

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
กิจกรรมที่ 1 : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Identification of Bacterial Causal Agent of Leaf Spot on Mokara
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน : ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล
ทัศนพร ทศกร
บุรณี พัววงศ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเคิ่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรค ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2558 ในจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมียลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าได้ ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 10% สร้างเอนไซม์ catalase สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยเจลาตินและ esculin ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose glycerol และ mannitol ได้ เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ arginine dihydrolase ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถสร้าง H₂S และไม่สามารถย่อยแป้งได้ การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R กับ ERIC2 และ BOXA1R พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ผลการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา

ของเชื้อ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุกับฐานข้อมูล GenBank ประกอบกับคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุใกล้เคียงกับเชื้อ *Pantoea ananatis* และไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดนี้ในกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน

Abstract

The experiment was conducted to isolate and identify the causal agent of leaf spot on mokara orchid during October 2012 – September 2015. A yellow bacterium was consistently isolated from the affected leaves. Pathogenicity test revealed that the bacterium was able to cause leaf spot symptom on mokara orchid, and allowed reisolation of the inoculated bacterium from the infected leaves. For the physiological and biochemical properties, bacteria were gram-negative, rod-shaped, motile, facultative anaerobic, tolerate 10% NaCl concentration, positive for catalase, indole production, gelatin hydrolysis, citrate utilization and produced acid from cellobiose, lactose, glycerol and mannitol while negative for oxidase, arginine dihydrolase, nitrate reduction, hydrogen sulfide production and starch hydrolysis. Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) technique was used for study genetic relationship among the yellow bacterium. The BOX and ERIC primers showed low polymorphism and there was no genetic relationship between bacterial strains and their origin. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences and the biochemical test showed that the yellow bacterium positioned closely with *Pantoea ananatis*.

6. คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ทำให้ต้นและดอกกล้วยไม้เสียหายเป็นจำนวนมาก ลักษณะอาการของโรคบนใบเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงแผลจุดจะขยายตัวลามติดต่อกันเป็นแผลใหม่ขนาดใหญ่ อาการบนดอกพบอาการกลีบดอกไหม้ ช่อดอกหักพับ ทั้งใบและดอกร่วง ดอกกล้วยไม้เสียหายไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้ แนวโน้มในการระบาดของโรคพบว่าการขยายพื้นที่ในการระบาดเพิ่มมากขึ้น การแยกเชื้อสาเหตุโรคตามลักษณะอาการดังกล่าวพบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมสีเหลือง ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อเบื้องต้นพบว่า สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์และคณะ, 2552; Chuenchitt *et al.*, 1983) ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ลูบ ตะเกียง แอลกอฮอล์

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น ปิเปต เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH (pH meter) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่ง ความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและทำปฏิกิริยา PCR

4. เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า

5. กล้วยไม้สกุลมอศคาร่า

- วิธีการ

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอศคาร่าในแหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญ เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี บันทึกข้อมูล ลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ และแหล่งที่พบ

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างกล้วยไม้มาแยกเชื้อจากส่วนที่มีอาการของโรค ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นตัวอย่างมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA (Potato semi synthetic agar) หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีและทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

ทดสอบการเกิดโรคกับกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ใช้เข็มทำแผลบนกล้วยไม้แล้วหยดเชื้อลงบนแผล คลุมให้ความชื้นกล้วยไม้ด้วยถุงพลาสติก และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) คัดเลือกเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้ได้มาจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชต่อไป

4. จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

4.1 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการศึกษาคูณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียบางประการที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาตามวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition ได้แก่ การย้อมสีแบบแกรม, การทดสอบด้วยสารละลายต่าง, motility test, oxidative/fermentation test, salt tolerance, catalase test, oxidase test, indole test, gelatin hydrolysis, esculin hydrolysis, starch hydrolysis, citrate utilization, arginine dihydrolase, nitrate reduction, H₂S production และ acid production

4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR

วิธีการสกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เชื้อ 1 ลูบ 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 นำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติม บัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R (5' -ATGTAAGCTCCT GGGGATTCAC- 3') กับ ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') และ BOXA1R (5'-C TACGGCAAG GCGACGCTGACG 3') โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ แบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/ μ l, TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 0.5 μ M และไพรเมอร์ BOX จำนวน 1 μ M เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบ สุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้น นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % agarose ใน 0.5X TAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดู แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) ค่า coefficient ที่ใช้คือค่า Dice

