การเฝ้าระวังการเกิดและแพร่กระจายของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง

Surviellance for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, the curcubitaceae fruit blotch agent

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจติดตามการเกิดโรคผลเน่า จากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในแปลงผลิตเมลอน (แคนตาลูป) ระหว่างปี 2551-2553 สุ่มสำรวจการเกิดโรค 4 ระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะกล้า ระยะติดดอก ระยะติดผล และระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต ปี 2551 พบการเกิดโรค ในพื้นที่ปลูกเมลอน อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว อาการใบเลี้ยงไหม้ช้ำ ในระยะกล้าแต่พบน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะผลอ่อนพบแผลจุดช้ำขนาดเล็ก 0.1-0.3 มม. ประมาณ 20-80 เปอร์เซ็นต์ แผลจุดกระจาย 1-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผลซึ่งอาจพัฒนาเป็นแผลจุดช้ำขนาดใหญ่และเข้าทำลายลึกถึงเนื้อในผลเกิดโรคผลเน่า หรือไม่เกิดโรค ในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตพบการเกิดโรค 10-15 % ผลผลิตส่วนใหญ่มีอาการแผลจุดแต่ไม่แสดงอาการผลเน่ามากถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาการที่ใบพบแผลจุดขอบแผลช้ำ ที่ก้านใบและลำต้นพบอาการเน่าช้ำ เมื่อเก็บตัวอย่างมาตรวจในห้องปฏิบัติการไม่พบเชื้อสาเหตุโรค สำรวจโรคปี 2552 ในแหล่งปลูก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ในฤดูฝนพบอาการใบไหม้ในระยะกล้าต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และพบผลเน่าในระยะเก็บเกี่ยว ประมาณ 10% พื้นที่ปลูกภาคกลาง อ.บางไทร จ.อยุธยา พบอาการใบเลี้ยงเน่าช้ำ ในกะบะเพาะเมล็ด ระยะติดดอก และระยะติดผลอ่อน พบอาการใบเหลืองแห้ง ทั้งสองอาการพบการเกิดโรคต่ำกว่า 1 % ระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต พบอาการใบจุดและผลจุดช้ำ ประมาณ 10-20% ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรค พื้นที่ จ.สิงห์บุรี แปลงเมลอนพันธุ์ฮันนี่บอล พบอาการผลเน่าและใบแห้ง ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย แปลงปลูกในพื้นที่ อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี ทั้งระยะกล้า ระยะเจริญ ติดดอก และระยะเก็บเกี่ยว ไม่พบอาการโรค พบปัญหาแมลงเข้าทำลาย จากการสำรวจพบการเกิดโรคอื่น ๆ ได้แก่ ราน้ำค้าง ราแป้ง โรคต้นแตงยางไหล ใบด่าง และต้นเหี่ยว ปี 2553 ติดตามการเกิดโรคในพื้นที่ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว พบการเกิดโรคในระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูฝน ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าเมลอนและแคนตาลูป ทดสอบการเกิดโรค และจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี การใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Biolog test) และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคเมลอนเป็น *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-05-51

คำนำ

โรคผลเน่า (Fruit blotch) รายงานเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad et al.,1978) ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น *Acidovorax avanae* subsp.*citrulli* โรคผลเน่าเป็นโรคที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง โดยเฉพาะแตงโม แคนตาลูป เมลอน และสควอช มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาพบระบาดในหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ จีน อิสราเอล ญี่ปุ่น ตุรกี บราซิล และออสเตรเลีย (CAB International, 2005) Latin and Rane (1990) รายงานพบการระบาดในรัฐอินเดียน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลผลิตแตงโมที่เจริญเติบโตเต็มที่เน่าเสียหายมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก ต่อมาพบระบาดในอีกหลายรัฐของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ฟลอริดา (Somodi et al.,1991), โอคลาโฮมา (Jacob et al., 1992) เซาท์คาโรไรน่า , นอร์ธคาโรไรน่า, เมรี่แลนด์ (Hopkins et al., 1992)

ในประเทศไทย รายงานการพบโรคผลเน่าแตงโม ในแหล่งปลูก จ.สกลนคร และ จ.นครราชสีมา ในปี 2536 (ณัฏฐิมา, 2537) ปี พ.ศ. 2538-2540 ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสารเรืองแสง (non-fluorescent) สร้างเอนไซม์ oxidase รูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod-shape) ลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ สีขาวครีม เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปปลูกเชื้อลงบนใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมทำให้ต้นกล้าแสดงอาการ โดยทำให้ใบเลี้ยงหลุดร่วงภายใน 7 วัน และเมื่อปลูกเชื้อลงบนผลแตงโมสามารถทำให้ผลแตงโมเน่าเสียภายใน 14 วัน (ณัฏฐิมา, 2540) การแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรค สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ติดไปกับน้ำ แมลง และอุปกรณ์การเกษตรแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* จัดเป็นเชื้อต้องห้ามที่สำคัญทางการกักกันพืช (Wall et al.,1990) ในการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออก ต้องตรวจรับรองไม่ให้มีการปนเปื้อนแบคทีเรียสาเหตุโรคดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจโรคเพื่อการเฝ้าระวัง

