

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร
2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
 - กิจกรรมที่ 1 : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ
 - กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช
1. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Identification of the bacteria causes leaf blight disease on onion
2. คณะผู้ดำเนินงาน
 - หัวหน้าการทดลอง : ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - ผู้ร่วมงาน : ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล
บุรณี พัววงศ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเคิ่ง
กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและพื้นที่เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิด ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมูลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมแบ่ง และหอมหัวใหญ่ได้ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H₂S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม

ของเชื้อ *Xanthomonas* spp. การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จาก ยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii*

Abstract

The experiment was conducted to isolate and identify the causal agent of leaf blight on onion during October 2016 – September 2018. A yellow bacterium was consistently isolated from the affected leaves. Pathogenicity test revealed that the bacterium was able to cause leaf blight symptom on shallot, multiplied onion and onion, and allowed reisolation of the inoculated bacterium from the infected leaves. For the physiological and biochemical properties, bacteria were gram-negative, rod-shaped, motile, aerobic, tolerate 4% NaCl concentration, positive for catalase and pectinolytic activity. Does not produce oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase and urease. Hydrolyses gelatin, casein, esculin, starch, cellulose and Tween 80, produces H₂S from cysteine, grow on YPGA at 35°C but not at 40°C and produce acid from cellobiose, lactose and glycerol while negative for indole production and fluorescent pigments are not observed on King's B medium. Phylogenetic analysis based on partial 16S rDNA sequences, the BBO isolates were grouped into *Xanthomonas* spp. Further investigation based on multilocus sequence analysis (MLSA) by using concatenated phylogenies produced from multiple loci of house-keeping genes, *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* all BBO isolates were resemble of *X. axonopodis* pv. *allii*.

4. คำนำ

โรครีบแห้ง (bacterial leaf blight หรือ bacterial blight of onion: BBO) ของหอมในประเทศไทยเคยพบมีการระบาดเมื่อปี 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่ตำบลทุ่งทอง อำเภอนาทม จังหวัดกาญจนบุรี (นิตยา และคณะ, 2530) ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (นิตยาและคณะ, 2532) โดยวนิดาและคณะ (2529) ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *Xanthomonas* sp. ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมที่พบระบาดในประเทศไทยเป็นปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืชและจากการเก็บตัวอย่างโรคจากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรครีบแห้ง โดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และจำแนกชนิดด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA) เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

5. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องซั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา PCR

- วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. สืบสวนและเก็บตัวอย่างโรค

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ สุรินทร์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกุยช่าย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้

ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พนเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาตามวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al.*, 2001) ได้แก่ การย้อมสีแบบแกรม, motility test, oxidative/fermentation test, salt tolerance, catalase test, oxidase test, nitrate reduction, arginine dihydrolase test, urease test, indole production, esculin hydrolysis, gelatin hydrolysis, starch hydrolysis, casein hydrolysis, cellulose hydrolysis, tween 80 hydrolysis, H₂S production, pectinolytic activity, fluorescent pigment production และ acid production

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene

แยกสกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรีย 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 นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 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 แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 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

เพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') และ 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/ μ l, One PCR Master Mix (GeneDirex[®] Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 μ M 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 และ

สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA)

นำดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* ตามรายงานของ Young *et al.* (2008) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/μl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรมอร์ชนิดละ 0.5 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (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 มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) และส่งผลผลิต PCR ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งวิเคราะห์กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

- เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 59 – กันยายน 61

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานבקเทรวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงเกษตรกร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ฟันฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาที่พันธุ์พู่ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เซย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย มาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง ได้จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอมแดง 4 ไอโซเลท และหอมหัวใหญ่ 2 ไอโซเลท (Table 1)

2. สํารวจและเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างหอมที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ สุรินทร์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สุโขทัย พะเยา อุดรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการใบจืดรูปปร่างคล้ายเลนส์ตรงกลางแผลบางสีขาวซีด ขอบแผล ฉ่ำน้ำ และใบแห้งของหอม พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง คล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท จากตัวอย่างหอมแบ่งที่เก็บจากอำเภอพบพระ จังหวัดตาก (Figure 1) ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาในกลีเซอรอล 15% และ 50% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง จำนวน 1 ไอโซเลท และที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช จำนวน 6 ไอโซเลท รวม 7 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และ กุยช่าย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อบนพืชทดสอบเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้หอมแดง หอมแบ่ง และหอมหัวใหญ่เกิดโรคได้ แต่ไม่ก่อให้เกิดโรคในกุยช่าย โดยพืชทดสอบเริ่มแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำหัวท้ายแหลมคล้ายวงรีหรือรูปเลนส์ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน บริเวณแผลใบจะยุบตัวหรือบางลง เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นอาจทำให้ใบหักพับและปลายใบแห้งได้ โดยที่ต้นที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และกรรมวิธีควบคุมลบ (negative control) คือน้ำนิ่งฆ่าเชื้อไม่ทำให้พืชทดสอบปรากฏอาการโรค (Table 1) ผลทดสอบการเกิดโรคสอดคล้องกับรายงานของ Kadota *et al.* (2000) ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคใน Welsh onion (*A. fistulosum* L.) และหอมหัวใหญ่ (*A. cepa* L.) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคใน chive (*A. schoenoprasum* L.) กุยช่าย (*A. tuberosum* Rottler) และ hyacinth (*Hyacinthus orientalis* L.) และจากข้อมูลการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) ของ Roumagnac *et al.* (2004) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคบนหอมหัวใหญ่ (*A. cepa* L. cv. Red Creole) กระเทียม (*A. sativum* L. cv. Vacoa) กระเทียมต้น (*A. porrum* L. cv. Gros long d'e 'te ´) และหอมแดง (*A. cepa* var. *ascalonicum* Backer cv. Ambition) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบน chive (*A. schoenoprasum* L. cv. Civette) และ hyacinth (*H. orientalis* L. cv. Carnegie) การพิสูจน์โรค

ตามวิธีการของ Koch สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง จากแผลที่ทำการปลูกเชื้อ

4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H₂S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B (Table 2)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene

ทำการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คูไพรเมอร์ 27F และ 1492R แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของ type strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Xanthomonads มากกว่า 99% โดยเชื้อ *X. euvesicatoria* DSM19128 (accession NR104773.1) ค่า identity เท่ากับ 99.66% เชื้อ *X. perforans* XV938 (accession NR104792.1) ค่า identity เท่ากับ 99.60% เชื้อ *X. fuscars* LMG 826 (accession NR104958.1) ค่า identity เท่ากับ 99.66% และเชื้อ *X. campestris* ATCC 33913 (accession NR074936.1) ค่า identity เท่ากับ 99.46% นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 1.4 kb ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในพืชผักและหอม โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) ด้วยวิธี Maximum Likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมในไทย จัดกลุ่มรวมกับเชื้อ *X. euvesicatoria* และ *X. perforans* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ เชื้อ *X. fuscars* สาเหตุโรคใบจุดในถั่ว และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii* สาเหตุโรคใบแห้งของหอม แยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ (black rot) ของพืชผักตระกูลกะหล่ำ และแบคทีเรีย *Pantoea allii* สาเหตุ center rot ของหอมหัวใหญ่ (Figure 2)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่มีความใกล้เคียงกันมากกับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดแบคทีเรียสอดคล้องกับการศึกษาของ Hauben *et al.* (1997) ซึ่งทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของเชื้อสกุล *Xanthomonas* พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากและให้ผลไม่สอดคล้องกับข้อมูลของ DNA-DNA hybridization ที่มีการศึกษาไว้ ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ในระดับสปีชีส์ได้

6. การวิเคราะห์ multilocus sequence analysis (MLSA)

นำดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 940 bp, 698 bp, 865 bp และ 873 bp ตามลำดับ นำมาเรียงต่อกันรวมความยาวทั้งหมด 3,376 bp สร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pathovars และ *Xanthomonas* spp. ที่เป็น type strain และ pathotype strain ของเชื้อแบคทีเรียและมีข้อมูลของทั้ง 4 ยีนในฐานข้อมูล Genbank (Table 3) โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) ด้วยวิธี Maximum Likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii* สายพันธุ์ LMG 21894 (CFBP 6369) ซึ่งเป็น pathotype strain ตามรายงานของ Roumagnac *et al.* (2004) (Figure 3) โดยแยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ ICMP13 (type strain) และ ICMP6541 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มพืชผักเช่นเดียวกัน

