



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

สาขา

โรคพืช

ภาควิชา

เรื่อง การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย
สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในกล้ายูคาลิปตัสและการควบคุมโดยชีววิธี

Identification and Genetic Diversity of Bacteria Caused Angular Leaf Spot on
Eucalyptus Seedling and Its Biological Control

นามผู้วิจัย นายเทคโนโลยี โพธิ์ลักษณะ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุฤติ ประเทืองวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุพจน์ กาเข็ม, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์อนงค์นุช สาสนรักกิจ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงห์สีทอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค
ใบจุดเหลี่ยมในกล้ายูคาลิปตัสและการควบคุมโดยชีววิธี

Identification and Genetic Diversity of Bacteria Caused Angular Leaf Spot on
Eucalyptus Seedling and Its Biological Control

โดย

นายเทคน โปธิลักษณ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทคโนโลยี 2556: การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในกล้วยาลิปตัสและการควบคุมโดยชีววิธี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุทธฤดี ประเทืองวงศ์ Ph.D. 185 หน้า

กล้วยาลิปตัสพบมีโรคแบคทีเรียระบาดโดยแสดงอาการใบจุดน้ำ ต่อมาพัฒนาเป็นจุดเหลี่ยมขนาดเล็กซึ่งพันธุ์พืชที่เกิดโรครุนแรงมากที่สุด คือ *Eucalyptus camaldulensis* x *E. deglupta* และ *E. grandis* ซึ่งโรคนี้ได้รับการสนใจน้อย การศึกษาครั้งนี้จึงวิเคราะห์ความสามารถในการก่อโรคโดยพืชที่ถูกปลูกเชื้อทดสอบจะแสดงอาการผิดปกติเช่นเดียวกับอาการโรคที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติคือ เกิดอาการจุดเหลืองกระจายทั่วใบหลังปลูกเชื้อ 10 วัน และที่ 21 วัน เซลล์พืชจึงตายเป็นจุดเหลี่ยม เมื่อทดสอบการก่อโรคการวิเคราะห์ลักษณะทางสรีระและชีวเคมี และบริเวณยีนอนุรักษ์ 16S rDNA, ITS-PCR และ *hrpF* พบว่าเชื้อสาเหตุโรคที่ศึกษาทั้ง 190 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด 98% กับ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) และ *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xag) จึงออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ *hrpFS* จาก *hrpF* sequence ที่ได้ และใช้เป็นเครื่องหมายจำแนกเชื้อใหม่อีกครั้ง พบว่า *hrpFS* นี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ขนาด 360 bp ได้เฉพาะจาก 190 สายพันธุ์เชื้อของกล้วยาลิปตัสเท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ Xac หรือ Xag เมื่อทดสอบการปลูกเชื้อข้ามชนิดพืชอาศัยพบว่า เชื้อทั้ง 190 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดโรคเฉพาะบนพืชกล้วยาลิปตัส ขณะที่ไม่ก่อให้เกิดโรครวมทั้ง ไม่พบเชื้อเป้าหมายที่มีชีวิตหลังปลูกเชื้อบนพืชตระกูลส้ม (มะนาวและมะกรูด) และถั่วเหลือง (พันธุ์ สจ.4) จึงจำแนกเชื้อสาเหตุโรคทุกสายพันธุ์เหล่านี้ คือ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* เชื้อเหล่านี้แสดงความรุนแรงสูง (ระยะบ่มเชื้อ 7 วัน และโรครุนแรง 61-100%) ปานกลาง (10 วัน และ 31-60%) และต่ำ (15 วัน และ 1-30%) เมื่อปลูกเชื้อบนพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* มีจำนวน 16.8, 59.5 และ 23.7% ตามลำดับ เชื้อสายพันธุ์ RTDNO1-2 ก่อให้พืชเกิดโรครุนแรงสูงสุด จึงใช้ทดสอบในทุกการทดลอง เมื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์การตอบสนองกับพืชกล้วยาลิปตัส 8 พันธุ์ พบโรคเกิดเฉพาะ 4 พันธุ์ คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. grandis*, *E. urophylla* (N.1) และ *E. urophylla* (N.2) แสดงอาการรุนแรง 75, 60, 30 และ 12% ตามลำดับ ส่วนอีก 4 พันธุ์ ได้แก่ *E. camaldulensis* x *E. pellita*, *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.1), *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.2) และ *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.3) ไม่พบอาการผิดปกติเกิดขึ้น และจากการศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี rep-PCR สามารถจำแนกพื้นฐานพันธุกรรมเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ A และ B ซึ่งสอดคล้องกับการก่อให้เกิดโรคนกล้วยาลิปตัสรุนแรงมากและน้อย 92 และ 72% ตามลำดับ รวมทั้งวิธีการ rep-PCR นี้ยังจำแนกเชื้อทั้ง 190 สายพันธุ์ออกจากเชื้อโรคกลุ่มใกล้เคียงได้อย่างชัดเจน เมื่อทดสอบการยับยั้งโรคด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกและจำแนกชนิดใหม่คือ *Bacillus licheniformis* T5 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนหน้า 2 ชนิด คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s และสารเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งใช้แบบเดี่ยวหรือใช้ร่วมหรือใช้สลับกับสารเคมี copper hydroxide และ streptomycin สามารถควบคุมโรคในระดับที่ยอมรับได้ (ลดโรค 50-76%) ภายใต้สภาวะที่มีโรคระบาดมากและน้อย ตามลำดับ (P=0.05) ผลการศึกษานี้เป็นรายงานแรกของโรคใบจุดกล้วยาลิปตัสชนิดใหม่ที่จำแนกโดย *hrpFS* และ rep-PCR ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อสาเหตุโรค *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ที่ถูกจำแนกชนิดใหม่เช่นกัน

ลายมือชื่อผู้สมัคร

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Techno Pothiluk 2013: Identification and Genetic Diversity of Bacteria Caused Angular Leaf Spot on Eucalyptus Seedling and Its Biological Control. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 185 pages.