รวบรวมข้อมูลการเกิดโรคของพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงโม แตงแคนตาลูป เมลอน วางแผนการสำรวจโรค โดยสุ่มสำรวจแต่ละพื้นที่เพื่อประเมินและติดตามการเกิดโรคผลเน่าแตง ในแหล่งปลูกที่สำคัญ และแหล่งปลูกที่เคยมีรายงานการเกิดโรคระบาด โดยกำหนดการสำรวจติดตามโรคในระยะการเจริญต่าง ๆ แตงเมลอน (แคนตาลูป) เป็นพืชที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 60-70 วัน แบ่งช่วงการสำรวจ ดังนี้

-ระยะกล้า อายุ10-20 วัน มีใบเลี้ยง 2 คู่ หรือต้นกล้าหลังการย้ายกล้ามีใบจริง 1-2 ใบ

-ระยะการเจริญและออกดอก อายุ 21-35 วัน เป็นระยะที่ต้นเจริญ ออกดอกและติดผลอ่อน

-ระยะติดผล อายุ 36-50 วัน เป็นระยะติดผลขนาดเล็ก ถึงขนาดใหญ่

-ระยะผลแก่และเก็บเกี่ยว อายุ 51-70 วัน เป็นระยะที่ผลใหญ่และมีการเก็บเกี่ยว

<u>การเก็บและบันทึกข้อมูล</u>

- บันทึกแหล่งที่สำรวจ พืช พื้นที่ปลูก พันธุ์ ระยะการเจริญของพืช สภาพแวดล้อมอื่นๆ

- บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการ ประเมินความรุนแรงของโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

- บันทึกการเกิดโรคบนพืชอาศัยอื่นๆ ลักษณะอาการหรือบนวัชพืชบริเวณแปลงปลูก

สุ่มตรวจดูอาการผิดปกติทั้งต้น ประเมินความรุนแรง จำนวน 25 ต้นต่อแปลง สุ่ม 1 แถว เว้น 2 แถว และประเมินการเกิดโรคในภาพรวมทั้งแปลง บันทึกอาการโรคจากเชื้อสาเหตุอื่น

2. การแยกเชื้อและพิสูจน์การเกิดโรค

เก็บตัวอย่างอาการโรคจากแปลงปลูก จำแนกชนิดตัวอย่างตามชนิดพืช พันธุ์พืช ส่วนของพืชที่เกิดโรค ลักษณะอาการ แยกเชื้อสาเหตุโรคโดยตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณที่มีอาการโรคเชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่เป็นโรค ขนาดชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.2x 0.2 มิลลิเมตร ล้างชิ้นส่วนพืชโดยจุ่มแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ประมาณ 1 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชดังกล่าว วางบนหยดน้ำ 50 ไมโครลิตร ใช้ใบมีดฆ่าเชื้อหั่นชิ้นส่วนพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วใช้ลูปที่ลนไฟฆ่าเชื้อ จุ่มในหยดน้ำตัวอย่าง นำมาลาก (streak) บนอาหารสังเคราะห์ Nutrient glucose agar (NGA) หรือ Tween agar (TW) แยกเชื้อตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เก็บจานเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงพลาสติก บ่มเชื้อไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีของเชื้อที่เจริญ เลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหารจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อเพื่อทดสอบการเกิดโรค

เลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่แยกเก็บจากตัวอย่างพืช บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ ด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 0.1 OD ที่ A600 ทดสอบคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค โดยใช้กระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน นิโปร ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาขนาด 26 Gx 1/2” ฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าใต้ใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโม 3 ซ้ำ ใช้น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดลองเปรียบเทียบ เก็บต้นพืชทดลองในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจอาการโรคหลังการปลูกเชื้อ 1, 3 และ 5 วัน บันทึกลักษณะอาการและความรุนแรงในการเกิดโรค

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

<u>ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ</u> เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ใส่เชื้อ 1 ลูปเต็ม ต่อน้ำ 200 ไมโครลิตร นำไปลากบนอาหารสังเคราะห์ NGA, TW และ Yeast extract Dextrose Agar (YDC) บ่มเชื้อในตู้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี

<u>ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน Biolog test</u> เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ไอโซเลท 212 แยกเชื้อจากผลเมลอน ที่เก็บตัวอย่างจาก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว เป็นตัวแทนของเชื้อ เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร BUG™ Agar (Biolog, Inc.) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อในสารละลาย Inculation fluid (0.4% NaCl, 0.03% Pluronic F-68 และ 0.02% gellan gum) ที่มี 5 mM Sodium thioglycolate วัดค่าแสงส่องผ่าน (transmittance, T) 63% ด้วยเครื่อง Biolog® turbidimetor นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเติมลงใน Biolog® Microplate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่ม plate GN2 ที่ทดสอบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microlog™ System ที่ค่าดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร วิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจำแนกชนิดของเชื้อ จากการนำค่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลเป็นบวกหรือลบมาวิเคราะห์ด้วย Simple matching หาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ด้วยวิธีทางสถิติแบบ Principal Component Analysis จำแนกชนิดของเชื้อ

