ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การจำแนกและการทดสอบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกจากไพล

Identification and Pathogenicity Test of *Ralstonia solanacearum*

Isolated from Cassumunar (*Zingiber montanum*)

นามผู้วิจัย นางสาวธิดาวรรณ ชมเดช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบรูณ์, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ปริญญา จันทรศรี, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกและการทดสอบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกจากไพล

Identification and Pathogenicity Test of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Cassumunar (*Zingiber montanum*)

โดย

นางสาวธิดาวรรณ ชมเดช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธิดาวรรณ ชมเดช 2556: การจำแนกและการทดสอบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกจากไพล ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ด. 51 หน้า

เปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* จำนวน 9 ไอโซเลทที่แยกได้จากไพล (*Zingiber montanum*) จากการทดสอบไบโอวาร์ การตอบสนองอย่างเฉียบพลันในยาสูบ และการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัย 5 ชนิด ผลการจัดจำแนกตามวิธีของ Hayward พบว่าเชื้อ 7 ไอโซเลทอยู่ในไบโอวาร์ 3 และ 2 ไอโซเลท อยู่ในไบโอวาร์ 4 โดยเชื้อทุกไอโซเลททำให้เกิดการตอบสนองอย่างเฉียบพลันในยาสูบที่ 36-48 ชั่วโมง เมื่อจัดจำแนก race ตามพืชอาศัย พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทจัดอยู่ใน race 4 นำเชื้อ 9 ไอโซเลทมาจำแนกด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 759 และ 760 โดยการตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 281 bp ของเชื้อ *R. solanacearum* นอกจากนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ 21F-21R และ AKIF-AKIR ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 125 bp และ 165 bp กับเชื้อ *R. solanacearum* race 4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 21F-21R พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากเชื้อที่แยกจากไพลทุกไอโซเลท และจากพืชชนิดอื่น ได้แก่ ขิง, กระชาย, มะเขือเทศ และพริก ในขณะที่ไพรเมอร์ AKIF-AKIR พบแถบดีเอ็นเอขนาด 165 bp จากเชื้อที่แยกได้จากไพลจำนวน 3 ไอโซเลท คือ C5/1, C9/1 และC13/1 และไอโซเลทเชื้อจากขิง และกระชาย นำดีเอ็นเอขนาด 165 bp ที่สังเคราะห์ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับความเหมือนกันพบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลในการก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจจำนวน 8 ชนิด โดยทำการทดสอบในโรงเรือนโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการทำแผลที่ราก พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทมีความรุนแรงมากกับขิง (*Zingiber officinale*) เชื้อส่วนมากทำให้เกิดโรคกับกระชาย (*Boesenbergia pandurata*) ยกเว้น C6/1 และ C11/1 เชื้อ 3 ไอโซเลท คือ C7/1, C8/2 และ C13/1 มีความรุนแรงเล็กน้อยในการทำให้เกิดโรคกับข่า (*Alpinia galanga*) ส่วนในขมิ้น (*Curcuma domestica*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), พริก (*Capsicum annuum*), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และ ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) พืชไม่แสดงอาการโรค

_____ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tidawan Chomdate 2013: Identification and Pathogenicity Test of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Cassumunar (*Zingiber montanum*). Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Chalida Leksomboon, Ph.D. 51 pages.

Nine isolates of *Ralstonia solanacearum* from cassumunar (*Zingiber montanum*) were compared with respect to result of biovar test, hypersensitivity in tobacco and pathogenicity to five host plants. Based on Hayward's classification scheme, 7 isolates were placed in biovar 3 and 2 in biovar 4. All isolates caused a typical hypersensitivity in tobacco leaves 36-48 h. Based on host range, all isolates were placed in race 4. The nine isolates were further identified by polymerase chain reaction (PCR) technique using primer 759 and 760 to amplify a unique DNA fragment of 281 bp from *R. solanacearum*. Furthermore, two PCR primer sets (21F-21R and AKIF-AKIR) were used to amplify a unique DNA fragment of 125 and 165 bp from *R. solanacearum* race 4. The 21F-21R did not amplify the bands from genomic DNA of *R. solanacearum* from cassumunar and the other isolates from ginger, boesenbergia, tomato and chili. Whereas, the AKIF-AKIR primer set amplified a single band (165 bp) from genomic DNA obtained from three isolated of cassumunar (C5/1, C9/1 and C13/1) and the other isolates from ginger and boesenbergia. These 165 bp fragments from 3 isolates of cassumunar, ginger isolates and boesenbergia isolates were sequenced and determined their similarity. It was found that the five isolates showed 100% homology with each other.

The pathogenicity of *R. solanacearum* isolated from cassumunar was evaluated on eight species of economic plants. The plants were grown in the greenhouse and inoculated by root-injury technique. The results showed that all isolates were highly virulent on edible ginger (*Zingiber officinale*). Most isolates were pathogenic to boesenbergia (*Boesenbergia pandurata*), but C6/1 and C11/1 were not. Three isolates, C7/1, C8/2 and C13/1 were slightly virulent on galangal (*Alpinia galanga*). In turmeric (*Curcuma domestica*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), chili (*Capsicum annuum*), groundnut (*Arachis hypogaea*) and para rubber (*Hevea brasiliensis*) no systemic symptoms appeared.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชลิดา เล็กสมบูรณ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา อ.ดร. ปริญญา จันทรศรี กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณศูนย์วิทยาการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรแห่งชาติ ที่สนับสนุนงบประมาณส่วนหนึ่งในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ด้านต่างๆ ขอบคุณพี่ เพื่อน น้อง เจ้าหน้าที่ และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นผู้ให้กำเนิด ให้การศึกษา และคุณความดีทั้งหมดแก่ข้าพเจ้า ขอบคุณญาติพี่น้องทุกคน ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

ธิดาวรรณ ชมเดช

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	21
ผล	21
วิจารณ์	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	42
สรุป	42
ข้อเสนอแนะ	42
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	43
ภาคผนวก	49
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกไบโอวาร์ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*	4
2	การเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันของยาสูบกับไอโซเลทเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพลและพืชชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ	25
3	การจำแนก Race ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล โดยการทดสอบการเกิดโรคบนพืชทดสอบ	27
4	การจำแนกไบโอวาร์ของไอโซเลทเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล	28
5	ระดับการเกิดโรคของขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3) และมะเขือเทศ(T160) หลังปลูกเชื้อ 28 วัน	35
6	ความรุนแรงของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3), และมะเขือเทศ(T160) ในการทำให้เกิดโรคกับ ขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา หลังปลูกเชื้อ 28 วัน	36
7	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3) และมะเขือเทศ(T160) หลังปลูกเชื้อ 28 วัน	37

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โรคเหี่ยวของไพลที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*	22
2	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน (Hypersensitive reaction) บนใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)	24
3	การทดสอบไบโอวาร์ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*	26
4	แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 759 – 760 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ	30
5	แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AKIF – AKIR กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ	31

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การจำแนกและการทดสอบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกจากไพล

Identification and Pathogenicity Test of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Cassumunar (*Zingiber montanum*)

คำนำ

ไพล (*Zingiber montanum*) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของอินเดีย แต่ในปัจจุบันได้มีการปลูกอย่างแพร่หลายในเอเชียเขตร้อน และได้นำมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหารและใช้เป็นยา (Guzman and Siemonsma, 1999) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาที่สำคัญคือ สารสกัดจากแง่งและน้ำมันจากไพล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ป้องกันอาการแพ้ และพบสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการใช้กับโรคหอบหืด, อาการปวดกล้ามเนื้อและข้อ (Jeenapongsa *et al*. 2003 ; Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007) จึงได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาตั้งแต่ปี 1975 (Wasuwat *et al*. 1986) ทำให้มีความต้องการวัตถุดิบที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้นสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา

ในปัจจุบันปัญหาหนึ่งของการเพาะปลูกไพล รวมถึงพืชอื่นในวงศ์ Zingiberaceae คือ ปัญหาของโรคเหี่ยวซึ่งสร้างความเสียหายต่อผลผลิตทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่มีคุณภาพมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ ยาสูบ พริก และปทุมมา เป็นต้น ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรค ได้แก่ การที่มีเชื้อติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ของพืชและดิน เนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถพักตัวอยู่ในดินได้นานหลายปี และมีพืชอาศัยหลายชนิด จึงทำให้ยากแก่การป้องกันกำจัด

โรคเหี่ยวของพืชวงศ์ขิงเกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีรายงานการศึกษาได้แก่ โรคเหี่ยวของขิง โดยเชื้อ *R. solanacearum* ที่รายงานไว้จัดอยู่ใน race 4 ไบโอวาร์ 3 และ 4 ในปัจจุบันได้มีการพบโรคเหี่ยวจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* กับพืชใหม่เพิ่มขึ้นอีกมากมาย การทดลองนี้จึงศึกษาลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิงชนิดหนึ่งโดยพบการแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกไพล แต่ยังไม่มีการรายงานการศึกษาลักษณะของเชื้อ และได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชชนิดต่างๆ ในวงศ์ขิงและพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการจัดการโรคต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของไพล

2. ศึกษาความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลในการก่อให้เกิดโรค กับพืชชนิดต่างๆ ในวงศ์ขิง และพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Beta protebacteria

Order : Burkholderiales

Family : Ralstoniaceae

Genus : *Ralstonia*

Species : *solanacearum*

เชื้อ *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ ค่อนข้างยาว (rod shape) หัวท้ายมนขนาดแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต ขนาดประมาณ 0.5-0.6 × 0.8-1.2 ต้องการออกซิเจน (Smith, 1914) ไม่สร้างสปอร์และ capsule เคลื่อนที่โดย 1-4 polar flagella หรือ peritrichous flagellum หรือพบว่าไม่เคลื่อนที่โดยไม่มี flagella ซึ่งพบว่าขึ้นอยู่กับระยะการเป็น parasitic phase หรือ saprophytic (วิชัย, 2549) เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne) เจริญได้ดีที่ pH 6.8 ในช่วงอุณหภูมิ 27-34 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride (TZC) โดยโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์รุนแรงจะค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ โคโลนีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูตรงกลาง ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงโคโลนีจะมีรูปร่างกลมขอบเรียบคล้ายเนยเหลว โคโลนีสีแดงเข้มเกือบทั้งโคโลนี (Kelman, 1954)

เชื้อ *R. solanacearum* เดิมชื่อ *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith (Smith, 1896) ต่อมาในปี 1992 Yabuuchi *et al.* ได้จัดเชื้ออยู่ในสกุลใหม่คือ *Burkholderia* ต่อมาในปี 1995 Yabuuchi *et al*. ได้เสนอให้ *B. solanacearum* อยู่ในสกุลใหม่คือ *Ralstonia* หลังจากศึกษาลักษณะของฟีโนไทป์ การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันและกรดไขมัน การศึกษา phylogenetic analysis ของลำดับเบสยีน 16S rDNA และ การใช้เทคนิคนิวคลีอิคแอซิด ไฮบริไดเซชันของสายดีเอ็นเอของโครโมโซม แล้วเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น *Ralstonia solanacearum* เนื่องจากเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ (Genotype) จึงสามารถจัดจำแนกได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็น race และไบโอวาร์ โดยสามารถจัดจำแนกเชื้อเป็น 5 races ตามการเข้าทำลายชนิดของพืชอาศัย (Buddenhagen *et al*., 1962; He *et al*., 1983) ดังนี้

race 1 ทำลายพืชในวงศ์ Solanaceae วัชพืช และกล้วย (diploid bananas)

race 2 ทำลายพืชวงศ์ Musaceae (triploid banana) และเฮลิโคเนีย

race 3 ทำลายมันฝรั่งและมะเขือเทศแต่ไม่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับพืชในวงศ์ Solanaceae ชนิดอื่น

race 4 ทำลายพืชในวงศ์ Zingiberaceae

race 5 ทำลายหม่อน (mulberry)

และจัดจำแนกเชื้อเป็น 5 ไบโอวาร์ ตามความสามารถในการใช้น้ำตาลไดแซคคาไรด์ และน้ำตาลเฮกโซสแอลกอฮอล์ (Hayward, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกไบโอวาร์ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

Utilization of	Biovars				
	1	2	3	4	5
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Cellobiose	-	+	+	-	+

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีรายงานในประเทศไทยโดยสถาบันพืชสวน(2539) อยู่ใน race 1 ไบโอวาร์ 3 และ 4

