

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : -
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
กิจกรรม : -
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Phylogenetic analysis of the Thai Isolates of *Pasteuria penetrans*
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
ผู้ร่วมงาน : อติยา สารพัฒน์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
วีรกรรม แสงไสย์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
รุ่งนภา ทองเครื่อง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
5. บทคัดย่อ : เลี้ยงแบคทีเรีย *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นไอโซเลตที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ มันฝรั่ง จ. ตาก 2 ไอโซเลต พริก จ. ขอนแก่น 1 ไอโซเลต มันขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี 7 ไอโซเลต พริกไทย จ. จันทบุรี 2 ไอโซเลต และ โหระพา จ. สกลนคร 1 ไอโซเลต รวม 13 ไอโซเลต โดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดี

เอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

6. คำนำ : *Pasteuria* spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เพื่อการครบวงจรชีวิต (obligate parasite) มีรายงานการพบแบคทีเรียสกุล *Pasteuria* ในไส้เดือนฝอย 323 ชนิด อยู่ใน 116 สกุล (Chen and Dickson, 1998; Ciancio *et al.*, 1994; Sayre and Starr, 1988; Sturhan, 1988) การจำแนกชนิดของ *Pasteuria* spp. ปัจจุบันยังไม่ชัดเจนแต่มีการแบ่งออกอย่างคร่าวๆ ออกเป็น 6 สปีชีส์ คือ *P. ramosa* เป็นปรสิตของ water flea (*Daphnia magna*) *P. thornei* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus penetrans* *P. nishizawae* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Heterodera* และ *Globodera* spp. *P. usage* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Belonolaimus longicaudatus* *P. hartismeri* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. ardensis* สำหรับ *P. penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al.*, 2008) Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืชและเริ่มชักนำเซลล์พืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube ผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ในระยะยาวจะทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยในดินลดลง ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อถูกสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999)

มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของ *P. penetrans* ในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก ยาสูบ กระเจี๊ยบ องุ่น และข้าวสาลี เป็นต้น (Chen and Dickson, 1998) เอ็นโดสปอร์ของ *P. penetrans* สายพันธุ์ P20 จำนวน 10,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม สามารถควบคุมไส้เดือนฝอย *M. arenaria* race1 ในถั่วลิสงได้ (Chen *et al.*, 1996) สปอร์จำนวนน้อยของ *P.*

penetrans ในดิน สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al.*, 2005) ในแปลงปลูกยาสูบที่มีการระบาดของอย่างหนักของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* race1 และ *M. javanica* และต่อมาพบว่าการระบาดลดลง เมื่อนำดินจากแปลงที่มีการระบาดลดลง (suppressive soil) มาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพบว่าสาเหตุที่ทำให้การระบาดของไส้เดือนฝอยลดลงนั้นเกิดจาก *P. penetrans* (Weibelzahl-Fulton *et al.*, 1996)

แบคทีเรียชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Brown and Kerry, 1987; Dickson *et al.*, 1994; Oostendorp *et al.*, 1990; Sayre and Starr, 1988; Stirling, 1991) แต่มีข้อจำกัดคือความเป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการควบคุมชีวิตทำให้การผลิตในปริมาณมากทำได้ยาก ปัจจุบันมีผู้รายงานการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้บนอาหารเทียมได้สำเร็จ และได้มีการผลิตแบคทีเรีย *Pasteuria* หลายชนิดเพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดต่างๆ ในเชิงพาณิชย์ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากปมของพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รวบรวมแบคทีเรียชนิดนี้จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยได้หลายไอโซเลต (Khaithong *et al.*, 2012) และพบว่าบางไอโซเลตสามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ (ไตรเดช และคณะ, 2558)

การจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา แบคทีเรีย *Pasteuria* ถูกค้นพบว่าเป็น endoparasite ของไส้เดือนฝอยในปี ค.ศ. 1975 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Mankau, 1975a) และได้ตั้งชื่อเป็น *Bacillus penetrans* (Thorne, 1940) Mankau, 1975 (Mankau 1975b) ต่อมา Sayre and Starr (1988) พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้คล้ายกับแบคทีเรีย *P. ramosa* (Metchnikoff, 1888) ซึ่งเป็น endoparasite ของไรน้ำ (water fleas) จึงได้จัดเข้าอยู่ในสกุล *Pasteuria* แบคทีเรียสกุล *Pasteuria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก dichotomous branching เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และมี septate mycelium (William *et al.*, 1994) แบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะที่แตกต่างกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์เช่นเดียวกันแต่ไม่ได้เป็นปรสิต แบคทีเรีย *P. penetrans* จัดจำแนกโดยการใช้ลักษณะของสปอร์และชนิดของไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย ต่อมา มีการนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาใช้ศึกษามากขึ้น เช่นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA Anderson *et al.* (1999) รายงานศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยใช้ยีน 16S rRNA ในไอโซเลต P-20 ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยราก

ปม *M. arenaria* race 1 และไอโซเลต P-100 ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. javanica* พบว่าแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ใน clade เดียวกับ *Alicyclobacillus acidocaldarius* *A. cycloheptanicus* *Sulfobacillus* sp. *B. tusciae* *B. schlegelii* และ *P. ramosa* ซึ่ง *P. ramosa* เป็นแบคทีเรีย *Pasteuria* ที่เป็นปรสิตของไรน้ำ (water fleas: *Daphnia* spp.) Atibalentja et al. (2000) รายงานศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยซีสต์ถั่วเหลือง (soybean cyst nematode: *Heterodera glycines*) โดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็น sister species ของ *P. ramosa* อยู่ในกลุ่ม *Alicyclobacillus* ภายในวงศ์ *Bacillaceae* Charles et al. (2005) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยใช้ยีนหลายตำแหน่งพบว่า *P. penetrans* เป็น low-G+C-content eubacteria ติดสีแกรมบวก และอยู่ใน class เดียวกับ *Bacillus* และจากการวิเคราะห์พบว่า *P. penetrans* เป็นบรรพบุรุษของ *Bacillus* spp. และมีความใกล้ชิดกับกลุ่ม saprophytic extremophile เช่น *B. halodurans* และ *B. subtilis* มากกว่าชนิดที่ก่อโรคคือ *B. anthracis* และ *B. cereus* งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตไทย เปรียบเทียบกับ *P. penetrans* จากแหล่งอื่นๆ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระชกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอเล็กโตรโฟรีซิส microcentrifuge tube, pcr tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, plasmid, agarose gel, gel star, pcr buffer, pcr mix

- วิธีการ

การเตรียม Inoculum ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในรากมะเขือเทศในกระถาง เมื่อต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 60 วัน แยกไข่ไส้เดือนฝอยจากรากโดยการตัดรากปมเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และแช่ใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอรีน 10%) และเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973)

นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เก็บตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งฟักออกมาจากไข่และอยู่ในน้ำในจานเลี้ยงเชื้อไปใช้

การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* เพื่อใช้ในการทดลอง

นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัวโดยวิธีปั่นเหวี่ยง (Hewlett and Dickson, 1993) ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 45 – 60 วันที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ เก็บรากมะเขือเทศ 60 วันหลังใส่เชื้อ ล้างน้ำให้สะอาด เชียไข่ไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายด้วยแบคทีเรีย *P. penetrans* ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร บดด้วยแท่งบดตัวอย่าง ตรวจสอบสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ รวมตัวอย่างจากแต่ละหลอดเข้าด้วยกันแล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและเก็บที่ 4°C เพื่อใช้เป็น stock

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี plain glass bead-beating (Atibalentja *et al.*, 2004) ดูดสปอร์จากหลอด stock 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แบบฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ acid-washed glass beads (Sigma) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.150-0.212 มิลลิเมตร ปริมาตรเท่ากับลงในหลอด ใส่ลงในเครื่อง Mini-BeadBeater ที่ 5,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด (ประมาณ 16,000g) นาน 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่เก็บที่ -20°C

การทำ PCR การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำ PCR ส่วนของ *Pasteuria* 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดๆ แรก คือ universal forward 27f: 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Lane, 1991) และ reverse primer 440r: 5' -CATTTCTTCTCCCGATG-3' ชุดที่สองคือ forward primer 440 f: 5' -CATCGGGAAGAAGAAATG-3' และ universal reverse primer 1492 r: 5' -TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991) ทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตร, 5 ไมโครลิตร 10x PCR buffer (Tris-HCl 200mM, pH 8.4, KCl 500 mM), MgCl₂ 1.5 mM, ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.2 μ M, dNTP แต่ละชนิด 0.2 mM และ 2.5 units Taq DNA Polymerase ทำปฏิกิริยาดำเนินการด้วยเครื่อง Thermal Cycler โดยมีสภาวะดังนี้ 94 °C