<u>จำแนกโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rDNA</u> เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท 212 ในอาหาร Nutrient broth บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 24 ชั่วโมง ใช้ไปเปตดูดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติก ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 14000 rpm สกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัด Geneaid วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ เก็บดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็น template ในการสังเคราะห์ยีน 16s rDNA ด้วยไพรเมอร์ 27f (5’AGAGTTTGATCATGGCTCAG3’) และ 1488r (5’CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC3’) Purified PCR product ด้วย GeneJet TM PCR Purification kit (Fermentas) ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช แปลงปลูกเมลอนของเกษตรกร อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว จ.อยุธยา จ. ลพบุรี และ จ.สระบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจโรคเพื่อการเฝ้าระวัง

จากการสืบค้นข้อมูลพื้นที่ปลูกเมลอนและแคนตาลูป พบว่าแหล่งใหญ่ของประเทศไทยคือพื้นที่ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว มีการปลูกเมลอน (แคนตาลูป) ซึ่งเป็นพืชตระกูลแตงที่ได้รับความเสียหายจากโรคผลเน่ามานาน และมีความรุนแรงขึ้นทุกปี จึงเลือกสุ่มสำรวจโรคในแหล่งปลูกดังกล่าว พบว่ามีการปลูกเมลอนเป็นการค้ามานานนับ 40 ปี มีพื้นที่ปลูกรวม 600 -1,200 ไร่ ต่อปี ปลูกมากที่ตำบลผ่านศึก และตำบลป่าไร่ มีการปลูกหมุนเวียนตลอดปี (5-6 รุ่นต่อปี) ต่อมา

เกษตรกรจะไม่ปลูกซ้ำที่ โดยย้ายไปเช่าที่ปลูก เนื่องจากปัญหาโรคผลเน่า จากการสำรวจในพื้นที่พบว่า เกษตรกรซื้อเมล็ดพันธุ์จากบริษัท ผ่านตัวแทนในพื้นที่ พันธุ์เมลอนที่มีการปลูกมาก ได้แก่ พันธุ์ซันเลดี้ พันธุ์สีทอง พันธุ์ฮันนี่เวิล์ด เรดดิว พอร์ทออเรนท์ และฮันนี่ดิว ส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจากบริษัทเพื่อนเกษตร และบริษัทตะวันรุ่ง ในปี 53 พบว่ามีการปลูกแตงพันธุ์ทิเบต เป็นพันธุ์ใหม่ ปัญหาจากการสอบถามเกษตรกร และสังเกตพฤติกรรมการปลูกพืช พบว่าเนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาแพง กระป๋องละ 700-1000 บาท ขึ้นกับชนิดพันธุ์ เกษตรกรจะเพาะเมล็ดในกะบะหลุม แล้วย้ายกล้าลงปลูกในแปลง (โดยเฉลี่ยขนาดแปลง 5-10 ไร่) และขึ้นร้านแนวยืน เกษตรกรมีการพ่นสารเคมี โดยผสมสารเคมีจำนวนหลายชนิด ทั้งสารฆ่าแมลง และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคค่อนข้างมาก โดยส่วนใหญ่พ่นวันเว้นวัน หลังเก็บผลผลิตเกษตรกรทิ้งผลที่เป็นโรคไว้เกิดการเน่าเสียในแปลง และมีการสะสมเชื้อโรคในดิน

ปัญหาโรคอื่น ๆ ที่พบในการผลิต ได้แก่ ราแป้ง ราน้ำค้าง โรคต้นแตกยางไหล ซึ่งเกษตรกรมีการพ่นสารเคมีควบคุมโรคสม่ำเสมอ จึงไม่เป็นปัญหามากนัก ปัญหาที่พบมากคือโรคใบด่างเหลืองจากไวรัส ยอดหงิก เนื่องจากแมลงเป็นพาหะนำโรคพบมากแต่ยังเก็บผลผลิตได้ และปัญหาที่สำคัญคือโรคผลเน่า ทำให้ผลเมลอนเน่าเสีย ผลผลิตไม่มีคุณภาพ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีอากาศร้อนชื้นโรคผลเน่าเป็นปัญหามากที่สุด

ในการปลูกเมลอนเกษตรกรเพาะเมล็ดในถาดหลุมวางเรียงบนแพท่อนไม้ไผ่บนดิน จากนั้นย้ายกล้าปลูก ขึ้นค้างไม้ไผ่เมื่อต้นเริ่มสูงขึ้นและเลื้อย (ภาพที่ 1) เก็บผลผลิตเมื่อเมลอนอายุประมาณ 60 วัน เก็บผลผลิตรวมกันแล้วคัดขนาดและคุณภาพ ผลจากการสำรวจติดตามอาการโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อและพิสูจน์โรค ดังนี้