เชื้อ *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne) และเข้าทำลายพืชทางบาดแผลซึ่งอาจเกิดจากการเขตกรรมหรือช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ช่วงที่พืชงอกรากใหม่ หลังจากเชื้อเข้าไปในต้นพืชแล้วจะทวีจำนวนขึ้นในท่อน้ำท่ออาหารและแพร่ไปตามส่วนต่างๆ ของพืชได้อย่างรวดเร็ว ในพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อจะแสดงอาการเหี่ยวภายใน 4 วัน เชื้อแบคทีเรียจะเริ่มออกมาสู่ดินหลังจากพืชเริ่มแสดงอาการแล้วและสามารถเข้าทำลายพืชต้นข้างเคียงได้ใหม่ การแพร่ระบาดของโรคนี้ไปได้ไม่ไกล นอกจากจะมีการให้น้ำแบบไหลตามร่องหรือสภาพที่ฝนตกหนักจนมีน้ำไหลไปตามที่ต่างๆ (ประสาทพร, 2527) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนย้ายเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ แมลงพาหะ ไส้เดือนฝอย เป็นต้น เชื้อ *R. solanacearum* อยู่ข้ามฤดูในดินได้เป็นเวลานานถึง 4 ปี โดยปราศจากพืชอาศัยในสภาพ saprophyte เมื่อมีพืชอาศัยที่เหมาะสมสามารถปรับตัวเข้าทำลายพืชต่อไป (McCarter, 1976) โดยเชื้อมีชีวิตอยู่รอดข้ามฤดูได้ในบริเวณรากพืช (rhizosphere) ของวัชพืช (Hayward, 1991) รายงานของวนิดาและคณะ (2534) พบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่รอดในดินเหนียวที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่าง 6.9 ได้นาน 12 สัปดาห์ ส่วนในดินร่วนเหนียวสภาพดินเป็นด่าง เชื้ออยู่ในดินได้นาน 10 สัปดาห์ แต่ในดินร่วนเหนียวปนทรายมีอินทรีย์วัตถุสูงและความเป็นกรด-ด่างปานกลาง เชื้ออยู่ได้นาน 8 สัปดาห์ และพบว่าเชื้ออยู่ได้ในระดับลึก 30 เซนติเมตร ปริมาณของเชื้อน้อยลงในระดับ 60 ถึง 75 เซนติเมตร ส่วนในระดับ 15 เซนติเมตร ไม่พบเชื้อเนื่องจากความแห้งของดินเช่นเดียวกับ Moffett *et al.* (1983) ซึ่งพบว่าในสภาพดินที่แห้งแล้งปริมาณประชากรของเชื้อไบโอวาร์ 2 และ 3 ลดลง

เชื้อ *R. solanacearum* เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ที่ระบาดทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน และเขตอบอุ่น ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งเชื้อนี้มีพืชอาศัยมากกว่า 200 สปีชีส์ มีทั้งพืชผัก เช่น แครอท พริก ถั่วต่างๆ พืชหัว เช่น มันฝรั่ง ไม้ดอกไม้ประดับ เช่น พิททุเนีย ทานตะวัน ดาวเรือง ไม้ผล เช่น แตงโม กล้วย ไม้ยืนต้น พืชสมุนไพร เช่น ขิง กระชาย ไพล ขมิ้น ข่า และวัชพืชบางชนิด (Hayward, 1994) โดยพืชที่เชื้อเจริญได้ดีอยู่ในวงศ์ Solanaceae และรองลงมาคือ Leguminoceae (Hayward, 1991) สำหรับลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไปคือ ในระยะแรกพืชจะเกิดอาการเหี่ยวในช่วงกลางวันที่มีอากาศร้อน ใบล่างเหี่ยวห้อยลง หลังจากนั้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น ใบม้วนงอลงทั้งที่ต้นยังเขียวอยู่ การพัฒนาของโรคจะเร็วมาก พืชจะเหี่ยวทั้งต้นและตายอย่างรวดเร็วในเวลา 2-3 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. โรคเหี่ยวของไพลและพืชวงศ์ขิง

โรคเหี่ยวของไพล เป็นโรคที่จัดว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของการปลูกไพลในปัจจุบัน ซึ่งได้มีการปลูกอย่างแพร่หลายในเอเชียเขตร้อน ซึ่งในประเทศไทยได้มีการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากไพลอย่างครบวงจร (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2552) โรคเหี่ยวที่เกิดกับพืชวงศ์ขิงบางชนิด เช่น ขิง พืชมีอาการในระยะเริ่มแรกหลังจากถูกเชื้อเข้าทำลาย ใบแก่ที่อยู่ตอนล่างๆ จะเหี่ยว ตกลู่ลง ต่อมาจะม้วนเป็นหลอดและเหลือง อาการจะค่อยๆ ลามจากล่างสูงขึ้นไปยังส่วนบน ในที่สุดใบจะม้วนและเหลืองแห้งทั้งต้น บริเวณโคนต้นและหน่อที่แตกออกมาใหม่จะมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ ซึ่งต่อมาจะเน่าเปื่อยหักหลุดออกมาจากแง่งโดยง่าย แต่จะไม่มีกลิ่นเหม็น เมื่อตรวจดูที่ลำต้นจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำท่ออาหาร จะถูกทำลายเป็นสีคล้ำหรือน้ำตาลเข้ม และมีเมือกของแบคทีเรียเป็นของเหลวสีขาวข้นคล้ายน้ำนมซึมออกมาตรงรอยแผลหรือรอยตัดของต้นหรือแง่งขิงที่เป็นโรค สำหรับแง่งจากต้นที่เพิ่งแสดงอาการโรคในระยะแรก หากนำขึ้นมาผ่าออกดู จะพบรอยช้ำฉ่ำน้ำเป็นปื้นๆ โดยเฉพาะแง่งที่ยังอ่อน ต่อมาอาการจะทวีความรุนแรงทำให้เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ยและสีคล้ำขึ้น อาการเหล่านี้จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในสภาพที่อากาศชื้นและร้อน ตั้งแต่เริ่มแสดงอาการจนทำให้ต้นหักพับตายจะใช้เวลา 5-7 วัน เป็นอย่างช้า (วิโรจน์ และคณะ, ม.ป.ป.) นอกจากขิงแล้วเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลขิงชนิดอื่นๆ ได้แก่ ข่า และไพล (สมศิริ และชลิดา, 2552)

ศศิธร (2525) ได้ทำการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากขิงที่เป็นโรคเหี่ยวหรือแง่งเน่า โดยใช้การทำแผลที่ราก แล้วราดเซลล์แขวนลอยเชื้อลงดินบริเวณโคนต้นพืช พบว่ามีพืช 9 ชนิดที่แสดงอาการเหี่ยวและตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 สัปดาห์ ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือยาว มันฝรั่ง พุทธรักษา ขิง ข่า กระชาย ไพล และขมิ้น ส่วนหอมหัวใหญ่แสดงอาการเหี่ยวและแห้งตาย 55 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยาสูบ ละหุ่ง และพริกขี้หนู ไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่มีเนื้อเยื่อในส่วนของท่อลำเลียงถูกทำลายบางส่วน ในงา ถั่วลิสง พริกชี้ฟ้า ถั่วพุ่ม ถั่วฝักยาว กล้วยน้ำว้า กล้วยหอม และปักษาสวรรค์ ไม่แสดงอาการผิดปกติ และไม่พบเชื้อสาเหตุโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อังสนา (2533) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และเซลล์สำหรับศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันของสายพันธุ์ขิงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว โดยศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลัน ในขิงพันธุ์ต่างๆ และ/หรือในพืชตระกูลเดียวกับขิง เช่น กระทือ ไพล ไพลดำ โดยแยกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวขิงจากแหล่งปลูกขิงในจังหวัดเลย เพชรบูรณ์ ชุมพร เชียงใหม่ เชียงราย และกรุงเทพฯ และแยกเชื้อได้ 24 สายพันธุ์ และจัดอยู่ในไบโอไทป์ 3 จำนวน 16 สายพันธุ์ และไบโอไทป์ 4 จำนวน 8 สายพันธุ์ และได้ศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันในสภาพโรงเรือน โดยฉีดเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สายพันธุ์ PB-71 ชนิด virulent, avirulent, virulent ที่ฆ่าด้วยความร้อน, *P. fluorescens*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* และน้ำกลั่น ระหว่างใบของขิงสายพันธุ์ต่างๆ ไพล กระทือ ไพลดำ และยาสูบใหญ่ พบว่าในยาสูบใบใหญ่สามารถเกิดปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันได้กับเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ PB-71 ชนิด avirulent ภายใน 18-20 ชั่วโมง และชนิด virulent ภายใน 24-30 ชั่วโมง และในขิงสายพันธุ์ต่างๆ และไพลไม่แสดงการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันของเนื้อเยื่อที่ใบกับเชื้อทุกชนิด แต่จะแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ PB-71 ชนิด virulent เท่านั้น ส่วนไพลดำและกระทือไม่แสดงอาการของโรคเลย

ปิยรัตน์ (2541) ได้ศึกษาเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา โดยสันนิษฐานว่าเชื้อที่เข้าทำลายปทุมมานั้นมาจากขิง โดยนำเชื้อจากปทุมมาปลูกลงพืชชนิดต่างๆ ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธี leaf clipping พบว่า ปทุมมา ขิง มะเขือเทศ มะเขือยาว พริก และดาวเรือง เกิดอาการเหี่ยว ยาสูบ และถั่วลิสงไม่แสดงอาการเหี่ยวแต่พบเชื้อเจริญอยู่ในลำต้น ส่วนงาไม่พบโรค นอกจากนี้ได้ศึกษาการเข้าทำลายปทุมมาของเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชอาศัยอื่นพบว่ามีเพียงเชื้อสายพันธุ์จากขิงและงา ที่ทำให้ปทุมมาเกิดโรคเหี่ยว เชื้อ *R. solanacearum*จากปทุมมาแสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์จากขิง มะเขือเทศ พริก และมันฝรั่งโดยพบว่าเชื้อ *R. solanacearum* ปทุมมาทั้งหมด 16 ไอโซเลท อยู่ใน race 1 ไบโอวาร์ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุทธนา (2543) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 111 สายพันธุ์จากพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ พริกชี้ฟ้า 3 สายพันธุ์, พริกหวาน 11 สายพันธุ์, พริกขี้หนู 10 สายพันธุ์, พริกหยวก 1 สายพันธุ์, มะเขือเทศ 26 สายพันธุ์, มะเขือยาว 5 สายพันธุ์, มะเขือเปราะ 2 สายพันธุ์, มะเขือพวง 1 สายพันธุ์, ขิง 2 สายพันธุ์, มันฝรั่ง 12 สายพันธุ์, งา 8 สายพันธุ์, ปทุมมา 17 สายพันธุ์, กระชาย 1 สายพันธุ์, ยาสูบ 1 สายพันธุ์ และถั่วลิสง 1 สายพันธุ์ ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค rep-PCR และไพรเมอร์ที่เป็น repetitive sequences 3 ชนิดคือ BOX ERIC และREP ผลการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ผลิตได้จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *R. solanacearum* มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ที่ค่า similarity มากกว่า 0.40 ขึ้นไป และ เชื้อไบโอวาร์ 3 และ 4 จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ค่า similarity 0.80 โดยเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากขิงจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์จากปทุมมา และแยกกลุ่มออกจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดอื่น

Thammakijjawat (2002) ได้นำลักษณะในระดับโมเลกุล และลักษณะของ fingerprint ของเชื้อ *R. solanacearum* ในประเทศไทยและประเทศในทวีปเอเชีย มาใช้ในการจัดจำแนกร่วมกับการศึกษาลักษณะทาง phenotype พบว่าในการศึกษาลักษณะทาง phenotype สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *R. solanacearum* จัดอยู่ใน race 1 ไบโอวาร์ 3 และ 4 ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ PCR-RFLP พบว่าสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่ม 1 อยู่ใน ไบโอวาร์ 3 แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยลงไปอีกคือ Ia ซึ่งได้มาจาก มันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกไทย ยาสูบ ดาวเรือง และถั่วลิสง และ Ib ได้มาจาก งา กลุ่ม 2 ประกอบด้วย ไบโอวาร์ 4 จากขิง และปทุมมา และ กลุ่ม 3 คือ ไบโอวาร์ 2 จากมันฝรั่ง

Villa *et al*. (2003) ได้นำเชื้อ *R. solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* และ blood disease bacterium (BDB) จากประเทศต่างๆ ทดสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 759 และ 760 และสร้าง phylogenetic tree แบ่งเชื้อได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยไบโอวาร์ 3, 4, 5 และ N2 จากญี่ปุ่น กลุ่ม 2 ประกอบด้วยไบโอวาร์ 1, 2 และ N2 จากบราซิล และกลุ่ม 3 ประกอบด้วยไบโอวาร์ N2 จากญี่ปุ่นและฟิลิปปินส์ เชื้อ *P. syzygii* และ blood disease bacterium (BDB) เมื่อทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยเอนไซม์ *Nlall* พบว่า ไบโอวาร์ 3 และ 4 ในกลุ่ม 1 ดีเอ็นเอมีขนาด 116 และ 166 คู่เบส ไบโอวาร์ 1 และ 2 ในกลุ่ม 2 ไม่พบการตัดของเอนไซม์ และกลุ่ม 3 ไบโอวาร์ N2 ดีเอ็นเอมีขนาด 54 และ 228 คู่เบส ดังนั้นเอนไซม์ *Nlall* สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ *R. solanacearum* ในระดับโมเลกุลได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yu *et al*. (2003) ได้ทำการจัดหมวดหมู่และแยกความแตกต่างของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค AFLP โดยการวิเคราะห์แรกได้คัดเลือกเชื้อ *R. solanacearum* 28 สายพันธุ์จากพืช 5 ชนิด พบว่าเชื้อสายพันธุ์จากขิงแสดงค่าความแตกต่างที่สูงคือ 0.853 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างเชื้อสายพันธุ์จากเฮลิโคเนียและขิง พบว่ามีค่าเพียง 0.165 และค่าความแตกต่างสายพันธุ์จากขิงจะน้อยกว่า สายพันธุ์เชื้อจากพืชอาศัยชนิดอื่น การวิเคราะห์ที่สองนำ *R. solanacearum* 55 สายพันธุ์จากพื้นที่ปลูกขิงที่ต่างกันมาทำการวิเคราะห์ พบว่าสายพันธุ์จากขิงมีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับสายพันธุ์จากมะเขือเทศ นอกจากนี้ในกลุ่มสายพันธุ์จากขิงยังมีความแตกต่างที่สูงด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ปลูกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีความแตกต่างกัน