The bacterial symptoms with water soaking developed to a small angular lesions on seedling leaves of eucalyptus was highly destructive to two cultivars, *Eucalyptus camaldulensis* x *E. deglupta* and *E. grandis* that received less attention. In this study, pathogenicity assay showed symptoms similar to those observed on seedlings that the first symptoms of yellow lesions and the late stage of necrotic spot were established in 10 and 21 days post inoculation respectively. Characterization of the causal agent involving pathogenicity test, physiological and biochemical properties, 16S rDNA, ITS-PCR, and *hrpF* assay was conducted for 190 strains. They were more closely related to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) and *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xag) with 98% identity. Specific primer *hrpFS* designed from its sequence alignment of 360 bp was accurately yielded from 190-eucalyptus strains and discriminated against Xac and Xag. Inoculation of citrus (*Citrus aurantifolia* and *C. hystrix*) and soybean (cv. SJ.4) with these 190 strains resulted in no disease or recovery of the pathogen from the tested plants. The 190 strains were therefore, identified as *X. axonopodis* pv. *eucalypti*. Based on progressive infection and severity *E. camaldulensis* x *E. deglupta* cultivar, 190 strains revealed as high (7-day incubation period and 61-100% disease severity), moderate (10 days and 31-60%), and less virulence (15 days and 1-30%) with 16.8, 59.5, and 23.7% respectively. Strain RTDNO1-2 was found mostly virulent and used for all trials. The response of 8-clonal cultivars were evaluated for infection by this strain that *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. grandis*, *E. urophylla* (N.1), and *E. urophylla* (N.2) exhibited 75, 60, 30, and 12% severity respectively. No symptom was detected on 4 cultivars included *E. camaldulensis* x *E. pellita*, *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.1), *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.2), and *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.3). Genetic fingerprinting of *X. axonopodis* pv. *eucalypti* using rep-PCR analysis enabled 190 strains into 2 groups, A and B that associated with high and less virulent phenotypes of 92 and 72% respectively. The rep-PCR also exhibited clear differentiation of 190 strains toward other closely related pathovars. A novel bacterial strain T5 of *Bacillus licheniformis* (newly identified in this study); and the well-studied strains *B. amyloliquefaciens* KPS46 and *Pseudomonas fluorescens* SP007s were screened for disease suppression, compared to chemical treatment. The results revealed that these possible technologies including each alone biocontrol agent and biocontrol agent plus and/or alternate with chemicals (copper hydroxide and streptomycin) were achieved the control performance (50-76% disease reduction) when it was high; and low disease occurrence respectively (P= 0.05). This is the first report of a new spot disease on eucalyptus caused by newly identified *X. axonopodis* pv. *eucalypti* characterized specific *hrpFS* nucleotides and rep-PCR.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุทธฤดี ประเทืองวงศ์ อาจารย์ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ แนวคิดในการทำงานวิจัยและการดำเนินชีวิตที่ดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุพจน์ การัมย์ และ ดร. จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำทางด้าน วิชาการ ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหา และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ดร. ดิยากรณ์ ฉัตรนภารัตน์ และน.ส. วิลาวรรณ เชื้อบุญ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำที่ดีในทุกๆ ด้าน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่เป็นกำลังใจ กำลังกาย กำลังความคิดและให้การสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้แก่ศิษย์ เพื่อที่จะนำความรู้ต่างๆ ที่ได้ไปใช้ในการดำเนินชีวิตการทำงานและชีวิตประจำวัน เพื่อให้เป็นบุคลากรที่มีคุณภาพ และทำ ประโยชน์ให้สังคมและประเทศชาติต่อไป

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุรัตน์ คุณแม่จวีวรรณ ที่รักและเคารพยิ่งชีวิต ที่คอย อบรม ให้ความรัก ตลอดมา และประโยชน์คุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ ครอบครัวโพธิ์ลักษณะ และครอบครัวอุ่นกาย

เทคโน โพธิ์ลักษณะ

พฤษภาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	51
ผล	51
วิจารณ์	141
สรุป	153
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	155
ภาคผนวก	172
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	185

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Lists of seedling diseases of <i>Eucalyptus</i> spp.	8
2	Host range of <i>Pantoea ananatis</i>	11
3	The information of Xanthomonads in genome data base	13
4	Morphological and biochemical characteristics of <i>Pantoea</i> sp. and <i>Xanthomonas</i> sp.	18
5	Primers for <i>Xanthomonas</i> sp. and <i>Pantoea ananatis</i> identification	34
6	Samples and sources of eucalyptus leaf spot collection	53
7	Colony morphology of bacteria isolated from water and rhizosphere soil collected from eucalyptus plantation	56
8	Colony morphology of bacteria isolated from leaves and roots of eucalyptus	59
9	The hypersensitive response (HR) induction on different index plants at 48 hour after infiltration	63
10	Severity of angular leaf spot on tested eucalyptus (<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>) artificially inoculated by 190- eucalyptus strains compared to 12-reference strains	69
11	Physiological and biochemical properties of test bacteria isolated from eucalyptus leaves compared to the reference strains	80
12	Sequence analysis of the 16S rDNA from bacterial pathogens Group 1 and 2 compared with the sequencing data in GenBank	81
13	Sequence analysis of the 16S rDNA of <i>X. axonopodis</i> caused angular leaf spot compared to sequencing data in GenBank	82
14	Degenerated primers from <i>hrpF</i> genes of <i>Xanthomonas</i> spp.	86
15	Nucleotide sequencing analysis of the <i>hrpF</i> of bacteria caused eucalyptus angular leaf spot compared with data in the GenBank	89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	Disease severity of angular leaf spot artificially inoculated by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> strain RTDNO1-2 on different clones of <i>Eucalyptus</i> spp.	98
17	Grouping strains of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> obtained from the analysis of DNA fingerprinting with REP primers using NTSYSpc 2.1	106
18	Grouping strains of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> obtained from the analysis of DNA fingerprinting with ERIC primers using NTSYSpc 2.1	110
19	Grouping strains of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> obtained from the analysis of DNA fingerprinting with BOX primers using NTSYSpc 2.1	114
20	Efficacy of antagonistic bacteria on growth inhibition of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> tested by dual culture method under laboratory conditions	116
21	Efficacy of antagonistic bacteria on growth inhibition of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> tested by agar diffusion and paper disc diffusion methods	118
22	Effectiveness of antagonistic bacterial strains to reduce disease incidence of angular leaf spot on eucalyptus under greenhouse experiments	125
23	Effectiveness of antagonistic bacterial strains to reduce disease severity of angular leaf spot on eucalyptus under greenhouse experiments	127
24	Efficacy of antagonistic bacterial strains to reduce disease incidence and severity of angular leaf spot on 20-day-old eucalyptus seedlings under greenhouse conditions	131

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
25	Efficacy of antagonistic bacterial strains to reduce disease severity of angular leaf spot on 45-day-old eucalyptus seedlings under outdoor nursery conditions	133
26	Physiological and biochemical properties of new bacterial antagonistic strain T5	135
27	Nucleotide sequence analysis of new antagonistic bacterial strain T5 isolated from root eucalyptus compared to nucleotide data base in GenBank	135

