

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : วิจัยการกักกันพืช
กิจกรรม : การเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของ *Pantoea agglomerans* ในพื้นที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออก
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Surveillance and Epidemiology of *Pantoea agglomerans* in Corn seed production area for exportation
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ญัฐธิดา โมซิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน : ชลธิชา รักใคร่ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
รุ่งนภา ทองเครื่อง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* สาเหตุโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวของข้าวโพด (leaf blight and vascular wilt disease of maize) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง(pathway) ของเชื้อนี้อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ ติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดเชื้อนี้อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553- กันยายน 2556 จำนวน 155 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 15 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 20 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 15 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 13 แปลง น่าน จำนวน 15 แปลง หนองคาย จำนวน 17 แปลง นครราชสีมา จำนวน 20 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการใบไหม้ที่เกิดจาก จำนวน 235 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* ห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจตัวอย่างทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ไม่ใช่ แบคทีเรีย *P. agglomerans* แสดงให้เห็นว่า จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553- กันยายน 2556 จำนวน 155 แปลง ไม่พบโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในประเทศไทย

6. คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ในปี 2547 มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 871,791 ตันต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,651 ล้านบาท (ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเนื่องจากประเทศปลายทางตรวจพบ แบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ศัตรูกักกันพืชของประเทศปลายทาง แต่จากรายงานของ ญัฐิมา *et al.* (2553) ที่ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวโพดเพื่อส่งออก ยังไม่พบแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* และ จุฑาทเทพ (2550) ได้ศึกษาโรคเหี่ยวของข้าวโพดในประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยที่มีอาการใบขีดสีน้ำตาล ขอบหยักคล้ายอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เมื่อนำมาจำแนกตามวิธีการมาตรฐานของ EPPO โดย เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* สายพันธุ์ LMG2715 มาตรฐาน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* แต่เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* มากและสามารถทำให้ข้าวโพดเป็นโรคได้เช่นกัน จากรายงานทั้งสองแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยอาจมีแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* ระบาดในแหล่งปลูกข้าวโพด ได้มีรายงานของ Morales-Valenzuela *et.al.* (2007) รายงานการพบโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวในข้าวโพดและข้าวฟ่างที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* ครั้งแรกที่ประเทศเม็กซิโก จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *P. agglomerans* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* มาก และประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดข้าวโพดมีมูลค่านำเข้า เพื่อการบริโภคและเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออก ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ ทำให้อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย *P. agglomerans* เป็นแบคทีเรียที่ระบาดในแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศไทย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจในพื้นที่ข้าวโพดส่งออก เพื่อติดตามสถานการณ์ของแบคทีเรีย *P. agglomerans* ว่ามีในประเทศไทยหรือไม่ ซึ่งเป็นการศึกษาการเฝ้าระวังและการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด เพื่อเป็นข้อมูลในการเจรจาการค้าเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกและนำเข้าข้าวโพดในอนาคต

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

แบบการวิจัย การสำรวจโรคเหี่ยวของข้าวโพดดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลโรคเหี่ยวของข้าวโพดและเชื้อสาเหตุโรค *Pantoea agglomerans* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลลักษณะของแบคทีเรีย *P. agglomerans* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะอาการของโรคใบไหม้และโรคเหี่ยว(Leaf Blight and Vascular Wilt disease) ของข้าวโพด พร้อมรูปภาพ และจัดทำคู่มือการสำรวจโรคใบไหม้และโรคเหี่ยว ของข้าวโพด

2. **จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ** จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลที่ต้องการบันทึกได้แก่ แหล่งปลูก ตำบล อำเภอ จังหวัด ช่วงเวลาในการสำรวจ พิกัดของแหล่งปลูก(GPS) ลักษณะอาการ เป็นต้น

3. **การสำรวจ** กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของประเทศ จำนวน 12 แหล่งปลูก ใน 4 จังหวัด ได้แก่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละส่วนทำการสุ่มสำรวจ จำนวน 10 จุดขนาดพื้นที่จุดละ 2x2 เมตร สุ่มตรวจ จุดละ 20 ตัวอย่าง ตรวจแบบตัวอักษร W ซ้าย ทำการสุ่มตรวจทุกเดือน

4. **วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแปลงปลูก** จัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือและบันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างโรคที่พบใส่ถุงหรือภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างพร้อมเขียนรายละเอียดกำกับ รีบนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผล

5. **การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ** นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยตัดใบข้าวโพดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บด นำมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเฉพาะ Nigrosine medium หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีสีใสตรงกลางมีสีดำคล้ายตากบ ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

5.1 จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทาง สรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา ศึกษาลักษณะบนอาหารสังเคราะห์ ลักษณะและสีของโคโลนี ของแบคทีเรีย

5.2 จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ gelatin hydrolysis, indole production, acid production from raffinose, utilization of glycerol, D-glucose, mannitol, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, melibiose, D-fucose, และ D-arabitol และ จัดจำแนกโดยใช้ ชุดสำเร็จรูป API 50 CHE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

เก็บข้อมูลที่ได้ในรูปแบบ data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกข้าวโพด ในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ของประเทศไทย

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลลักษณะของแบคทีเรีย *P. agglomerans* รวบรวมข้อมูลรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* จาก CAB International, 2007 ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Pantoea*

Species: *Pantoea agglomerans*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ไม่สร้างสารเรืองแสงได้บนอาหาร King's medium B ไม่สามารถย่อย gelatin hydrolysis, ไม่สร้าง indole production ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล raffinose แต่สามารถใช้ carbon source จาก glycerol, D-glucose, mannitol, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, melibiose, D-fucose, and D-arabitol

เชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวของข้าวโพด (leaf blight and vascular wilt of maize) รายงานครั้งแรกที่ประเทศเม็กซิโก เมื่อปี 2007 (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007) ลักษณะอาการของโรคที่พบ ใบไหม้ และ เกิดอาการต้นเหี่ยวเนื่องจากท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลาย (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007)

2. ศึกษาและสำรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพดจากแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทยเพื่อการส่งออกปี 2554-2556

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553- กันยายน 2556 จำนวน 155 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 15 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 20 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 15 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 13 แปลง น่าน จำนวน 15 แปลง หนองคาย จำนวน 17 แปลง นครราชสีมา จำนวน 20 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และ ลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการใบไหม้ที่เกิดจาก จำนวน 235 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* ห้องปฏิบัติการ

2. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* บนอาหาร King's medium B หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคลนีสีเหลืองที่ไม่สร้างสารเรืองแสง (Fluorescent) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 10 ไอโซเลทนำไปจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ gelatin hydrolysis, indole production, acid production from raffinose, utilization of glycerol, D-glucose, mannitol, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, melibiose, D-fucose, และ D-arabitol และ จัดจำแนกโดยใช้ ชุดสำเร็จรูป API 50 CHE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่ สามารถสร้างกรดจาก raffinose และไม่สามารถใช้ carbon source ได้แก่ esculine และ cellobiose ซึ่งเป็นคุณสมบัติแตกต่างจากแบคทีเรีย *P. agglomerans* และเมื่อนำไปจำแนกด้วยชุดสำเร็จรูป API 50 CHE จำแนกได้เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas putida*

จากผลการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพดทั้ง 12 จังหวัด จำนวน 155 แปลง ไม่พบโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในประเทศไทย

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553- กันยายน 2556 จำนวน 155 แปลง เชียงราย จำนวน 15 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 20 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 15 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 13 แปลง น่าน จำนวน 15 แปลง หนองคาย จำนวน 17 แปลง นครราชสีมา จำนวน 20 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบโรคใบไหม้และโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในประเทศไทย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลของการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ทำให้ทราบสถานภาพของแบคทีเรีย *P. agglomerans* ในประเทศไทย สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอเปิดตลาดสินค้าเกษตรระหว่างประเทศ ซึ่งส่งผลทำให้สามารถขยายปริมาณและมูลค่าการส่งออกได้มากยิ่งขึ้น

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

จุฑาทาเทพ วัชรระไชยคุปต์. 2550. การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์

ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล พิระวรรณ พัฒนวิภาส ณัฐพร อุทัยมงคล และ ชลธิชา รักใคร่. 2553. การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* . รายงานผลการวิจัยประจำปี 2553 .

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช หน้า 1366-1375.

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

Morales-Valenzuela, G. , Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D., Valadez-Moctezuma,E., Alarcón-Zúñiga, B., X. Zelaya-Molina,L., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo,A., Farfán-Gómez, A. and Ávila-Quezada, G. 2007. First Report of *Pantoea agglomerans* Causing Leaf Blight and Vascular Wilt in Maize and Sorghum in Mexico. Plant Dis 91:1365.

13. ภาคผนวก

-