3. ลักษณะทั่วไปของไพลและพืชวงศ์ขิงที่ใช้ในการทดลอง

Kingdom : Plantae

Phylum : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

Order : Zingiberaceae

ไพล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. โดยมี *Z. cassumunar* Roxb. เป็นชื่อพ้องชื่อสามัญ คือ cassumunar ginger มีชื่อเรียกแตกต่างไปตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น banglai (อินโดนีเซีย) bangle (มาเลเซีย) หรือ bolai (ลาว) สำหรับประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น ปูเลย (เหนือ) ไพล (ทั่วไป) และว่านไฟ (ภาคกลาง) ไพล เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชลงหัวมีเหง้าใหญ่ เนื้อในสีเหลือง มีกลิ่นหอม ใบเรียวยาวปลายแหลมออกดอกรวมกันเป็นช่ออยู่บนก้านช่อดอก ไพลเป็นพืชล้มลุกสูง 0.7 ถึง 1.5 เมตร มีเหง้าใต้ดิน เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองถึงเหลืองแกมเขียว แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ซึ่งประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5 ถึง 5.5 เซนติเมตร ยาว 18 ถึง 35 เซนติเมตร ดอกช่อ แทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวล ใบประดับสีม่วง ผลเป็นผลแห้งรูปกลม เหง้าไพลมีเปลือกนอกสีเหลืองอ่อน เนื้อในเหง้ามีสีเหลืองเข้ม ถึงสีส้ม มีกลิ่นหอมฉุนจำเพาะ ลำต้นเทียมสูง 1.2 ถึง 1.8 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ กาบใบ เกลี้ยง หรือมีขนใกล้ขอบใบ ลิ้นใบแยกเป็นสองพู มีขนยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ใบยาวเรียว ยาว 20 ถึง 35 เซนติเมตร กว้าง 2 ถึง 4 เซนติเมตร ใต้แผ่นใบมีขนนุ่ม ช่อดอกรูปกระสวย หรือรูปทรงกระบอกถึงรูปไข่ ยาว 10 ถึง 16 เซนติเมตร กว้าง 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร ปลายช่อดอกแหลม ช่อดอกแทงตั้งตรงจากพื้นดินก้านช่อดอกยาว 20 ถึง 25 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใบประดับ รูปไข่ ยาว 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร มีขนสั้นนุ่ม สีน้ำตาลเข้มถึงสีเขียว ใบประดับย่อยยาว 1 ถึง 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง ยาว ประมาณ 1.2 เซนติเมตร กลีบดอกยาวประมาณ 6 เซนติเมตร สีเหลืองซีด กลีบปากยาวประมาณ 6 เซนติเมตร สีเหลืองซีด กลีบกลางยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบกว้าง ปลายแยกเป็น 2 พู กลีบด้านข้างรูปขอบขนาน ไพลมีจำนวนโครโมโซม 11 คู่ (x=11 2n=22) (Guzman and Siemonsma, 1999; Triboun *et al*., 2005)

นอกจากไพลแล้วยังมีพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ ขิง ข่า กระชาย และขมิ้น ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ขิงมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (พิทยา, 2529) ปัจจุบันมีการปลูกแพร่หลายทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของทวีปเอเชีย ได้แก่ อินเดีย จีน ศรีลังกา ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ในส่วนของประเทศไทยขิงสามารถปลูกได้ทุกภาคแต่แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ในแถบภาคเหนือเขตจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ และเพชรบูรณ์ (นิรนาม, 2545) ขิง เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีนวลมีกลิ่นหอมเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบ เป็นชนิดใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันเป็นสองแถว ใบรูปหอกเกลี้ยงๆ กว้าง 1.5 ถึง 2 เซนติเมตร ยาว 12 ถึง 20 เซนติเมตร หลังใบห่อจีบเป็นรูปรางนำปลายใบสอบเรียวแหลม โคนใบสองแคบและจะเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม ตรงช่วงระหว่างกาบกับตัวใบจะหักโค้งเป็นข้อศอก ดอก สีขาว ออกรวมกันเป็นช่อรูปเห็ดหรือกระบองโบราณแทงขึ้นมาจากเหง้า ชูก้านสูงขึ้นมา 15 ถึง 25 เซนติเมตร ทุกๆ ดอกที่กาบสีเขียวปนแดงรูปโค้งห่อรองรับ กาบจะปิดแน่นเมื่อดอกยังอ่อน และจะขยายอ้าให้เห็นดอกในภายหลัง กลีบดอกและกลีบรองกลีบดอก มีอย่างละ 3 กลีบ อุ้มน้ำ และหลุดร่วงไว โคนกลีบดอกม้วนห่อ ส่วนปลายกลีบผายกว้างออกเกสรผู้มี 6 อัน ผล กลม แข็ง โต วัดผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ขิงที่ปลูกในประเทศมีหลายพันธุ์ อาจแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ขิงใหญ่ (ขิงหยวกหรือขิงขาว) ขิงประเภทนี้มีแง่งใหญ่ ข้อห่าง เนื้อละเอียด มีเสี้ยนน้อย ไม่เผ็ดมาก เนื้อมีสีเหลืองเรื่อๆ เหมาะจะทำขิงดองหรือขิงบริโภคสด อีกประเภทได้แก่ ขิงเล็กหรือขิงเม็ด แง่งเล็กสั้น ข้อถี่ เนื้อมีเสี้ยนน้อย รสค่อน ข้างเผ็ด เนื้อมีสีน้ำเงินอมเขียว นิยมใช้ทำน้ำยาสมุนไพรหรือขิงแห้ง (ทวีศักดิ์, ม.ป.ป.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข่าเป็นไม้ล้มลุกที่มีอายุยืนนานหลายปี ลำต้นลงหัวอยู่ใต้ดิน เหง้ามีสีน้ำตาลอมแสดมีเส้นแบ่งข้อช่วงสั้นๆ เนื้อในเหง้ามีสีขาวรสขมเผ็ดร้อน แต่ไม่เผ็ดเหมือนกับขิง มักมีกลิ่นหอมฉุน ข่าเป็นพืชใบเดี่ยว ใบยาวปลายใบมนขอบใบเรียบ ก้านใบยาวเป็นกาบหุ้มซ้อนกัน ดอกเป็นช่อสีขาวนวล ผลกลมสีแดงส้มมีรสเผ็ดร้อน ลักษณะภายนอกของลำต้นมีข้อ และปล้องเห็นได้ชัดเจนอยู่ใต้ดิน ส่วนที่เหนือดิน จะเป็นก้านและใบ สูงประมาณ 1 ถึง 2 เมตร พืชชนิดนี้จะเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี เพราะได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการปรุงอาหารรับประทาน (นิรนาม, ม.ป.ป.)

กระชาย เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าหรือลำต้นอยู่ใต้ดิน ซึ่งมีลักษณะเรียว ยาวอวบน้ำ ตรงกลางเหง้าจะพองคล้ายกระสวย ออกเกาะกลุ่มกันเป็นกระจุก มีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแกมส้ม เนื้อข้างในเป็นสีเหลืองมีกลิ่นหอม ใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับกัน สีค่อนข้างแดง ใบมีขนาดยาวรีรูปไข่ ปลายใบแหลมมีขนาดใหญ่สีเขียวอ่อน โคนใบเป็นกาบหุ้มซ้อนกัน ออกดอกเป็นช่อที่ยอด ดอกมีสีขาวหรือสีขาวปนชมพู ผลของกระชายเป็นผลแห้งขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า กระชายชอบดินร่วนปนทรายไม่ชอบดินแฉะ ต้องการแค่ปริมาณน้ำฝนตามธรรมชาติ ฤดูที่เหมาะกับการปลูกคือปลายฤดูแล้ง (นิรนาม, ม.ป.ป.)

ขมิ้นเป็นพืชล้มลุก สูง 0.7 ถึง 1.5 เมตร มีเหง้าใต้ดิน เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองถึงเหลืองแกมเขียว แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ซึ่งประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5 ถึง 5.5 เซนติเมตร ยาว 18 ถึง 35 เซนติเมตร ดอกช่อ แทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวล ใบประดับสีม่วง ผลเป็นผลแห้งรูปกลม ขมิ้นเป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดินเช่นเดียวกับขิงและไพล โดยมากนักจะเรียกส่วนที่เป็นลำต้นนี้ว่าเหง้า ลำต้นส่วนที่เหนือดินมีความสูง ประมาณ 1 เมตร ใบมีขนาดยาว 2 ถึง 3 ฟุต ปลายใบมน ใบมีสีเขียว ดอกมีสีขาวแกมเหลือง ขมิ้นมักจะขึ้นรวมกันอยู่เป็นกอๆ ส่วนเหง้าจะมีเนื้อ สีเหลืองจัด ถ้าเจริญในดินปนทรายจะให้เหง้ามากกว่าปลูกในดินธรรมดา เจริญได้ดีในฤดูฝน ใน แต่ละปีประเทศต่างๆ ผลิตขมิ้นได้ประมาณ 160,000 ตัน ในจำนวนนี้ผลิตจากอินเดียและบังคลาเทศถึง 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในอินเดียนั้นมีความต้องการขมิ้นเป็นอย่างมาก ขมิ้นที่ผลิตได้ในแต่ละปีจะนำไปใช้ภายในประเทศมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือนำไปขายยังสหรัฐอเมริกา ศรีลังกา และญี่ปุ่น (นิรนาม, ม.ป.ป.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อ *R. solanacearum* จากไพล

1.1 การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของไพล โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกไพลที่พบโรคจำนวน 5 ไร่จากจังหวัดนครราชสีมา (มีนาคม 2552) นำไพลที่แสดงอาการของโรคเหี่ยว มาล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้งใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่ดีกับบริเวณช้ำฉ่ำน้ำออกเป็นสี่เหลี่ยมออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร นำไปใส่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที สังเกตดูเมือกสีขาวขุ่น (ooze หรือ bacterial exudates) ไหลออกจากเนื้อเยื่อนำมาเขย่าด้วย Vortex mixer แล้วใช้ loop แตะสารละลายแขวนลอย นำไป cross streak บนอาหาร TZC (Tetrazolium Chloride Medium) (Kelman, 1954) ซึ่งเป็นอาหารกึ่งจำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ซึ่งมีลักษณะโคโลนีกลม กระจายตัวได้ดีในน้ำ มีสีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูอ่อนตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะของ Virulent strain ของ *R. solanacearum* บนอาหาร TZC และนำมา cross streak บน TZC อีก 2-3 ครั้ง เพื่อทำให้เชื้อที่ได้บริสุทธิ์เพื่อทำการศึกษาต่อไป

1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จาก ข้อ 1.1 บนอาหาร NGA นาน 24-48 ชั่วโมง และเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งเชื้อจะมีความเข้มข้นประมาณ 1×10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีทำแผลที่ราก แล้วราดเซลล์แขวนลอยเชื้อลงดินบริเวณโคนต้นพืช ชนิดเดียวกับที่แยกเชื้อมาได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร/ต้น ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น ตรวจบันทึกผลลักษณะอาการของโรค ระยะเวลาในการเกิดโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้นทำการแยกเชื้อจากต้นที่เป็นโรค (re-isolate) และปลูกเชื้อที่แยกได้นั้นลงบนต้นพืชต้นใหม่อีกครั้ง(re-inoculate) นำเชื้อที่แยกได้ไปre-streak ใหม่ บนอาหารTZC อีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อที่พิสูจน์โรคแล้วโดยการเก็บในหลอดอาหารเอียงNGA เก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2. การศึกษาลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายไพล

2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน

ทดสอบเชื้อ*R. solanacearum* ในปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันทำการทดสอบบนต้นยาสูบ โดยการเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหาร NGA นาน 24 ชั่วโมง และเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อโดยปรับความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร โดยไม่ใส่เข็มฉีดยาดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อ และฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าสู่ใบยาสูบอย่างช้าๆ ทางใต้ใบโดยจะแบ่งฉีดใบบน ใบกลาง และใบล่าง อย่างละ 3 ซ้ำ และฉีดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดลองเปรียบเทียบตรวจผลการทดสอบทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อดูความแตกต่าง และนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบในการจัดกลุ่มเชื้อ