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการโรคใบไหม้ยูคาลิปตัส; อาการเริ่มต้นแสดงแผลเป็นจุดจ้ำน้ำบนผิวใบ (ก), เมื่ออาการรุนแรงขึ้นแผลจะลุกลามติดกันแสดงอาการแผลไหม้เซลล์ตาย (necrosis) (ข), และมีสีเขียวรอบแผล (chlorotic) (ค), อาการแผลจุดรุนแรงบริเวณเส้นใบและขอบใบ (ง), เมื่อพืชแสดงอาการรุนแรงมากใบจะหงิกงอผิดรูปร่างและแสดงอาการไหม้รุนแรง (จ)	10
2	ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดเหี่ยวยูคาลิปตัส โดยแบ่งตามระดับความรุนแรงของโรคจากพื้นที่ใบที่ถูกทำลายเป็น 5 ระดับ; ระดับ 0 = ไม่พบอาการโรค, ระดับ 1 = พบอาการใบจุดเหี่ยวย 1-25% (ก), ระดับ 2 = พบอาการใบจุดเหี่ยวย 26-50% (ข), ระดับ 3 = พบอาการใบจุดเหี่ยวย 51-75% (ค) และระดับ 4 = พบอาการใบจุดเหี่ยวย 76-100% (ง)	47
3	ใบยูคาลิปตัสสายพันธุ์ <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i> แสดงอาการใบจุดที่เกิดตามธรรมชาติในหลายลักษณะ; ลักษณะที่ 1 มีลักษณะเซลล์ตายแผลเป็นจุดเหี่ยวยจำกัดด้วยเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ (ก-ข), ลักษณะที่ 2 อาการเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุด กลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีเข้ม (ค) และบริเวณเส้นกลางใบดำ (ง), และลักษณะที่ 3 แสดงอาการเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุดไหม้ กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง (จ) เปรียบเทียบกับใบปกติที่ไม่แสดงอาการโรค (ฉ)	52
4	ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการโรคใบจุดและใบไหม้ของยูคาลิปตัสจาก 3 ลักษณะอาการที่แตกต่างกัน; อาการโรคแบบที่ 1 แผลจุดเหี่ยวยมี halo ล้อมรอบ โคโลนีสีเหลืองอ่อนใส กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ (ก), แบบที่ 2 อาการแผลจุด ขอบไหม้สีเข้ม ก้านใบดำ โคโลนีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างใสโปร่งแสง กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ (ข), และแบบที่ 3 อาการแผลไหม้มี halo ล้อมรอบ โคโลนีสีเหลืองครีม กลม นูน ขอบเรียบ (ค)	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
5	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแหล่งปลูกและดินบริเวณรอบรากยูคาลิปตัสบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง โดยแยกความแตกต่างของโคโลนีได้ทั้งหมด 16 กลุ่ม (G1-G16) (รายละเอียดเพิ่มเติมอธิบายตาม ตารางที่ 7)	58
6	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากผิวใบและผิวรากยูคาลิปตัส บนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง โดยแยกความแตกต่างของโคโลนีได้ทั้งหมด 20 กลุ่ม (T1-T20) (รายละเอียดเพิ่มเติมอธิบายตามตารางที่ 8)	61
7	ลักษณะอาการเซลล์พืชตายที่เกิดจากปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) ด้วยการฉีด cell suspension ของเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 กลุ่ม; กลุ่มที่ 1 (1), กลุ่มที่ 2 (2), และกลุ่มที่ 3 (3) บนพืชทดสอบได้แก่ มะเขือเทศ (ก) ยาสูบ (ข) และพริก (ค)	64
8	ลักษณะอาการโรคจากการปลูกเชื้อกลุ่มที่ 1 บนยูคาลิปตัสด้วยวิธีปลูกเชื้อโดยพ่นใบด้วย cell suspension ที่ 7 วัน (ก) และ 15 วัน (ข) และอาการที่เกิดจากการฉีดเชื้อเข้าสู่ผิวใบพืช (ค) โดยมีอาการลุกลามกระจายออกกรอบรอยที่ฉีดเชื้อ หลังฉีดเชื้อ 3 วัน (ง), 6 วัน (จ) และ 15 วัน (ฉ)	67
9	ลักษณะอาการโรคจากการปลูกเชื้อกลุ่มที่ 2 โดยวิธีการพ่นใบ พืชจะแสดงอาการก้านใบดำ (ก), อาการแผลไหม้ตามเส้นกลางและขอบใบ (ข), และลักษณะเซลล์ตายจากการฉีดเชื้อเข้าสู่ผิวใบพืช (ค)	67
10	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มที่ 1 (ก), กลุ่มที่ 2 (ข), และ กลุ่มที่ 3 (ค) ที่แยกได้จากใบยูคาลิปตัสที่แสดงลักษณะอาการใบจุดแผลไหม้บนอาหาร YDC agar	78
11	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มที่ 1 บนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+Bacitracin) (ก) และลักษณะ โคโลนีเชื้อกลุ่มที่ 2 เจริญบนอาหารจำเพาะ PA20 (ข)	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัสกับเชื้อ <i>Xanthomonas</i> spp. และ <i>Pantoea</i> spp. ด้วยโปรแกรม MEGA5 วิธี neighbor-joining (NJ)	83
13	การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS ของเชื้อ <i>Pantoea ananatis</i> สาเหตุโรคใบไหม้ในยูคาลิปตัสที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 398 bp	85
14	การทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งของ <i>hrpF</i> เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ	88
15	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์บริเวณยีน <i>hrpF</i> ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> และเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>Xanthomonas</i> spp. กลุ่มต่างที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 วิธี neighbor-joining (NJ)	90
16	การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> บริเวณยีน <i>hrpF</i> ด้วยโปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment	92
17	การตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน <i>hrpF</i> (HrpFS-F และ HrpFS-R) ที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp	94
18	การสังเคราะห์ DNA probe จากไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน <i>hrpF</i> ของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> (RTDNO1-2) สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส ด้วยเทคนิค PCR	95
19	การตรวจสอบเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization	97
20	อาการของโรคใบจุดเหลี่ยมจากการปลูกเชื้อบนยูคาลิปตัสสายพันธุ์ <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i> (ก), <i>E. grandis</i> (ข), <i>E. urophylla</i> (N.1) (ค) และ <i>E. urophylla</i> (N.2) (ง)	99

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
21	ลักษณะใบพืชทดสอบหลังจากการปลูกเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ด้วยวิธีการพ่นเชื้อ (1) และการฉีดเชื้อเข้าผิวใบ (2) บนพืชทดสอบต่างชนิด; ชูคาลิปดัส (ก), ถั่วเหลือง (ข), มะกรูด (ค), มะนาว (ง), มะเขือเทศ (จ) และมันสำปะหลัง (ฉ)	101
22	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ REP	104
23	Dendrogram จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ REP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1	105
24	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC	108
25	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ERIC ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1	109
26	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX	112
27	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ BOX วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1	113
28	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 (ก1), T6 (ก2), T9 (ข1), T11 (ข 2), T14 (ข3), T20 (ข4), G6 (ค1), G7 (ค2), G15 (ค3), G16 (ค4), SP007s (ง1), SW01/4 (ง2), KPS46 (ง3) และ SPt360 (ง4) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ด้วยวิธี agar diffusion หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง	119
29	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 (ก1), T6 (ก2), T9 (ข1), T11 (ข 2), T14 (ข3), T20 (ข4), G6 (ค1), G7 (ค2), G15 (ค3), G16 (ค4), SW01/4 (ง1), SP007s (ง2), KPS46 (ง3) และ SPt360 (ง4) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ด้วยวิธี paper disc diffusion หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง	120

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ T5 (ก), T20 (ข), G15 (ค), G16 (ง) ที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i>	121
31	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ทดสอบด้วยวิธีการย้อมสีแกรม (ก) และการย้อมสีเอนโดสปอร์ (ข) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	136
32	ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ <i>Bacillus subtilis</i> group บริเวณยีน 16S rDNA	138
33	ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน <i>adk</i> ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 518 bp	140
34	ระดับความรุนแรงของโรคจากการปลูกเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ความเสียหายบนพื้นที่ใบแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ ระดับ 0 = ไม่พบอาการโรค 0% (ก) ระดับ 1 = พบอาการใบจุดเล็กน้อย 1-30% (ข) ระดับ 2 = พบอาการใบจุดปานกลางแผลจุดกระจาย 31-60% (ค) ระดับ 3 = พบอาการใบจุดรุนแรงถึงไหม้ทั่วใบ 61-100% (ง)	184

การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ใบจุดเหลี่ยมในกล้ายูคาลิปตัสและการควบคุมโดยชีววิธี