โรคใบแห้งของหอม (Bacterial leaf blight) มีรายงานการพบโรคครั้งแรกที่ฮาวายในปี 1975 และจำแนกเชื้อสาเหตุครั้งแรกเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. อาการของโรคเริ่มแรกใบเป็นจุดฉ้ำน้ำ แล้วขยายเป็นรูปร่างรีแหลมหัวท้าย และขยายใหญ่ไปตามความยาวใบ จากนั้นแผลเริ่มแห้งแตกตรงกลางแผลและใบหักพับลง หากอาการรุนแรงใบจะแห้งตายมีผลทำให้หัวมีขนาดเล็กหรือฝ่อ (Alvarez *et al.*, 1978) ต่อมา Paulraj and O'Garro (1993) ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่ระบาดในแหล่งปลูกหอมที่สำคัญใน Barbados โดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ และทำ fatty acid analysis พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* และ Kadota *et al.* (2000) ทำการศึกษา pathovar ของเชื้อ *X. campestris* สาเหตุโรคใหม่ของ Welsh onion (Bacterial blight of Welsh onion) ซึ่งพบระบาดที่เมืองโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่นในปี 1998 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคใน Welsh onion และหอมหัวใหญ่ แต่ไม่ทำให้เกิดโรคใน chive, กุยช่าย (Chinese chive) และ hyacinth จึงเสนอเป็น pathovar ใหม่ และจำแนกเชื้อสาเหตุเป็น *X. campestris* pv. *allii* pv. nov. อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Kadota *et al.* (2000) ใช้เพียงคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย ต่อมา Roumagnac *et al.* (2004) ได้ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA, วิธี DNA-DNA hybridization, ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source utilization), การวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของเซลล์แบคทีเรีย และเทคนิค fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLPs) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *X. axonopodis* pv. *allii*

สำหรับประเทศไทยพบโรคใบแห้งของหอมระบาดในปี 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่ ตำบลทุ่งทอง อำเภอนาทม จังหวัดกาฬสินธุ์ (นิตยา และคณะ, 2530) ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรี และนครปฐม (นิตยา และคณะ, 2532) การศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยวนิดา และคณะ (2529) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็น *Xanthomonas* sp. และยังไม่พบรายงานการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมในประเทศไทยในระดับสปีชีส์ แต่เนื่องจากการขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DNA-DNA hybridization เพื่อดูความ

คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียทำให้นักวิจัยพยายามหาวิธีการเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว เทคนิค multilocus sequence analysis (MLSA) เป็นการวิเคราะห์หากลุ่มยีนที่เป็น housekeeping gene ซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียจำนวน 4-7 ยีน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank มีความนิยมใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้สอดคล้องกับการศึกษา DNA-DNA hybridization โดย Young *et al.* (2008) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 119 สายพันธุ์ โดยใช้ multilocus sequence analysis ของ 4 ยีน ได้แก่ *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* พบว่าสามารถแยก *Xanthomonas* spp. ออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยเปรียบเทียบกับวิธี DNA-DNA hybridization การนำเทคนิค MLSA มาใช้จำแนกชนิดเชื้อในกลุ่มของ *Xanthomonas* spp. โดย Lang *et al.* (2017) วิเคราะห์กลุ่มยีน *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *fusA*, *lepA* และ *rpoD* เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุอาการใบขีด (bacterial leaf streak) ของข้าวโพดที่พบในสหรัฐอเมริกาพบว่าเกิดจากเชื้อ *X. vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. และการศึกษาของ Roach *et al.* (2018) ใช้การวิเคราะห์หากลุ่มยีน *atpD*, *dnaK*, *efp* และ *gyrB* จำแนกชนิดเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศและพริกในออสเตรเลีย จำนวน 64 ไอโซเลท พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น *X. euvesicatoria*, *X. perforans* และ *X. vesicatoria* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ 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 จากข้อได้เปรียบของเทคนิค MLSA ที่สามารถเปรียบเทียบเชื้อที่ศึกษากับเชื้อสายพันธุ์อื่นจากทั่วโลกโดยใช้ฐานข้อมูล GenBank จึงนับเป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียเพื่อลดข้อจำกัดเรื่องขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DNA-DNA hybridization ได้ โดยต้องพิจารณาคัดเลือกยีนพื้นฐานที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและแบคทีเรียจำเป็นต้องรักษาคุณสมบัติที่ไวให้คงที่โดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อยีนนั้นน้อยที่สุด

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมียีนลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมหัวใหญ่ และหอมแบ่งได้ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทาง

สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H₂S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จากยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมที่ระบาดในประเทศไทยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii*

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอม เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัย เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช และใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงหนังสือของกลุ่มวิจัยโรคพืช

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

10. เอกสารอ้างอิง

นิตยา ก้นหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณะ วรณภีร์. 2530. การป้องกันกำจัดโรครีบแห้งของหอมหัวใหญ่. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 69-76.

นิตยา ก้นหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณะ วรณภีร์. 2532. การป้องกันกำจัดโรครีบแห้งของหอมหัวใหญ่. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 106-114.

นิตยา ก้นหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยาปี 2545. 33 หน้า.

