การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม กระเทียม เพื่อการส่งออก

Surveillance and Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in onion and garlic plantation for exportation

ทิพวรรณ กันหาญาติ ดารุณี ปุญญพิทิทักษ์
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รุ่งนภา ทองเครื่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ดำเนินการโดยตรวจเอกสารข้อมูลของแบคทีเรีย และลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ที่พบในหอมและกระเทียม หาแหล่งปลูกหอมและกระเทียมพร้อมทั้งวางแผนการสำรวจโรค ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างหอมแดงและกระเทียม จากจังหวัดศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่ จำนวน 38 ตัวอย่าง นำมาตรวจในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ผลการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร King medium B สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงได้ จำนวน 12 ไอโซเลท การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้สาร Arginine ได้ นำตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*

รหัสโครงการ 03-04-54-03-06-00-08-54

คำนำ

ในปี 2552 ประเทศอินโดนีเซียได้ออกกฎระเบียบ The Regulation of the Minister ofAgriculture No. 18/permentan/OT. 140/2/2008 (Plant Quarantine Requirements andMeasures Toward the Importation of Fresh Plant Products in the Form of Fresh Bulb Vegetables into the Territory of Republic of Indonesia เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2551 มีผล บังคับใช้ตั้งแต่เดือนเมษายน 2551 โดยมีข้อกำหนดในการนำเข้าสินค้าพืชสดประเภทพืชหัวกลุ่ม bulb ต้องผ่านการตรวจรับรองและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช ประเทศไทยส่งออกหัวหอมไปยังประเทศอินโดนีเซีย มูลค่าประมาณ 300 ล้านบาท เมื่อกฎระเบียบมีผลบังคับใช้ทำให้เกิดปัญหากับการส่งออกหัวหอม เนื่องจากประเทศไทยมีเชื้อศัตรูพืชที่เป็นศัตรูกักกันพืชของอินโดนีเซีย ได้แก่ ราเขม่าดำสาเหตุเกิดจาก *Urocystis cepulae* และแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ทำให้การส่งออกหอมแดงและกระเทียมไปประเทศอินโดนีเซียต้องมีใบรับรองปลอดจากโรคทั้งสองชนิดกำกับไปด้วย จากการสืบค้นข้อมูลบัญชีรายชื่อโรคพืชที่พบในประเทศไทย ไม่พบรายงานการพบแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียมในประเทศไทย แต่มีรายงานของ พัฒนาและคณะ (2537) พบแบคทีเรีย *P. syringae* ในพริกไทย เมื่อสืบค้นข้อมูลต่างประเทศ พบว่า CABI (2007) ได้รายงานว่าในประเทศไทยพบแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพืชหลายชนิดได้แก่ มะเขือเทศ พริก พริกไทย ส้มโอ หอม กระเทียม เป็นต้น จากข้อมูลที่สืบค้นดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกัน ทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ในปัจจุบันของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียม ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียมส่งออก ติดตามสถานการณ์ของโรคนี้ว่ามีในประเทศไทยหรือไม่ ซึ่งเป็นการศึกษาการเฝ้าระวังและการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกพืชทั้งสองชนิด เพื่อที่จะรายงานและตีพิมพ์ผลงานเพื่อเป็นการปลดโรคชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกหอมและกระเทียมในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

แบบการวิจัย การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียมดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพโรคของพืชหัว (bulb) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อ ที่อยู่ ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น

3. การสำรวจ โดยกำหนดพื้นที่แหล่งปลูกหอมและกระเทียมในเขตภาคเหนือ (เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศรีสะเกษ ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และสุรินทร์) และภาคกลาง (อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์) วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว ทำการสุ่มตรวจทุกเดือนในระหว่างฤดูปลูก

4. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

5.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บเชื้อบริสุทธิ์ นำตัวอย่างที่มีลักษณะนิ่มคล้ายจะเน่ามาแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* โดยตัดส่วนของพืชระหว่างรอยต่อของบริเวณที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 4 ตร.มม. แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และ streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร King medium B หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างสารเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 366 nm คัดเฉพาะโคโลนีที่สร้าง fluorescent pigment และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลายๆ ครั้ง เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Arginine dihydrolase test

5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาเลี้ยงในอาหาร Thornley's medium แล้วปิดทับด้วย paraffin oil

ถ้าเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ โดยอาหารจะไม่เปลี่ยนสีจากชมพูเป็นสีแดง

5.3 ยืนยันผลด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ specific primer B1 (5'-CTT TCC GTG GTC TTG ATG AGG-3') และ B2 (5'-TCG ATT TTG CCG TGA TGA GTC-3') (Sorensen *et al*., 1998) หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp

6. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกหอมแดงและกระเทียมของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P.syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ดำเนินการโดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อแบคทีเรีย และลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ที่พบในหอมและกระเทียม หาแหล่งปลูกหอมและกระเทียมพร้อมทั้งวางแผนการสำรวจโรค จากจังหวัดศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่ จำนวน 38 ตัวอย่าง นำมาตรวจในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ผลการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร King medium B สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงได้ จำนวน 12 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test พบว่าเชื้อสามารถใช้สาร Arginine ได้ ยืนยันผลการตรวจโดยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P.syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด จากจังหวัดศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน และเชียงใหม่ จำนวน 38 ตัวอย่าง ยังไม่พบแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

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

Sorensen K.N., K.H. Kim and J.K. Takemoto. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol*. 64: 663-666.