รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : วิจัยการกักกันพืช

กิจกรรม : การเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Pest status survey of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in corn production in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ชลธิชา รักใคร่ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รุ่งนภา ทองเครง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. syringae* สาเหตุโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ของข้าวโพดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง(pathway) ของเชื้อนี้ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ ติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดเชื้อนี้อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดจากแหล่งปลูกข้าวโพด 20 แหล่งปลูก ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก ตาก แม่ฮ่องสอน นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุดรธานี หนองคาย สกลนคร ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2558 จำนวน 245 แปลง โดยเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการเป็นใบจุดสีขาวคล้ายกับโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในข้าวโพด จำนวน 52 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในห้องปฏิบัติการ โดยการแยกเชื้อสาเหตุและจำแนกชนิดโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer B1 และ B2 หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*

Pseudomonas syringae pv. syringae causes holcus spot of corn, is an important quarantine pest. The disease could be spread by seed transmission. Thailand is the important corn seed production in Southeast Asia. Every year Thailand import corn seed to use in seed

production industry, it makes a high risk of bacterial disease enter through the farming systems in the country. Therefore, it is necessary to survey, monitoring and surveillance to the scientific information in preparing the list of pests, pest risk analysis and the pest-free area. From October 2013 to September 2015, a corn pest survey was conducted in Thailand to determine the establishment of *Pseudomonas syringae pv. syringae*. Total 245 sites from 20 locations of corn productions (Chiang Mai, Chiang Rai, Tak, Nakhon Sawan, Mae Hong Son, Lamphun, Phrae, Nan, Uttaradit, Phitsanulok, Sakon Nakhon, Kanchanaburi, Khon Kaen, Chaiyaphum Nong Khai, Udontani, Nakhon Ratchasima, Supanburi, Saraburi and Lopburi, Suphanburi province) were surveyed throughout the province. 52 samples of leaf white spot symptoms were collected and detected for *P. syringae pv. syringae* by Isolation and Biochemical test and PCR using specific primer B1and B2. The result showed all samples were negative for *P. syringae pv. syringae*.

6. คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นทีปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ในปี 2547 มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 871,791 ตันต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,651 ล้านบาท(ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเนื่องจากประเทศปลายทางตรวจพบ แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. syringae* ศัตรูกักกันพืชของประเทศปลายทาง แต่จากการสืบค้นข้อมูลบัญชีรายชื่อโรคพืชที่พบในประเทศไทย พบว่า ไม่พบรายงานการพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในข้าวโพดในประเทศไทย แต่มีรายงานของ พัฒนา *et al.* (2537) พบแบคทีเรีย *P. syringae* ในพริกไทย เมื่อสืบค้นข้อมูลต่างประเทศ พบว่า CABI (2007) ได้รายงานว่าในประเทศไทยพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพืชหลายชนิดได้แก่ มะเขือเทศ พริก พริกไทย ส้มโอ หอมกระเทียม เป็นต้น จากข้อมูลที่สืบค้นดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกันทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ในปัจจุบันของแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในข้าวโพด ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจในพื้นที่ปลูกข้าวโพด เพื่อติดตามสถานการณ์ของโรคนี้ว่ามีในประเทศไทยหรือไม่ ซึ่งเป็นการศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae*ในพื้นที่ข้าวโพด เพื่อที่จะรายงานและตีพิมพ์ผลงานเพื่อเป็นการปลดโรคชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการเจรจาการค้าเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกและนำเข้าข้าวโพดในอนาคต

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลลักษณะของแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะอาการของโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในข้าวโพด พร้อมรูปภาพ และจัดทำคู่มือการสำรวจใบจุดโฮลคัสของข้าวโพด

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น

3. การสำรวจ กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่สำคัญของประเทศ จำนวน 19 แหล่งปลูก ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก ตาก แม่ฮ่องสอน นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุดรธานี หนองคาย สกลนคร ดำเนินการสำรวจตาม ISPM No. 6 Guidelines for surveillance (International Plant Protection Convention,. 2005) วางแผนการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง

4. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มใบข้าวโพดที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภาพนำมาแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* โดยตัดใบข้าวโพดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บดนำมา streak บนอาหาร King medium B หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง คัดเฉพาะโคโลนีที่สร้างสารเรืองแสง (fluorescent pigment) ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใน 15% กลีเซอรอล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษา

5.1 จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทาง สรีรวิทยา และสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Schaad *et al*.(2001)