2.2 การจำแนก Race

พืชที่ใช้ทดสอบ

Race 1 : มะเขือเทศ	-	*Lycopersicon esculentum*
Race 2 : เฮลิโคเนีย	-	*Heliconia* spp.
Race 3 : มันฝรั่ง	-	*Solanum tuberosum*
Race 4 : ขิง	-	*Zingiber officinale* Roscoe.
Race 5 : หม่อน	-	*Morus alba*

ปลูกพืชทั้ง 5 ชนิดในดินที่อบฆ่าเชื้อในกระถางพลาสติก มะเขือเทศเพาะเมล็ดก่อนแล้วจึงทำการย้ายปลูกกระถางละ 1 ต้น เฮลิโคเนีย (ก้ามกุ้ง) แยกกอแล้วปลูกกระถางละ 1 กอ มันฝรั่งและขิงปลูกกระถางละ 1 แง่ง หม่อนใช้ท่อนพันธุ์ปลูกกระถางละ 1 ท่อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำการปลูกเชื้อโดยใช้การทำแผลที่ราก แล้วราดเซลล์แขวนลอยเชื้อลงดินบริเวณต้นพืช ปริมาตร 30 มิลลิลิตร/ต้น ทำการทดลอง 10 ซ้ำต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท สังเกตผลการพัฒนาของโรค เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในการปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 เดือนแล้วนำพืชที่แสดงอาการเหี่ยว มาแยกเชื้อเพื่อตรวจยืนยันการเกิดโรค บนอาหาร TZC

2.3 การจำแนกไบโอวาร์

นำเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้มาศึกษาการจำแนกไบโอวาร์ตามวิธีของ Hayward (1964) โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อลงเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสม 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 6 ชนิด คือน้ำตาลไดแซกคาไรด์ 3 ชนิดได้แก่ maltose lactose cellobiose และน้ำตาลแอลกอฮอล์ 3 ชนิดได้แก่ mannitol sorbitol dulcitol เพื่อทดสอบการเกิด oxidative ของน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromothymol blue ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ ในอาหารทดสอบที่มีน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ นำผลไปเปรียบเทียบกับตารางจำแนกไบโอวาร์ (Hayward, 1964)

2.4 การตรวจสอบและจำแนกเชื้อ *R. solanacearum* ในระดับโมเลกุล

2.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *R. solanacearum* มาเลี้ยงบนอาหาร TZC จนเกิดโคโลนีเดี่ยว ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงบนอาหาร TTC จากนั้นย้ายเชื้อลงในเหลว Pseudo liquid (Opina *et al.,* 1997) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการสกัดดีเอ็นเอแบบ minipreparation โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและวางเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี minipreparation ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Kuo (1993) โดยแบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งไป เติม lysis buffer (40mM Tris-acetate pH7.8, 20mM sodium acetate, 1mM EDTA, 1%SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ เติม 5M NaCl ปริมาตร 66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่โดยวัดปริมาตรด้วย เติม RNAase A (เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วย chloroform ปริมาตรเท่ากับน้ำใส ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกคว่ำหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ของเหลวแยกชั้นแล้วดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตรสกัดซ้ำด้วย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่ดูดออกมาผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่วัดปริมาตร เติม 100%ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสออกแล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4.2 การจำแนกเชื้อในระดับโมเลกุล

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 759 และ 760 (Opina *et al*., 1997) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งมีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังนี้

759 (5’-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3’)

760 (5’-GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG-3’)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตรในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *R. solanacearum* 50 นาโนกรัม ผสมกับ 1X PCR buffer 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTPs, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase และไพรเมอร์ 759 และ 760 จำนวน 50 pmol แล้วเติมน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	53	1
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	72	1.30
	94	0.15
	53	0.15
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extention)	72	0.15
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extention)	72	5

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 3-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย 0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ gel star 2 ไมโครลิตร แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis (Villa *et al*., 2003)

เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากไพลซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิงจึงได้นำไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพืชวงศ์ขิงมาใช้ในการศึกษาด้วยโดยใช้ไพร์เมอร์ คือ AKIF – AKIR และ 21F – 21R (Horita *et al*., 2004) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

AKIF (5’-AACCGCACGTAAATCGTCGACA-3’)

AKIR (5’-ACGACTGCCCATTCGACGATG-3’)

21F (5’-CGACGCTGACGAAGGGACTC-3’)

21R (5’-CTGACACGGCAAGCGCTCA-3’)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตรในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *R. solanacearum* 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.5 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 200 µM dNTPs, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase และไพรเมอร์ AKIF – AKIR และ 21F – 21R จำนวน 50 pmol เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ทีละคู่ แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	5
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	61	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extention)	72	3
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extention)	72	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย 0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ gel star 2 ไมโครลิตรแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis (Villa *et al*., 2003) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป DNAstar และChromas ของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลในการก่อให้เกิดโรคในพืชวงศ์ขิงและพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ

3.1 พืชที่ใช้ทดลอง

ใช้พืชทดลอง 8 ชนิด และไพลซึ่งเป็นพืชอาศัย โดยพืช 8 ชนิดอยู่ใน 4 วงศ์ดังนี้

3.1.1 วงศ์ : Zingiberaceae

ขิง (edible ginger) - *Zingiber officinale* Roscoe.

ข่า (galangal) - *Alpinia galanga* Swartz.

กระชาย (boesenbergia) - *Boesenbergia pandurata* (Boxb.) S.

ขมิ้น (turmeric) - *Curcuma domestica* Valeton.

3.1.2 วงศ์ : Solanaceae

มะเขือเทศ (tomato) - *Lycopersicon esculentum*

พันธุ์สีดาทิพย์ 4

พริกชี้ฟ้า (chili spur peper) - *Capsicum annuum* Linn.

พริกมันบางช้าง TVRC 365

3.1.3 วงศ์ : Fabaceae

ถั่วลิสง (groundnut) - *Arachis hypogaea* L.

3.1.4 วงศ์ : Euphobiaceae

ยางพารา (para rubber) - *Hevea brasiliensis*

ปลูกพืชทั้ง 8 ชนิด และพืชอาศัยคือไพลในดินที่อบฆ่าเชื้อในกระถางพลาสติก มะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าจะเพาะเมล็ดก่อนแล้วจึงทำการย้ายปลูกกระถางละ 1 ต้น จนอายุ 1 เดือน ถั่วลิสงใช้เมล็ดปลูกกระถางละ 1 เมล็ด จนอายุ 2 เดือน ยางพาราจะใช้ต้นยางชำถุงอายุ 2 เดือน ปลูกลงกระถางละ 1 ต้น ส่วน ขิง ข่า กระชาย ไพล ขมิ้น ทำการปลูกกระถางละ 1 แง่ง จนอายุ2 เดือน โดยทดลอง 8 ซ้ำต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท การทดลองกับพืชแต่ละชนิดทำไม่พร้อมกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* บนอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อลงในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อและปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ได้ไปปลูกเชื้อ

3.3 การปลูกเชื้อ

ทำการปลูกเชื้อโดยใช้การทำแผลที่ราก แล้วราดเซลล์แขวนลอยเชื้อลงดินบริเวณโคนต้นพืชปริมาตร 30 มิลลิลิตร/ต้น โดยทดลอง 8 ซ้ำต่อเชื้อ 1 ไอโซเลทสังเกตผลการพัฒนาของโรคเปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในการปลูกเชื้อบันทึกผลทุก 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำพืชที่แสดงอาการเหี่ยวมาแยกเชื้อเพื่อตรวจยืนยันการเกิดโรค บนอาหาร TZC และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม R stat version 0.2.9

ประเมินระดับการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค โดยให้ระดับคะแนนดังนี้

การเกิดโรคโดยดัดแปลงจาก Winstead and Kelman (1952)

0 หมายถึง ไม่แสดงอาการผิดปกติ

1 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลือง 1-2 ใบ

2 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวมากกว่า 2 ใบ แต่น้อยกว่าครึ่งต้น

3 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลือง เกือบทั้งหมดยกเว้นยอด

4 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลืองทั้งต้น

5 หมายถึง ต้นพืชตาย

ความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค (He *et al*., 1983)

H หมายถึง เกิดโรครุนแรง (ระดับการเกิดโรค 4.1-5.0)

M หมายถึง เกิดโรครุนแรงปานกลาง (ระดับการเกิดโรค 2.6-4.0)

L หมายถึง เกิดโรครุนแรงต่ำ (ระดับการเกิดโรค 1.0-2.5)

O หมายถึง ไม่แสดงอาการเกิดโรค (ระดับการเกิดโรค 0-0.9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ A411 เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

โรงเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การแยกเชื้อ *R. solanacearum* จากไพล

1.1 การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

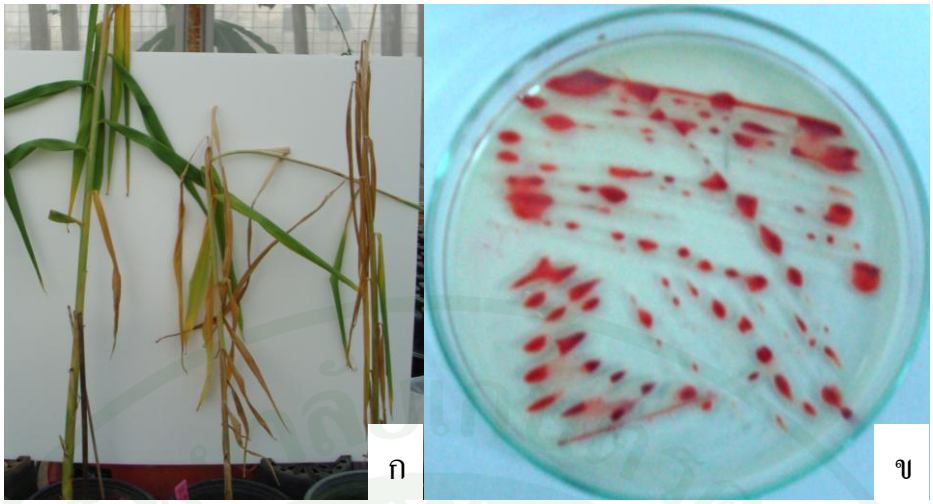
การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของไพล โดยต้นที่เป็นโรคจะแสดงอาการเหี่ยว ใบม้วนลู่ลง เริ่มเหลือง โคนต้นเน่าหักพับ และต้นมีลักษณะแห้งตาย เมื่อตัดลำต้นจะพบว่าลำต้นมีลักษณะช้ำ ในส่วนของแง่งจะมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ สีน้ำตาล เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหาร TZC ได้เชื้อที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม ขาวขุ่นมีสีชมพูตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* (ภาพที่ 1) นำเชื้อที่ได้มา cross streak บน TZC อีก 2-3 ครั้ง

ในการทดลองนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของไพล ได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชอื่นจาก ผศ.ดร. ชลิดา เล็กสมบูรณ์ มาทำการทดสอบเปรียบเทียบ ได้แก่ RS21 จากขิง RS40 จากกระชาย RS1/3 จากพริก และT160 จากมะเขือเทศ

1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อที่แยกจากไพลทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถทำให้ไพลแสดงอาการเหี่ยวภายใน 7-14 วัน โดยอาการเริ่มแรกหลังการปลูกเชื้อนั้นจะเริ่มจากใบล่างของต้นพืชจะเริ่มเหลือง ม้วน และเหี่ยวลู่ลง อาการดังกล่าวเริ่มแสดงที่ใบบนจากนั้นใบก็จะแห้งเป็นสีน้ำตาล โคนต้นหักพับ และตายในที่สุด เมื่อตรวจสอบบริเวณแง่งในไพล พบอาการช้ำฉ่ำน้ำ มีกลิ่นค่อนข้างแรง ภายในจะเห็นเนื้อเยื่อเป็น สีน้ำตาลมีของเหลวสีขาวคล้ายน้ำนมซึมอยู่ เนื่องจากท่อน้ำถูกทำลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 โรคเหี่ยวของไพลที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*
ก. อาการของไพลที่เป็นโรคใบจะม้วนเหลือง เหี่ยว และแห้งตาย
ข. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* บนอาหารกึ่งจำเพาะ TZC (Tetrazolium Chloride Medium)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกจากไพล

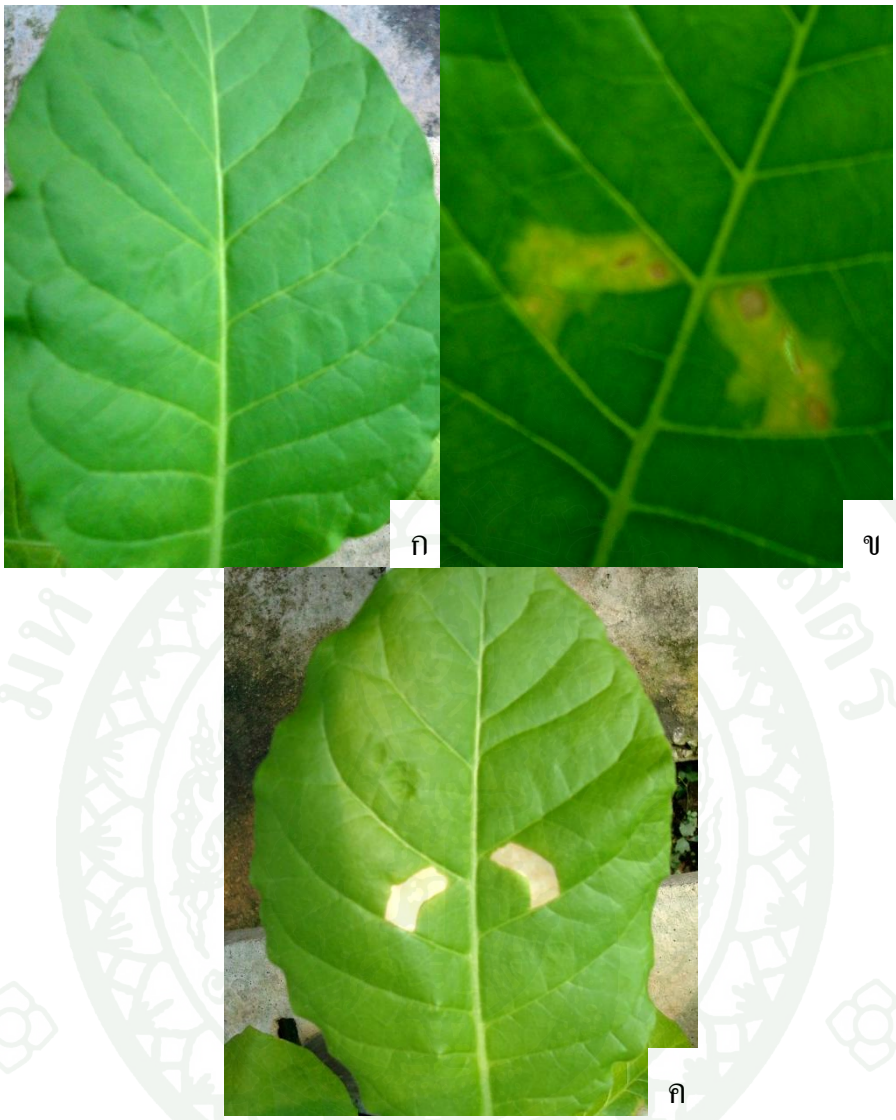
2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน

การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน หลังจากทำการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และจากพืชชนิดอื่น 4 ไอโซเลท บนใบยาสูบพบว่าภายใน 18-24 ชั่วโมงเนื้อเยื่อใบยาสูบเริ่มมีอาการยุบตัว และ 36-48 ชั่วโมง ใบยาสูบเกิดอาการไหม้แห้งตายเป็นสีน้ำตาลบริเวณที่ฉีดเซลล์แขวนลอย (ภาพที่ 2) โดยทุกไอโซเลทเกิดอาการแห้งตายที่ 36 ชั่วโมง ยกเว้นไอโซเลท C9/1 เกิดอาการแห้งตายที่ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

2.2 การจำแนก Race และไบโอวาร์

การจัดจำแนก race พบว่าเชื้อไอโซเลทจากไพลทั้ง 9 ไอโซเลท และเชื้อ RS21 จากขิง RS40 จากกระชายจัดอยู่ใน race 4 โดยสามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์ Zingiberaceae และไม่ทำให้พืชชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบความเป็นโรคคือ พริก เฮลิโคเนีย มันฝรั่ง และหม่อน (ตารางที่ 3) เมื่อจำแนกไบโอวาร์จากการทดสอบการใช้น้ำตาล พบว่าเชื้อไอโซเลท C11/1 และ C23/1 สามารถใช้น้ำตาล mannitol sorbitol และdulcitol ได้ แต่ไม่ใช้น้ำตาล maltose lactose และ cellobiose จัดอยู่ในไบโอวาร์ 4 ส่วนไอโซเลท C5/1, C6/1, C8/2, C9/1, C11/1, C13/1 และ C23/1 สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง 6 ชนิด จัดอยู่ในไบโอวาร์ 3 และเชื้อที่ใช้เปรียบเทียบคือ RS21 และ RS40 อยู่ในไบโอวาร์ 4 เชื้อ RS1/3 และ T160 อยู่ในไบโอวาร์ 3 (ภาพที่ 3 และตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน (Hypersensitive reaction) บนใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)

ก. ฉีดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (เปรียบเทียบ)

ข. ฉีดด้วยเชื้อ *Ralstonia solanacearum* เนื้อเยื่อยุบตัว ที่ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

ค. ฉีดด้วยเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งแสดงเป็นแผลไหม้ ที่ระยะเวลา 36-48 ชั่วโมง

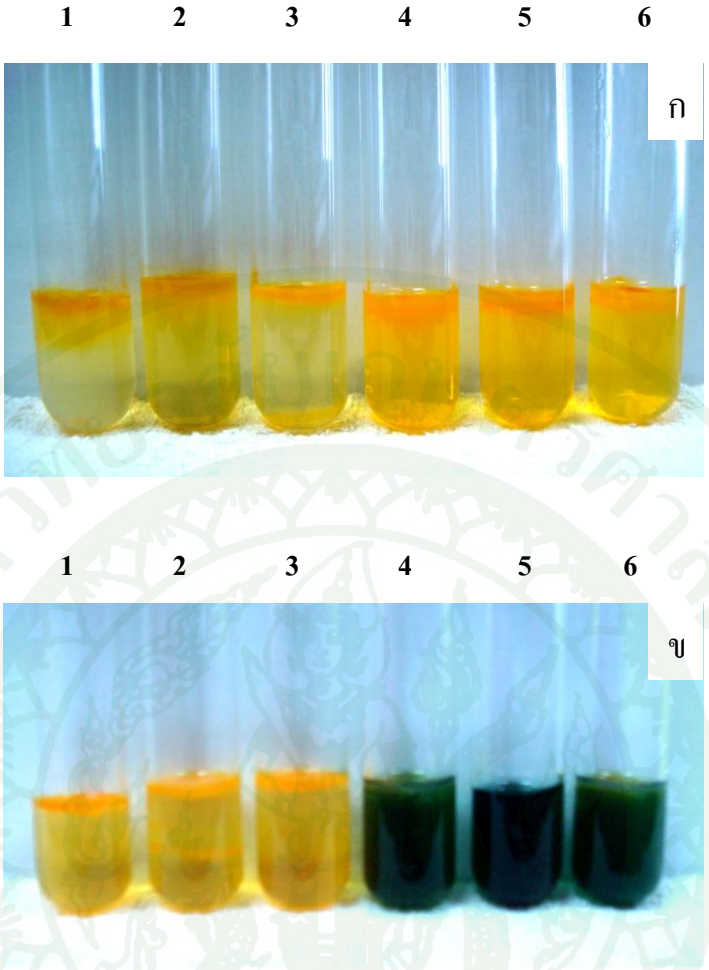
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันของยาสูบกับไอโซเลทเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพลและพืชชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ

ไอโซเลท	พืชอาศัย	ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนอง [1]	
		เนื้อเยื่อพืชยุบตัว	เนื้อเยื่อพืชแห้งตาย
C5/1	ไพล	24	36
C6/1	ไพล	24	36
C7/1	ไพล	24	36
C8/2	ไพล	24	36
C9/1	ไพล	18	48
C11/1	ไพล	24	36
C13/1	ไพล	24	36
C19/1	ไพล	18	36
C23/1	ไพล	24	36
RS21	ขิง	24	36
RS40	กระชาย	24	36
RS1/3	พริก	18	36
T160	มะเขือเทศ	18	36

[1] จากการบันทึกผลทุกๆ 6 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 การทดสอบไบโอวาร์ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

1 – 6 คือ อาหาร mineral medium ที่มีน้ำตาล maltose lactose cellobiose manitol sobitol และ dulcitol ปฏิกิริยาบวกเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ก. ไบโอวาร์ 3 ใช้น้ำตาล maltose lactose cellobiose manitol sobitol และ dulcitol

ข. ไบโอวาร์ 4 ใช้น้ำตาล manitol sobitol และdulcitol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 การจำแนก Race ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล โดยการทดสอบการเกิดโรคบนพืชทดสอบ

ไอโซเลทเชื้อ	พืชอาศัย	พืชทดสอบ					Race[1]
		พริก	เฮลิโคเนีย	มันฝรั่ง	ขิง	หม่อน	
C5/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C6/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C7/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C8/2	ไพล	-	-	-	+	-	4
C9/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C11/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C13/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C19/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
C23/1	ไพล	-	-	-	+	-	4
RS21	ขิง	-	-	-	+	-	4
RS40	กระชาย	-	-	-	+	-	4
RS1/3	พริก	+	-	-	-	-	1
T160	มะเขือเทศ	+	-	-	-	-	1

[1] จัดแบ่งตาม Hayward (1964)

+ คือ ปรากฏอาการโรค

- คือ ไม่ปรากฏอาการโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 การจำแนกไบโอวาร์ของไอโซเลทเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล

ไอโซเลทเชื้อ	การใช้น้ำตาล						ไบโอวาร์
	maltose	lactose	cellobiose	mannitol	sorbitol	dulcitol	
C5/1	+[1]	+	+	+	+	+	3
C6/1	+	+	+	+	+	+	3
C7/1	+	+	+	+	+	+	3
C8/2	+	+	+	+	+	+	3
C9/1	+	+	+	+	+	+	3
C11/1	-	-	-	+	+	+	4
C13/1	+	+	+	+	+	+	3
C19/1	+	+	+	+	+	+	3
C23/1	-	-	-	+	+	+	4
RS21	-	-	-	+	+	+	4
RS40	-	-	-	+	+	+	4
RS1/3	+	+	+	+	+	+	3
T160	+	+	+	+	+	+	3

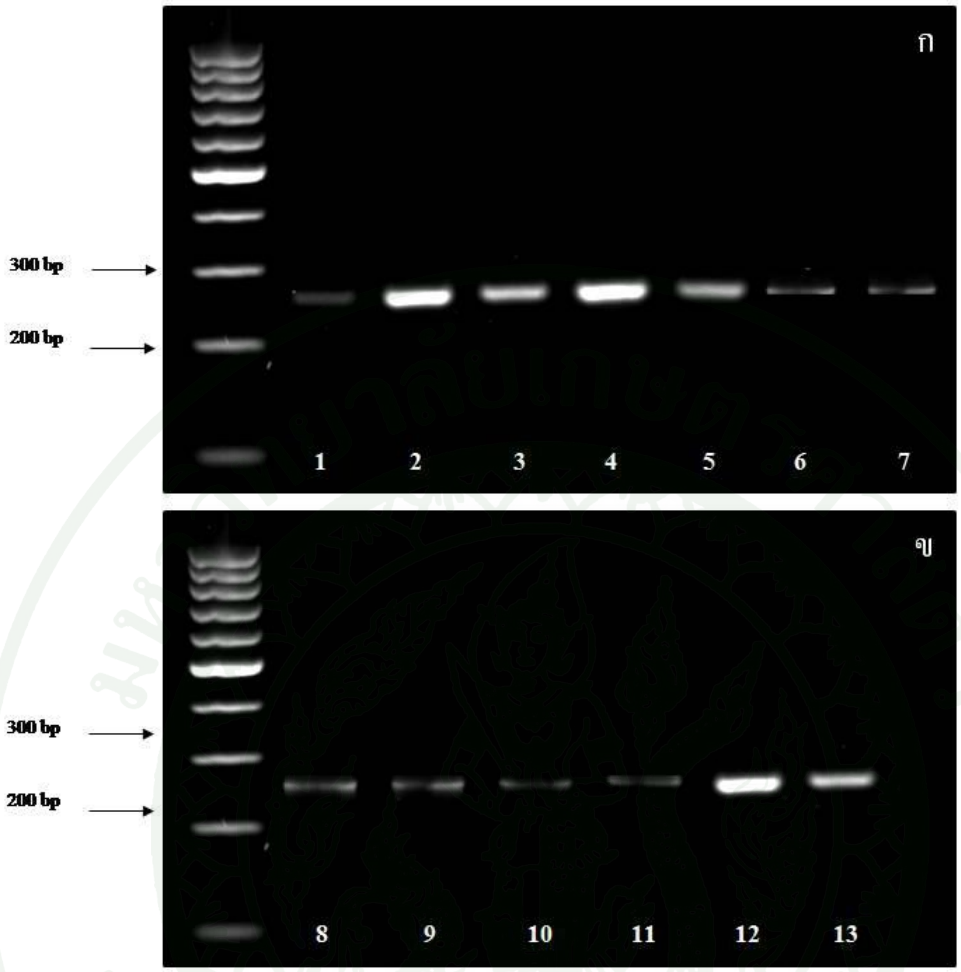
[1] + คือ ใช้น้ำตาล
- คือ ไม่ใช้น้ำตาล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การตรวจสอบและจำแนกเชื้อ *R. solanacearum* ในระดับโมเลกุล