-<u>ระยะกล้า</u> พบอาการใบเลี้ยงเน่าช้ำ และไหม้ ในต้นกล้าหลังการย้ายปลูกลงแปลง อายุประมาณ 15 วัน (ภาพที่ 2ก) พบการเกิดโรคต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่อมาพบว่าใบเลี้ยงไหม้และหลุดร่วงไป ทำให้ต้นเมลอนสามารถเจริญได้ปกติ ซึ่ง Hopkins และคณะ (1992) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของแตงโมสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า หากอาการรุนแรงสามารถทำให้ต้นกล้าตายได้

-<u>ระยะการเจริญและออกดอก</u> ที่ใบพบอาการแผลจุดขอบแผลช้ำสีเขียวอมเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2ข) ซึ่งพบได้เกือบทั้งต้นโดยพบมากบริเวณใบที่ 2-5 จากยอด พบมาก 20-50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ไม่มีรายงานอาการโรคทางใบ Hopkins et al. (1992) รายงานว่าในระยะต้นโตเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายพืชได้แต่อาการไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการเลยแต่แฝงอยู่บนต้น เมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยวเชื้อจะเข้าทำลายผล ทำให้ผลแตงโมแสดงอาการของโรคและเน่าเสียไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้

-<u>ระยะติดผล</u> พบอาการผลจุดขนาดเล็ก 1 มม. แผลขยายขนาดขึ้นเมื่อผลใหญ่ขึ้น (2-3 มม.)บางแผลมีอาการจุดนูนช้ำเป็นสีเขียว (ภาพที่ 2ค) พบอาการโรค 20-80 เปอร์เซ็นต์ และอาการก้านใบและลำต้นเน่าช้ำ (ภาพที่ 2ง)

-<u>ระยะผลแก่และเก็บเกี่ยว</u> พบอาการผลจุด 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอาการผลเน่า 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2จ-ฉ) เช่นเดียวกับอาการโรคผลเน่าของแตงโม ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยว พบอาการเป็นจุดแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลพัฒนาอย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำคล้ายรอยเปื้อนน้ำมันขยายลามไม่มีขอบเขต ในเวลา 2-3 วันจะขยายลามคลุมทั่วทั้งผลทำให้ผลแตงโมแตกเนื้อแตงโมภายในเน่าเสีย ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ (Schaad et al.,1978; Hopkins et al.,1992 ; Latin and Rane,1990)

สำหรับผลเน่าที่เกษตรกรเก็บผลผลิตออกจากแปลง จะถูกคัดออกและโยนทิ้งไว้ข้างแปลง ซึ่งจะเป็นแหล่งเชื้อในการปลูกพืชรุ่นต่อไป ทำให้เกษตรกรไม่สามารถปลูกซ้ำที่ได้ จึงต้องย้ายที่ปลูกบ่อย ๆ

การสำรวจโรคในปี 2552 ได้ผลเช่นเดียวกับในปีที่ผ่านมา เนื่องจากการปลูกเมลอน เกษตรกรจะย้ายที่ปลูกโดยเช่าที่ใหม่ ทุกรุ่นไม่ปลูกซ้ำที่เดิม หากเกษตรกรจะปลูกซ้ำที่เดิมจะเว้นการปลูกไว้อย่างน้อย 2-3 ปี เนื่องจากต้องการหลีกเลี่ยงปัญหาโรคและแมลง

จากการสำรวจพบว่า เกษตรกรปลูกแตงแคนตาลูป และเมลอน หลายพันธุ์ ได้แก่ แตงแคนตาลูป เนื้อเขียว เปลือกแข็งเป็นตาข่าย และปลูกเมลอน หลายพันธุ์ เนื้อเขียวได้แก่ ฮันนี่เวิลด์ เนื้อส้ม ได้แก่ ฮันนี่ดิว ซันสวีท เป็นต้น อายุพืชตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวผลผลิต ประมาณ 65-75 วัน เกษตรกรรู้จักโรคผลเน่า และเรียกว่า ราเข้าลูก พบทำความเสียหายกับเมลอนมากในระยะเก็บเกี่ยว ปัญหาผลเน่าจะพบมากในฤดูฝน ที่มีสภาพอากาศร้อนอบอ้าว ฝนชุกติดต่อกันหลายวัน

แปลงแคนตาลูป เมลอน และแตงโม แหล่งปลูก อ.บางไทร จ.อยุธยา พบว่าเจ้าของแปลงมีการรักษาสุขอนามัยของแปลงเป็นอย่างดี เริ่มตั้งแต่การเพาะกล้า เลือกย้ายกล้าที่สมบูรณ์แข็งแรง และเมื่อต้นเจริญขึ้นประมาณ 20-25 วัน จะทำการมัดโยงต้นขึ้นค้างแล้ว หมั่นสำรวจแปลง เด็ดใบเลี้ยงคู่แรก และใบด้านล่างออกทิ้ง ช่วยทำให้ลำต้นโปร่ง พบว่าสามารถลดปัญหาการเกิดโรคผลเน่าได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถปลูกซ้ำที่เดิมได้