Identification and Genetic Diversity of Bacteria Caused Angular Leaf Spot on Eucalyptus Seedling and Its Biological Control

คำนำ

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มพืชโตเร็วที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถเจริญเติบโตได้เกือบทุกพื้นที่ แม้แต่สภาพดินเลื่อมโทรม การปลูกยูคาลิปตัสในประเทศไทยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษเป็นหลัก และปัจจุบันการส่งเสริมการปลูกยูคาลิปตัสมีการขยายตัวมากขึ้น ทั้งนี้จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการปลูกไม้ยูคาลิปตัสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การผลิตกล้าไม้เพื่อจำหน่ายโดยภาคเอกชนมีการขยายตัวตามไปด้วยและปัญหาสำคัญในขั้นตอนการผลิตกล้าไม้ยูคาลิปตัสคือ ความเสียหายจากโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบจุดเหลี่ยม (angular leaf spot) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุโรคสำคัญของยูคาลิปตัสที่ทำให้กล้าไม้เกิดความเสียหายทั้งในระยะอนุบาลช่วงอายุ 1-4 สัปดาห์ จนถึงระยะต้นกล้าที่พร้อมจำหน่าย และพบการระบาดของอย่างรุนแรงในฤดูฝนลักษณะอาการโรคใบจุดเหลี่ยมที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุของกล้า และสภาพแวดล้อม เช่น อาการตายจากยอด (die back) และอาการใบไหม้ (blight) หรือใบมีลักษณะแผลเป็นจุดเหลี่ยม (angular leaf spot) ซึ่งต้นกล้าที่แสดงอาการของโรคส่งผลให้ใบยูคาลิปตัสมีแผลและเป็นตำหนิต้นไม้สมบูรณ์ จึงไม่เป็นที่ต้องการของเกษตรกร นอกจากนี้โรสดังกล่าวจะมีระดับความรุนแรงแตกต่างกันไปตามลักษณะประจำพันธุ์ของยูคาลิปตัส โดยพันธุ์อ่อนแอมักเป็นสายพันธุ์ผสม ซึ่งจากการรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศพบว่าสาเหตุหลักของโรสดังกล่าวเกิดจากเชื้อ *Pantoea ananatis* (Coutinho et al., 2010) แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุมากกว่าหนึ่งชนิดที่เข้าทำลาย และทำให้เกิดอาการคล้ายคลึงกันซึ่งมีแนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* sp. จึงเป็นสาเหตุให้การวินิจฉัยโรคอาจเกิดความไม่ชัดเจน และอาจส่งผลให้การจัดการโรคไม่ตรงเป้าหมาย ทำให้โรคใบจุดเหลี่ยมยังคงเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอีกหลายประการที่ทำให้การควบคุมโรสดังกล่าวในระยะต้นกล้ายังไม่ประสบผลสำเร็จ เช่น สภาพแวดล้อมในโรงเรือนอนุบาลกล้าที่มักมีความชื้นสูง การวางต้นพืชอย่างหนาแน่นความหลากหลายของสายพันธุ์ยูคาลิปตัส ที่มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้ลักษณะ

เนื้อไม้ที่ดี เจริญเติบโตเร็ว แต่ยังมีการวิจัยถึงความต้านทานต่อโรคก่อนข้างจำกัด เชื้อสาเหตุโรคจึงมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วและเกิดการสะสมของเชื้อสาเหตุโรค ตั้งแต่ในโรงเรือนส่งผลให้ต้นกล้าที่ผลิตออกมาได้รับความเสียหายเป็นจำนวนมากทำให้การใช้สารเคมีควบคุมโรคติดต่อกันไม่ได้ผล เนื่องจากเชื้อสาเหตุมีการพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีได้อย่างรวดเร็ว

ทั้งนี้ข้อมูลจากการวิจัยด้านโรคและการจัดการโรคดังกล่าวยังมีน้อยในประเทศ การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายหลักในการศึกษาชีววิทยาการเกิดโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสและการยืนยันการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่แท้จริงทั้งในระดับสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ตลอดจนวิธีการทางโมเลกุล รวมทั้งการพัฒนาวิธีการคัดพันธุ์ต้านทานโรค และพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการใช้ชีววิธีโดยการควบคุมโรคทั้งแบบเดี่ยวและวิธีผสมผสานเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ยืนยันการวินิจฉัยและการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้วยาลิปดัส ตลอดจนการศึกษาชีววิทยาการเกิดโรคในพืชอาศัย
2. พัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการจำแนกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction
3. ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้วยาลิปดัส ด้วยเทคนิค rep-PCR
4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาวิธีการใช้ในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้วยาลิปดัส

การตรวจเอกสาร

1. ยูคาลิปตัสและการใช้ประโยชน์จากยูคาลิปตัสในประเทศไทย

1.1 แหล่งที่มาและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) เป็นไม้ยืนต้น (tree) หรือ ไม้พุ่ม (shrub) ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ พบประมาณ 700 ชนิด ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย พบเป็นส่วนน้อยในติมอร์ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน มีดังนี้ (Pryor and Johnson, 1971; Samuel and Arlene, 1987)

หมวด (Division) Magnoliophyta

ชั้น (Class) Magnoliopsida

ชั้นย่อย (Subclass) Rosidae

อันดับ (Order) Myrtales

วงศ์ (Family) Myrtaceae

สกุล (Genus) *Eucalyptus*

ชนิด (Species) *E.camaldulensis* Dehnh.

พฤกษศาสตร์ของยูคาลิปตัสโดยทั่วไปพบว่าขนาดและความสูงของลำต้นยูคาลิปตัสมีความแตกต่างไปตามพันธุ์โดยเฉลี่ยจะมีความสูงต้นเมื่อโตเต็มที่ระหว่าง 24-50 เมตร ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 0.9-2.1 เมตร มีกิ่งก้านน้อย ในระยะต้นกล้าลักษณะของใบคล้ายรูปไข่หรือรูปหอก (lanceolate) ลักษณะใบเรียงตรงกันข้าม (opposite) ใบยูคาลิปตัสมีความผันแปรไปตามช่วงอายุของไม้ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตัวแบบสลับ (alternate) บางครั้งมีสีเทาใบบางเส้นใบมองเห็นได้ชัดเจน เนื้อใบละเอียดค่อนข้างหนา ผิวเกลี้ยง ท้องใบมีคราบสีขาวของปากใบ เส้นใบทำมุม 40-50 องศา กับเส้นขนานใบ ผิวเปลือกเรียบ เป็นมัน สีเทาสลับขาวและน้ำตาลแดง เปลือกนอกเมื่อแก่จะแห้งและลอกเป็นแผ่นหลุดออกจากผิวของลำต้น หนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร คล้ายเปลือกลำต้นฝรั่ง ช่อดอกจะออกดอกรวมกันเป็นช่อกลมสีขาวหรือเหลืองอ่อน เกิดตรงข้อต่อระหว่างกิ่งกับใบ รังรองดอก (hypanthium) เป็นรูปถ้วย (acorn) กลีบเลี้ยงและกลีบดอกปรับสภาพเป็นฝาปิด (operculum) และมีจำนวนฝาปิด 2 ชั้น (Boland *et al.*, 1997; Eldridge *et al.*, 1997)