เมื่อนำดีเอ็นเอเชื้อ *R. solanacearum* ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี minipreparation มาตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 759 และ 760 พบว่าเชื้อจากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อจากพืชชนิดอื่น 4 ไอโซเลทให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 281 bp (ภาพที่ 4) มีขนาดเท่ากับเชื้อ *R. solanacearum* จึงสามารถยืนยันได้ว่าทุกไอโซเลทเป็นเชื้อ *R. solanacearum* และเมื่อนำไอโซเลทเชื้อที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท C5/1, C6/1, C7/1, C8/2, C9/1 C11/1, C13/1, C19/1 และ C23/1 จากไพล ไอโซเลท RS21 และ RS40 จากขิงและกระชาย มาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AKIF – AKIR และ 21F – 21R ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* race 4 ซึ่งเข้าทำลายพืชวงศ์ขิง พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ 21F – 21R ส่วนไพรเมอร์ AKIF – AKIR พบแถบดีเอ็นเอขนาด 165 bp เฉพาะไอโซเลท C5/1, C9/1 และ C13/1 ส่วนอีก 6 ไอโซเลทไม่ให้แถบดีเอ็นเอ สำหรับไอโซเลท RS21 จากขิง และ RS40 จากกระชายให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 165 bp (ภาพที่ 5) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทที่พบแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเหมือนกัน 100% (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

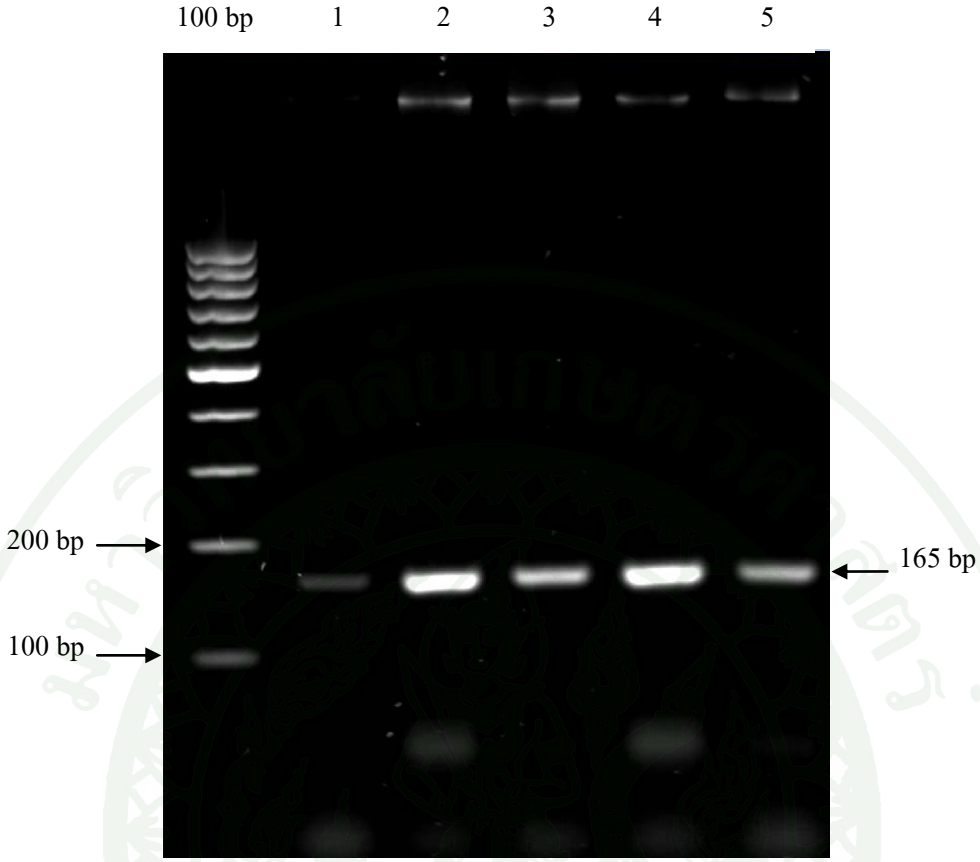


ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 759 – 760 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ

ก. (1) C5/1 ; (2) C6/1 ; (3) C7/1 ; (4) C8/2 ; (5) C9/1 ; (6) 11/1 ; (7) 13/1

ข. (8) C19/1 ; (9) C23/1 ; (10) RS21 ; (11) RS40 ; (12) RS1/3 ; (13) T160

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AKIF – AKIR กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ
(1) RS21 ; (2) RS40 ; (3) C5/1 ; (4) C13/1 ; (5) C9/1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้ของเชื้อ *R. solanacearum* 5 ไอโซเลท ได้แก่ RS21 จากขิง RS40 จากกระชาย C5/1, C9/1 และC13/1 จากไพล ดังนี้

RS21

AACCGCACGTAAATCGTCGACAATCCAGACCTGTAACCGCACGGAGGTTGACATGTC
CCGCGAATCCGAGTGGATCAAGGTAATCCTTCACAGCGAATTTCCCGATGACGTTGA
ATTTCGCGAGGGCAGCCTGCCAAACCACGTCATCGTCGAATGGGCAGTCGT

RS40

AACCGCACGTAAATCGTCGACAATCCAGACCTGTAACCGCACGGAGGTTGACATGTC
CCGCGAATCCGAGTGGATCAAGGTAATCCTTCACAGCGAATTTCCCGATGACGTTGA
ATTTCGCGAGGGCAGCCTGCCAAACCACGTCATCGTCGAATGGGCAGTCGT

C5/1

AACCGCACGTAAATCGTCGACAATCCAGACCTGTAACCGCACGGAGGTTGACATGTC
CCGCGAATCCGAGTGGATCAAGGTAATCCTTCACAGCGAATTTCCCGATGACGTTGA
ATTTCGCGAGGGCAGCCTGCCAAACCACGTCATCGTCGAATGGGCAGTCGT

C9/1

AACCGCACGTAAATCGTCGACAATCCAGACCTGTAACCGCACGGAGGTTGACATGTC
CCGCGAATCCGAGTGGATCAAGGTAATCCTTCACAGCGAATTTCCCGATGACGTTGA
ATTTCGCGAGGGCAGCCTGCCAAACCACGTCATCGTCGAATGGGCAGTCGT

C13/1

AACCGCACGTAAATCGTCGACAATCCAGACCTGTAACCGCACGGAGGTTGACATGTC
CCGCGAATCCGAGTGGATCAAGGTAATCCTTCACAGCGAATTTCCCGATGACGTTGA
ATTTCGCGAGGGCAGCCTGCCAAACCACGTCATCGTCGAATGGGCAGTCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลในการก่อให้เกิดโรคในพืชวงศ์ขิง และพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ

การตอบสนองของพืชวงศ์ขิง และพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ 8 ชนิด คือ ขิง, ข่า, กระชาย, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และ ยางพารา กับเชื้อ *R. solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชชนิดอื่น4 ไอโซเลท เพื่อเป็นเชื้อเปรียบเทียบรวมทั้งหมด 13 ไอโซเลท โดยการปลูกเชื้อลงพืชทดสอบด้วยวิธีการตัดรากแล้วราดเซลล์แขวนลอยเชื้อลงดินที่ความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร บันทึกผลทุก 7 วันเป็นเวลา1 เดือน พบว่าเชื้อ*R. solanacearum* ทุกไอโซเลทที่แยกได้สามารถเข้าทำลายขิงได้ในระดับรุนแรง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 98-100 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชแสดงอาการเหี่ยวจากใบล่าง บริเวณโคนต้นมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ หักพับและตายในที่สุดที่ค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 5.0 โดยมีเพียงไอโซเลท C6/1 เท่านั้น ที่มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 4.9

การเกิดโรคในข่าพบว่า เชื้อ *R. solanacearum* จากไพล มีเพียง 3 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ ไอโซเลทC7/1, C8/2 และ C13/1 โดยมีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค1.6, 0.8 และ 0.8 ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับต่ำ โดยไอโซเลท C7/1 ทำให้ข่าเกิดโรค 32 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท C8/2 และ C13/1 สามารถ ทำให้ข่าเกิดโรคเพียง 16 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งข่าแสดงอาการเพียงเล็กน้อยคือใบห่อเข้าหาลำต้นและค่อยๆเหี่ยว แต่บริเวณโคนต้นจะไม่หักพับ และอาการที่เกิดขึ้นจะปรากฏให้เห็นช้าเมื่อเปรียบเทียบกับอาการที่เกิดในขิง ส่วนเชื้อเปรียบเทียบ 4 ไอโซเลทไม่ทำให้ข่าเป็นโรค

การเกิดโรคในกระชายสามารถแบ่งระดับการเกิดโรคออกเป็นกลุ่มโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังนี้ กลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระดับรุนแรงโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค88-100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลทC8/2, C13/1 และ C19/1 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 5.0, 5.0 และ 4.4 ตามลำดับ กลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระดับปานกลาง โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 60-62 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ไอโซเลท C5/1, C7/1 และ C23/1 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 3.1, 3.0 และ 3.1 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่ไม่ทำให้กระชายเกิดโรคได้แก่ C6/1, C9/1, C11/1, RS1/3 และ T160 โดยกระชายจะแสดงอาการใบห่อม้วนเข้าหาลำต้น และต้นจะค่อยๆเหี่ยว ในต้นที่แสดงอาการรุนแรงตรงบริเวณโคนต้นจะมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ ทำให้ต้นหักพับและตาย โดยไอโซเลทเปรียบเทียบพบว่าไอโซเลทRS40 ทำให้เกิดโรคในระดับปานกลางคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค80 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 4.0 ไอโซเลท RS21 ทำให้เกิดโรคในระดับต่ำคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเกิดโรค 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 2.4 ส่วนไอโซเลท RS1/3 และ T160 ไม่ทำให้กระชายเกิดโรค

การเกิดโรคในไพลซึ่งเป็นพืชอาศัยสามารถแบ่งเชื้อตามระดับการเกิดโรคออกเป็นกลุ่ม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังนี้ กลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระดับรุนแรง ได้แก่ ไอโซเลท C6/1, C7/1, C8/2 C11/1 และ C13/1 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 4.5, 4.4, 4.4, 4.3 และ 4.9 ตามลำดับมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 88-100 เปอร์เซ็นต์กลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระดับปานกลาง ได้แก่ ไอโซเลท C5/1, C19/1 และ C23/1 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 3.5, 3.0 และ 3.1 ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 75-100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่เกิดโรคในระดับต่ำได้แก่ ไอโซเลท C9/1 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 1.5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 63 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทเปรียบเทียบได้แก่ RS21 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 3.5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ RS40 มีค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค 1.8 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 50 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่ไม่ทำให้ไพลเกิดโรคได้แก่ RS1/3 และ T160 ส่วนขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา ทุกต้นที่ปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ทั้ง 9 ไอโซเลทจากไพล และ 2 ไอโซเลทจาก ขิง กระชายที่ใช้เปรียบเทียบไม่แสดงอาการโรค ส่วนไอโซเลทจากพริก และมะเขือเทศที่ใช้เปรียบเทียบนั้น พบว่าไอโซเลทจากพริกไม่สามารถทำให้ขมิ้น, ถั่วลิสง และ ยางพาราเกิดโรค ส่วนไอโซเลทจากมะเขือเทศไม่ทำให้ขมิ้น, พริก, ถั่วลิสง และ ยางพาราเกิดโรค (ตารางที่ 5 ตารางที่ 6 และตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ระดับการเกิดโรคของขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3) และมะเขือเทศ(T160) หลังปลูกเชื้อ 28 วัน

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยระดับการเกิดโรค								
	ขิง	ข่า	กระชาย	ไพล	ขมิ้น	พริก	มะเขือเทศ	ถั่วลิสง	ยางพารา
C5/1	5.0a[1]	0b	3.1bc	3.5bcd	0	0b	0b	0	0
C6/1	4.9b	0b	0.0d	4.5ab	0	0b	0b	0	0
C7/1	5.0a	1.6a	3.0bc	4.4abc	0	0b	0b	0	0
C8/2	5.0a	0.8ab	5.0a	4.4abc	0	0b	0b	0	0
C9/1	5.0a	0b	0.8d	1.5f	0	0b	0b	0	0
C11/1	5.0a	0b	0.0d	4.3abcd	0	0b	0b	0	0
C13/1	5.0a	0.8ab	5.0a	4.9a	0	0b	0b	0	0
C19/1	5.0a	0b	4.4a	3.0de	0	0b	0b	0	0
C23/1	5.0a	0b	3.1bc	3.1cd	0	0b	0b	0	0
RS21	5.0a	0b	2.4c	3.5bcd	0	0b	0b	0	0
RS40	5.0a	0b	4.0ab	1.8ef	0	0b	0b	0	0
RS1/3	5.0a	0b	0d	0g	0	4.8a	5.0a	0	0
T160	5.0a	0b	0d	0g	0	0b	5.0a	0	0

[1] วิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม R stat version 0.2.9 ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์แสดงว่าไม่มีค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อ a>b>c>d>e>f>g

การเกิดโรคโดยดัดแปลงจาก Winstead and Kelman (1952)

