รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

กิจกรรมที่ 2 : ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย)

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโรคพืช

1. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biology of the Bacteria Causal Agent of Leaf Spot Disease on Mokara Orchid

2. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครง
กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส เชื้อไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่นไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เก็บข้อมูลการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในเศษซากพืชอาศัย พบว่าใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียหลังจากร่วงแล้วจนถึง 60 วัน เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyr*B, *rpo*B, *atp*D และ *inf*B ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย

สาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T}

Abstract

Biology of the bacteria causal agent of leaf spot on Mokara orchid was conducted during October 2016–September 2019. The results showed that the bacterial pathogen can grow at temperatures of 10-40°C. Bacteria does not grow on medium containing more than 5 ppm of streptomycin and more than 9,000 ppm of cupric sulfate. Pathogenicity test revealed that the bacteria was able to produce leaf spot symptom on Mokara (Bangkhuntien, Calypso, Jitti), Vanda (Vanda Famui) and Rhynchostylis (Changdaeng) but does not show typical leaf spot symptom on Dendrobium (Bom) and Cattleya orchid. Inoculation of onion bulb exhibited bulb scale turns brown while spraying the bacteria on corn leaves were not appeared disease symptom. For the survival on plant debris, bacteria were recovered from orchid leaf 60 days after fall down which suggests that orchid leaf residues could be a primary source of inoculum. The bacterial pathogen had been pre-identified using specific primer to *P. stewartii* subsp. *indologenes*, which showed the positive reactions. To confirm the identification, phylogenetic reconstruction had been conducted to identify the bacterial isolations collected from previous study. The result of ML analysis of concatenated dataset of four house-keeping genes, namely *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB*, confirmed that all bacterial isolations from leaf spot of Mokara orchid in Thailand were resembled of *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T}.

4. คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ใบร่วง กลีบดอกไหม้ และช่อดอกหักพับไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้ จากการศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเหลือง ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น Facultative anaerobe โคโลนีสีเหลืองที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์และคณะ, 2552; Chuenchitt *et al*., 1983) ดังนั้น เพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคนี้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยาอื่นๆ มากขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุล ม็อคคาร่า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

5. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

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

- วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ดังนี้

2.1 กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์ต่างๆ เช่น บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ

2.2 กล้วยไม้สกุลอื่น เช่น แวนด้า หวาย ช้าง แคทลียา

2.3 พืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Pantoea* เช่น ข้าวโพด หอม

โดยใช้เข็มทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร หรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch’s postulation)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารทุกวันจนถึง 28 วัน

4. การเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร mannitol-glutamate (MG) ที่มี 0.025% yeast extract (MGY) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MGY ที่มี cupric sulfate (MGYCu) ความเข้มข้น 375, 500, 750, และ 1,000 μg/ml และอาหาร streptomycin (MGYSm) 50, 75, 100 และ 500 μg/ml เปรียบเทียบกับเลี้ยงบนอาหาร MGY บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร

5. การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียบนพืชอาศัย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ใช้เข็มทำแผลบนพืชแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตรหรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูก ทุก 1 เดือน โดยมีวิธีการดังนี้

การแยกเชื้อจากผิวพืชอาศัย แช่ใบพืชอาศัยในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

การแยกเชื้อจากพืชอาศัยหรือเศษซากพืชอาศัย ตัดใบพืชอาศัยเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง บดใบพืชในน้ำกลั่น และเลี้ยงบนอาหาร PSA และอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

6. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* ตามรายงานของ Gehring *et al.* (2014) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. ananatis* ตามรายงานของ Kido *et al.* (2008) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรีย 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 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

ทำการเพิ่มปริมาณ housekeeping gene เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taipei, Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, 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 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

ส่งผลผลิต PCR วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Korea ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit (Hall, 1999) จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al*., 2018) แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย type strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v 8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA และกำหนดค่า maximum likelihood bootstrap 1,000 ซ้ำ

- เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 10 ไอโซเลท

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

ทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบโดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวายและแคทลียา (Figure 1) การทดสอบในพืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุสกุล *Pantoea* พบว่าหอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอาการคล้ายคลึงกับรายงานของ Carr *et al*. (2013) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. ananatis* และรายงานของ Stumpf *et al*. (2018) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบแรนดัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อสาเหตุ พบว่าข้าวโพดแสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับรายงานของ Krawczyk *et al.* (2010) ซึ่งรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาวเกิดจากเชื้อ *P. ananatis*

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4. การเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดง

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดงของเชื้อสาเหตุ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 5 ppm และทองแดงความเข้มข้น 9,000 ppm

5. การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียบนพืชอาศัย

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า จำนวน 10 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วพ่นเชื้อลงบนใบกล้วยไม้คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูกทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกเดือนที่ตรวจถึงแม้แผลบนใบจะ

แห้งแล้วก็ตาม โดยใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 60 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Sauer *et al*. (2015) ที่ทำการศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอดบนเศษซากพืชอาศัยของเชื้อ *Pantoea ananatis* สาเหตุโรคจุดสีขาวของข้าวโพด โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบนเศษซากของข้าวโพดหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว 60 วัน และยังตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้บนใบข้าวโพดที่ยังไม่แสดงอาการของโรคและบนพืช *Digitaria horizontalis* ซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ แสดงให้เห็นแหล่งที่เชื้อแบคทีเรียอาศัยและมีชีวิตรอดโดยอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte สำหรับการแยกเชื้อจากวัสดุปลูกหรือดินปลูกไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าไม่ได้ใช้วัสดุปลูกและไม่มีพืชอาศัยอื่นที่ใช้วัสดุปลูกหรือดินในการเพาะปลูก

จากข้อมูลเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่อาศัยบนเศษซากพืชได้นาน 60 วัน จึงสามารถเป็นแหล่งในการแพร่กระจายเชื้อไปยังแหล่งอื่นได้ ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปทิ้ง

6. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* และ *P. ananatis* พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกสอดคล้องกับรายงานของ Gehring *et al.* (2014) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 267 bp (*galE*) และ 422 bp (*recA*) ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และให้ผลการตรวจสอบเป็นลบโดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 343 bp ของเชื้อ *P. ananatis* เมื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียตามรายงานของ Kido *et al.* (2008) (Figure 2)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้ พบว่ายีน *gyrB*, *rpoB*, *infB* มีขนาดประมาณ 1,000 bp และยีน *atp*D มีขนาดประมาณ 800 bp จัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เพื่อวิเคราะห์แบบ multilocus sequence analysis เปรียบเทียบกับ *Pantoea* spp. ที่เป็น type strain และมีข้อมูลของทั้ง 4 ยีนในฐานข้อมูล Genbank สร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้เพื่อจัดจำแนกเชื้อ โดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมีเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. เป็น outgroup พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจัดกลุ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T} แยกกลุ่มออกจากเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* LMG 1268^{T}, *P. ananatis* LMG 2665^{T} และ *P. allii* LMG 24248^{T} โดยแยกกลุ่มชัดเจนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. cypripedii* LMG 2657^{T} ซึ่งแยกได้จากกล้วยไม้ cypripedium (cypripedium orchids) ของสหรัฐอเมริกา (Figure 3)

เชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อชนิดใหม่ตั้งชื่อตามคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถสร้าง indole ได้ พบเข้าทำลายเฉพาะข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet: *Setaria italica*) และ pearl