ยูคาลิปตัสสามารถเจริญเติบโตได้ในดินเกือบทุกประเภท เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิประเทศเขตร้อนและแห้งแล้ง ทนต่ออุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส และทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ถึงติดลบ 5 องศาเซลเซียส (National Academy of Science, 1980) สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้นาน 6-8 เดือน และทนน้ำท่วมขัง 2-3 เดือน ซึ่งสายพันธุ์ *E. camaldulensis* สามารถพบได้ที่ความสูงตั้งแต่ 0-600 เมตรจากระดับน้ำทะเลและในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝน 200-1,200 มิลลิเมตรต่อปี (มนตรีและคณะ, 2529)

1.2 การปลูกยูคาลิปตัสในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์

ยูคาลิปตัสเป็นพืชต่างถิ่น (exotic tree) ที่ถูกนำมาปลูกในประเทศไทย ประมาณ 100 ปี (ค.ศ. 1900-1903) แต่มีการนำมาปลูกเพื่อใช้เป็นประโยชน์ทางอุตสาหกรรมเมื่อประมาณ 40 ปี (1970) ที่ผ่านมามีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรจากการปลูกเป็นพืชหลัก การนำไปปลูกหรือนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่เสื่อมโทรมที่ไม่สามารถปลูกพืชชนิดอื่นได้เพราะเป็นพืชทนทานทั้งต่อสภาพแวดล้อมและเชื้อสาเหตุโรคพืช

ในปี พ.ศ. 2508 ได้มีการริเริ่มโครงการพัฒนาต้นแบบการปลูกไม้ยูคาลิปตัสเพื่ออุตสาหกรรม โดยมีการนำพันธุ์ยูคาลิปตัสต่างสายพันธุ์เข้ามาทดสอบในประเทศไทยภายใต้โครงการสำรวจวัตถุดิบเพื่อผลิตเยื่อกระดาษระหว่างปี 2508-2512 โดยความร่วมมือของกรมป่าไม้ และ UNDP/FAO (United Nation Development Project) ได้นำเมล็ดยูคาลิปตัสจากประเทศออสเตรเลียจำนวน 15 ชนิด ปลูกทดลองเพื่อคัดเลือกสปีชีส์และถิ่นกำเนิด (กรมป่าไม้, 2544 ; Pousajja, 1993) ต่อมาในปี 2512 กรมป่าไม้และDANIDA (Danish International Development Agency) จากประเทศเดนมาร์กได้จัดตั้งโครงการบำรุงพันธุ์ไม้สนและไม้ไผ่เร็ว ซึ่งมีการส่งเมล็ดพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัสจากประเทศออสเตรเลียและประเทศแซมเบียมาปลูกทดลองในปี 2516 พบว่ายูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส (*E. camaldulensis*) มีอัตราการเจริญและมีปริมาณการรอดตายสูงกว่ายูคาลิปตัสสปีชีส์อื่นๆ

Luangviriyasaeng (2003) กล่าวว่ายูคาลิปตัส ได้แก่ *E. brassiana*, *E. camaldulensis*, *E. citriodora* และ *E. tereticornis* เป็นสปีชีส์ที่เหมาะสมในการปลูกในพื้นที่แห้งแล้งซึ่งมีปริมาณฝนเฉลี่ย 1,000-1,200 มิลลิเมตร/ปี โดย *E. urophylla* เหมาะในการปลูกในพื้นที่ชุ่มชื้นที่มีปริมาณฝนเฉลี่ย 1,500 มิลลิเมตร/ปี นอกจากนี้ *E. grandis* และ *E. saligna* เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่สูง กรมป่าไม้ (2544) รายงานว่าเมล็ดพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสจากถิ่นกำเนิดเพพฟอร์ด

(Petford) กลุ่มแม่น้ำเมรี (Marry River) กลุ่มแม่น้ำกิบ (Gibb River) แคทเธอริน (Katherine) และกลุ่มแม่น้ำเออร์วิน (Irvine) มีความเหมาะสมที่จะนำมาปลูกในประเทศไทยโดยเฉพาะพื้นที่ลุ่มน้ำต่ำที่เกิดจากเพทฟอร์ดจะสามารถปรับตัวได้ดีที่สุด จึงเป็นเหตุให้ใช้พันธุ์สำหรับขยายพันธุ์เพื่อปลูกต่อไป ซึ่งในปี 2519-2520 กรมป่าไม้และองค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ได้เริ่มต้นปลูกสร้างสวนป่ายูคาลิปตัส ภายหลังจากนั้นเกษตรกรและภาคเอกชนก็ได้ให้ความสนใจที่จะปลูกสวนป่ายูคาลิปตัสในเชิงเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง

การใช้ประโยชน์ไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้ในภาคอุตสาหกรรมโดย Luangviriyasaeng (2003) รายงานว่าผลผลิตของไม้ยูคาลิปตัสที่ป้อนเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทยมีประมาณ 7.6 ล้านตัน โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและใช้ในการก่อสร้างเนื่องจากเนื้อไม้มีความคงทนต่อการทำลายของปลวกได้ดี การเพาะปลูกได้ในสภาพแห้งซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์และอายุของไม้ด้วย นอกจากนี้เป็นการปลูกยูคาลิปตัสในปัจจุบันเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรและยังเป็นพืชที่สามารถแข่งขันได้ในระดับโลกซึ่งสามารถเพิ่มพูนความชุ่มชื้นสู่อากาศโดยรอบ สร้างออกซิเจนสู่บรรยากาศ 1.6 ล้านตันต่อปี และช่วยลดคาร์บอนไดออกไซด์ 2.4 ล้านตันต่อปี สอดคล้องกับการเกษตรแบบสวนผสมของเกษตรกรไทย และจากการพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่องทำให้ยูคาลิปตัสสามารถปลูกควบคู่กับพืชหลักของเกษตรกรอื่นได้และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหรือโครงสร้างดิน (กรมป่าไม้, 2544) นอกจากนี้ยังนำไปเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมไม้แปรรูปเพื่อทดแทนไม้ธรรมชาติและใช้เป็นเชื้อเพลิงในธุรกิจพลังงานไฟฟ้า ยูคาลิปตัสสามารถปลูกเป็นแนวรั้วเป็นแนวกันลมปลูกเพื่อช่วยควบคุมการพังทลายของดิน ดอกใช้เลี้ยงผึ้ง ใบนามาสกัดน้ำมันหอมระเหย (มนตรีและคณะ, 2529) นำเปลือกไม้ยูคาลิปตัสมาผลิตเป็นปุ๋ยหมัก และเหมาะสำหรับการผลิตเป็นวัตถุดิบผลิตเยื่อกระดาษกราฟท์ วัตถุดิบในอุตสาหกรรมแผ่นขึ้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด ชี้นไม้ผสมปูนซีเมนต์ (สมบัติ, 2544)

2. โรคสำคัญของยูคาลิปตัสและการจัดการในระบบโรงเรือน

โรคพืช (Plant disease) เป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตพืชทุกชนิด ทั้งพืชไร่ พืชสวน ไม้ผล พืชผัก ตลอดจนพืชป่า (forest crops) ชนิดของโรคจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืช (host) แหล่งปลูก ฤดูปลูก หรือสภาพการปลูกพืช รวมทั้งอายุพืชที่แตกต่างกัน โรคที่เข้าทำลายก็แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพืชประกอบด้วย สายพันธุ์เชื้อโรคที่รุนแรงและมีประชากรเชื้อโรค

