

การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม
 Identification of the Bacteria Causes Leaf Blight Disease on Onion

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณิชฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัววงศ์แพทย์
 รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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*.

Keyword : onion, leaf blight, identification

บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและพื้นที่ฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บเชื้อของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิด ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครามีลักษณะโคโลนีกลม 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 และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสงบนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Xanthomonas* spp. การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จากยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *Allii*

คำหลัก : หอม โรคใบแห้ง จำแนกชนิด

คำนำ

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง
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. สํารวจและเก็บตัวอย่างโรค

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

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกุยช่าย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ฟันเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ที่มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคูณสมบัติทางสัณฐานวิทยา 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/μl, One PCR Master Mix (GeneDirex[®] Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 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 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ 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 ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ความเข้มข้น 100 ng/μl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (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 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) และส่งผลผลิต PCR ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบผลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ส่งวิเคราะห์กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟันฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟันฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟันฟูเชื้อแบคทีเรีย *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 อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการใบจืดรูปรางคล้ายเลนส์ตรงกลางแผลบางสีขาวซีด ขอบแผลฉ่ำน้ำ และใบแห้งของหอม พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง คล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท จากตัวอย่างหอมแบ่งที่เก็บจากอำเภอพบพระ จังหวัดตาก (Figure 1) ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาในน้ำกลั่นหนึ่ง

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 และกุยช่าย 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 โดยพืชทดสอบเริ่มแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำหัวท้ายแหลมคล้ายวงรีหรือรูปเลนส์หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 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. porum* 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) การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนิกรวม 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 และแบ่งได้ สามารถสร้าง H_2S 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 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 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. fusca* 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 ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรครีบแห้งในพืชผักและหอม โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) ด้วยวิธี Maximum Likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมในไทย จัดกลุ่มรวมกับเชื้อ *X. euvesicatoria* และ *X. perforans* สาเหตุโรครีบแห้งในพริกและมะเขือเทศ เชื้อ *X. fusca* สาเหตุโรครีบแห้งในถั่ว และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii* สาเหตุโรครีบแห้งของหอมแยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* สาเหตุโรครีบเน่าดำ (black rot) ของพืชผักตระกูลกะหล่ำ และแบคทีเรีย *Pantoea allii* สาเหตุ center rot ของหอมหัวใหญ่ (Figure 2)

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

6. การวิเคราะห์ multilocus sequence analysis (MLSA)

นำดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 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 สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งของหอมใกล้เคียงกับของเชื้อ *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 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรครีบแห้งในกลุ่มพืชผักเช่นเดียวกัน

โรครีบแห้งของหอม (Bacterial leaf blight) มีรายงานการพบโรคครั้งแรกที่ฮาวายในปี 1975 และจำแนกเชื้อสาเหตุครั้งแรกเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. อาการของโรคเริ่มแรกใบเป็นจุดฉ่ำน้ำแล้วขยายเป็นรูปร่างรีแหลมหัวท้าย และขยายใหญ่ไปตามความยาวใบ จากนั้นแผลเริ่มแห้งแตกตรงกลางแผลและใบหักพับลง หากอาการรุนแรงใบจะแห้งตายมีผลทำให้หัวมีขนาดเล็กหรือฝ่อ (Alvarez *et al.*, 1978) ต่อมา Paulraj and O'Garro (1993) ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรครีบแห้งของหอมที่ระบาดในแหล่ง

ปลุกหอมที่สำคัญใน Barbados โดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ และทำ fatty acid analysis พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* และ Kadota *et al.* (2000) ทำการศึกษา pathovar ของเชื้อ *X. campestris* สาเหตุโรครไหม้ของ 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) ใช้เพียงคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย ต่อมา Roumagnac *et al.* (2004) ได้ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA, วิธี DNA-DNA hybridization, ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source utilization), การวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของเซลล์แบคทีเรียและเทคนิค fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLPs) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *X. axonopodis* pv. *allii*