millet (*Pennisetum americanum*) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Grimont and Grimont, 2009) แต่จากการศึกษาของ Stumpf *et al*. (2018) พบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ทำให้เกิดอาการเน่ากลางหัวของหอมหัวใหญ่ (center rot of onion) ได้ นับเป็นเชื้อสาเหตุชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรคในหอมหัวใหญ่นอกจากเชื้อ *P. ananatis*, *P. agglomerans* และ *P. allii* ที่พบรายงานแล้ว สนับสนุนผลการศึกษานี้ที่เริ่มพบการแพร่ระบาดของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ในพืชชนิดใหม่นอกเหนือจากพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าและยังไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อชนิดนี้ในกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน โดยมีข้อสันนิษฐานการระบาดของโรคในครั้งนี้เกิดจากการปรับตัวของเชื้อที่เดิมอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte ทำให้เกิดโรคได้แต่ไม่รุนแรงเพราะจากการสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ พบว่าเกษตรกรเคยเห็นลักษณะอาการของโรคมาก่อนแต่ไม่รุนแรง และข้อสันนิษฐานอีกประการหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ทำให้อ่อนแอต่อเชื้อเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเป็นกล้วยไม้ลูกผสม 3 สกุล (Arachnis x Ascocentrum x Vanda) และจากการสำรวจเบื้องต้นพบการระบาดของโรคในกล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลเข็ม (Ascocentrum) แล้ว แต่ไม่รุนแรงเหมือนม็อคคาร่าแต่ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้วยไม้สกุลแวนด้าส่วนใหญ่ส่งออกต่างประเทศจึงมีการดูแลแปลงอย่างดี เมื่อมีอาการของโรค กล้วยไม้จะถูกแยกออกจากแปลงจึงพบการระบาดของโรคค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ต้องเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อในกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อการปลูกและการส่งออกกล้วยไม้ไปต่างประเทศ โดยมีข้อสังเกตจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (monopodium) ได้แก่ ม็อคคาร่า แวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวายและแคทลียา ทั้งนี้ยังเหลือกล้วยไม้อีกหลายสกุลที่ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสังเกตดังกล่าวโดยกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (Ascocentrum) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะแรคนิส (Arachnis) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รองเท้านารี ออนซิเดียม

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าโดย ทิพวรรณ และคณะ (2562) เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีสีเหลือง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) และเชื้อสามารถสร้าง indole (indole production) ได้ โดยคุณสมบัติดังกล่าวคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* spp. จากข้อมูลการจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA ร่วมกับรายงานพืชอาศัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้พิจารณาในการจำแนกเชื้อ *Pantoea* spp. ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *P. stewartii* subsp*. stewartii, P. stewartii* subsp*. indologenes, P. agglomerans, P. ananatis, P. allii* และ *P. cypripedii* (*Erwinia cypripedii*) คือความสามารถในการสร้าง indole (indole production) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เชื้อ *P. stewartii* subsp*. indologenes* เชื้อ *P. ananatis* และเชื้อ *P. allii* มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเชื้อ *P. stewartii* subsp*. indologenes* พบเข้าทำลายเฉพาะ foxtail millet (*Setaria italica*) และ pearl millet (*Pennisetum americanum*) (Grimont and Grimont, 2009) ส่วนเชื้อ *P. ananatis* มีรายงานทำให้เกิดโรคในพืชอาศัยหลาย

ชนิด 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) ข้าวฟ่าง (Cota *et al*., 2010) และข้าว (Mondal *et al*., 2011) เป็นต้น และเชื้อ *P. allii* มีรายงานทำให้เกิดโรคในหอมหัวใหญ่ (Brady *et al*., 2011) จากรายงานพืชอาศัยของเชื้อ *P. ananatis* ที่ค่อนข้างกว้างสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายวงศ์รวมทั้งรายงานของณัฏฐิมาและวนิดา (2539) ซึ่งพบเชื้อ *P. ananatis* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรดในประเทศไทย จึงทำให้สรุปในเบื้องต้นว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. ananatis* แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อเพิ่มเติม พบว่าให้ผลตรวจสอบเป็นบวกเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และให้ผลตรวจสอบเป็นลบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. ananatis* จากนั้นยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้ multilocus sequence analysis (MLSA) ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันสูงได้ดีเหมือนวิธี DNA-DNA hybridization กับเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) เพื่อดูความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Stackbrandt and Goebel, 1994) แต่การศึกษาส่วนใหญ่มีข้อจำกัดเรื่องการขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษา ปัจจุบันจึงมีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค MLSA วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์กลุ่มของ housekeeping gene ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียจำนวน 4-7 ยีน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่รวบรวมไว้ใน Genbank โดยข้อมูลการจำแนกชนิดสอดคล้องกับการศึกษา DNA–DNA hybridization ทำให้นิยมใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสะดวกและสามารถลดข้อจำกัดเรื่องไม่มี type strain ในการศึกษาได้ โดยมีรายงานการใช้เทคนิคนี้สำหรับจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *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* 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 โดยต้องพิจารณาคัดเลือกยีนพื้นฐานที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและแบคทีเรียจำเป็นต้องรักษาคุณสมบัตินั้นไว้ให้คงที่โดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อยีนนั้นน้อยที่สุด