4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุ

ทำการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ fD2 (5'-CCGAATTCGTC GACAACAGAGTTTGGATCATGGCTCAG-3') และ rP1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGA CTT-3') โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/μl, TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., USA) และไพรเมอร์ fD2 และ rP1 ชนิดละ 0.5 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank

- เวลาและสถานที่

เดือนตุลาคม 55 – กันยายน 58 ที่ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานבקเทรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงกล้วยไม้เกษตรกร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในแปลงปลูกกล้วยไม้จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี โดยเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน หากอาการรุนแรงแผลจุดขยายตัวลามติดต่อกันเป็นแผลขนาดใหญ่ ทำให้ใบร่วงได้ ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงโดยเฉพาะช่วงมีฝนและอากาศร้อนจะพบลักษณะอาการไหม้บนก้านช่อดอกและกลีบดอกกล้วยไม้ด้วย ทำให้ช่อดอกหักพับและดอกร่วงได้ (Figure 1a, 1b)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บเชื้อบริสุทธิ์

ผลการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการใบจุด และกลีบดอกไหม้ของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง บนอาหาร NA ในขณะที่ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PSA โคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม (Figure 1c) เลือกเก็บโคโลนีและทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บในกลีเซอรอล 15% และ 50% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อเบื้องต้นพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้ที่เคยมีรายงานทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้ที่มีรายงานในต่างประเทศ และเป็น facultative anaerobe มีรายงานการศึกษาของ Abdullah and Kadzimin (1993) พบเชื้อ *E. chrysanthemi* เป็นสาเหตุโรคน้ำและกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนอปซิสในประเทศมาเลเซีย Cating *et al.* (2008) รายงานพบการเกิดโรคน้ำและ (bacterial soft rot) สาเหตุจากเชื้อ *Dickeya chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) บนกล้วยไม้ลูกผสมแวนด้าในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นครั้งแรก และ Cating and Palmateer (2011) รายงานพบโรคน้ำและ สาเหตุจากเชื้อ *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) บนกล้วยไม้ออนซิเดียมในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นครั้งแรกเช่นกัน

สำหรับประเทศไทยมีรายงานโดย Chuenchitt *et al.* (1983) ตรวจพบเชื้อ *Pseudomonas gladioli* สาเหตุอาการใบจุดของกล้วยไม้สกุลหวายในแปลงปลูกกล้วยไม้เขตหนองแขม นิยมรัฐ (2547) พบโรคน้ำและเกิดจากแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* โรคน้ำเกิดจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* (*P. gladioli*) และ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ปิยรัตน์และคณะ (2552) แยกเชื้อจากใบกล้วยไม้ลูกผสมแวนด้าซึ่งมีอาการเป็นแผลจุดกลมขอบสีเหลือง รอบแผลมีลักษณะซ้ำฉ่ำน้ำ บางแผลขยายลุกลามติดกันทำให้เกิดอาการไหม้เป็นปื้น และจำแนกเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi*

จากข้อมูลสืบค้น พบว่าแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* เป็นสาเหตุโรคของกล้วยไม้ที่พบรายงานทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ และรายงานของ ญัฐฐิมาและวนิดา (2539) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้องานของสับปะรด (marbling disease of pineapple) โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. herbicola* var. *ananas* ซึ่งปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Pantoea ananatis* (Mergaert *et al.*, 1993; Trüper and DeClari, 1997) โดยเชื้อทั้งสองชนิดเป็น facultative anaerobe เช่นเดียวกันกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการใบจุดกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าของไทย ดังนั้นจึงใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* และ *P. ananatis* ในการศึกษาเปรียบเทียบ

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

ผลการทดสอบการเกิดโรกับกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลืองที่แยกได้จากกล้วยไม้จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี สามารถทำให้เกิดโรบนกล้วยไม้ได้ ลักษณะอาการหลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน ใบกล้วยไม้เป็นจุดช้ำน้ำและขอบแผลเริ่มมีสีเหลืองอ่อน จากนั้นจุดขยายใหญ่ขึ้นขอบแผลเป็นสีเหลืองชัดเจน แผลที่ลามมาติดกันทำให้เหมือนอาการไหม้ และทำให้ใบร่วงจากต้นได้ (Figure 1d) การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง จากแผลที่ทำการปลูกเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรบนกล้วยไม้ได้มาจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

4. จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

4.1 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad *et al.*, 2001) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Grimont and Grimont, 2009) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PSA เป็นเมือกเยิ้มสีเหลือง เมื่อย้อมสีแกรมและทดสอบด้วยสารละลาย 3% KOH พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 5% 7% และ 10% สร้างเอนไซม์ catalase สร้างเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยเจลาติน ย่อย esculin ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose glycerol และ mannitol ได้ แต่เชื้อไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase, arginine dihydrolase ไม่สามารถสร้าง H₂S และไม่สามารถย่อยแป้งได้ (Table 1)

4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR

การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่สามารถทำให้เกิดโรบนกล้วยไม้ได้ จำนวน 30 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด ได้แก่ BOXA1R และ ERIC1R กับ ERIC2 (Versalovic *et al.*, 1994) พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองชุดให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้ทุกสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ไพรเมอร์ BOXA1R ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6 แบบ มีแถบดีเอ็นเอ 5 แถบที่พบได้ในทุกสายพันธุ์

ของเชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้และจากเชื้อ *P. ananatis* โดยมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างอย่างชัดเจนกับเชื้อ *E. chrysanthemi* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจากจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาครมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน ส่วนแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจากราชบุรีมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกันกับ *P. ananatis* มากกว่า ส่วนคู่ไพรเมอร์ ERIC1R กับ ERIC2 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันจำนวน 9 แบบ มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบที่พบได้ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้และจากเชื้อ *P. ananatis* โดยมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างอย่างชัดเจนกับเชื้อ *E. chrysanthemi* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจากจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาครมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน ส่วนแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจากราชบุรีมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกับ *P. ananatis* มากกว่าซึ่งสอดคล้องกันกับไพรเมอร์ BOXA1R (Figure 2) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ทดสอบโดยกำหนดแถบดีเอ็นเอให้เป็น binary data คือให้การปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น “1” และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น “0” วิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) version 2.20e (Rohlf, 1993) ค่า coefficient ที่ใช้คือค่า Dice (Dice, 1945) และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages clustering (UPGMA) (Sokal and Michener, 1985) ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ พบว่าที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.8 ไพรเมอร์ทั้งสองชุดให้ผลสอดคล้องกัน โดยจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *P. ananatis* และแยกกลุ่มออกจากเชื้อ *E. chrysanthemi* ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.9 ไพรเมอร์ BOXA1R สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม การจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ ส่วนคู่ไพรเมอร์ ERIC1R กับ ERIC2 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.85 สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม ผลการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องแหล่งที่มาของเชื้อเช่นเดียวกัน (Figure 3) ความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้จากจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี เกิดขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสามจังหวัดเป็นทั้งแหล่งปลูกและแหล่งซื้อขายที่มีอาณาเขตใกล้เคียงกัน อาจเกิดการเคลื่อนย้ายของเชื้อโดยติดไปกับส่วนขยายพันธุ์หรือวัสดุปลูกกล้วยไม้ได้และจากจำนวนที่ใช้ในการศึกษามีเพียง 30 สายพันธุ์ จากแหล่งปลูก 3 จังหวัด จึงอาจเป็นไปได้ที่ทำให้ไม่พบความผันแปรของเชื้อให้เห็น แต่เมื่อพิจารณาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในภาพรวมแล้วสามารถบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้นั้นมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. ananatis* สาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรดของไทย อย่างไรก็ตาม ในการทดลองควรมีเชื้อที่เป็น type strain จาก culture collection ที่ได้รับการยอมรับจะทำให้ผลการจำแนกเชื้อเป็นที่การยอมรับและชัดเจนมากขึ้น