2. การแยกเชื้อและพิสูจน์การเกิดโรค

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากอาการที่เก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกเมลอน บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) อายุ 48 ชั่วโมง พบแบคทีเรียลักษณะโคโลนีกลมนูนสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก 1-2 มม. บนอาหาร Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ (YDC) โคโลนีกลมสีครีมอมส้ม ขอบราบ เมื่อโคโลนีอายุ 4-5 วันจะสร้างคราบเป็นรอยบางรอบโคโลนี และบนอาหาร Tween agar (TW) อายุ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียมีโคโลนีกลมนูนสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก รอบโคโลนีสร้างฝ้าเป็น

ตะกอนขาวขุ่น (ภาพที่ 3) แยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจ ได้ผลดังนี้

-อาการแผลเน่าช้ำบริเวณใบเลี้ยง แยกได้เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

-อาการแผลจุดช้ำที่ใบ จากการเก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง 25 ตัวอย่าง แยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ ไม่พบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยส่วนมากพบโคโลนีกลมนูนสีเหลือง ซึ่งเมื่อทำการปลูกเชื้อกลับที่ใบเมลอน ไม่เกิดอาการโรค

-อาการก้านใบเน่าช้ำ แยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค

-อาการผลจุด แผลจุดช้ำที่แยกได้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ลักษณะอาการแผลจุดที่เป็นร่องแผลลึก เมื่อผ่าผลพบอาการที่เชื้อเข้าทำลายทะลุไปถึงเนื้อทำให้เนื้อเมลอนเป็นสีน้ำตาล และทำให้เนื้อเยื่อที่ยึดเกาะเมล็ดล่มกลายเป็นน้ำ และอาการแผลจุดช้ำที่เชื้อลุกลาม ไหลเป็นร่องช้ำเป็นแนว ต่อมาเชื้อลุกลามลงไปที่เนื้อทำให้เกิดอาการเน่าช้ำ (ภาพที่ 4) โดยอาการทั้งสองลักษณะแยกเชื้อได้เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

จากข้อสังเกตพบว่าอาการโรคผลเน่าของเมลอน มีลักษณะคล้ายกับอาการโรคผลเน่าของแตงโม โดยพบได้ในระยะกล้าและพบอาการที่ผล Hopkins et al. (1992) รายงานว่าผลแตงโมที่เจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยว พบอาการเป็นจุดแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลพัฒนาอย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำคล้ายรอยเปื้อนน้ำมันขยายลามไม่มีขอบเขต แต่เมลอนมีลักษณะของผิวเปลือกและเนื้อที่แข็งกว่าแตงโม ทำให้การพัฒนาอาการเกิดได้ช้ากว่าเล็กน้อย

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

<u>ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ</u>

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA พบว่าแบคทีเรียเจริญหลังการบ่มเชื้อ 36-48 ชั่วโมง โคโลนีมีขนาดค่อนข้างเล็กสีขาวขุ่นถึงใส ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ตรงลางโคโลนีนูนคล้ายโดม ขนาดประมาณ 1-2 มม. เมื่ออายุเชื้อเก็บไว้เป็นเวลา 3-5 วัน พบบริเวณรอบของโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกสีขาวขุ่นขอบไม่เรียบ บนอาหาร Yeast-extract Dextrose $CaCO_3$ แบคทีเรียมีโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีเบจหรือส้มอมน้ำตาล เมื่อเชื้อมีอายุ 3-5 วัน มีคราบบางใส ขอบไม่เรียบล้อมรอบ และลักษณะโคโลนีบนอาหาร Tween agar แบคทีเรียมีโคโลนีขนาดเล็กสีขาวใส สร้างฝ้าเป็นเม็ดเล็กๆ สีขาวขุ่น รอบโคโลนี บนอาหารเมื่อบ่มเชื้อไว้นาน 3-5 วัน (ภาพที่ 3)

<u>ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน Biolog test</u>

แบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าเมลอน ไอโซเลท 212 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ปฏิกิริยาออกซิเดส และคะตะเลส เป็นบวก สามารถย่อยเปปโตน ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนบนอาหาร GN2 จำนวน 95 ชนิด หลังการบ่มเชื้อ 16 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 29 ชนิด ได้แก่ Tween 40, Tween 80, L-Arabinose, D-Fructose,D-Psicose, Pyruvic Acid Methyl Ester, Succinic Acid Mono-Methyl-Ester, Acetic Acid, D-