สำหรับประเทศไทยพบโรคใบแห้งของหอมระบาดในปี 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่ ตำบลทุ่งทอง อำเภอนาทม จังหวัดกาญจนบุรี (นิตยา และคณะ, 2530) ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (นิตยา และคณะ, 2532) การศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยวนิดา และคณะ (2529) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็น *Xanthomonas* sp. และยังไม่พบรายงานการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของหอมในประเทศไทยในระดับสปีชีส์ แต่เนื่องจากการขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DNA-DNA hybridization เพื่อดูความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียทำให้นักวิจัยพยายามหาวิธีการเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว เทคนิค multilocus sequence analysis (MLSA) เป็นการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เป็น housekeeping gene ซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียจำนวน 4-7 ยีน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank มีความนิยมใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้สอดคล้องกับการศึกษา DNA-DNA hybridization โดย Young *et al.* (2008) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 119 สายพันธุ์โดยใช้ 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) ใช้การวิเคราะห์กลุ่มยีน *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* และเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งแยกได้จากยุคาลิปตัส 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

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและพื้นที่เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิดพบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมียลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมหัวใหญ่ และหอมแบ่งได้ 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 และแบ่งได้ 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 สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *Allii*

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา ก้นหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณะ วรณภีร์. 2530. การป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่. หน้า 69-76. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- นิตยา ก้นหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณะ วรณภีร์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่. หน้า 106-114. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- นิตยา ก้นหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยาปี 2545. 33 หน้า.
- วนิดา ฐิติฐาน นิตยา ก้นหลง สมใจ วิวิธจินดา และสุนตรา ภาวิจิตร. 2529. ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ของหอมแดง. หน้า 47-54. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- 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, Minnessota, 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

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

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

+ means positive; - means negative

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

Character	DOABCC								Xca
	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), Xca: *X. campestris* 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