4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุ

ทำการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ fD2 และ rP1 แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของ type strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าใกล้เคียงกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* CIP104006 (accession NR104928) ค่า identity เท่ากับ 99% เชื้อ *P.*

stewartii subsp. *stewartii* ATCC8199 (accession NR044800) ค่า identity เท่ากับ 99% เชื้อ *P. ananatis* NCPPB1846 (accession NR026045) ค่า identity เท่ากับ 98% เชื้อ *P. allii* BD390 (accession NR115258) ค่า identity เท่ากับ 98% และเชื้อ *P. agglomerans* DSM3493 (accession NR041978) ค่า identity เท่ากับ 98% นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 117-1299 bp ขนาดประมาณ 1.1 kb ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์ M2229 M2551 และ M2615 สร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในกล้วยไม้ (Table 3) โดยใช้โปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) ด้วยวิธี maximum likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ M2229 M2551 และ M2615 จัดกลุ่มรวมกับเชื้อจิ้งส Pantoea ทั้ง 5 ชนิด แยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* และ *Burkholderia gladioli* ซึ่งไม่ใช่เชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae (Figure 4)

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามารถใช้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ชัดเจนเหมือนวิธี DNA-DNA reassociation (Stackbrandt and Goebel, 1994) การนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนส่วนอื่นหลายๆ ยีนมาใช้ร่วมกันโดยใช้เทคนิค Multilocus sequence analysis และการทดสอบพีชอคัยของเชื้อจะทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ชัดเจนขึ้นเหมือนกับรายงานการใช้เทคนิคนี้สำหรับจำแนกเชื้อจิ้งส Pantoea หลายชนิดได้สอดคล้องกับวิธี DNA-DNA reassociation เช่น Brady *et al.* (2008) นำเชื้อ Pantoea สาเหตุโรคพืช โรคคน และจากสิ่งแวดล้อม มาศึกษา multilocus gene sequencing ของ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* โดยใช้เชื้ออ้างอิง (reference strain) จาก 7 สปีชีส์ที่จำแนกเป็นเชื้อ Pantoea แล้ว เชื้อสาเหตุโรคคนซึ่งยากต่อการจำแนกเป็น *P. agglomerans* หรือ *P. ananatis* และเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งแยกได้จากยูคาลิปตัส ข้าวโพด และหอม พบว่าสามารถใช้จำแนกเชื้อได้ดีเหมือนกับเทคนิค DNA-DNA hybridization และ Delétoile (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกเชื้อ *P. agglomerans* โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและ API 20E จำแนกเชื้อเบื้องต้นเป็น *P. agglomerans* จำนวน 28 สายพันธุ์ นำมาศึกษา multilocus gene sequencing ของ 6 ยีน ได้แก่ *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* พบว่าสามารถแยกเชื้อ *P. agglomerans* ออกจากเชื้อ Pantoea ต่างสปีชีส์ได้

อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลการจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA ร่วมกับรายงานพีชอคัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้พิจารณาในการจำแนกเชื้อจิ้งส Pantoea ทั้ง 5 สปีชีส์ คือ ความสามารถในการสร้าง indole (indole production) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และเชื้อ *P. ananatis* มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อชนิดใหม่ตั้งชื่อตามคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถสร้าง indole ได้ พบเข้าทำลายเฉพาะ foxtail millet (*Setaria italica*) และ pearl millet (*Pennisetum americanum*) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Grimont and Grimont, 2009) ส่วนเชื้อ *P. ananatis* มีรายงานพีชอคัยหลายชนิด เช่น honeydew melons (Wells *et al.*, 1987) แคนตาลูป (Bruton *et al.*, 1991) หอม (Gitaitis and Gay, 1997) sudangrass (Azad *et al.*, 2000) ข้าวโพด (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001) ยูคาลิปตัส (Coutinho *et al.*, 2002)

netted melon (Kido *et al.*, 2008) ข้าวฟ้าง (Cota *et al.*, 2010) และข้าว (Mondal *et al.*, 2011) เป็นต้น จากรายงานพืชอาศัยของเชื้อ *P. ananatis* ที่ค่อนข้างกว้างสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายวงศ์รวมทั้งรายงานของณัฐธิดาและวนิดา (2539) ซึ่งพบเชื้อ *P. ananatis* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรดในประเทศไทย จึงทำให้สรุปในเบื้องต้นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. ananatis*

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า ในจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง สามารถทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าได้ การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง จากแผลที่ทำการปลูกเชื้อ

ผลการศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือถึง 10% สร้างเอนไซม์ catalase สร้างเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยเจลาติน ย่อย esculin ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose glycerol และ mannitol ได้ แต่เชื้อไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase, arginine dihydrolase ไม่สามารถสร้าง H₂S และไม่สามารถย่อยแป้งได้

จากการสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น facultative anaerobe ลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าหรือกล้วยไม้สกุลอื่นทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน

ลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า โดยใช้เทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ BOXA1R และ ERIC1R กับ ERIC2 ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อพบว่าที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.8 ไพรเมอร์ทั้งสองชุดจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *P. ananatis* โดยแยกเชื้อ *E. chrysanthemi* อยู่คนละกลุ่ม เชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยและไม่มีความสัมพันธ์กันกับแหล่งที่มาของเชื้อ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าใกล้เคียงกับเชื้อ *P. ananatis* อย่างไรก็ตาม การทดสอบพืชอาศัยของเชื้อและทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อที่เป็น type strain จาก culture collection ที่ได้รับการยอมรับจะทำให้ผลการจำแนกเชื้อเป็นที่ยอมรับและชัดเจนมากขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

- ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล และวนิดา ฐิตะฐาน. 2539. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื่อแกนของสับปะรด. หน้า 60-70. ใน: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2539. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Abdullah, H. and S. Kadzimin. 1993. Etiology of Bacterial Soft Rot of Orchids. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 16: 1-4.
- Azad, H.R., G.J. Holmes and D.A. Cooksey. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Dis.* 84: 973-979.
- Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter M. Vancanneyt, J. Swings and T. Coutinho. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol* 31: 447-460.
- Brady, C.L., T. Goszczynska, S.N. Venter, I. Cleenwerck, P. De Vos, R.D. Gitaitis and T.A. Coutinho. 2011. *Pantoea allii* sp. Nov., isolated from onion plants and seed. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.* 61: 932-937.
- Bruton, B.D., J.M. Wells, G.E. Lester and C.L. Patterson. 1991. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a postharvest disease of cantaloupe fruit. *Plant Dis.* 75: 180-183.
- Cating, R.A. and A.J. Palmateer. 2011. Bacterial soft rot of *Oncidium* orchids caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida. *Plant dis.* 95: 74.
- Cating, R.A., J.C. Hong, A.J. Palmateer, C.M. Stiles and E.R. Dickstein. 2008. First report of bacterial soft rot on vanda orchid caused by *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) in the United States. *Plant dis.* 92: 977.
- 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.

- Cota, L.V. Cota, R.V. Costa, D.D. Silva, D.F. Parreira, U.G.P. Lana and C.R. Casela. 2010. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 120–122.
- Coutinho, T.A., O. Preisig, J. Mergaert, M.C. Cnockaert, K.H. Riedel, J. Swings and M.J. Wingfield. 2002. Bacterial blight and dieback of Eucalyptus species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant Dis.* 86: 20–25.
- Delétoile, A., D. Decré, S. Courant, V. Passet, J. Audo, P. Grimont, G. Arlet and S. Brisse. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 47: 300-310.
- Dice, L. R. 1945. Measurement of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Gitaitis R.D. and J.D. Gay. 1997. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Dis.* 81: 1096–1096.
- Goszczyńska, T., Botha, W. J., Venter, S. N., and Coutinho, T. A. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Dis.* 91:711-718.
- Grimont, P.A.D. and F. Grimont. 2009. Genus XXIII. *Pantoea*, pp. 713-720. In: P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer and W. Whitman, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. Springer, New York.
- 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. 376 p.
- Kido, K., R. Adachi, M. Hasegawa, K. Yano, Y. Hikichi, S. Takeuchi, T. Atsuchi and Y. Takikawa. 2008. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 302–312.
- Mergaert, J., L. Verdonck and K. Kersters. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., Respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 162-172.
- Mondal, K.K., C. Mani, J. Singh, J.G. Kim and M.B. Mudgett. 2011. A new leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* in India. *Plant Dis.* 95: 1582-1583.

- Paccola-Meirelles L.D., A.S. Ferreira, W.F. Meirelles, I.E. Marriel and C.R. Casela. 2001. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Phytopathol.* 149: 275–279.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York. 206 p.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota, USA. 373 p.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1985. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 28: 1409-1438.
- Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Trüper, H.G. and L. DeClari. 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (noun) in apposition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 908–909.
- Versalovic J, M. Schneider, F.J. De Bruijn and J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- Wells, J., W. Sheng, M. Ceponis and T. Chen. 1987. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. *Phytopathol.* 77: 511–514.
- Yan H., S.H. Yu, G.L. Xie, W. Fang, T. Su and B. Li. 2010. Grain discoloration of rice caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. *Plant Dis.* 94: 482.