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่น ไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นแล้วจนถึง 60 วัน ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปทิ้ง เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (monopodium) ได้แก่ ม็อคคาร่า แวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวายและแคทลียา ยังเหลือกล้วยไม้อีกหลายสกุลที่ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าว โดยกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (Ascocentrum) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะแรคนิส (Arachnis) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รองเท้านารี ออนซิเดียม ตรวจสอบเชื้อเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyr*B, *rpo*B, *atp*D และ *inf*B ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T} และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัย และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

10. เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และวนิดา ฐิตะฐาน. 2539. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรด. หน้า 60-70. ใน: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2539. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเครั่ง. 2562. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า.หน้า 60-73. *ใน*: เอกสารประกอบการประชุม

วิชาการประจำปี 2562 อารักขาพืชสร้างสรรค์ ก้าวทันยุทธศาสตร์ชาติ ภาคแผ่นภาพ. วันที่ 10-12 มิถุนายน 2562 ณ โรงแรมรอยัล ฮิลล์ กอล์ฟ รีสอร์ท แอนด์ สปา, นครนายก.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. *ใน*: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

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.

Carr, E.A., A.M. Zaid, J.M. Bonasera, J.W. Lorbeer, and S.V. Beer. 2013. Infection of onion leaves by *Pantoea ananatis* leads to bulb infection. *Plant Dis*. 97: 1524-1528.

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.

Gehring, I., Wensing, A., Gernold, M., Wiedemann, W., Coplin, D. L., and Geider, K. 2014. Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. *J. Appl. Microbiol*. 116:1553-1562.

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.

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.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*. 41:95-98.

Hori, S. 1911. A bacterial leaf-disease of tropical orchids. Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II. 31: 85-92.

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.

Krawczyk , K., J. Kamasa, A. Zwolinska and H. Pospieszny. 2010. First report of *Pantoea anantis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J. Plant Pathol*. 92: 807-811.

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.

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.

Sauer, A.V. , K.R. Rocha, R.M. Gonçalves, W.F Meirelles, J.E.F. Figueiredo, I.E. Marriel and L.D. Paccola-Meirelles. 2015. Survival of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease in crop debris. *Agronomy Science and Biotechnology*. 1: 21-24.

Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies". *Bioinformatics.* 30: 1312–1313.

Stumpf, S., B. Kvitko, R. Gitaitis and B. Dutta. 2018. Isolation and characterization of novel *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strains exhibiting center rot in onion. *Plant dis*. 102: 727-733.

Wallis, F.M., J.J. Joubert and I.F. Schlosser. 1975. Bacterial brown rot of Cypridium orchids in Natal. *Phytophylactica*. 7: 125-13.

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.