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

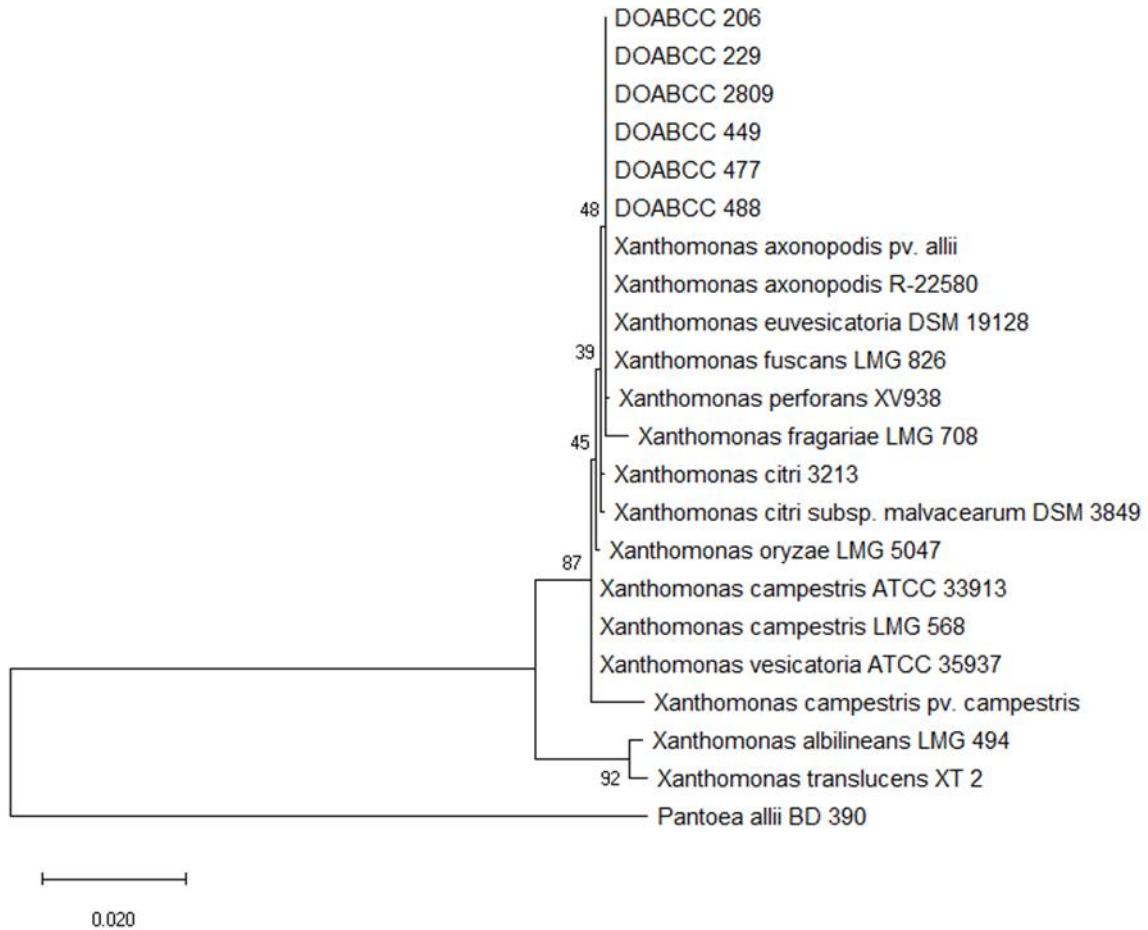


Figure 2 Maximum-likelihood tree based on partial 16S rDNA gene sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

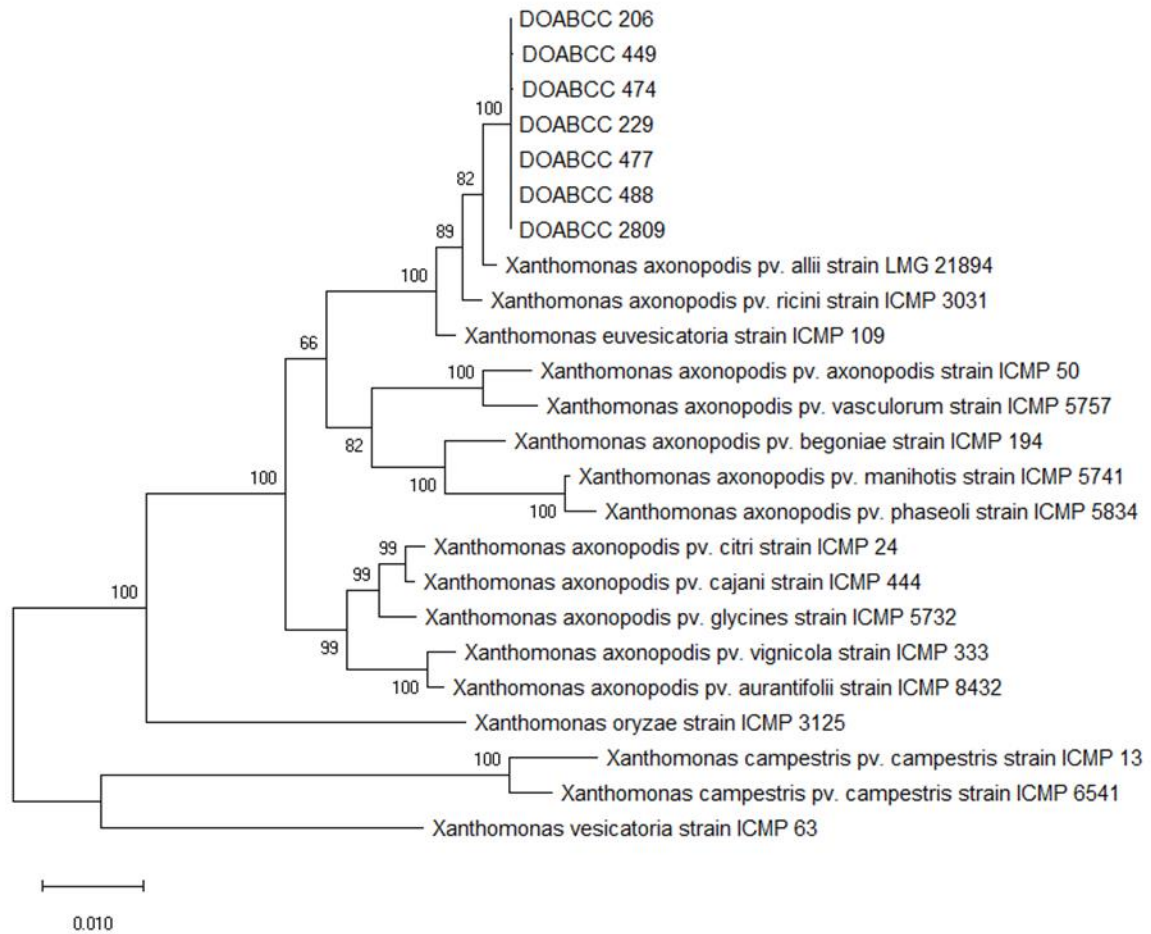


Figure 3 Maximum-likelihood tree based on the concatenated *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* nucleotide sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on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