13. ภาคผนวก

-



Figure 1 Leaf spot of mokara orchid

- a. Disease symptom begins as small yellow water soaked spots, later the spots expanded and turned brown with yellow haloes
- b. Symptom on flowers
- c. Yellow mucoid colonies on Potato semi synthetic agar
- d. Pathogenicity test on mokara orchid leaf

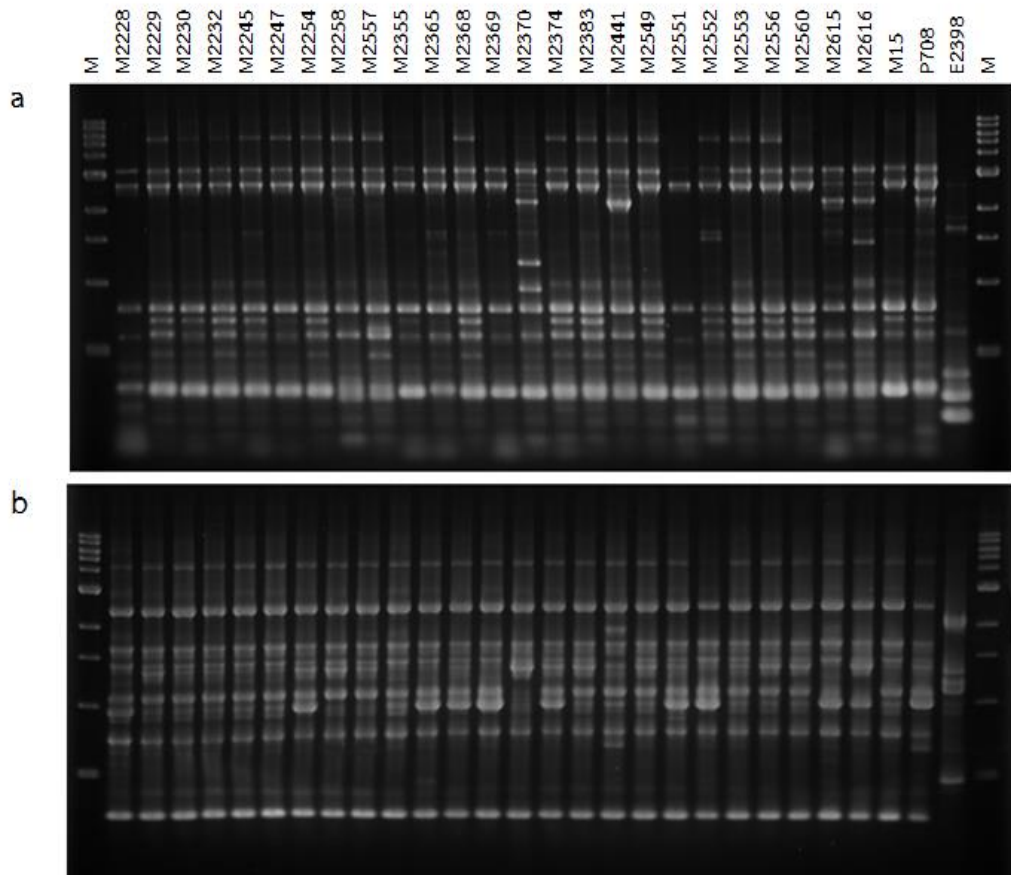


Figure 2 Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) fingerprints obtained from mokara strains with (a) BOX primer and (b) ERIC primers; Lane M, 1 Kb DNA Ladder.