- Gram test นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อมากวนในสารละลายด่าง 3% KOH สังเกตที่ปลายลูป หากมีสารเหนียวติดปลายลูปเมื่อยกลูปขึ้น แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวกเชื้อจะมีการติดสีแบบแกรมลบ หากไม่มีสารเหนียวเกิดขึ้นเชื้อจะมีการติดสีแบบแกรมบวก

- Arginine dihydrolase test นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาเลี้ยงใน Thornley's medium แล้วปิดทับด้วย paraffin oil ถ้าเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะไม่สามารถใช้สาร arginine ได้ โดยอาหารจะไม่เปลี่ยนสีจากชมพูเป็นสีแดง

- oxidase test นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาตรวจสอบปฏิกิริยา oxidase ด้วยแผ่นตรวจสอบสำเร็จรูป Bactident® Oxidase (Merck, Germany)

5.2 จำแนกโดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีการของ Schaad et al.(2001)

- สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แตะเชื้อ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

- ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer B1 (5'-CTT TCC GTG GTC TTG ATG AGG-3') และ B2 (5'-TCG ATT TTG CCG TGA TGA GTC-3') หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบ ด้วย 1X TopTaq master mix (Oiagen, USA), 0.5 μM ไพรเมอร์ B1 และไพรเมอร์ B2, ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม และน้ำ นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที ดีเอ็นเอจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing temperature) ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบ

สุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบน 1.5% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gel Pilot 100 bp plus ladder (Qiagen, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้ gel documentation UV transilluminator พร้อมทำการบันทึกภาพ

เวลาและสถานที่

ต.ค.56 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลลักษณะของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* รวบรวมข้อมูลรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* จาก CAB International, 2015 (http://www.cabi.org/cpc/datasheetreport?dsid=45014) ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: Pseudomonas

Species: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ต้องการออกซิเจน (aerobic) ในการดำรงชีวิต รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.2 x 1.5 µm สามารถเคลื่อนไหวได้ โดยมีหางตั้งแต่หนึ่งเส้นถึงหลายเส้น โคโลนีของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* มีสีขาวน้ำนม ลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ โคโลนีโปร่งแสง เป็นประกายระยิบระยับเมื่อต้องแสงและเมื่อมองผ่านแสงจะเห็นเป็นสีรุ้งเล็กน้อย แบคทีเรียสร้างสารเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent pigment) ได้บนอาหาร King's medium B ไม่สามารถใช้สาร arginine ได้ และไม่สร้างเอนไซม์ oxidase (Holt et al., 1994, Schaad et al., 2001)

ลักษณะอาการของโรค

โรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในข้าวโพด เกิดจากเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* มีลักษณะอาการของโรค เริ่มจากแผลจุดสีเขียวเข้ม ฉ่ำน้ำ และพัฒนาเป็นจุดทรงกลม หรือ รี สีน้ำตาลอ่อน ถึงเกือบขาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2-10 มิลิลิเมตร ต่อมาแผลพัฒนาเป็นจุดตายขอบสีแดงถึงน้ำตาล และอาจมีวงสีเหลืองล้อมรอบ และเชื่อมต่อกันจนลักษณะใบขีดเนื้อเยื่อตาย จนในที่สุดแผลจะแห้ง เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื้อใบแห้ง

คล้ายกระดาษ แผลมักเกิดบริเวณปลายใบของใบล่าง (Kendrick, 1926 ; Robertson, 2004) อย่างไรก็ตาม ลักษณะอาการมักสับสนกับอาหารใบที่โดนทำลายด้วยสารเคมีกำจัดวัชพืช และบางครั้งมีความสับสนกับอาการใบจุดรูปตา (Eyespot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Aureobasidium zeae* ซึ่งอาการของโรค holcus spot มีจุดสังเกตที่ขอบแผลจะมีสีน้ำตาลเข้มและมีวงสีเหลืองล้อมรอบแผล (Robertson, 2004) โรค holcus spot เกิดได้ดีในสภาพอุณหภูมิระหว่าง 23-30 องศาเซลเซียส ภายหลังจากมีสภาพฝนและลมแรง อาการของโรคมักปรากฏภายหลังช่วงที่มีฝนตกหนัก แต่จะไม่ลุกลามหรือถ่ายทอดไปยังใบใหม่ โดยเชื้อโรคสามารถแพร่กระจายผ่านทางดินที่กระเด็นหรือลม เชื้อโรคสามารถอยู่อาศัยข้ามฤดูในเศษซากพืช และเข้าทำลายพืชใหม่ผ่านทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปากใบ หรือบาดแผล ความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ ในกรณีที่ใบเป็นแผลและเชื่อมต่อกันทำให้ใบแห้งตายได้ และเชื้อราสามารถเจริญได้หลังจากแผลแห้ง แต่ไม่มีรายงานความสำคัญของโรคนี้ต่อความเสียหายทางเศรษฐกิจของผลผลิต และอาการของโรคนี้อาจทำให้เกิดความสับสนกับอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทำให้การจัดการโรคผิดวิธี (Robertson, 2004)