วนิดา ฐิติฐาน นิตยา ก้นหลง สมใจ วิวิธจินดา และสุนตรา ภาวิจิตร. 2529. ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมแดง. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 47-54.

Alvarez, A.M., I.W. Buddenhagen, E.S. Buddenhagen and H.Y. Domen. 1978. Bacterial blight of onion, a new disease caused by *Xanthomonas* sp. *Phytopathol.* 68: 1132-1136.

- 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.
- 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.
- Hauben, L. , L. Vauterin, J. Swings and E.R.B. Moore. 1997. Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 328-335.
- Kadota, I., K. Uehara, H. Shinohara and K. Nishiyama. 2000. Bacterial blight of Welsh onion: a new disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. nov. *J Gen Plant Pathol* 66: 310–315.
- 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.
- Lang, J.M. , E. DuCharme, J. Ibarra Caballero, E. Luna, T. Hartman, M. Ortiz-Castro, K. Korus, J. Rascoe, T.A. Jackson-Ziems, K. Broders and J.E. Leach. 2017. Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. *Phytopathology* 107: 1312–1321.
- Paulraj, L. and L. W. O’Garro. 1993. Leaf blight of onions in Barbados caused by *Xanthomonas campestris*. *Plant Dis.* 77: 198-201.
- Roach, R., R. Mann, C.G. Gambley, R.G. Shivas and B. Rodoni. 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *Eur J Plant Pathol* 150: 595–608.
- Roumagnac, P., L. Gagnevin, L. Gardan, L. Sutra, C. Manceau, E.R. Dickstein, J. B. Jones, P. Rott, and O. Pruvost. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 15-24.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota, USA. 373 p.
- Young, J.M., D.C. Park, H.M. Shearman and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas*. *Sys. Appl. Microbiol.* 31: 366–377

13. ภาวะผิดปกติ

-



Figure 1 Bacterial blight on field grown multiplied onion (*A. cepa* var. *aggregatum*)



Figure 2 Maximum-likelihood tree based on partial 16S rDNA gene sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