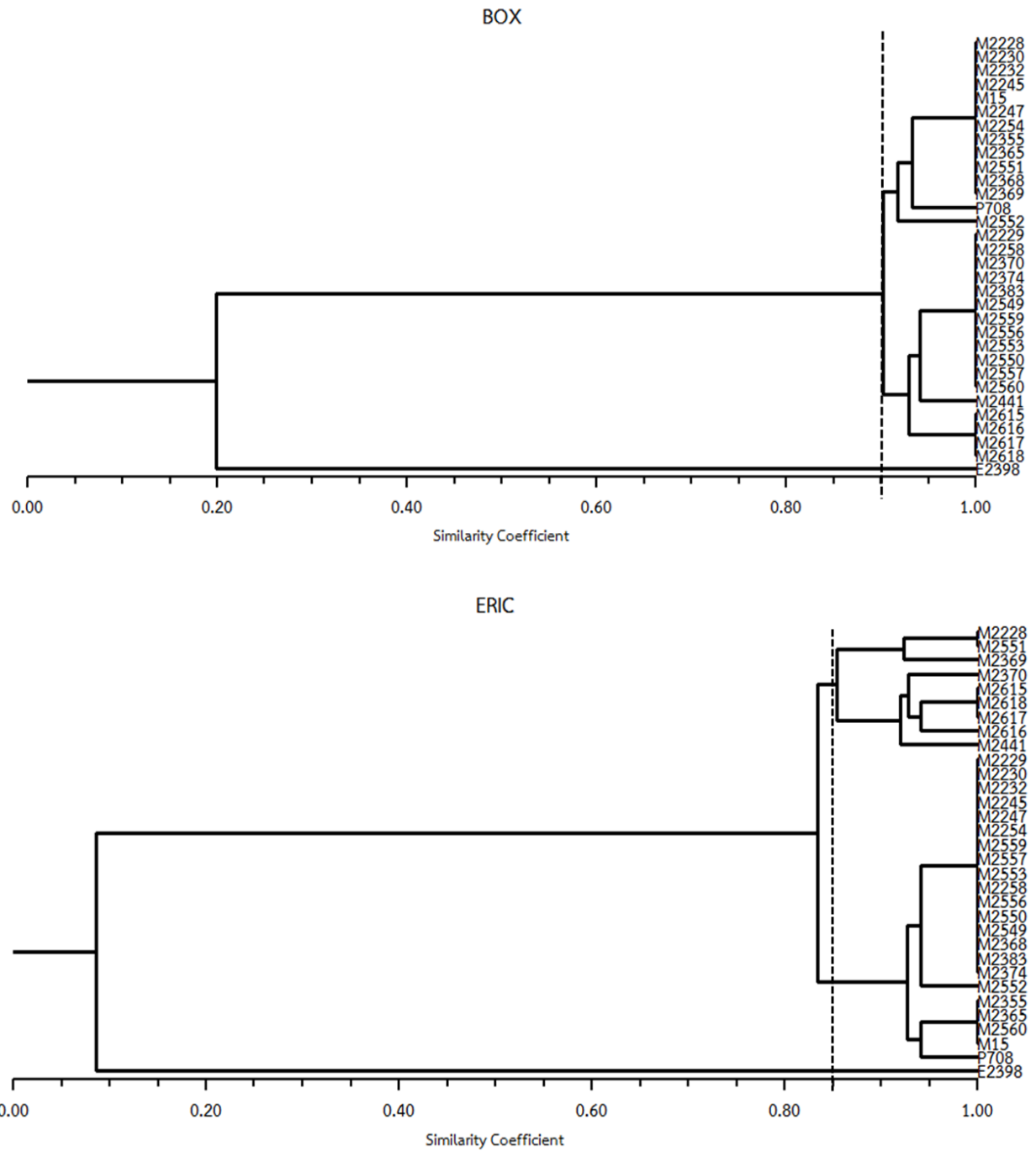


Figure 3 Dendrogram among mokara orchids strains applying the Dice coefficient of similarity and the UPGMA method using the NTSYS-Pc software.