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

แบคทีเรีย *P. syringae* pv *syringae* พบได้ในดินและน้ำและบนผิวของพืชโดยทั่วไป สามารถถ่ายทอดและแพร่กระจายผ่านจากพืชปลูกไปสู่ส่วนขยายพันธุ์และโดย ลม ฝน สามารถแยกแบคทีเรียได้จากพืชปกติที่ยังไม่แสดงอาการของโรค แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียทีอยู่บนผิวพืชโดยไม่เข้าทำลายพืชได้หรือแอบแฝงอยู่ในพืชได้ มีรายงานการศึกษายีน hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) ที่จำเป็นต่อการเกิดโรคในแบคทีเรีย *P. syringae* pv *syringae* ทำได้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกระหว่างแบคทีเรียกับพืชอาศัยและพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย (Lingren, 1997) ยีน Hrp เป็นยีนที่จัดการและกำกับดูแลการขนส่งโปรตีนที่เกี่ยวกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค ระบบ hrp type III secretion ของแบคทีเรียนี้มีการผลิต multiple harpin และกำหนดเป้าหมายของโปรตีนอยู่ภายในผนังเซลของพืชทำให้แบคทีเรียเข้าไปเจริญเติบโตได้ใน phylloplane ของพืช (Hirano *et al.*, 1999) แบคทีเรีย *P. syringae* pv *syringae* ผลิตสารพิษ lipopeptide 2 ชนิดคือ syringomycin และ syringopeptin จากรูในเยื่อหุ้มพลาสม่าและเคลื่อย้ายเข้าสู่เซลล์พืช สารพิษ syringomycin จะมีผลต่อขบวนการ oxidation phosphorylation ในระบบเซลล์พืชมากกว่า syringopeptin (Hutchison and Gross, 1997)

1. **การสำรวจแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* สาเหตุโรค Holcus spot จากแหล่งผลิตข้าวโพดในประเทศไทยปี 2557-2558**

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 20 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2558 จำนวน 245 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 15 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 15 แปลง ลำพูน จำนวน 10 แปลง แพร่ จำนวน 10 แปลง น่าน จำนวน 10 แปลง อุตรดิตถ์ จำนวน 10 แปลง พิษณุโลก จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 15 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง สุพรรณบุรี จำนวน 10 แปลง ลพบุรี จำนวน 15 แปลง สระบุรี จำนวน 15 แปลง กาญจนบุรี จำนวน 10 แปลง นครราชสีมา จำนวน 20 แปลง ขอนแก่น จำนวน 15 แปลง ชัยภูมิ จำนวน 10 แปลง อุดรธานี จำนวน 10 แปลง หนองคาย จำนวน 10 แปลง สกลนคร จำนวน 10

แปลง โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่มีลักษณะอาการเป็นใบจุดสีขาวคล้ายกับโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) จำนวน 52 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

3. **การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ**

3.1 จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทาง สรีรวิทยา และสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำตัวอย่างใบข้าวโพดที่มีลักษณะอาการเป็นใบจุดสีขาวคล้ายกับโรคใบจุดโฮลคัส มาแยกเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* บนอาหาร King's medium B เก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง คัดเฉพาะโคโลนีสีขาว ที่สร้างสารเรืองแสง (fluorescent pigment) ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบด้วย 3% KOH และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี arginine dihydrolase test และ oxidase test พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถใช้สาร arginine และสร้าง oxidase ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อ fluorescent pseudomonads ที่ส่วนใหญ่เป็น saprophyte ไม่ใช่คุณสมบัติของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ที่ไม่สามารถใช้สาร arginine และไม่สร้างเอนไซม์ oxidase (Holt *et al*., 1994)