Gluconic Acid, α-Hydroxybutyric Acid, β-Hydroxybutyric Acid, γ-Hydroxybutyric Acid, α-Keto Butyric Acid, α-Keto Valeric Acid, D,L-Lactic Acid, Propionic Acid, Sebacic Acid, Succinic Acid, Bromosuccinic Acid, D-Alanine, L-Asparagine, L-Asartic Acid, L-Glutamic Acid, L-Leucine, L-Pyroglutamic Acid, L-Serine, γ- Amino Butyric Acid, 2-aminoethanol และ Glycerol เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Biolog จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้เป็น *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยค่า probability 100 เปอร์เซ็นต์ Similarity 65 เปอร์เซ็นต์ และ Distance 5.37

<u>จำแนกโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rDNA</u>

วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 16s rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบว่าลำดับเบส 16S ribosomal RNA ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* ไอโซเลท P212 มีความคล้ายกับลำดับเบสของแบคทีเรียสกุล *Acidovorax* หลายชนิด และ 91% คล้ายกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* 16S ribosomal RNA sequence, partial sequence Accession no. AF137506.1 (ภาพที่ 5)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. จากการสำรวจโรคเพื่อการเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง พบการเกิดโรคระยะกล้าในระดับต่ำ ลักษณะอาการใบเลี้ยงเป็นแผลไหม้ช้ำ ในระยะผลอ่อนมีอาการผลจุดช้ำขนาดเล็ก 0.1-0.3 มม. พบผลที่แสดงอาการแผลจุด 20-80 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่แผลจุดกระจายเฉลี่ย 1-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผล ซึ่งอาจพัฒนาแผลจุดช้ำขนาดใหญ่และเข้าทำลายลึกถึงเนื้อในผลเกิดโรคผลเน่าในระยะผลแก่เก็บเกี่ยวผลผลิต 10-15 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นผลที่มีอาการแผลจุดแต่ไม่เกิดอาการผลเน่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาการที่ใบพบแผลจุดขอบแผลช้ำ ที่ก้านใบและลำต้นพบอาการเน่าช้ำ แต่เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค

2. จากคุณสมบัติสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบส จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าเมลอน เป็น *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* แหล่งแพร่ระบาดที่พบ คือ อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว โดยพบอาการโรคได้ในระยะกล้า อาการโรคชัดเจนในระยะเก็บเกี่ยวเกิดอาการผลเน่า

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เป็นข้อมูลสำหรับการวิจัยเพื่อการควบคุมโรค
2. เป็นข้อมูลสำหรับงานกักกันโรคพืช เพื่อการวิเคราะห์ความเสี่ยงการนำเข้าส่งออกเมล็ดพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์. 2537. โรคผลเน่า:ปัญหาใหม่ของแตงโม. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา.4:20

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2540. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2540 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Hopkins, D.L, T. Kucharek, D. Gay, R. Gitaitis, W. Cook and A. Keirath. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon. Report of Asgrow Seed Company. USA. 3 p.

Jacobs, J.L., J.P. Damicone and B.D. Mcgraw. 1992. First Report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. Plant Dis. 76: 1185.

Latin, R.X. and K.K. Rane. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. Plant Dis. 74: 331.

Schaad, N.W., G.Jr. Sowell, R.W. Goth, R.R. Colwell and R.E. Webb. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol.28:117-125.

