การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย

Phylogenetic Analysis of the Thai Isolates of *Pasteuria penetrans*

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ รุ่งนภา ทองเครั่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans*, the antagonistic bacteria of root-knot nematode, was carried out during 2017-2018. Thirteen *P. penetrans* isolates, 2 from potato at Tak province, 1 from chili at Khon Kaen province, 7 from hausa potato at Surat Thani province, 2 from black pepper at Chanthaburi province and 1 from sweet basil at Sakon Nakhon province had been collected and maintained at Nematology Section, Plant Pathology Research Group, Department of Agriculture. Spores of each *P. penetrans* isolates was multiplied by soaking second stage juvenile of root-knot nematodes in spore suspension. Spore-encumbered juveniles were then inoculated on tomato roots so that nematode subsequently developed into mature females filled with *P. penetrans* endospores. Spores of each isolate was extracted from nematode females and subjected to DNA extraction. Amplification of 16S rDNA gene was carried out using 27f/440r and 440f/1492r primers, the 448 and 1,063 bp bands were obtained form 11 *P. penetrans* isolates. Maximum likelihood analysis revealed that all 11 *P. penetrans* isolates from Thailand are in the same clade with other *P. penetrans* strains from GenBank and there is no difference in nucleotide sequences among Thai isolates.

Keywords: biocontrol, antagonistic bacteria, bioinformatics, root-knot nematode

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-08-60

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *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 ดำเนินการระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 เพิ่มปริมาณสปอร์ของแบคทีเรียโดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายใน แยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต ผลการวิเคราะห์ maximum likelihood พบว่า *P. penetrans* ไอโซเลตไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. penetrans* strain ต่าง ๆ ที่ได้จากฐานข้อมูลและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตไทยทั้ง 11 ไอโซเลต ไม่แตกต่างกัน

คำหลัก: ชีววิธี แบคทีเรียปฏิปักษ์ ชีวสารสนเทศ ไส้เดือนฝอยรากปม

คำนำ

Pasteuria spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เพื่อการครบวงชีวิต (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 เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืชและเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube แทงผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ในระยะยาวจะทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยในดินลดลง ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อถูกสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนัง

ลำตัวจำนวนมาก 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 สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al.,* 1996; Oostendrop *et al.,* 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al.,* 2005) ในแปลงปลูกยาสูบที่มีการระบาดอย่างหนักของไส้เดือนฝอยรากปม *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 ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการควบวงชีวิตทำให้การผลิตในปริมาณมากทำได้ยาก ปัจจุบันมีผู้รายงานการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้บนอาหารเทียมได้สำเร็จ และได้มีการผลิตแบคทีเรีย Pasteuria หลายชนิดเพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ในเชิงพาณิชย์ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากปมของพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รวบรวมแบคทีเรียชนิดนี้จากพื้นที่ต่าง ๆ 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 ต่อมามีการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาใช้ศึกษามากขึ้น เช่นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA Anderson *et al.* (1999) รายงานศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยใช้ยีน 16S rRNA ในไอโซเลต P-20 ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *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* กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ 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. haladurans* และ *B. subtilis* มากกว่าชนิดที่ก่อโรคคือ *B. anthracis* และ *B. cereus* งานวิจัยนี้นี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตไทย เปรียบเทียบกับ *P. penetrans* จากแหล่งอื่นๆ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยขั้นต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตโฟรีสีส 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 และเขย่าใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอร็อก 10%) และเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งฟักออกมาจากไข่และอยู่ในน้ำในจานเลี้ยงเชื้อไปใช้

การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* เพื่อใช้ในการทดลอง

นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัวโดยวิธีปั่นเหวี่ยง (Hewlett and Dickson, 1993) ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 45 – 60 วันที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ เก็บรากมะเขือเทศ 60 วันหลังใส่เชื้อ ล้างน้ำให้สะอาด เขี่ยไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายด้วยแบคทีเรีย *P. penetrans* ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร บดด้วยแท่งบดตัวอย่าง ตรวจสอบสปอร์ของแบคที่เรีย *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 ปริมาตรเท่ากันลงในหลอด ใส่ลงในเครื่อง Mini-BeadBeater ที่ 5,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด (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 ชุด ๆ แรก คือ universal forward 27f: 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Lane, 1991) และ reverse primer 440r: 5'-CATTTCTTCTTCCCGATG-3' ชุดที่สองคือ forward primer 440f: 5' -CATCGGGAAGAAGAAATG-3' และ universal reverse primer 1492r: 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), $MgCl_2$ 1.5 mM, ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.2 µM, dNTP แต่ละชนิด 0.2 mM และ 2.5 units Taq DNA Polymerase ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง 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 ที่ได้ใน 2% agarose gel, ตรวจด้วยการแช่ ethidium bromide (0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และตรวจภายใต้แสง UV ตัดเจลส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไป purify ด้วย QIAEX® II gel extraction kit (Qiagen) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแก้ไข จัดเรียง วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ฐานข้อมูลใน GenBank ในการเปรียบเทียบ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

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 แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S

rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ทำปฏิกิริยาด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r พบว่าเส้นกราฟมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ จึงใช้เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 440f/1492r เท่านั้น ผลการวิเคราะห์ maximum likelihood พบว่า *P. penetrans* ไอโซเลตไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. penetrans* strain ต่าง ๆ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตไทยทั้ง 11 ไอโซเลต ไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจากการทดลองประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการเข้าทำลายแตกต่างกันก็ตาม (ไตรเดช และคณะ, 2558)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *P. penetrans* และสกัดดีเอ็นเอได้ รวม 13 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่า *P. penetrans* ไอโซเลตไทยไม่มีความแตกต่างกัน และอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *P. penetrans* strain อื่น ๆ ในฐานข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัดเชียงราย

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 Natherlands.

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.

Kumar S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.

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.

Oostendrop, 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.

Table 1 Source of *P. penetrans* Thai isolates

P. penetrans isolates	Source	Location
PP121	Potato	Tak
PP122	Potato	Tak
PP685	Hausa Potato	Surat Thani
PP689	Hausa Potato	Surat Thani
PP695	Hausa Potato	Surat Thani
PP705	Hausa Potato	Surat Thani
PP720	Hausa Potato	Surat Thani
PP722	Hausa Potato	Surat Thani
PP735	Hausa Potato	Surat Thani
PP330	Black Pepper	Chanthaburi
PP332	Black Pepper	Chanthaburi
PPR70	Chili	Khon Kaen
PPOB	Sweet Basil	Sakon Nakhon

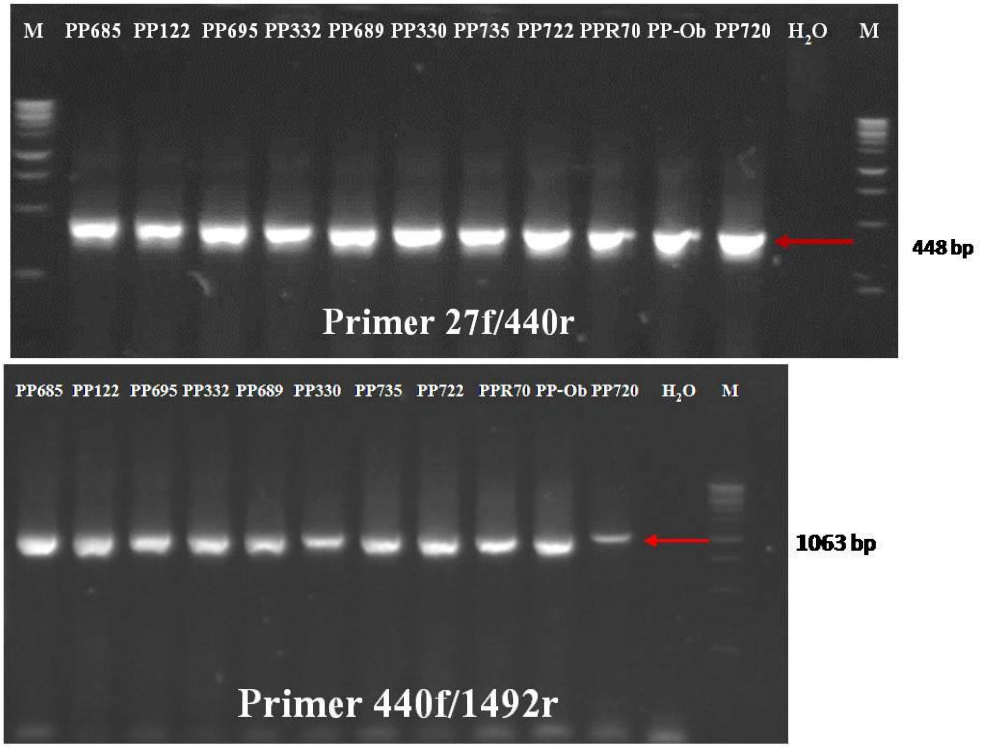

Figure 1 Amplification of *P. penetrans* 16S rRNA gene using 27f/440r and 440f/1492r primers yielded 448 bp and 1,063 bp respectively