นาน 10 นาที; 94 °C 1 นาที, 52 °C 1 นาที และ 72 °C 2 นาที ทั้งหมด 45 รอบ, final extension ที่ 72 °C 10 นาทีและ incubation ที่ 4 °C ทำ electrophoresis PCR products ที่ได้ ใน 2% agarose gel, ตรวจด้วยการแช่ ethidium bromide (0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และตรวจ ภายใต้แสง UV ตัดเจลส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไป purify ด้วย QIAEX® II gel extraction kit (Qiagen) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแก้ไข จัดเรียง วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony maximum likelihood และ Bayesian สร้าง phylogenetic tree โดยใช้ฐานข้อมูลใน GenBank ในการเปรียบเทียบ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นไอโซเลตที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ มั่นฝรั่ง จ. ตาก 2 ไอโซเลต พริก จ. ขอนแก่น 1 ไอโซเลต มั่นขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี 7 ไอโซเลต พริกไทย จ. จันทบุรี 2 ไอโซเลต และ โหระพา จ. สกลนคร 1 ไอโซเลต รวม 13 ไอโซเลต โดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *P. penetrans* และสกัดดีเอ็นเอได้ รวม 13 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

ทราบข้อมูลความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไโอโซเลตไทย
เปรียบเทียบกับ *P. penetrans* จากแหล่งอื่นๆ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ เป็นข้อมูล
พื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม
แบบชีววิธีต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง :

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิม้งสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. ใน: การประชุมวิชาการ
อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัด
เชียงราย

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of spores of *Pasteuria penetrans* on the motility of
second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5–
6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The effect of different initial densities of
nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans*
population. Journal of Zhejiang University Science 6B:113-118.

Anderson, J.M., J.F. Preston, D.W. Dickson, T.E. Hewlett, N.H. Williams, and J.E. Maruniak.
1999. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and
sequencing. Journal of Nematology 31:319-325.

Atibalentja, N., G.R. Noel, and L.L. Domier. 2000. Phylogenetic position of the North American
isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*,
as inferred from 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Systematic and
Evolutionary Microbiology 50:605-613.

Atibalentja, N., G.R. Noel, and A. Ciancio. 2004. A Simple Method for the Extraction, PCR-
amplification, Cloning, and Sequencing of *Pasteuria* 16S rDNA from Small Numbers of
Endospores. Journal of Nematology 36:100-105.

- Brown, R.H., and B.R. Kerry. 1987. Principles and practices of nematode control in crops. New York: Academic Press.
- Charles, I., I. Carbone, K.G. Davies, D. Bird, M. Burke, B.R. Kerry, and C.H. Opperman. 2005. Phylogenetic Analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. Journal of Bacteriology 187: 5700-5708.
- Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.
- Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.
- Ciancio, A., R. Bonsignore, N. Vovlas, and F. Lamberti. 1994. Host records and spore morphometrics of *Pasteuria penetrans* group parasites of nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 63:260-267.
- Dickson, D. W., M. Oostendorp, R.M. Giblin-Davis, and D.J. Mitchell. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. Pp. 575-601 in D. Rosen, F.D. Bennett, and J.L. Capinera, eds. Pest management in the subtropics, biological control: A Florida perspective. Andover, UK: Intercept.
- Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential use of *Pasteuria* spp. in the management of plant parasitic nematodes. Pp. 205-219 in Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Hewlett, T.E. and D.W. Dickson. 1993. A Centrifugation Method for Attaching Endospores of *Pasteuria* spp. to Nematodes. Supplement to Journal of Nematology 25(4S): 785-788.
- Hussey, R.S., and K.R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.