(inoculum source) ที่เหมาะสม พืชมีลักษณะพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคหรืออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมจึงมีความต้านทานหรือทนทานต่ำและมีสภาพแวดล้อมและช่วงเวลาที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของเชื้อสาเหตุโรค เช่น มีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของโรคได้สมบูรณ์ (disease development) และแสดงออกมาในลักษณะอาการ โรคต่างๆ กรณีของยูคาลิปตัสมีรายงานว่าโรคที่สำคัญหลายโรคที่เข้าทำลายโดยมีทั้งที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส โดยโรคของยูคาลิปตัสก็จะมีอาการแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุ พันธุ์ และการดูแล อย่างไรก็ตามเนื่องจากยูคาลิปตัสเป็นพืชป่าที่มีเนื้อไม้ค่อนข้างแข็ง เป็นเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเข้าทำลายลำต้นได้โดยตรง แต่เชื้อโรคจะเข้าทางบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติ หรือรอยแตกทางลำต้นจากสภาวะเครียดต่างๆ (stress factors) (กฤษณา, 2542)

ปัจจุบันการปลูกยูคาลิปตัสเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเชื้อกระดาษ มีการขยายตัวอย่างมาก และมีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ยูคาลิปตัสเพื่อให้ได้เนื้อไม้หรือเส้นใยคุณภาพ เป็นเหตุให้พันธุ์ยูคาลิปตัสที่เป็นลูกผสม (hybrid/clone) มีความอ่อนแอต่อโรคต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะในระยะต้นกล้าที่ต้องการปลูกขยายและอนุบาลในสภาพโรงเรือนอนุบาล นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรคยังสามารถติดไปกับต้นยูคาลิปตัสและไปแสดงอาการโรคได้ต่อเนื่องเมื่อปลูกลงในแปลงปลูก

การศึกษาโรคของยูคาลิปตัสในประเทศไทยยังมีข้อมูลน้อย ซึ่งปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่กระทบต่อผลผลิตทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพของไม้ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเชื้อและกระดาษเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายในยูคาลิปตัสได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า กิ่งชำ กล้าไม้ และต้นโตในแปลงปลูก โดยระดับความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อสาเหตุโรค ความต้านทานโรคของพืชแต่ละสายพันธุ์และสภาพภูมิอากาศในขณะนั้น สาเหตุของโรคโดยส่วนใหญ่พบว่าเกิดจากเชื้อรา (Old *et al.*, 2003) ซึ่งก่อให้เกิดอาการเน่า (rot, damping off) แผลจุด (spot) แผลไหม้ (blight) กิ่งแห้ง (shoot blight) ยอดตาย (die-back) ขางไหล (gummosis) แผลแตกตามกิ่งและลำต้น (canker) และเนื้อเยื่อเจริญของลำต้น (cambium) ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความเสียหายกับไม้ยูคาลิปตัสในช่วงอายุไม่เกิน 2 ปี คือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และ *Pantoea ananatis* รุนแรงถึงกับทำให้ต้นตายได้ในที่สุด (Coutinho *et al.*, 2002; Dianese *et al.*, 1990)

สำหรับโรคยูคาลิปตัสที่พบในระยะกล้าโดยส่วนใหญ่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราได้แก่ โรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อ *Cylindrocladium scoparium*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Kirramyces* sp., *Cercospora* sp. โรคใบไหม้เกิดจากเชื้อ *Cylindrocladium*

sp., *Coniella* sp. โรคยอดไหม้เกิดจากเชื้อ *Phomopsis* sp. และ *Lasiodiplodia theobromae* และมีบางส่วนเกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้แก่ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โรคยอดไหม้เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *eucalyptus* (Truman, 1974) และโรคใบไหม้เกิดจากเชื้อ *P. ananatis* (Keane et al., 2000) Table 1

Table 1 Lists of seedling diseases of *Eucalyptus* spp.

Disease	Pathogen	Host
Damping off	<i>Cylindrocladium scoparium</i>	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>E. deglupta</i>
Leaf spot	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>Kirramyces</i> sp.	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>Cercospora</i> sp.	<i>E. camaldulensis</i>
	Unidentified (Coelomycetes)	<i>E. camaldulensis</i>
Leaf blight	<i>Coniella</i> sp.	<i>E. camaldulensis</i>
	Unidentified (Coelomycetes)	<i>E. camaldulensis</i>
Top blight	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
Bacterial wilt	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>E. camaldulensis</i>
Shoot blight	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>E. camaldulensis</i>
	pv. <i>eucalyptus</i>	
Bacterial blight	<i>Pantoea ananatis</i>	<i>E. camaldulensis</i>

Source: Keane et al. (2000)