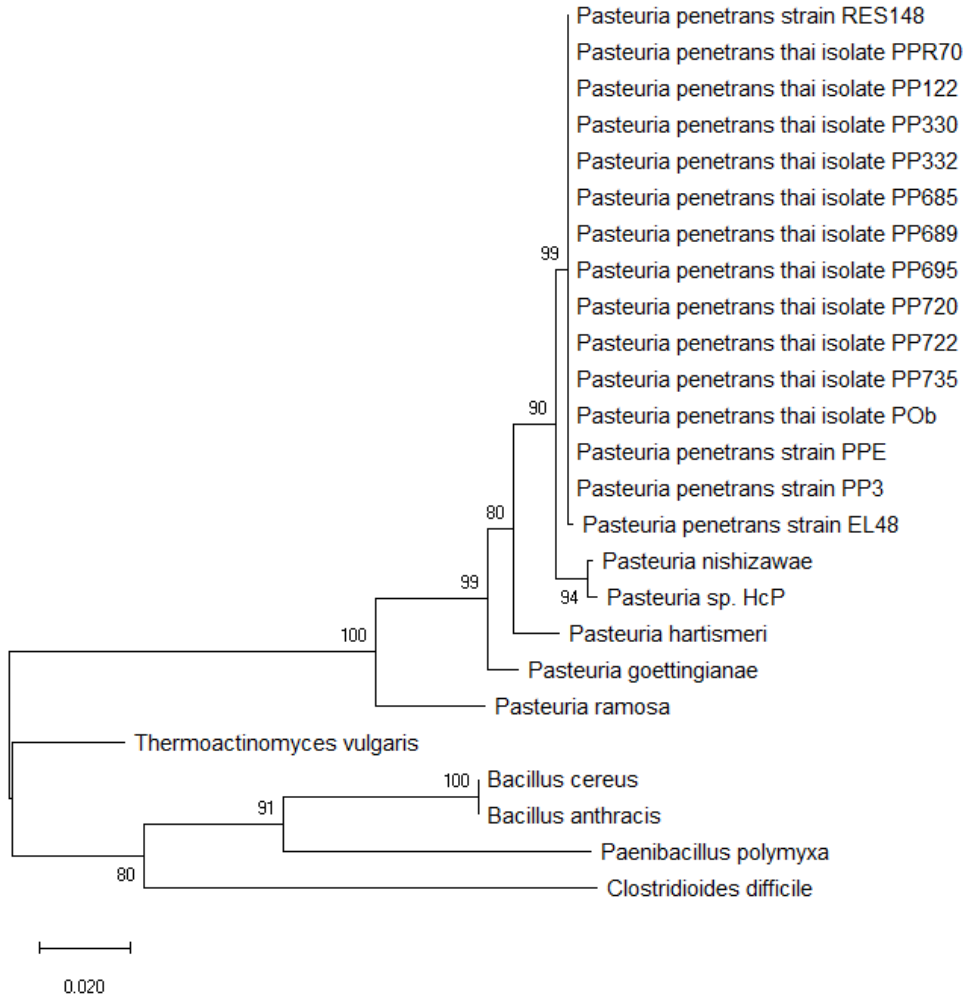

Figure 2 Maximum likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences, accession numbers within parentheses, showing relationship between *Pasteuria penetrans* thai isolates, other *Pasteuria* spp. (*Pasteuria* sp. HcP (JN592479); *P. hartismeri*, HQ849363; *Pasteuria nishizawae*, AF134868; *Pasteuria penetrans* strains EL48, HQ849357; PP3, HQ849362; PPE, HQ849358; RES148, HQ849359; *P. goettingianae*, AF515699; *Pasteuria ramosa*, U34688) and other Firmicutes (*Bacillus anthracis*, NR_041248.1; *Bacillus cereus*, JF705198; *Clostridioides difficile*, NR_113132.1; *Paenibacillus polymyxa*, NR_037006.1; *Thermoactinomyces vulgaris*, EU430570). Bootstrap values >50% are indicated; bar indicates 0.02 substitutions