- Khaithong, T., M. Iemwimangsa, T. Sarapat, and P. Thammakijjawat. 2012. Collection of *Pasteuria penetrans* in Thailand. Page 133. In: The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases. Feb. 7-10, 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Pp. 115–176 in E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York, NY: John Wiley.
- Mankau, R. 1975a. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 26:333–339.
- Mankau, R. 1975b. Prokaryote affinities of *Duboscqia penetrans*, Thorne. Journal of Protozoology 21:31–34.
- Oostendorp, M., D.W. Dickson, and D.J. Mitchell. 1990. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. Journal of Nematology 22:522–531.
- Oostendorp, M., D.W. Dickson and D.J. Mitchell. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 23:58–64.
- Sano, Z. and J.T. Gaspard. 1995. Differences in mortality and reproduction of *Meloidogyne incognita* infected with varied amounts of *Pasteuria penetrans*. Japanese Journal of Nematology 25:129.
- Sayre, R. M., and M. P. Starr. 1988. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. Pp. 69–101 in G. O. Poinar, Jr., and H. -B. Janson, eds. Diseases of nematodes. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sturhan, D. 1988. New host and geographical records of nematode parasitic bacteria of the *Pasteuria penetrans* group. Nematologica 34: 350–356.
- Stirling, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, UK: CAB International.

Weibelzahl-Fulton, E., D.W. Dickson and E.B. Whitty. 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in Field Soil. Journal of Nematology 28:43-49.

Williams, S.T., M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

13. ภาคผนวก

:

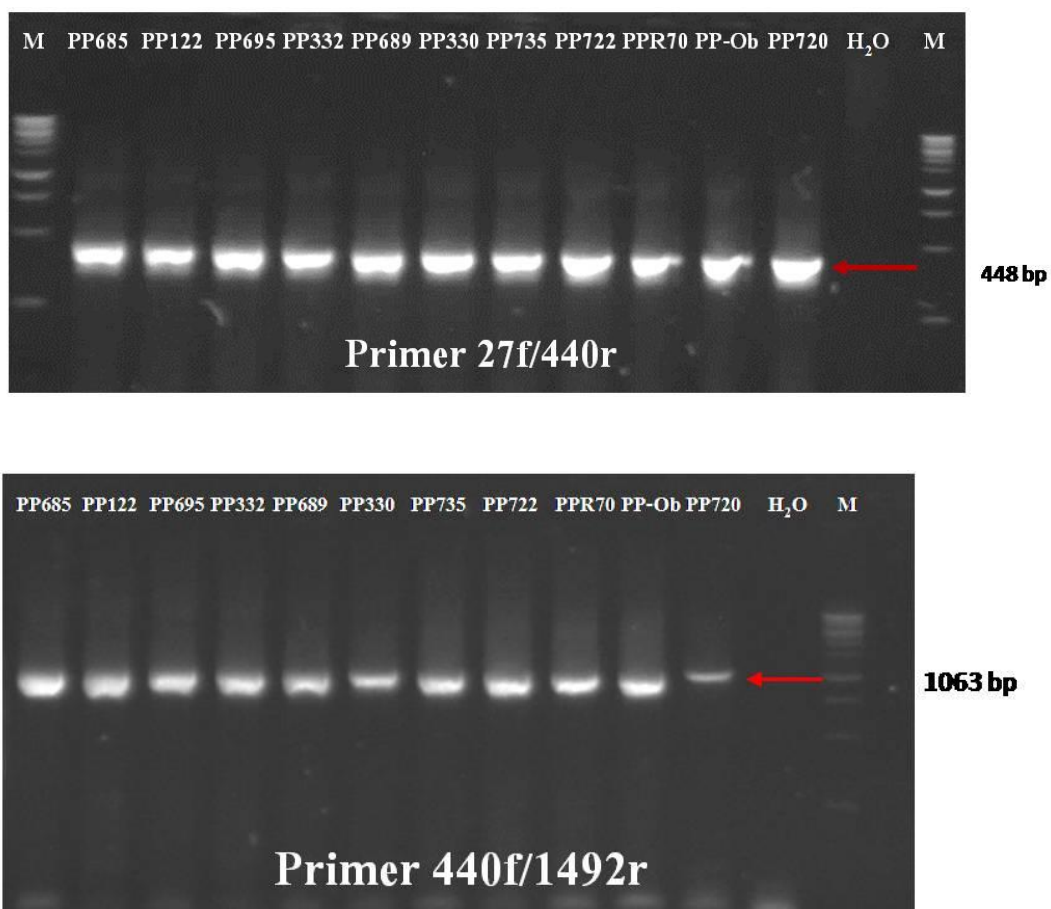


Figure 1 Amplification of *P. penetrans* 16S rRNA gene using 27f/440r and 440f/1492r primers yielded 448 bp and 1063 bp respectively