3.2 จำแนกโดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำแบคทีเรียทีแยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำมายืนยันผลการตรวจโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ B1 และ B2 หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp (Sorensen *et al*., 1998) ผลการตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 752 bp ในแบคทีเรียทุกไอโซเลท แบคทีเรียทั้งหมดจึงไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*

จากผลการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของประเทศ 20 แหล่งปลูก จำนวน 245 แปลง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556- กันยายน 2558 ไม่พบโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot)ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในประเทศไทย

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด ที่สำคัญของประเทศ 20 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556-กันยายน 2558 จำนวน 245 แปลง ได้แก่ ได้แก่ เชียงราย จำนวน 15 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 15 แปลง ลำพูน จำนวน 10 แปลง แพร่ จำนวน 10 แปลง น่าน จำนวน 10 แปลง อุตรดิตถ์ จำนวน 10 แปลง พิษณุโลก จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 15 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง สุพรรณบุรี จำนวน 10 แปลง ลพบุรี จำนวน 15 แปลง สระบุรี จำนวน 15 แปลง กาญจนบุรี จำนวน 10 แปลง นครราชสีมา จำนวน 20 แปลง ขอนแก่น จำนวน 15 แปลง ชัยภูมิ จำนวน 10 แปลง อุดรธานี จำนวน 10 แปลง หนองคาย จำนวน 10 แปลง สกลนคร จำนวน 10 แปลง ไม่พบโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในประเทศไทย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลของข้อมูลสถานภาพแบคทีเรีย *P. syringae pv. pv. syringae* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) ที่สามารถนำไปประกอบการเจรจาทางการค้าในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด และสนับสนุนการออกประกาศการปลอดศัตรูพืช โดย NPPO สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอเปิดตลาดสินค้าเกษตรระหว่างประเทศ ซึ่งส่งผลทำให้สามารถขยายปริมาณและมูลค่าการส่งออกได้มากยิ่งขึ้น

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International.

CAB International. 2014. CropProtection Compendium (2014 edition) Copyright ©2014 CABI. CAB International is a registered EU trademark. Available source: http://www.cabi.org/cpc/datasheetreport?dsid=45014. (Site date: April 25, 2015)

Hirano SS, Charkowski AO, Collmer A, Willis DK, Upper CD, 1999. Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of Pseudomonas syringae pv. syringae B728a on host plants in the field. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(17):9851-9856.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Hutchison ML, Gross DC, 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by Pseudomonas syringae pv. syringae: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10(3):347-354.

International Plant Protection Convention. 2005. International standards for phytosanitary measures: ISPM No. 6. Guidelines for surveillance. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Kendrick, J.B. 1926. Holcus bacterial spot on species of Holcus and Zea mays. Phytopathology 16:236-237.

Lindgren P, 1997. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Phytopathol., 35:129-152.

Robertson, A. 2004. Holcus leaf spot being found on corn. Intergrated crop management news 492(14) : 81

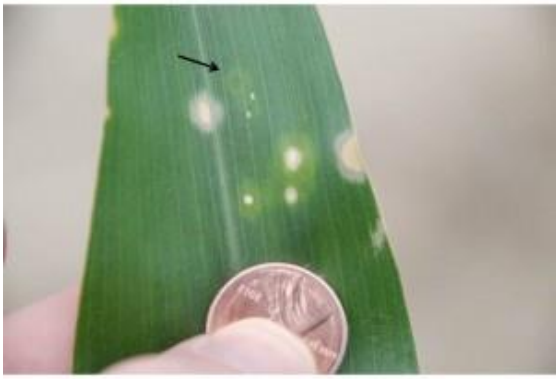
Sorensen, K.N., Kim, K. and Takemoto, J.M. 1998. PCR detectin of cyclic lipodepsinonapeptide producing Pseudomonas syringae pv. syringae and similarity of strains. Applied and environmental microbiology 64: 226-230.

Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota, USA

13. ภาคผนวก

ที่มา: http://www.extension.umn.edu/agriculture/crop-diseases/corn/holcusspot.html

ที่มา: http://livegpath.cals.cornell.edu/gallery/corn-sweet/holcus-spot-on-sweet-corn/



Note watersoaked lesion-type, indicative of infection, at the end of the arrow

ที่มา http://www.mississippi-crops.com/2012/04/21/corn-holcus-leaf-spot-occurring-in-the-central-delta/

รูปภาพ ลักษณะอาการของโรค Holcus spot ที่สืบค้นจาก internet นำมาจัดทำคู่มือการสำรวจ