13. ภาคผนวก

-

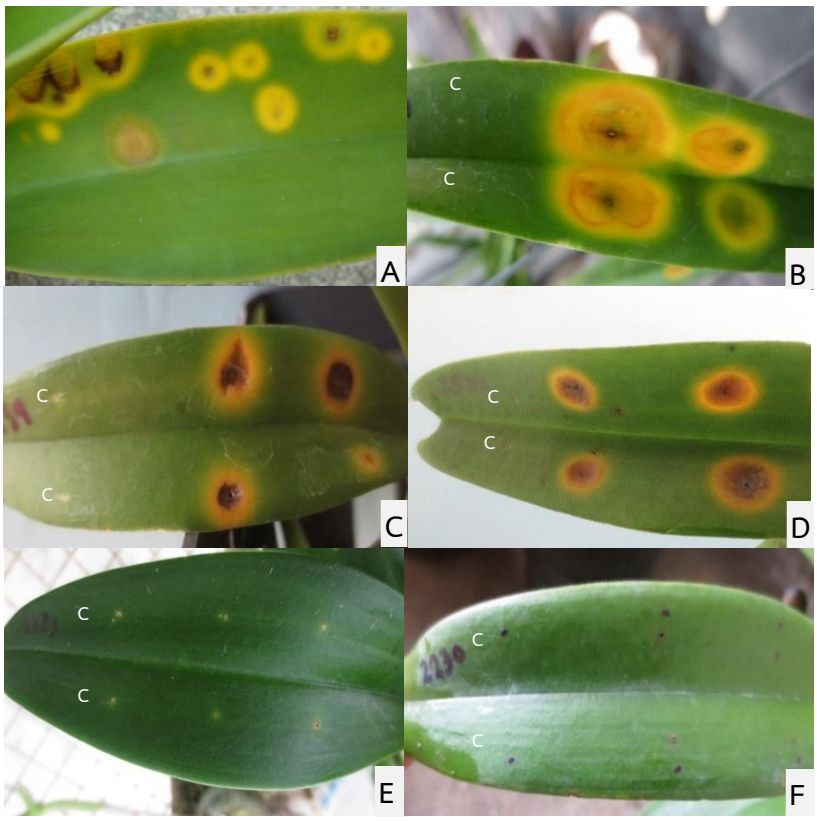

Figure 1 Leaf spot disease of Mokara orchid and pathogenicity test

A. Disease symptom

B. Pathogenicity test on Mokara orchid leaf

C. Pathogenicity test on Vanda orchid leaf

D. Pathogenicity test on Rhynchostylis orchid leaf

E. Pathogenicity test on Dendrobium orchid leaf

F. Pathogenicity test on Cattleya orchid leaf

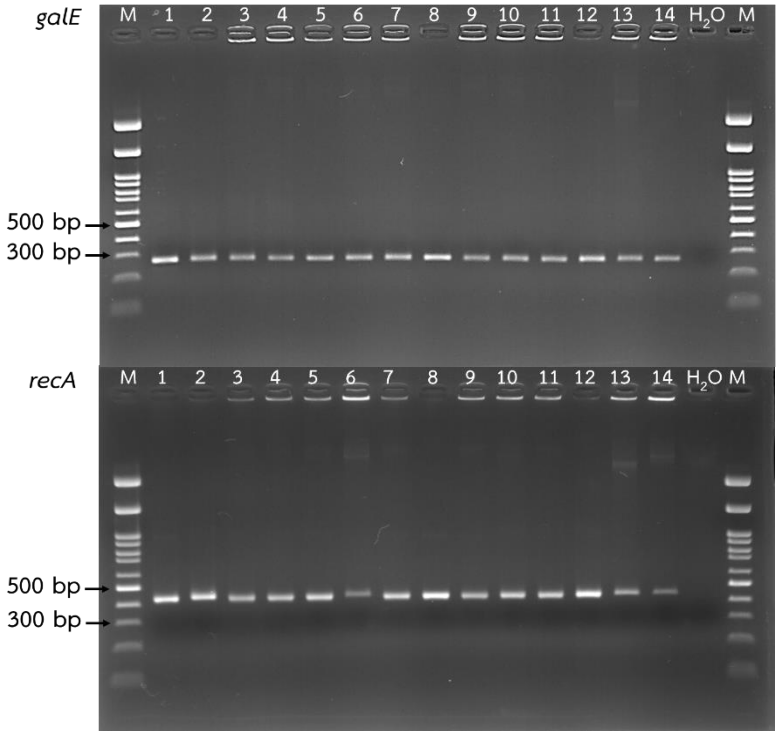

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for detection *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* using *galE* and *recA* primers, M: onemark 100, lane 1–14: bacterial isolated from leaf spot disease of mokara orchid