0 หมายถึง ไม่แสดงอาการผิดปกติ

1 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลือง 1-2 ใบ

2 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือมากกว่า 2 ใบ แต่น้อยกว่าครึ่งต้น

3 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลือง เกือบทั้งหมดยกเว้นยอด

4 หมายถึง พืชแสดงอาการเหี่ยวหรือเหลืองทั้งต้น

5 หมายถึง ต้นพืชตาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ความรุนแรงของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3), และมะเขือเทศ(T160) ในการทำให้เกิดโรคกับขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา หลังปลูกเชื้อ 28 วัน

ไอโซเลท	ความรุนแรงของโรค								
	ขิง	ข่า	กระชาย	ไพล	ขมิ้น	พริก	มะเขือเทศ	ถั่วลิสง	ยางพารา
C5/1	H	O	M	M	O	O	O	O	O
C6/1	H	O	O	H	O	O	O	O	O
C7/1	H	L	M	H	O	O	O	O	O
C8/2	H	O	H	H	O	O	O	O	O
C9/1	H	O	O	L	O	O	O	O	O
C11/1	H	O	O	H	O	O	O	O	O
C13/1	H	O	H	H	O	O	O	O	O
C19/1	H	O	H	M	O	O	O	O	O
C23/1	H	O	M	M	O	O	O	O	O
RS21	H	O	L	M	O	O	O	O	O
RS40	H	O	M	L	O	O	O	O	O
RS1/3	H	O	O	O	O	H	H	O	O
T160	H	O	O	O	O	O	H	O	O

ความรุนแรงของโรค (He *et al*., 1983)

H หมายถึง เกิดโรครุนแรง (ระดับการเกิดโรค 4.1-5.0)

M หมายถึง เกิดโรครุนแรงปานกลาง (ระดับการเกิดโรค 2.6-4.0)

L หมายถึง เกิดโรครุนแรงต่ำ (ระดับการเกิดโรค 1.0-2.5)

O หมายถึง ไม่แสดงอาการเกิดโรค (ระดับการเกิดโรค 0-0.9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของขิง, ข่า, กระชาย, ไพล, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพล 9 ไอโซเลท และเชื้อเปรียบเทียบจากขิง(RS21), กระชาย(RS40), พริก(RS1/3) และมะเขือเทศ(T160) หลังปลูกเชื้อ 28 วัน

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค								
	ขิง	ข่า	กระชาย	ไพล	ขมิ้น	พริก	มะเขือเทศ	ถั่วลิสง	ยางพารา
C5/1	100	0	62	75	0	0	0	0	0
C6/1	98	0	0	100	0	0	0	0	0
C7/1	100	32	60	100	0	0	0	0	0
C8/2	100	16	100	100	0	0	0	0	0
C9/1	100	0	16	63	0	0	0	0	0
C11/1	100	0	0	88	0	0	0	0	0
C13/1	100	16	100	100	0	0	0	0	0
C19/1	100	0	88	88	0	0	0	0	0
C23/1	100	0	62	100	0	0	0	0	0
RS21	100	0	48	100	0	0	0	0	0
RS40	100	0	80	50	0	0	0	0	0
RS1/3	100	0	0	0	0	100	96	0	0
T160	100	0	0	0	0	0	100	0	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

จากการศึกษา ไพลที่เป็นโรคเหี่ยว พบว่าต้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวใบม้วนลู่ลง เริ่มเหลือง โคนต้นเน่าหักพับ และบางต้นมีลักษณะแห้งตาย เมื่อตัดลำต้นพบว่าลำต้นมีลักษณะช้ำ ในส่วนของแง่งมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ สีน้ำตาล เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหาร TZC ได้โคโลนีเชื้อเป็นเมือกเยิ้ม สีขาวขุ่น มีสีชมพูตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อที่มีความรุนแรง Kelman(1954) พบว่าอาหาร TZC จัดเป็นอาหารแยกความแตกต่าง สามารถแยกลักษณะโคโลนีได้ 2 ชนิดคือ โคโลนีที่มีลักษณะค่อนข้างเยิ้ม รูปร่างไม่แน่นอนหรือกลมรี สีขาวครีม ตรงกลางโคโลนีมีสีแดงอมชมพู จัดเป็นเชื้อที่รุนแรง ส่วนโคโลนีกลมสีแดงเข้ม และมีขอบโคโลนีสีใส จัดเป็นเชื้อที่ไม่รุนแรง Husain and Kelman (1958) ศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตเมือก (slime) ที่มีผลต่อกลไกการเหี่ยวและการเกิดโรคของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรครุนแรงจะผลิตเมือกขึ้นรอบๆ โคโลนี ตรงกลางโคโลนีมีลักษณะเยิ้มเป็นสีชมพู ต่างจากเชื้อที่ไม่รุนแรงซึ่งโคโลนีที่ได้มีสีแดงเข้ม และมีไม่สารเมือกรอบโคโลนี

จากการทดลองสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท เมื่อทำการพิสูจน์โรคโดยการปลูกเชื้อกับไพลที่เป็นพืชอาศัย พบว่าเชื้อทุกไอโซเลททำให้ไพลแสดงอาการ ใบม้วนลู่ลง เริ่มเหลือง โคนต้นหักพับภายในเวลา 7-14 วัน และตายภายใน 1 เดือน การแสดงอาการเหลืองในพืชวงศ์ขิง หลังการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* มีรายงานโดย Anderson and Gardner (1999) ซึ่งได้ทดสอบการก่อโรคของเชื้อก่อโรคเหี่ยวในขิงที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* โดยทดลองกับต้นขิงอายุ 8 สัปดาห์ ที่ปลูกด้วยหัวพันธุ์ปลูกเชื้อโดยวิธีตัดรากใช้ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเทราดลงไปบนหัวพันธุ์อีก 10 มิลลิลิตร พบว่าวันที่ 5-10 คลอโรฟิลล์จะถูกทำลาย หลังจากนั้นจะแสดงอาการเหี่ยวเหลืองใน 4 สัปดาห์ ส่วนในสัปดาห์ที่ 5-6 จะทำให้หัวพันธุ์เน่าเละ และตายลงในสัปดาห์ที่ 8-10 แสดงว่าไพลแสดงอาการใบเหลืองหลังการปลูกเชื้อ เกิดจากคลอโรฟิลล์ถูกทำลาย ซึ่งอาการใบเหลืองเป็นอาการที่พบในสภาพธรรมชาติในพืชวงศ์ขิงเมื่อถูกเชื้อ *R. solanacearum* เข้าทำลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันเชื้อ *R. solanacearum* ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากไพล ทำให้ใบยาสูบเกิดอาการไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลตรงบริเวณที่ฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าไปภายในเวลา 36 – 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาพบว่าไอโซเลท C9/1 ทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลัน โดยทำให้เกิดอาการไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าไอโซเลทอื่นและเมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อในการทำให้เกิดโรคกับไพล พบว่าไอโซเลท C9/1 ทำให้ไพลเกิดโรคในระดับต่ำโดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดโรคเท่ากับ 1.5 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Dhital *et al*. (2000) ซึ่งทำการศึกษาความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* ในการทำให้เกิดโรคเปรียบเทียบกับความรุนแรงของเชื้อ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* 15 สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันฝรั่งมีจำนวน 13 สายพันธุ์ ที่ทำให้ใบยาสูบเกิดอาการไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลที่ 48 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับความรุนแรงของเชื้อ เชื้อทั้ง 13 สายพันธุ์ สามารถทำให้มันฝรั่งเกิดโรคในระดับปานกลางถึงระดับรุนแรง ส่วนสายพันธุ์ KD 17 และ SA 1 ที่ไม่เกิดอาการไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลก็สามารถทำให้มันฝรั่งเกิดโรคได้ในระดับปานกลาง

จากการศึกษาเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในประเทศไทยพบว่าจัดอยู่ในไบโอวาร์ 3 และ 4 ซึ่ง Titatarn (1986) ได้นำเชื้อที่แยกได้จากมะเขือเทศ, พริก, งา, มะเขือ, ยาสูบ และ ขิง มาทดสอบไบโอวาร์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวในประเทศไทยอยู่ในไบโอวาร์ 3 และ 4 โดยเชื้อจากขิงมีสัดส่วนเป็นไบโอวาร์ 3 มากกว่าไบโอวาร์ 4 และจากรายงานประจำปีของสถาบันวิจัยพืชสวน (2534) ได้ทำการสุ่มตัวอย่างโรคเหี่ยวของขิงเนื่องจากเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพธรรมชาติจากแปลงปลูกนำมาเปรียบเทียบไบโอวาร์พบว่าจัดเป็นเชื้อไบโอวาร์ 3 และ 4 และมีสัดส่วนเป็นไบโอวาร์ 3 มากกว่าไบโอวาร์ 4 อังสนา (2533) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และเซลล์สำหรับศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันของสายพันธุ์ขิงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว โดยแยกเชื้อได้ 24 สายพันธุ์ และจัดอยู่ในไบโอไทป์ 3 จำนวน 16 สายพันธุ์ และไบโอไทป์ 4 จำนวน 8 สายพันธุ์ ศุทธนา (2543) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ได้แก่ พริก, มะเขือเทศ, มะเขือยาว, ขิง, มันฝรั่ง, งา, ปทุมมา, กระชาย, ยาสูบ และถั่วลิสง พบว่าเชื้อทั้งหมดจัดอยู่ใน race 1 ไบโอวาร์ 3 และ 4 โดยเชื้อจากขิง 12 ไอโซเลทเป็นไบโอวาร์ 3 จำนวน 10 ไอโซเลท และไบโอวาร์ 4 เพียง 2 ไอโซเลท ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน 2 ไบโอวาร์ คือ ไบโอวาร์ 3 จำนวน 7 ไอโซเลท และไบโอวาร์ 4 จำนวน 2 ไอโซเลท สอดคล้องกับรายงานเชื้อจากขิงดังกล่าวข้างต้น ที่ส่วนมากเชื้อที่พบจะเป็นไบโอวาร์ 3 มากกว่าไบโอวาร์ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจาก *R. solanacearum* เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างอยู่ใน 50 วงศ์ 200 ชนิด ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการจัดการโรค การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาพืชอาศัยเพื่อจำแนก race ของเชื้อจากไพล พบว่าเชื้อไอโซเลทจากไพล สามารถเข้าทำลายขิงซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกันได้และไม่ทำให้ พริก ก้ามกุ้ง มันฝรั่ง และหม่อนเกิดอาการเหี่ยวจึงจัดอยู่ใน race 4 และเมื่อทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *R. solanacearum* จากไพลในการก่อให้เกิดโรคในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ขิง, ข่า, กระชาย, ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และ ยางพารา จากการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากไพล และเชื้อที่นำมาใช้เปรียบเทียบคือไอโซเลท RS1/3 จากพริก และT160 จากมะเขือเทศโดยพืชแต่ละชนิดได้รับการปลูกเชื้อไม่พร้อมกัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืชอาศัยและไอโซเลทของเชื้อสาเหตุโรค กล่าวคือเชื้อจากพืชวงศ์ขิงทั้งจากไพล, ขิง และ กระชาย สามารถทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับขิงในระดับรุนแรง ในกระชายมีไอโซเลทเชื้อจากไพลที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรง ได้แก่ C8/2, C13/1 และ C19/1 ส่วนไอโซเลท C5/1, C7/1 และ C23/1 ทำให้เกิดโรคในระดับปานกลาง ในข่ามีไอโซเลทเชื้อจากไพลที่ทำให้เกิดโรคในระดับต่ำ ได้แก่ C7/1 นอกจากนี้เชื้อจากไพลไม่ทำให้เกิดโรคในขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และ ยางพารา แสดงให้เห็นว่าพืชอาศัยของเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากไพลคือ ขิง, กระชาย และ ข่า เมื่อพิจารณาไบโอวาร์เชื้อจากไพลจัดอยู่ในไบโอวาร์ 3 และ 4 นอกจากนี้ยังสามารถทำให้ขิงแสดงอาการโรคได้ในระดับรุนแรงกว่าการแสดงโรคในไพล และเชื้อจากขิงก็สามารถทำให้ไพลเป็นโรคได้เช่นเดียวกัน และพบว่า เชื้อ *R. solanacearum* จากไพลทั้ง9 ไอโซเลทมีความสามารถในการเข้าทำลายพืชอาศัยต่างๆ คล้ายคลึงกับเชื้อจากขิงมากกว่าเชื้อจากพืชชนิดอื่นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่เข้าทำลายไพลเป็นเชื้อที่มาจากขิง นอกจากนี้ได้ทำการทดลองปลูกเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชอาศัยอื่นในพืชวงศ์ขิง พบว่าเชื้อทั้งจากพริก และมะเขือเทศสามารถทำให้เกิดการเหี่ยวระดับรุนแรงในขิงเท่านั้น ในการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* จากขิงและกระชายในไพล พบว่าเชื้อจากขิงทำให้ไพลเกิดโรคได้ในระดับปานกลาง แต่เชื้อจากกระชายทำให้ไพลเกิดโรคในระดับต่ำ และเชื้อจากกระชายก็ทำให้ขิงเกิดโรครุนแรงกว่ากระชาย ดังนั้น ขิงจึงเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อ *R. solanacearum* มากกว่าไพล และ กระชาย และข่าอาจจะไม่ใช่พืชอาศัยตามธรรมชาติเนื่องจากมีการเกิดโรคที่ต่ำมาก อย่างไรก็ตาม ศศิธร (2525) พบว่าเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวจากขิงทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศ, มะเขือยาว, มันฝรั่ง, พุทธรักษา, ขิง, ข่า, กระชาย, ไพล และ ขมิ้น แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในยาสูบและพริกซึ่งเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อที่ได้จากขิง ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับไพลแต่ให้ผลที่ต่างกันคือ เชื้อจากไพลไม่ทำให้มะเขือเทศ และขมิ้นเป็นโรค ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน โดยศศิธรใช้การปลูกเชื้อวิธีทำแผลที่ตาหน่ออ่อนสำหรับพืชที่ปลูกด้วยแง่ง และทำแผลที่รากสำหรับพืชที่ปลูกด้วยเมล็ด และความแตกต่างของไอโซเลทเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกจากไพลในระดับโมเลกุลโดยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ 759 และ 760 ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่มีความจะเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเทคนิคที่ง่ายและมีความรวดเร็วในการตรวจสอบ โดยพบว่าทุกไอโซเลทให้แถบดีเอ็นเอขนาด 281 bp แต่เทคนิคนี้ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มา พืชอาศัย race และไบโอวาร์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากไพลโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์ AKIF – AKIR และ 21F – 21R ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบเพื่อใช้กับเชื้อ *R. solanacearum* race 4 ผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ AKIF – AKIR คือ ไอโซเลท C5/1, C9/1 และ C13/1 จากไพล RS21 จากขิงและ RS40 จากกระชายโดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 165 bp ส่วนเชื้อไอโซเลทอื่นๆ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ 21F – 21R ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอ ทั้งนี้ Horita *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *R. solanacearum* race 4 จำนวน 20 สายพันธุ์ จากปทุมมาจำนวน 4 สายพันธุ์ mioga จำนวน 4 สายพันธุ์ และขิงจำนวน 12 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ AKIF – AKIR และ 21F – 21R พบว่าไพรเมอร์ AKIF – AKIR สายพันธุ์เชื้อจาก race 4 จำนวน 14 ไอโซเลทให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 165 bp โดยเป็นสายพันธุ์จากปทุมมาจำนวน 4 สายพันธุ์ mioga จำนวน 4 สายพันธุ์ และขิงจำนวน 6 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อจากขิงจำนวน 6 สายพันธุ์ที่เหลือไม่พบแถบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ 21F – 21R สายพันธุ์เชื้อจาก race 4 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 125 bp โดยเป็นสายพันธุ์จากขิงจำนวน 6 สายพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ AKIF – AKIR จากผลการทดลองจะเห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ทุกไอโซเลทซึ่งอาจจะต้องหาไพรเมอร์คู่อื่นๆมาใช้ในการศึกษาร่วมด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของไพล คือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* เมื่อจัดจำแนกไบโอวาร์ พบว่าเชื้อที่แยกได้ 9 ไอโซเลทจัดอยู่ในไบโอวาร์ 3 จำนวน 7 ไอโซเลทและไบโอวาร์ 4 จำนวน 2 ไอโซเลท เมื่อจัดจำแนก race พบว่าเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลทจัดอยู่ใน race 4 การวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล ด้วยไพรเมอร์ 759-760 พบว่าทั้ง 9 ไอโซเลทให้แถบดีเอ็นเอขนาด 281 bp และไพรเมอร์ AKIF-AKIR ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 165 bp จำนวน 3 ไอโซเลท ส่วนอีก 6 ไอโซเลทไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 165 bp และเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลท ไม่ให้แถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ 21F – 21R การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันบนใบยาสูบ พบว่าทุกไอโซเลททำให้เกิดอาการไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลภายในเวลา 36 – 48 ชั่วโมง