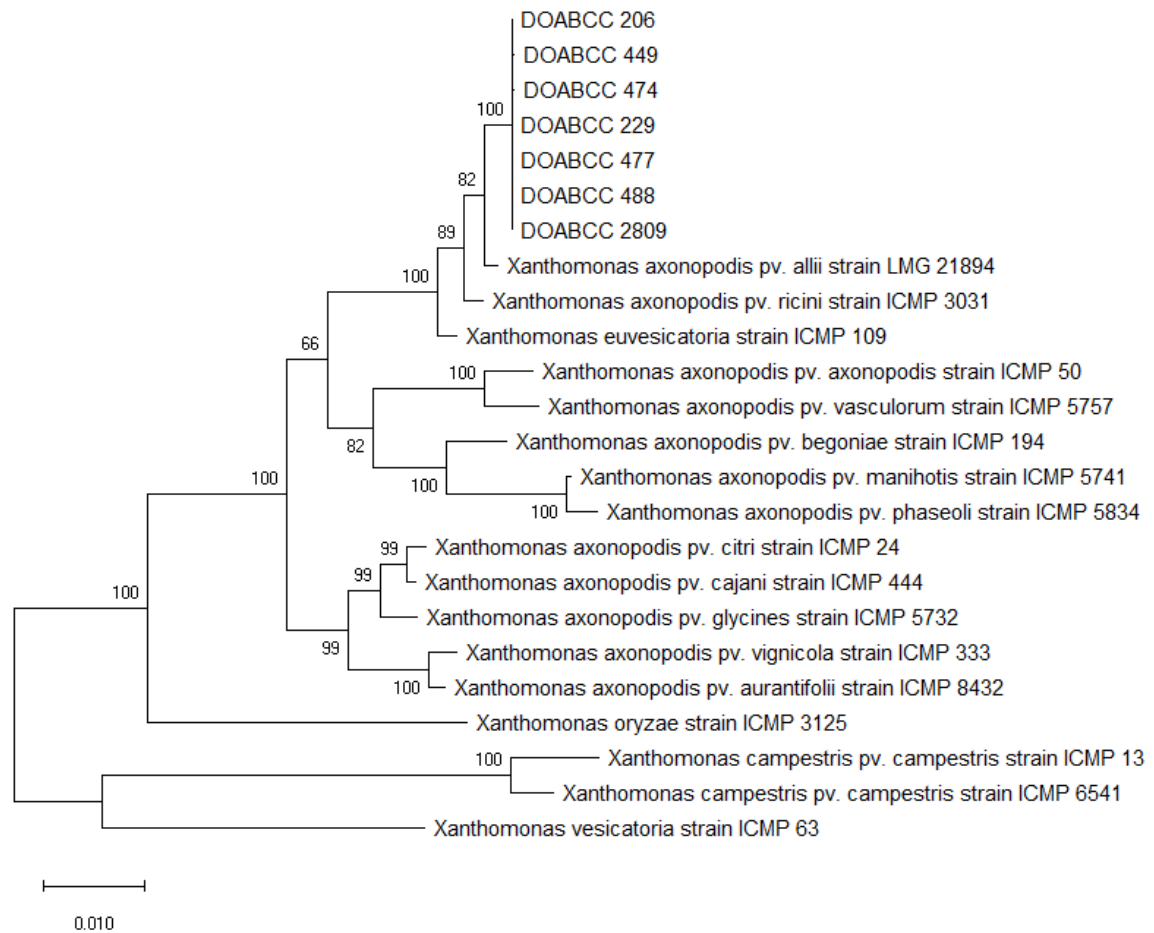


Figure 3 Maximum-likelihood tree based on the concatenated *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* nucleotide sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

Table 1 Bacterial strains used in this study and their pathogenicity for *Allium* spp.

Strain	Host	Host	Location	Year	Pathogenicity Test			
					Shallot	Onion	Multiplied onion	Chinese chive
DOABCC 206	Shallot	<i>A. cepa</i> var. <i>ascalonicum</i>	Ratchaburi	1984	+	+	+	-
DOABCC 229	Onion	<i>A. cepa</i>	Kanchanaburi	1984	+	+	+	-
DOABCC 449	Shallot	<i>A. cepa</i> var. <i>ascalonicum</i>	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 474	Onion	<i>A. cepa</i>	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 477	Shallot	<i>A. cepa</i> var. <i>ascalonicum</i>	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 488	Onion	<i>A. cepa</i>	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 2809	Multiplied onion	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Tak	2018	+	+	+	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> DOABCC 493	Cauliflower	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Prathum Thani	1985	-	-	-	-

+ means positive; - means negative

Table 2 Comparison of physiological and biochemical characteristics of bacterial strains isolated from *Allium* spp.

Character	DOABCC								<i>Xaa</i> ^{1/}
	206	229	449	474	477	488	2809	493	
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic metabolism of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic metabolism of glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulose hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinolytic activity	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tolerance to 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigment production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:									
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^{1/} Kadota *et al.* (2000), Roumagnac *et al.* (2000), *Xaa*: *X. axonopodis* pv. *allii*

Table 3 Xanthomonas strains used in multilocus sequence analysis

No.	Species name	Strain	Accession Number			
			dnaK	fyuA	gyrB	rpoD
1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 13 ^T	EU498747.1	EU498849.1	EU498948.1	EU499067.1
2	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	ICMP 24 ^P	EU498749.1	EU498851.1	EU498950.1	EU499069.1
3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	ICMP 50 ^T	EU498751.1	EU498853.1	EU498952.1	EU499071.1
4	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ICMP 63 ^T	EU498753.1	EU498855.1	EU498954.1	EU499073.1
5	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ICMP 109 ^T	EU498754.1	EU498856.1	EU498955.1	EU499074.1
6	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	ICMP 194 ^P	EU498757.1	EU498859.1	EU498962.1	EU499081.1
7	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i>	ICMP 333 ^P	EU498764.1	EU498866.1	EU498970.1	EU499089.1
8	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cajani</i>	ICMP 444 ^P	EU498767.1	EU498869.1	EU498973.1	EU499092.1
9	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>	ICMP 3031	EU498782.1	EU498884.1	EU498991.1	EU499110.1
10	<i>Xanthomonas oryzae</i>	ICMP 3125 ^T	EU498784.1	EU498886.1	EU498993.1	EU499112.1
11	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	ICMP 5732 ^P	EU498794.1	EU498896.1	EU499003.1	EU499122.1
12	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	ICMP 5741 ^P	EU498796.1	EU498898.1	EU499006.1	EU499125.1
13	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	ICMP 5757 ^P	EU498798.1	EU498900.1	EU499011.1	EU499130.1
14	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	ICMP 5834 ^P	EU498802.1	EU498904.1	EU499015.1	EU499134.1
15	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 6541	EU498805.1	EU498907.1	EU499018.1	EU499137.1
16	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	ICMP 8432	EU498811.1	EU498913.1	EU499027.1	EU499146.1
17	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	LMG 21894 ^P	KJ491213.1	HQ591016.1	CM002866.1	KJ491663.1

ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants

LMG: BCCM/LMG Bacteria Collection, Laboratory for Microbiology NCPPB- National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

^T Type strain of species

^P Pathotype strain