การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม

Identification of Causal Agent of Bacterial Leaf Blight Disease on Onion

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครื่ง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2560 โดยฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช ได้ จำนวน 6 ไอโซเลท และเก็บตัวอย่างหอมที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากจังหวัดตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย อุบลราชธานี สุรินทร์ สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท ทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหอมสามารถทำให้หอมแดงเกิดโรคได้ ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยแป้งและ esculin ได้ ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ arginine dihydrolase ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตร์ท

คำหลัก : หอม โรคใบแห้ง จำแนกชนิด

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-03-60

คำนำ

โรคใบแห้ง (bacterial leaf blight หรือ Xanthomonas blight) ของหอมในประเทศไทยเคยพบมีการระบาดในปี พ.ศ. 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (นิตยา และคณะ, 2532) โดยวนิดาและคณะ (2529) ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *Xanthomonas* sp. ซึ่งเป็นการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับจีนัสเท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลสาเหตุของโรคใบแห้งของหอมเป็นปัจจุบัน ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชและจากการเก็บตัวอย่างโรคจากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบแห้ง เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัย เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) และใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงหนังสือของกลุ่มวิจัยโรคพืชในโอกาสต่อไป

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

วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จาก culture collection

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ใน 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. เก็บตัวอย่างโรคและแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

ทำการเก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกที่สำคัญ เช่น จังหวัดศรีษะเกษ บุรีรัมย์

เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี ราชบุรี อุตรดิตถ์ ตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน เป็นต้น บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยแยกเชื้อจากส่วนของพืชที่มีอาการของโรค ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมนูนเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

4. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียบางประการที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาตามวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จาก culture collection

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชได้ 6 ไอโซเลท

2. เก็บตัวอย่างโรคและแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เก็บตัวอย่างหอมที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากจังหวัดลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย อุบลราชธานี สุรินทร์ สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และตาก นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีเหลืองผิวมันวาวคล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้สามารถทำให้หอมแดงเกิดโรคได้

4. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อตามวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมเป็นแบคทีเรีย แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยแป้งและ esculin ได้ ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ arginine dihydrolase ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตร์ท (Table 1)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชได้ จำนวน 6 ไอโซเลท เก็บตัวอย่างหอมที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากจังหวัดตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย อุบลราชธานี สุรินทร์ สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท ทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดงและพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหอมสามารถทำให้หอมแดงเกิดโรคได้ ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมเป็น

แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยแป้งและ esculin ได้ ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ arginine dihydrolase ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตร์ท โดยจะดำเนินการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA gene และวิเคราะห์ multilocus sequence analysis ของ 4 ยีน ได้แก่ dnaK, fyuA, gyrB และ rpoD ของแบคทีเรีย Xanthomonas sp. เพื่อให้ทราบชนิดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นิตยา กันหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณา วรรณภีร์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532* กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 106-114.

วนิดา ฐิติฐาน นิตยา กันหลง สมใจ วิวิธจินดา และสุเนตรา ภาวิจิตร. 2529. ศึกษาเชื้อบักเตรีสาเหตุโรคใบไหม้ของหอมแดง. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529* กลุ่มงานบักเตรี กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 47-54

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.

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strains isolated from onion

Characteristics	Onion isolate	*X. campestris pv. allii*[1/]
Gram reaction	-	-
O-F test	O	O
Yellow colonies	+	+
Catalase reaction	+	+
Oxidase reaction	-	-
Esculin hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Nitrate reduction	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Indole production	-	-
Growth in 4% NaCl	+	+
Acid production from		
Cellobiose	+	+
Lactose	+	+
Glycerol	+	+

[1/] Kadota *et al.* (2000); O, oxidative reaction; +, positive reaction; -, negative reaction