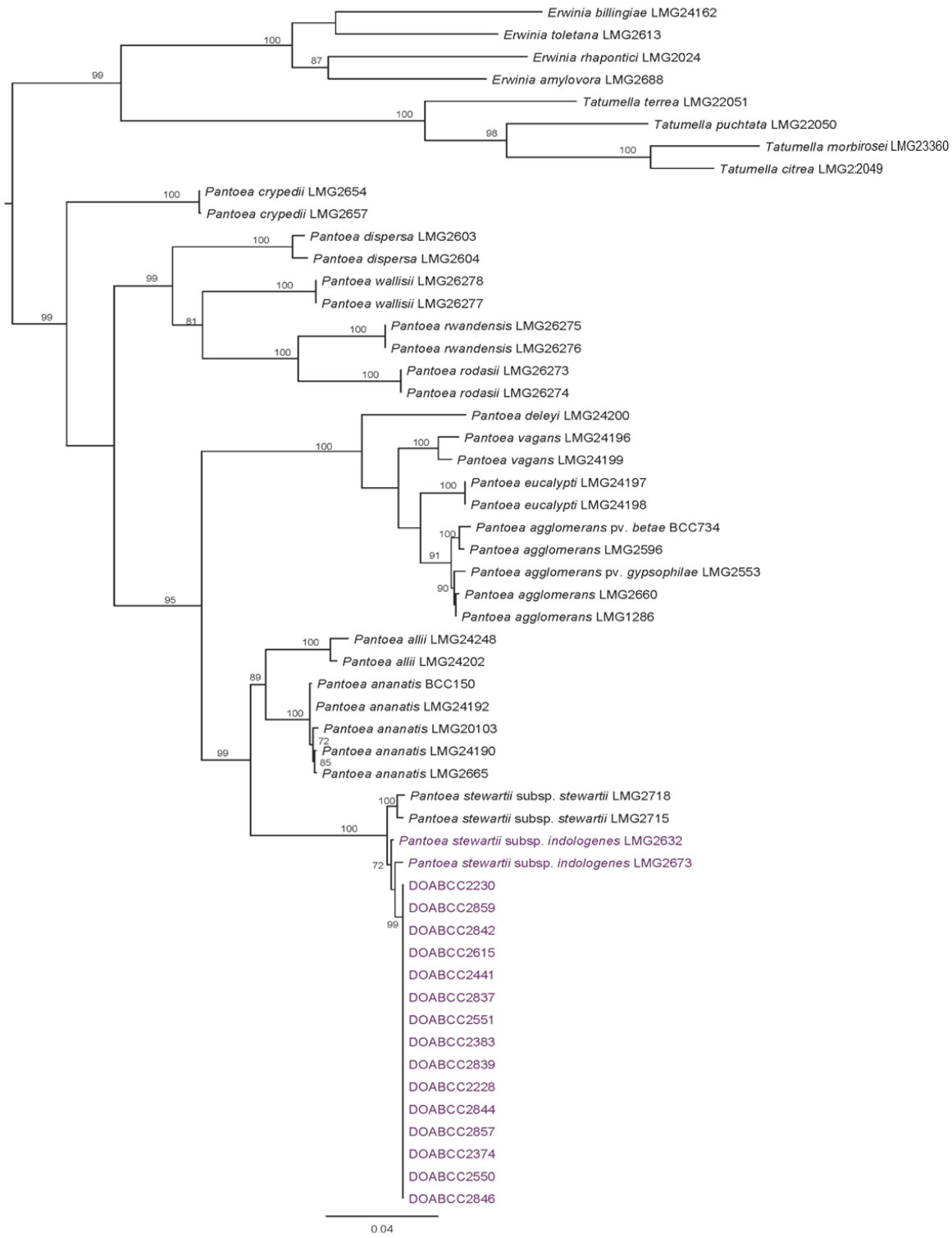

Figure 3 Maximum-likelihood tree based on on the concatenated *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB* nucleotide sequences showing the relationships of Mokara orchid isolates and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes.