร้อยละ 99.86 และ 99.52 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท BG22PNA-49 จากจังหวัดพังงา มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ 957856-41-c สาเหตุโรคข้าวในรัฐลุยเซียนา สหรัฐอเมริกา และ *B. glumae* 60BGCRMSO3-9 สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวในจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย มีค่า ANI ร้อยละ 99.94 (Table 4)

### 5. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

ระยะกล้าและแตกกอ หลังปลูกเชื้อ 3 วัน ต้นข้าวเริ่มแสดงอาการกาบใบเน่าเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม (Fig. 5A-5B) แผลขยายไปที่ใบ และพบอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลที่เส้นกลางใบ (Fig. 5C) หลังปลูกเชื้อ 7 วัน ต้นข้าวแสดงอาการเนื่อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาลที่บริเวณ

ใบและขอบใบ โดยมีขอบแผลเป็นคลื่นและมีสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลแดง (Fig. 5D) โดยไอโซเลทที่แสดงอาการรุนแรงมาก คือ ไอโซเลท BG19NPT-11 แยกได้จากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข41 จังหวัดนครปฐม ไอโซเลท BG22UBN4.1 แยกจากข้าวพันธุ์ กข59 จังหวัดอุบลราชธานี และไอโซเลท BG22NPA-49 แยกได้จากข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จังหวัดพังงา แผลขยายอย่างรวดเร็วจนทำให้ยอดข้าวเน่าตาย หรือแผลขยายตามความยาวลำต้นจากกาบใบขึ้นไปยังใบข้าวจนสุดปลายใบ

ระยะออกดอก หลังปลูกเชื้อ 3 วัน กลีบดอกเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าว ลีบและด่างเป็นแถบสีน้ำตาลตามแนวขวางของกลีบดอก โดยกลีบดอกที่ปลายรวงจะเริ่มแสดงอาการก่อน (Fig. 5E) และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า เมล็ดข้าวแสดงอาการโรครวงไหม้ทั้งรวง (Fig. 5F) นอกจากนี้ยังพบอาการกาบใบและใบเป็นแผลเนื่อเยื่อตายสีน้ำตาล ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม ในขณะที่ต้นที่พ่นด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อไม่แสดงอาการทั้งในระยะกล้า แตกกอ และออกดอก (Fig. 5G) เมื่อทำการแยกเชื้อจากต้นที่แสดงอาการ พบลักษณะโคโลนีเหมือนกับที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงนา (Fig. 2) และเมื่อปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้ง ข้าวแสดงอาการเช่นเดียวกับที่ปลูกเชื้อในครั้งแรก จึงพิสูจน์ได้ว่าเชื้อ

Table 4 Top 5 genomes resulted from ANI analysis

No.	BG19NPT-03			BG22PNA-49			BG23SSK04-20		
	Species/strain	Accession no.	ANI (%)	Species/strain	Accession no.	ANI (%)	Species/strain	Accession no.	ANI (%)
1	<i>B. glumae</i> /BD 21g	CP130145, CP130146	99.87	<i>B. glumae</i> /957856-41-c	NZ_CP021074, NZ_CP021075	99.94	<i>B. glumae</i> /BD 21g	CP130145, CP130146	99.66
2	<i>B. glumae</i> /60BGCRMSO31-5	NZ_JAMQEQ000000000	99.86	<i>B. glumae</i> /60BGCRMSO3-9	NZ_JAMQEQ000000000	99.94	<i>B. glumae</i> /60BGCRMSO31-5	NZ_JAMQEQ000000000	99.52
3	<i>B. glumae</i> /60BGCRWC8-5	NZ_JAMQEL000000000	99.86	<i>B. glumae</i> /60BGCRPA10-1	NZ_JAMQEM000000000	99.91	<i>B. glumae</i> /60BGCRWC8-5	NZ_JAMQEL000000000	99.50
4	<i>B. glumae</i> /R2	NZ_CP100291, NZ_CP100292	99.85	<i>B. glumae</i> /60BGCRMSO3-11	NZ_JAMQEN000000000	99.90	<i>B. glumae</i> /R2	NZ_CP100291, NZ_CP100292	99.50
5	<i>B. glumae</i> /SL-2395S	NZ_CP100296, NZ_CP100297	99.83	<i>B. glumae</i> /BGR33S	NZ_CP100140, NZ_CP100141	99.89	<i>B. glumae</i> /BGR80S	CP033672	99.50

Type strain = LMG 2196 = ATCC 33617

ANI: % of relatedness at whole-genome level



Fig. 5 Systemic symptoms of bacterial panicle blight disease on rice KDML105 after artificial inoculation with *Burkholderia glumae*: A = systemic symptoms in seedling stage, brown lesion on rice leaf sheaths and blades; B = symptoms in tillering stage, brown or grey rot with a dark brown margin on rice leaf sheaths; C = initial infection on rice midrib; D = necrotic symptom with a dark brown margin on a rice blade; E-F = symptoms in flowering stage, unfilled grains, grain discoloration with transverse brown rot of lemma and palea; and G = no symptom on negative control

แบคทีเรียที่ตรวจพบนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรครวงไหม้ของข้าว

### สรุปผลการทดลอง

ผลจากการสำรวจแปลงนาข้าว ตั้งแต่ระยะกล้า จนถึงออกรวง ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ รวม 255 แปลง ใน 38 จังหวัด ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 พบต้นข้าวแสดงอาการคล้ายโรครวงไหม้ในระยะแตกกอ ระยะตั้งท้อง และระยะออกรวง รวม 663 ตัวอย่าง จาก 27 แปลง นำมาแยกได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีลักษณะสัณฐานของโคโลนีบนอาหาร NA คล้ายเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* spp.

การตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S-23S rDNA ITS ตรวจพบเชื้อ *B. glumae* จำนวน 118 ไอโซเลท แยกได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ ในระยะแตกกอ ตั้งท้อง และออกรวง จากภาคกลาง ใต้ และตะวันออกเฉียงเหนือ ตรวจพบเชื้อ *B. gladioli* จำนวน 3 ไอโซเลท ในข้าวเก่า (พันธุ์พื้นเมือง) จำนวน 2 แปลงสำรวจ ในจังหวัดมุกดาหาร และข้าวไม่ทราบชื่อพันธุ์ จำนวน 1 แปลงสำรวจ ในจังหวัดมหาสารคาม ด้วยวิธีพีซีอาร์และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *B. gladioli*

ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ยังสอดคล้องกับผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของตัวแทนเชื้อ 16 ไอโซเลท ผลการวิเคราะห์ลำดับ

นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ITS ของตัวแทนเชื้อ 6 ไอโซเลท และยืนยันผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ BG19NPT-03, BG22PNA-49 และ BG23SSK04-20 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมตรงกับเชื้อ *B. glumae* ร้อยละ 99.87 99.94 และ 99.66 ตามลำดับ

ผลการพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคโดยปลูกเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* บนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ระยะกล้า แตกกอ และออกดอก พบว่า ข้าวแสดงอาการของโรครวงไหม้ คือ กาบใบเน่าเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม แผลขยายไปที่ใบ เกิดอาการเนื้อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาลที่บริเวณใบและขอบใบ โดยมีขอบแผลเป็นคลื่นและมีสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลแดง ขยายตามความยาวใบ กลีบดอกเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าวหรือสีน้ำตาล สิบและต่างเป็นแถบสีน้ำตาลตามแนวขวางของกลีบดอก คล้ายกับอาการที่พบในสภาพธรรมชาติ จึงพิสูจน์ได้ว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรครวงไหม้

การสำรวจโรคครั้งนี้เป็นข้อมูลสำคัญในการวางแผนจัดการโรครวงไหม้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันผลกระทบที่รุนแรงจากการระบาดของโรคนี้ในอนาคต ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีสารเคมีป้องกันกำจัดโรคที่ขึ้นทะเบียนใช้กับโรครวงไหม้ ดังนั้น ควรมีการศึกษา



แนวทางในการป้องกันกำจัดโรคอย่างบูรณาการ ทั้งใน ระยะเร่งด่วน โดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ในระยะ กลางหรือสำหรับนาข้าวอินทรีย์ โดยการใช้จุลินทรีย์ ปฏิบัณฑ์ และในระยะยาว ซึ่งเป็นการจัดการโรคอย่างยั่งยืน ด้วยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรครวงไหม้ รวมทั้ง ศึกษาวิธีการเตรียมเมล็ดพันธุ์อย่างเหมาะสม เช่น การแช่ เมล็ดด้วยน้ำร้อน สารเคมี หรือจุลินทรีย์ปฏิบัณฑ์ เป็นต้น เพื่อช่วยลดการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ที่ติดมากับ เมล็ดพันธุ์

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก เงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยและส่งเสริมด้านข้าว กรมการข้าว ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ภายใต้โครงการ “โรครวงไหม้ของข้าวและการบริหารจัดการแบบ บูรณาการ”

### เอกสารอ้างอิง

ณัฐพร อุทัยมงคล, วาสนา ฤทธิไธสง, วาริรัตน์ สมประทุม และ ณัฐริมา ไชยิตเจริญกุล. 2559. การกำหนดมาตรการ สุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม กรณีศึกษา: จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์. วารสารวิชาการ เกษตร 34(3): 299-320.

ณัฐพร อุทัยมงคล, สุนันท์ทิพย์ สมบัติ, วาสนา ฤทธิไธสง, อลงกต โพธิ์ดี, วาริรัตน์ สมประทุม และณัฐริมา ไชยิตเจริญกุล. 2557. ศึกษาการกำหนดมาตรการสุข อนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมจาก สาธารณรัฐฟิลิปปินส์. หน้า 2251-2426. ใน: รายงาน ผลงานวิจัยประจำปี 2557 สำนักวิจัยพัฒนาการ อารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร.

บุญยาพร ภาคภูมิ และศิริพร ดอนเหนือ. 2562. การศึกษาเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioli* สาเหตุโรคของ ข้าวในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและ การจัดการ 2(2): 48-58.

วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ, จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์, สุจินต์ ภัทรภูวดล และวิชัย ไชยิตรัตน์. 2560. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรครวงไหม้ และเมล็ดต่างของข้าวโดยการ วิเคราะห์ลำดับเบสของกลุ่มยีน. วารสารวิทยาศาสตร์ เกษตร 48(2): 297-311.

วิชัย ไชยิตรัตน์. 2549. บทปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ แบคทีเรีย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน, นครปฐม.

ศิริพร ดอนเหนือ. 2559. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการ “เฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ที่เกิดจากเชื้อ แบคทีเรียของข้าวในประเทศไทย” สนับสนุนงบประมาณโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 54 หน้า.

อริษา จิตรติกรกุล, จุฑาทเทพ วัชรไชยคุปต์, สุจินต์ ภัทรภูวดล และวิชัย ไชยิตรัตน์. 2560. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวโพดด้วยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีน. วารสารวิทยาศาสตร์ เกษตร 48(3): 358-375.

Cha, K.H., Y.H. Lee, S.J. Ko, S.K. Park and I.J. Park. 2001. Influence of Weather Condition at heading Period on the Development of Rice Bacterial Grain Rot Caused by *Burkholderia glumae*. Research in Plant Disease 7: 150-154.

Chen, R., I.K. Barphagha, H.S. Karki and J.H. Ham. 2012. Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production. PLoS ONE. 7:e52150. doi:10.1371/journal.pone.0052150.

Chuenchitt, S., W. Dhirabhava, S. Karnjanarat, D. Buangsuwon and T. Uematsu. 1983. A new bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. Kasetsart J. 17: 26-36.

Echeverri-Rico, J., E. Petro, P.A. Fory, G.M. Mosquera, J.M. Lang, J.E. Leach, J.D. Lobaton, G. Garcés, R. Perafán, N. Amezcua, S. Toro, B. Mora, J.B. Cuasquer, J.R. Villegas, M.C. Rebolledo and E.A. Torres. 2021. Understanding the complexity of disease-climate interactions for rice bacterial panicle blight under tropical conditions. PLoS ONE 16(5): e0252061.

Fory, P.A., L. Triplett, C. Ballen, J.F. Abello, J. Duitama, M.G. Aricapa, G.A. Prado, F. Correa, J. Hamilton, J.E. Leach, J. Tohme and G.M. Mosquera. 2014. Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. Phytopathology 104: 436-444.

- Furuya, N., H. Ura, K. Iiyama, M. Matsumoto, M. Takeshita and Y. Takanami. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. *Journal of General Plant Pathology* 68: 220-224.
- Glandorf, D.C.M., I. Brand, P.A.H.M. Bakker and B. Schippers. 1992. Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and Soil* 147: 135-142.
- Goto, K. and K. Ohata. 1956. New bacterial diseases of rice (brown stripe and grain rot) (in Japanese, English abstr.). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 21: 46.
- Groth, D.E., M.C. Rush and C.A. Hollier. 1991. Rice diseases and disorders in Louisiana. Bull. 828. Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge.
- Ham, J.H., R.A. Melanson and M.C. Rush. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology*. 12: 329-339.
- Hikichi, Y. 1993. Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice plants and disease severity of bacterial grain rot of rice. *Journal of Pesticide Science* 18: 319-324.
- Iiyama, K., N. Furuya, Y. Takanami and N. Matsuyama. 1995. A role of phytotoxin in virulence of *Pseudomonas glumae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 470-476.
- Jeong, Y., J. Kim, S. Kim, Y. Kang, T. Nagamatsu and I. Hwang. 2003. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Disease* 87: 890-895.
- Jungkhun, N., A.R.G. de Farias, J. Watcharachaiyakup, N. Kositcharoenkul, J.H. Ham and S. Patarapuwadol. 2022. Phylogenetic Characterization and Genome Sequence Analysis of *Burkholderia glumae* Strains Isolated in Thailand as the Causal Agent of Rice Bacterial Panicle Blight. *Pathogens* 11(6): 676.
- Karki, H.S. 2010. Physiological, biochemical and molecular characteristics associated with virulence of *Burkholderia glumae*: the major causative agent of bacterial panicle blight of rice. Master's Thesis, Louisiana State University, USA.
- Karki, H.S., K.B.K. Shrestha, J.W. Han, D.E. Groth, I.K. Barphagha, M.C. Rush, R.A. Melanson, B.S. Kim and J.H. Ham. 2012. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLoS One* 7: e45376.
- Kim, S.Y., J.W. Park, J.Y. Lee, D.J. Shin, D.S. Park, J.S. Lim, I.Y. Choi and Y.S. Seo 2014. Understanding pathogenic *Burkholderia glumae* metabolic and signaling pathways within rice tissues through in vivo transcriptome analyses. *Gene* 547(1): 77-85.
- Lee, Y.H. 2016. A forecast model for bacterial grain rot of rice and its implementation in the national crop pest management system. Doctor of Philosophy Thesis. Seoul National University. 92 p.
- Morita, H. and M.P. Dhanapala. 1990. "So-called" grain sterility of rice in Sri Lanka in 1985 Yala and 1985-86 Maha cropping seasons. *Journal of Tropical Agriculture* 34(1): 20-26.
- Mulaw, T., Y. Wamishe and Y. Jia. 2018. Characterization and in Plant Detection of Bacteria That Cause Bacterial Panicle Blight of Rice. *American Journal of Plant Sciences* 9: 667-684.
- 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: 896-905.
- Ramachandran, K., S.I. Vijaya, F.N. Ahmad, B. Amzah and L. Zakaria. 2021. Characterization and identification of *Burkholderia glumae* as the causal pathogen of bacterial panicle blight of rice (*Oryza sativa* L.) in Malaysian rice granaries. *Journal of General Plant Pathology* 87: 164-169.
- Shew, A.M., A. Durand-Morat, L.L. Nalley, X.G. Zhou, C.

- Rojas and G. Thoma. 2019. Warming increases Bacterial Panicle Blight (*Burkholderia glumae*) occurrences and impacts on USA rice production. PLoS One. 2019; 14(7): e0219199.
- Syahri, R., U. Somantri and P. Sasmita. 2019. Detection and control bacteria cause grain rot *Burkholderia glumae* on rice. Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia 23(2): 163-170.
- Takeuchi, T., H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer region. Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho. 63: 455-462.
- Tsushima, S. 1996. Epidemiology of bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. Japan Agricultural Research Quarterly 30: 85-89.
- Uyematsu, T., D. Yoshimura, K. Nishiyama, T. Ibaraki and H. Fuji. 1976. Occurrence of bacterial seedling rot in nursery flat caused by grain rot bacterium *Pseudomonas glumae* (in Japanese, English abstract.). Annals of the Phytopathological Society of Japan 42: 310-312.
- Wamishe, Y.A., C. Kelsey, S. Belmar, T. Gebremariam and D. McCarty. 2015. Bacterial Panicle Blight of Rice in Arkansas. Agriculture and Natural Resources, University of Arkansas.
- Yuan, X. 2004. Identification of Bacterial Pathogens Causing Panicle Blight of Rice in Louisiana. Master's Thesis, Louisiana State University, USA.
- Zhou, X.G. 2019. Sustainable Strategies for Managing Bacterial Panicle Blight in Rice. pp. 67-80. *In: Protecting Rice Grains in The Post-Genomic Era*, Y. Jia (ed.). London, UK.