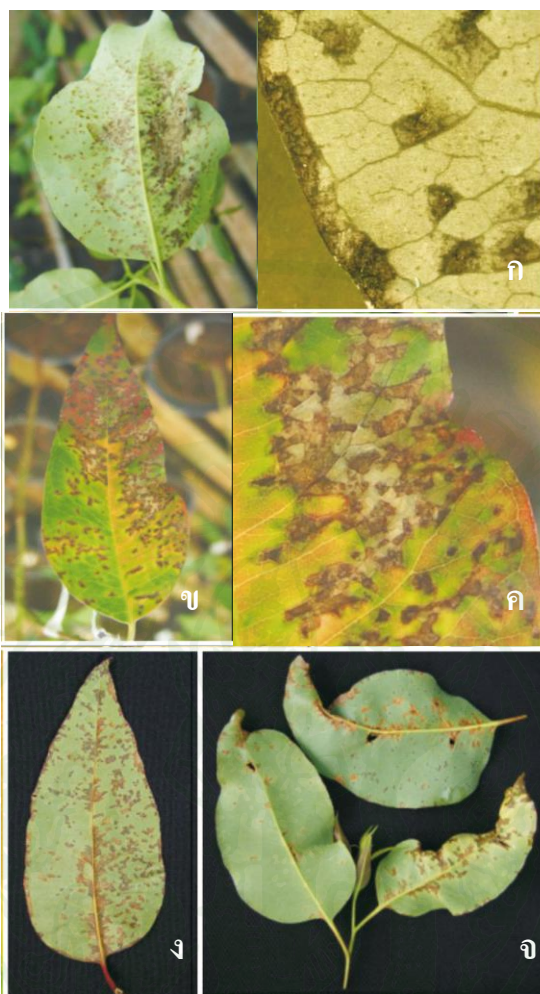
3. โรคแบคทีเรียทางใบของยูคาลิปตัส

3.1 โรคใบไหม้จากแบคทีเรีย

โรคทางใบของยูคาลิปตัสได้แก่ โรคใบไหม้แบคทีเรีย (bacterial leaf blight) เกิดจากเชื้อ *P. ananatis* และ โรคใบจุดแบคทีเรีย (bacterial leaf spot) เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas* sp. ในสภาพแปลงปลูกยูคาลิปตัสปัญหาโรคหลักที่ระบาดรุนแรงพบว่าเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. ananatis* เป็นโรคที่พบอันดับต้นๆ ในโรงเรียนอนุบาลกล้าไม้ยูคาลิปตัสในแปลงที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิประมาณ 20-25°C พบระบาดรุนแรงในโรงเรียนอนุบาลกล้ายูคาลิปตัส ในขณะที่มีความชื้นสูงจะพบกลุ่มเมือกแบคทีเรียไหลออกมาจากบริเวณแผลในกรณีที่พืชแตกตาและใบ จะพบว่าการพัฒนาของใบผิดปกติ เกิดเป็นพุ่ม (bushy) แคระแกรนในยูคาลิปตัสสายพันธุ์อ่อนแอ จะเกิดอาการรุนแรงจากการรวมกันของอาการแผลไหม้ (blight) และเหี่ยวจากยอด (die back) ส่งผลให้ต้นตายในที่สุด (ภาพที่ 1) ส่วนพันธุ์ต้านทานโรคนี้อาจพบอาการแผลจุด (Coutinho *et al.*, 2010) ซึ่งเชื้อ *P. ananatis* มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของยูคาลิปตัสสามารถก่อโรคกับยูคาลิปตัสที่มีพันธุกรรมลูกผสมหรือ clone ของ *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunni*, *E. nitens*, *E. smithii*, *E. grandis* x *E. camadulensis* (GC) และ *E. grandis* x *E. urophylla* (GU) เป็นพันธุ์อ่อนแอ

3.2 ลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัส

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. ananatis* (ชื่อเดิม *Erwinia ananas* หรือ *E. uredovora*) (Mergaert *et al.*, 1993) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สร้างรงควัตถุสีเหลือง แพลกเจลลามีอยู่รอบเซลล์ สามารถเคลื่อนที่ได้ไม่สร้างสปอร์ และเจริญแบบ facultative anaerobe เชื้อนี้สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิตั้งแต่ 4-41 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป (Smith, 1898)



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคใบไหม้ยูคาลิปดัส; อาการเริ่มต้นแสดงแผลเป็นจุดนํ้าบนผิวใบ (ก), เมื่ออาการรุนแรงขึ้นแผลจะลุกลามติดกันแสดงอาการแผลไหม้เซลล์ตาย (necrosis) (ข), และมีสีซีดรอบแผล (chlorotic) (ค), อาการแผลจุดรุนแรงบริเวณเส้นใบและขอบใบ (ง), เมื่อพืชแสดงอาการรุนแรงมากใบจะหงิกงอผิดรูปร่างและแสดงอาการไหม้รุนแรง (จ)

ที่มา: Rivadave *et al.* (2008)

Coutinho and Venter (2009) รายงานว่าเชื้อ *P. ananatis* พบครั้งแรกจากการแยกเชื้อได้จากสับปะรดที่แสดงอาการโรคผลเน่า (fruitlet rot) ในประเทศบราซิล จึงเป็นเหตุให้มีการตั้งชื่อของเชื้อตามถิ่นกำเนิดของสับปะรด คือ *Ananas comosus* และพบว่าเชื่อดังกล่าวมีพืชอาศัยกว้าง (wild host range) สามารถเข้าทำลายพืชชนิดต่างๆ ได้จำนวนมากและต่างกลุ่มพืช ได้แก่ โรคใบไหม้ของยูคาลิปตัส (bacterial blight of eucalyptus) (Coutinho *et al.*, 2002) โรคใบจุดไหม้ของข้าวโพด (necrotic spots of maize) (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001) โรคใบจุดของหญ้าซูดาน (leaf blotch of sudangrass) (Azad *et al.*, 2000) โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลแคนตาลูป (Bruton *et al.*, 1991) โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot) ของ honeydew melons (Wells *et al.*, 1987) โรค leaf blight, seed stalk และ blub decay ของหัวหอม (Gitaitis and Gay, 1997) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถติดต่อกับเมล็ดหัวหอมได้ (Walcott *et al.*, 2002) (Table 2)

Table 2 Host range of *Pantoea ananatis*

Host	Artificial host	Symptom	Reference
Pineapple		Fruitlet rot	Serrano, 1928
	Sugarcane	Leaf streaks	Serrano, 1928
Sudangrass		Leaf blotches and streaks	Azad <i>et al.</i> , 2000
	Sorghum and oats	Leaf blotches and streaks	Azad <i>et al.</i> , 2000
Cantaloupe fruit		Brown spot	Bruton <i>et al.</i> , 1991
Honeydew melons		Brown spot	Ceponis <i>et al.</i> , 1985
Onions including giant onions		Leaf blight, seed stalk rot, bulb decay	Gitaitis and Gay, 1997 Yumiko <i>et al.</i> , 2005
Eucalyptus		Leaf blight, shoot tip die-back	Coutinho <i>et al.</i> , 2002
Maize		Necrotic spots and streaks	Paccola-Meirelles <i>et al.</i> , 2001
		Brown stalk rot	Goszczyńska <i>et al.</i> , 2007
Rice		‘Palea’ browning	Tabei <i>et al.</i> , 1988
		Stalk rot	Cothier <i>et al.</i> , 2004

Table 2 Continued

Host	Artificial host	Symptom	Reference
Tomato		'Graywall'	Stall <i>et al.</i> , 1969
<i>Puccinia graminis</i>		Parasite of the rust	Pon <i>et al.</i> , 1954
King oyster mushroom		Soft rot	Kim <i>et al.</i> , 2007
	Cotton	Internal boll rot	Bell <i>et al.</i> , 2007
Watermelon			Walcott <i>et al.</i> , 2003

Source: Coutinho and Venter (2009)

3.3 โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Xanthomonads

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Xanthomonad เป็นกลุ่มที่มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 66 สกุล ในตระกูลของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และมากกว่า 160 สกุล ใน 49 ตระกูลของพืชใบเลี้ยงคู่ ก่อให้เกิดโรคแก่พืชผลทางเศรษฐกิจและไม้ประดับที่สำคัญ (Dye *et al.*, 1978; Vauterin *et al.*, 1995) ในพืชแต่ละชนิดประกอบด้วย pathovars ของเชื้อที่มีความหลากหลาย มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย และกระบวนการเข้าทำลายในพืช (Hayward, 1993) (Table 3)

Table 3 The information of Xanthomonads in genome data base

Species	Pathovar	Strain	Host	Disease	GenBank	Reference
<i>X. axonopodis</i>	Citri	306	Citrus	Citrus canker	AE008923 AE008924	da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>X. axonopodis</i>	citrumelo	F1 (FL 1195)	Citrus	Bacterial spot	CP002914	Jalan <i>et al.</i> , 2011
<i>X. axonopodis</i>	glycines	12-2	Soybean	Bacterial pustule	AJJO000000	Tiyakhon, 2012
<i>X. axonopodis</i>	punicae	LMG859	Pomegranate	Leaf blight	CAGJ01000 01	Sharma <i>et al.</i> , 2012
<i>X. axonopodis</i>	manihotis	65 strains	Cassava	Bacterial blight	121-888 contigs	Bart <i>et al.</i> , 2012
<i>X. albilineans</i>		GPE PC73	Sugarcane	Leaf scald	FP565176	Pieretti <i>et al.</i> , 2009
<i>X. campestris</i>	campestris	8004	Cauliflower	Black rot	CP000050	Qian <i>et al.</i> , 2005
<i>X. campestris</i>	campestris	ATCC 33913	Cabbage	Black rot	AE008922	da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>X. campestris</i>	raphani	756C	<i>Brassica oleracea</i>	Leaf spot	CP002789	Bogdanove <i>et al.</i> , 2011
<i>X. campestris</i>	vesicatoria	85-10	Pepper	Bacterial spot	AM039950 AM039951	Thieme <i>et al.</i> , 2005
<i>X. citri</i>	mangifera eindicae	LMG941 KACC10	Mango	Black spot	CAHO0100 001 AE013598	Midha <i>et al.</i> , 2012 Lee <i>et al.</i>
<i>X. oryzae</i>	oryzae	331 MAFF 311018	Rice	Bacterial leaf blight	AP008229	2005 Ochiai <i>et al.</i> , 2005