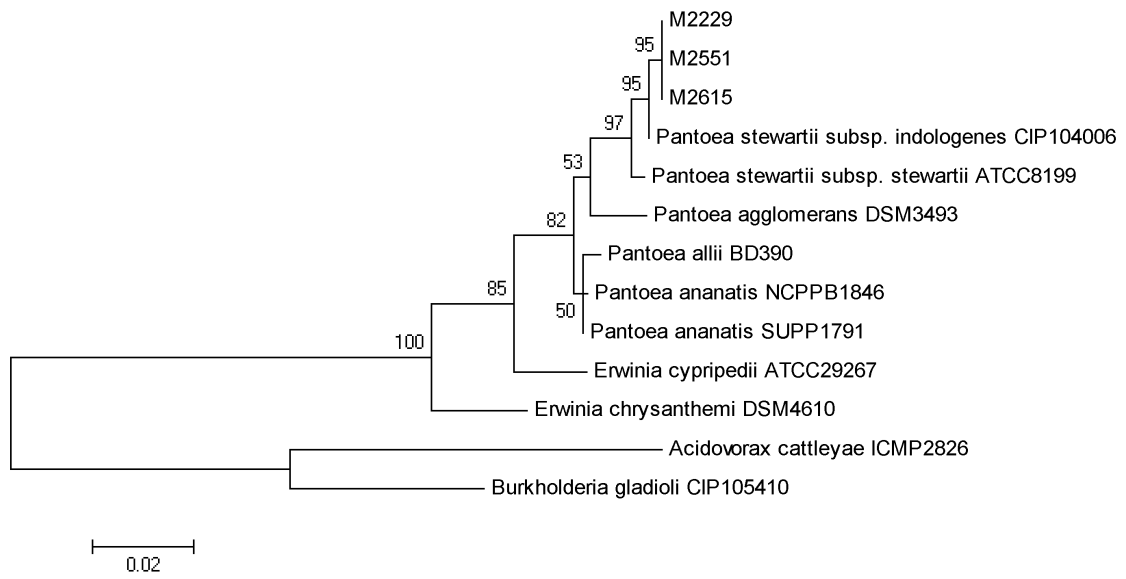


Figure 4 Maximum-likelihood tree based on partial 16S rDNA gene sequences showing the relationships of mokara orchid strains (M2229 M2551 and M2615) and type strains of species. Bootstrap values based on 1000 replicates are shown at branch nodes.

Table 1 Bacterial strains used in this study and their pathogenicity for mokara orchids

Strain	Host	Location	Pathogenicity test	
mokara strains				
M2228	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2229	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2230	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2232	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2245	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2247	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2254	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2258	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2355	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2365	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2368	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2369	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2370	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2374	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2383	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2441	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2549	Mokara	Samut Sakhon	+	
M2550	Mokara	Samut Sakhon	+	
M2551	Mokara	Samut Sakhon	+	
M2552	Mokara	Samut Sakhon	+	
M2553	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2556	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2557	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2559	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2560	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M15	Mokara	Nakhon Pathom	+	
M2615	Mokara	Ratchaburi	+	
M2616	Mokara	Ratchaburi	+	
M2617	Mokara	Ratchaburi	+	
M2618	Mokara	Ratchaburi	+	
<i>P. ananatis</i>	P708	Pineapple	Prachuap Khiri Khan	nd
<i>E. chrysanthemi</i>	E2398	Dendrobium	Nakhon Pathom	nd

nd means not determine; + means positive; - means negative

Table 2 Continued

Character	M2560	M15	M2615	M2616	M2617	M2618	P708	E2398	PAG ¹	PAN ¹	PSI ¹	PSS ¹
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F test	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Motility test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Growth on 10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Arginine dihydrolase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
Acid production from:												
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

^{1/} Data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three (Logan and De Vos, 2009) and Mergaert *et al.* (1993), "nd" means no data, "+" means positive, "-" means negative, F: facultative anaerobe, PAG: *P. agglomerans*, PAN: *P. ananatis*, PSI: *P. stewartii* subsp. *Indologenes*, PSS: *P. stewartii* subsp. *stewartii*

Table 3 Strains used in Maximum-likelihood tree

Strain	Source	Location	Accession no.
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i> CIP104006 ^T	Fox millet	India	NR104928
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ATCC8199 ^T	Maize	USA	NR044800
<i>P. ananatis</i> NCPPB1846 ^T	Pineapple	Brazil	NR026045
<i>P. ananatis</i> SUPP1791	Netted melon	Japan	AB297969
<i>P. allii</i> BD390 ^T	Onion seed	South Africa	NR115258
<i>P. agglomerans</i> DSM3493 ^T	Human	Zimbabwe	NR041978
<i>Erwinia cyripedii</i> ATCC29267 ^T (<i>Pectobacterium cyripedii</i>)	Orchid	USA	U80201
<i>E. chrysanthemi</i> DSM4610 ^T	Chrysanthemum	USA	NR041972
<i>Acidovorax cattleyae</i> ICMP2826 ^T (<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>)	Orchid	USA	AF137504
<i>Burkholderia gladioli</i> CIP105410 ^T	Gladiolus	USA	NR044378