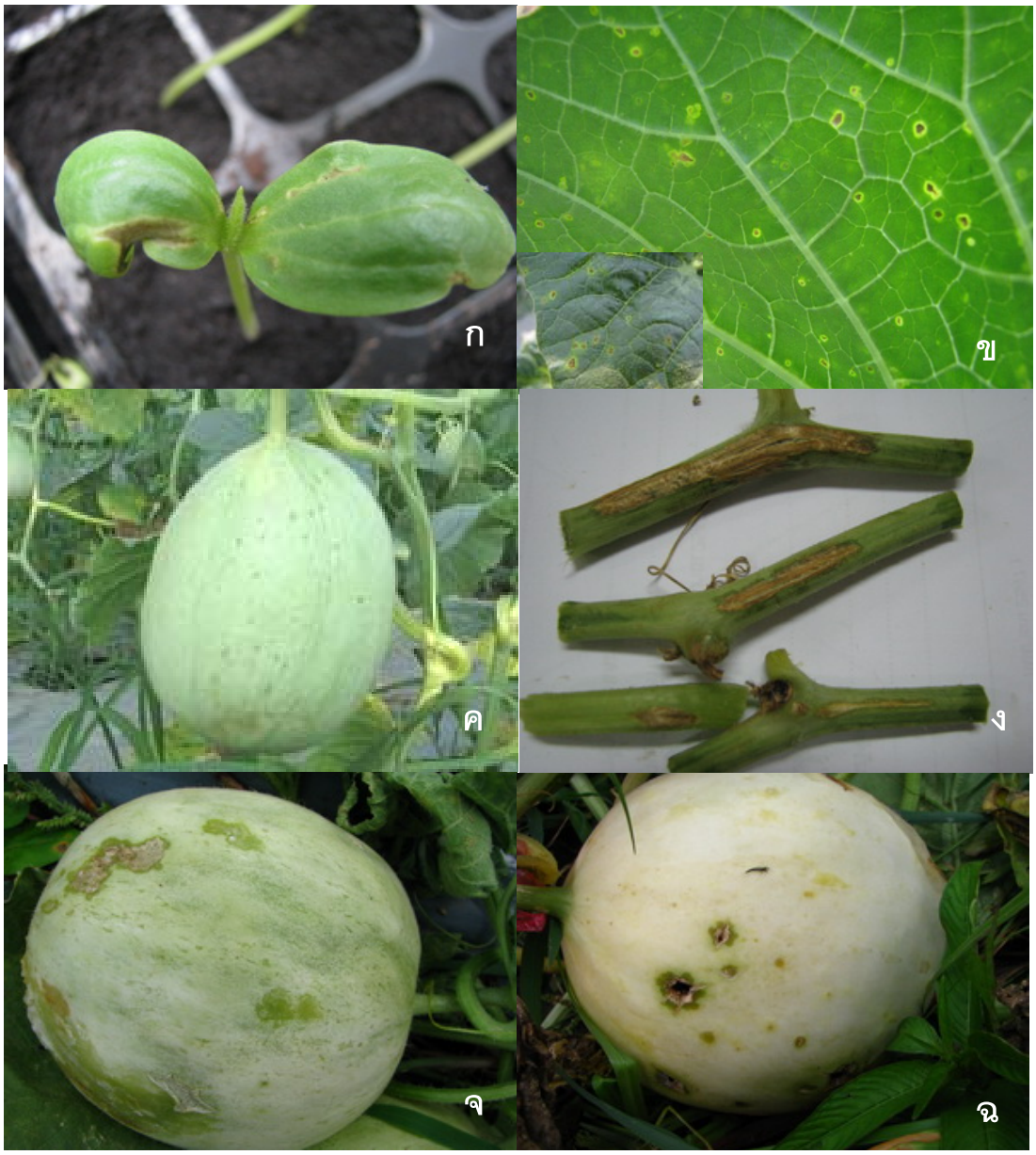
Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Sowell, G.Jr. and N.W. Schaad. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subp. *citrulli.* on watermelon : Seed transmission and resistance of plant introductions. Plt. Dis. Rept. 63 : 437-441.

Wall, G.C., V.M. Santos, F.J. Cruz and D.A. Nelson. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana Islands. Plant Dis. 74:80.

Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters and J. De Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Psuedomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovarax* a*venae* subsp. a*venae* subsp.nov. comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax* a*venae* subsp. *cattleyae*, and *Acidorovax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 107-119.

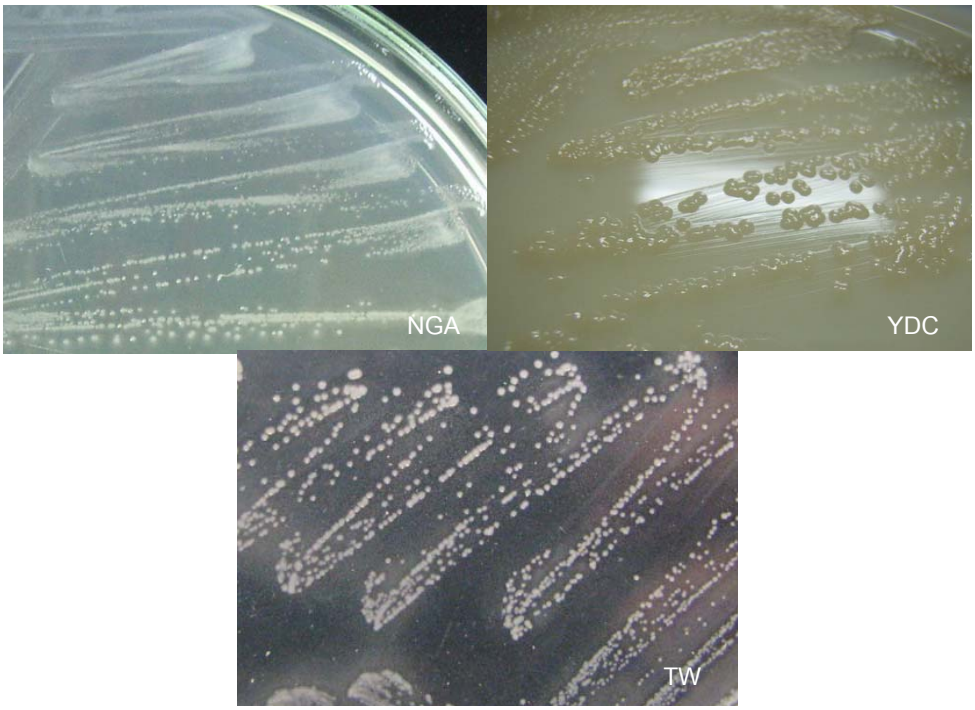
ภาพที่ 1 การปลูกเมลอนของเกษตรกร อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว
ก, เพาะกล้าในกะบะหลุม วางบนท่อนไม้ไผ่ที่เรียงกัน
ข, การผูกต้นโยงขึ้นค้าง ค, ผลแตงเมลอนที่เก็บมารวมเพื่อคัดเกรด
ง, หลังเก็บเกี่ยวผลผลิต จะถอนต้นและทิ้งผลเน่าอยู่ในแปลง