การศึกษาพืชอาศัยทั้ง 8 ชนิด พบว่าพืชอาศัยของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพลคือ ขิง, กระชาย และข่า โดยขิงจะเกิดโรคในระดับรุนแรง กระชายจะเกิดโรคในระดับปานกลาง และข่าเกิดโรคในระดับต่ำ ส่วนพืชชนิดอื่นๆ ไม่เกิดโรค ได้แก่ ขมิ้น, พริก, มะเขือเทศ, ถั่วลิสง และยางพารา

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดในด้านการศึกษาการปลูกพืชหมุนเวียน และการปลูกพืชแซม และด้านการควบคุม ป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากไพลทั้งการใช้สารสกัดสมุนไพร สารเคมีในอัตราที่เหมาะสม เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์. ม.ป.ป. **ขิง**. แหล่งที่มา:http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=45&i2=19, 10 กุมภาพันธ์ 2552.

นิรนาม. 2545. **โอกาสทองเผ็ดร้อนตลาดขิงไทยในสิงคโปร์**, น.15 ในโอกาสเศรษฐกิจ คม ชัดลึก. 7 พ.ย. 2545, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. ม.ป.ป. **คลังปัญญาไทย**. แหล่งที่มา:http://www.panyathai.or.th, 10 กุมภาพันธ์ 2552.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2527. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย**. โรคพืชวิทยา. น 203-257. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2541. **โรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gegnep.) และการป้องกันกำจัด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พิทยา สรวมศิริ. 2529. **พืชเครื่องเทศ**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วนิดา ฐิตะฐาน, สุทธิพงษ์ ญาณวารี และสุเนตรา ภาวิจิตร. 2534. การมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* biovar 3 สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในดินและเศษพืช. **รายงานการประชุมวิชาการพืชผักแห่งชาติ ครั้งที่ 10 ณ วิทยาลัยเกษตรกรรมอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี ระหว่างวันที่ 19-22 มีนาคม 2534.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

วิโรจน์ สุนทรภัค, ประพนธ์ ไทยวานิช และศุภลักษณ์ กลับน่วม. ม.ป.ป.**โรคเหี่ยวหรือแง่งขิงเน่า (wilt or rhizome rot)**. แหล่งที่มา: http://forecast.doae.go.th/web/ginger/247-diseases-of-ginger/1192-wilt-or-rhizome-rot.html, 10 กุมภาพันธ์ 2552.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิชัย โฆษิตรัตน. 2549. **แบคทีเรียโรคพืช** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 392 น.

ศุทธนา คล้ายมงคล. 2543. **การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในประเทศไทยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศศิธร จันทรโอทาน. 2525. **การศึกษาโรคเหี่ยวหรือแง่งขิงเน่าที่เกิดจากบักเตรี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2552**. บูรณาการไพลเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทย.** แหล่งที่มา. http://most.go.th/portal/index.php/flagship/114-tistr/1556-integrated-value-deviate-thai-herbs.html, 8 ธันวาคม 2554.

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2534. พืชผัก. **รายงานประจำปี 2534**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 76 น.

_____. 2539. พืชผัก. **รายงานประจำปี 2539**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 91 น.

สมศิริ แสงโชติ และ ชลิดา เล็กสมบูรณ์. 2552. **คู่มือการวินิจฉัยโรคพืช โรคพืชที่พบบ่อย**. เพชรเกษมการพิมพ์, นครปฐม.

อังสนา อัครพิศาล. 2533. **การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และเซลล์สำหรับศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันของสายพันธุ์ขิงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Anderson, R.C. and D.E. Gardner. 1999. An evaluation of the wilt-causing bacterium Ralstonia solanacearum as a potential biological control agent for the alien kahili ginger (Hedychium gardnerianum) in Hawaiian forests. **Biological Control** 15: 89–96.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Buddenhagen, I.W., L. Sequeira and A. Kelman. 1962. Designation of race in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology** 52: 726.

Chen, W.P. and T.T. Kuo. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacteria genomic DNA. **Nucleic Acids Research** 21: 2260.

Dhital, S.P., N. Thaveechai and K. Shrestha. 2000. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Strains of Potato Wilt Disease from Nepal and Thailand. **Nepal Agricultural Research Journals** 4: 42-47.

Guzman C.C. and J.S.Siemonsma. 1999. Plant resources of South-East Asia No. 13. Spices. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology** 27: 265-277.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology** 27: 265-277.

_____. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annuual Review of Phytopathology** 29: 65-87.

_____. 1994. **Systemics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and relayed bacteria**, pp. 123-135. *In* A.C. Hayward and G.L. Hartman(eds.). Bacterial Wilt; The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB international, Wallingford, United Kingdom.

He, L.Y., L. Sequeiar and A. Kelman. 1983. Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease** 67: 1357-1361.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Horita, M., K. Yano and K. Tsuchiya. 2004. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains. **Journal of General Plant Pathology**. 70: 278–283.

Husain, A. and A. Kelman. 1958. Relation of slime production to mecha nism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology** 48: 155-165.

Jeenapongsa, R., K. Yoovathaworn, K.M. Sriwatanakul, U. Pongprayoon, and K. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3, 4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **Journal of Ethnopharmacol** 87: 143–148.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium chloride medium. **Phytopathology** 44: 693-695.

McCarter, S. M. 1976. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soil. **Phytopathology** 66: 998-1000.

Moffett, M. L., J. B. Giles and B. A. Wood. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* biovar 2 and 3 in soil: effect of moisture and soil type. **Soil Biology Biochem.** 15: 587-591.

Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J. Wang, T. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. Hayward, V. Krishnapillai, W. Hong, B. Holloway and J. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 5(1); 19-30.

Shintaku, M. 2006. PCR Assay of the rhizosphere soil of weeds associated with an outbreak of bacterial wilt of ginger in east Hawaii. **The Journal for Hawaiian and Pacific Agriculture** 13: 9-14.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Smith, E. F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). Cited by Burkholder and Starr. 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 38: 494-502.

Smith, E.F. 1914. **Bacterianin relation to plant disease**, pp. 21-24. Cited by S. Chayachavalit. 1984. Studies on bacterial wilt of potato. M.S. Thesis Kasetsart University, Bangkok.

Tewtrakul, S. and S. Subhadhirasakul. 2007. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. **Journal of Ethnopharmacology** 109: 535-538.

Thammakijjawat, P. 2002. **Molecular characterization, fingerprinting and identification of the bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*) from Thailand and Asia**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Titatarn, V. 1986. Bacterial wilt in Thailand, pp. 65–67. In Persley (ed.). Bacterial Wilt Disease In Asia and South Pacific : Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philppines, 8–10 October 1985. **ACIAR Proceedings** No.13. 145 p.

Triboun, P., P. Chantaranothai and K. Larsen. 2005. The genus *Zingiber* Miller in Thailand, **In 13th Flora of Thailand meeting 13. ed.** Dublin, Ireland.

Villa, J., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N. Opina and M. Hyakumachi. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282-bp PCR-amplified fragment. **Plant Disease** 87: 1337-1343.

Wasuwat, S., P. Soonthorn Sarathoon, P. Boonkong, W. Rojanaphodi, P. Phicha, P. Nandhasri, D. Sankamnerd, W. Chamchaang, and K. Chenbhanij. 1986. **Zingiber cassumunar Roxb. pharmaceutical development**. In: Proceedings of the 24th national conference: poster session. Kasetsart University, Thailand, pp 673–675.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Winstead, N.N. and A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology** 42: 628-634.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaisu, I. Yano, H.Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakava. 1992. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* Homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology** 36: 1251-1275.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solnacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (David 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology** 39: 897-904.

Yu, Q., A.M. Alvarez, P.H. Moore, F. Zee, M.S. Kim, A. de Silva, P.R. Hepperly, and R.Ming. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. **Phytopathology** 93: 1124-1130.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Nutrient Glucose Agar (NGA)

Beef extract 3.0 กรัม

Peptone 5.0 กรัม

Glucose 2.5 กรัม

Agar 15.0 กรัม

Distilled water 1000 มล.

ละลายส่วนผสมในน้ำ แบ่งใส่ขวดปิดฝา นำ ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. Tetrazolium chloride medium (TZC)

ส่วนที่ 1 : (basal medium)

Peptone 10.0 กรัม

Glucose 5.0 กรัม

Casein hydrolysate 1.0 กรัม

Agar 15.0 กรัม

Distilled water 1000 มล.

ละลายส่วนผสมในน้ำแบ่งใส่ขวดๆ ละ 200 มล. นำ ไปนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ส่วนที่ 2 : 2,3,5 – triphenyl tetrazolium chloride 1 g. ละลายใน น้ำกลั่น 100 ml.

ฆ่าเชื้อด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 นำ เอาส่วนที่ 1 กับ ส่วนที่ 2 ผสมกันในอัตรา ส่วนที่ 1 ปริมาตร 200ml. ต่อ ส่วนที่ 2 ปริมาตร 1 ml.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ธิดาวรรณ ชมเดช
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด	จังหวัด นครปฐม
ประวัติการศึกษา	ประถมศึกษา โรงเรียนสายประสิทธิ์วิทยา มัธยมศึกษา โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สตรีวิทยา พุทธมณฑล ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์