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการที่คาดว่าเป็นโรคผลเน่า ที่เก็บรวบรวมตัวอย่างมาพิสูจน์เชื้อ

ก, จ และ ฉ พบแบคทีเรียสาเหตุโรค *A. avenae* subsp. *citrulli*

ข, ค และ ง ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค



ภาพที่ 3 ลักษณะ typical โคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

ภาพที่ 4 อาการผลเน่าของเมลอนเปรียบเทียบลักษณะแผลภายนอกผลและภายในผล

> gb|AF137506.1| Acidovorax avenae subsp. citrulli 16S ribosomal RNA gene, partial Sequence Length=1481

Identities = 900/995 (91%), Gaps = 38/995 (3%) Strand=Plus/Plus

```
Query  1     AAGCACCTGGCTTAACCTAGCGTGCCCAGCAGACTGCGGTAATACGTAGGGTGCATGCGT  60
Sbjct  463   AAGCACC-GGC-TAA-CTA-CGTG-CCAGCAG-CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGT  516
Query  61    TAATCTGAAATTTCT-GGCGTAAAGCGGTG-GTCAGTTCGGTGTATGTTAGTACAAAATG  118
Sbjct  517   TAATC-GGAATTACTGGGCGTAAAGC-GTGCG-CAG-GCGGTG-ATGTAAG-AC-AGATG  569
Query  119   TGAAATCTCCCGGGCTGGAACCTGCAGAAGTGCATTTGTGACTGCATATGCTGGAGTAGG  178
Sbjct  570   TGAAATC-CCCGGGCT-CAACCTG-GGAACTGCATTTGTGACTGCAT-CGCTGGAGTACG  625
Query  179   GCAGAGGAGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGATGTAGATATGCGGAGGAACAC  238
Sbjct  626   GCAGAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATG-CGTAGATATGCGGAGGAACAC  684
Query  239   CGATGGAGAAGGCAATACCCTGGGCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGC  298
Sbjct  685   CGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGC  744
Query  299   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAAGATGTCAACTGGTTGTTGGGTC  358
Sbjct  745   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTC  804
Query  359   CTCACTGAATCAGTAATGAAGCTAACACTTGAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  418
Sbjct  805   TTCACTGACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  864
Query  419   AGGTTGAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAT  478
Sbjct  865   AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAT  924
Query  479   TAGATGCAACGAC-AAAAACCTTCCCCACCTTTTACATGTACTGAATCCTTTAGAGATAG  537
Sbjct  925   TCGATGCAACG-CGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAATCCTTTAGAGATAG  983
Query  538   ACGAGTGCTAGAAAGAAAACCGTAACACCGGTGCTGCATTGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG  597
Sbjct  984   AGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG  1043
Query  598   TGAGATGATGGGTTAAGTCCCGCCACGAGCGCACCCCTTTCCATTAGTTGCTACGAAAGG  657
Sbjct  1044  TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGG  1103
Query  658   ACACTCTAATGGGACTCCCGGTGCCAAACCGGAGGAAGGTGGGGAGGAGGCCAAGTCTTC  717
Sbjct  1104  GCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  1163
Query  718   ATGGCCCTTATAGCAGGGGCTACACACGTCATCCAATGGAGGGTCCAGAGGGTTCCCAAC  777
Sbjct  1164  ATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAAC  1223
Query  778   CCCGCGACGGGGGACCTAATCCCCATAAACCCCAGTTGTAGTCCGGATTGGCAGTCTGCA  837
Sbjct  1224  CC-GCGA-GGGGGAGCTAATCCC-ATAAAGCC-AGTCGTAGTCCGGATCG-CAGTCTGCA  1278
Query  838   ACTTCGATTGCGTGAAGTCGGGAATCGCTAGTAATC-CAGGATCAGAATGTCTGCGGTGA  896
Sbjct  1279  ACT-CGACTGCGTGAAGTCGG-AATCGCTAGTAATCGC-GGATCAGAATGTC-GCGGTGA  1334
Query  897   ATACGTTCCCGGGTCCTTGTACACACCGCCCCGTCACACCATGGGGAGCGGGTT-TGCAC  955
Sbjct  1335  ATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC-GTCACACCATGGG-AGCGGGTTCTGC-C  1390
Query  956   CAGAAGTAGGTAGCCTAACCTTAAGGAGGGCGCTT  990
Sbjct  1391  -AGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCGCTT  1424
```

ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ลำดับเบส 16S ribosomal RNA, partial sequence *A. avenae* subsp. *citrulli* ไอโซเลท 212 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank accession no. AF137506.1