Table 3 Continued

Species	Pathovar	Strain	Host	Disease	GenBank	Reference
<i>X. oryzae</i>	oryzicola	BLS256	Rice	Bacterial streak	CP003057	Bogdanove <i>et al.</i> , 2011
<i>X. hortorum</i>	carotae	M081	Carrot (<i>Daucus carota</i>)	Bacterial leaf blight	unpublished	Kimbrel <i>et al.</i> , 2011
<i>X. vesicatoria</i>		1111 (ATCC 35937)	Tomato and pepper	Bacterial spot	AEQV000000	Potnis <i>et al.</i> , 2011
<i>X. perforans</i>		91-118	Tomato	Bacterial spot	AEQW010000	Potnis <i>et al.</i> , 2011
<i>X. fuscans</i>	aurantifolii	ICPB 10535	Citrus	Citrus canker	ACPY000000	Moreira <i>et al.</i> , 2010

3.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความรุนแรงและการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย

โดยทั่วไปการเกิดโรคของพืชจะประกอบด้วยปัจจัยหลัก 3 ประการ ได้แก่ พืชอาศัย ที่มีพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อโรค เชื้อสาเหตุโรคที่เป็นสายพันธุ์รุนแรงและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และเอื้ออำนวยต่อการพัฒนาการเกิดโรค หากขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งไม่เหมาะสมจะไม่เกิดโรค ในส่วนของเชื้อสาเหตุโรคนั้นจะต้องเป็นสายพันธุ์รุนแรง (virulence strain) ในการก่อให้เกิดโรค (pathogenecity) และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (virulence factor) จึงจะทำให้พืชแสดงอาการโรคที่รุนแรง ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจะเข้าทำลายพืชได้ทางช่องเปิดธรรมชาติ ได้แก่ ปากใบ ต่อมคายน้ำ และทางบาดแผล และเมื่อเชื้อสาเหตุเข้าไปสู่เนื้อเยื่อพืชแล้วจะปลดปล่อย สารพิษ (toxin) หรือ enzyme ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์พืชเพื่อใช้อาหาร ทำให้เกิดอาการแผลจุด หรือแผลไหม้ (Agrios, 2005)

มีรายงานว่าแบคทีเรีย *P. ananatis* สาเหตุโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสสามารถผลิตสาร Indole-3-acetic acid ที่มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพืช (Enya *et al.*,

2007) โดยสารชนิดนี้เมื่ออยู่ในสภาพความเข้มข้นต่ำจะส่งผลให้ผนังเซลล์พืชสูญเสียความตึงในระหว่างการแบ่งเซลล์ และทำให้เกิดอาการเซลล์ตาย (Brandl and Lindow, 1998) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคในเชื้อ *P. ananatis* ยังมีการศึกษาน้อยและไม่ชัดเจน (De Maayer *et al.*, 2008) โดยจากการศึกษามีการรายงานว่าได้พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งถ่ายโปรตีน (protein secretion systems) ทั้ง Type II, Type III และ Type IV ที่สัมพันธ์กับกลไกการก่อโรคของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยทั่วไป (plant-associated bacteria) ดังนั้นกลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *P. ananatis* จึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ Type I secretion systems และมีรายงานว่า *P. ananatis* มี cluster ของยีนที่มีความคล้ายสูง (high homology) กับ Type VI secretion system ซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรคในคน สัตว์ และพืช (Mattinen *et al.*, 2008) นอกจากนี้เชื้อ *P. ananatis* จะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณ (signaling molecules) กลุ่มของ N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) (Yoshida *et al.*, 2006) ใช้สื่อสารระหว่างเซลล์ (quorum sensing) ในกระบวนการเข้าทำลายพืช (Pomini *et al.*, 2006)

ส่วนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* spp. มีรายงานว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบชนิดรองมาจากเชื้อ *P. ananatis* แต่มีบางงานชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *X. axonopodis* และ *X. campestris* เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคในต้นยูคาลิปตัสในประเทศบราซิล และแสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกับเชื้อ *P. ananatis* โดยอาการโรคที่เกิดจาก *X. axonopodis* จะเริ่มจากจุดช้ำน้ำ แผลจะมีลักษณะเป็นเหลี่ยมตามมุมเส้นใบ แผลที่รุนแรงจะขยายตามเส้นกลางใบ และมีอาการไหม้ที่บริเวณขอบใบ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *X. axonopodis* และ *X. campestris* จะมีกลไกในการการทำลายพืชที่ซับซ้อนทั้งการส่งสัญญาณผ่านระบบ TSS (Type secretion system) การครอบครองพื้นที่เนื้อเยื่อพืช (colonization) และการเพิ่มปริมาณประชากรเชื้อระหว่างช่องว่างเซลล์และผลิตสารพิษย่อยผนังเซลล์พืชให้เกิดการ lysis เพื่อใช้เป็นอาหาร ได้แก่ สารในกลุ่ม Polysaccharides (LPS, EPS) และ degradative enzymes ต่างๆ ทั้งนี้การเกิดโรคใบจุดของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *X. axonopodis* และ *X. campestris* ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทย

4. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเพื่อการวินิจฉัยและการจัดจำแนก

ในขั้นตอนการศึกษาโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียนั้นขั้นตอนการจำแนกเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญที่จะทำให้ทราบชนิดของเชื้อสาเหตุ ชีววิทยา และการควบคุม โดยการวินิจฉัยโรคและการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุเป็นกระบวนการที่สำคัญในการพิสูจน์ ยืนยันการเป็นโรคของพืชและสาเหตุของการเกิดโรคที่ถูกต้อง การวินิจฉัยโรคโดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนและวิธีการมากกว่า

1 วิธี ซึ่งจำเป็นต้องปฏิบัติตามขั้นตอนซึ่งเรียกว่า Numerical diagnosis (Sige, 1993) การวินิจฉัยอย่างมีขั้นตอนโดยเริ่มจากการพิจารณาอาการเฉพาะ (specific symptom) ซึ่งจะมีความแตกต่างไปตามกลไกการเข้าทำลายของเชื้อ ได้แก่ อาการเหี่ยว (wilt) อาการเซลล์ตาย ใบจุด ใบไหม้ (necrotic, spot, blight) อาการเน่าและ (rot) อาการปุ่มปม (gall) โดยสามารถเปรียบเทียบได้ดั่งเอกสารตำราหรือคู่มือภาพ (Compendium of crop disease) ทั้งการวินิจฉัยอาการโรคต้องมีข้อมูลลักษณะและรูปแบบการระบาด ประกอบกับประวัติการปลูกในแปลงด้วย นอกจากนี้โรคพืชบางชนิดอาจมีความแตกต่างของอาการหลายลักษณะตามชนิดพันธุ์พืชและสายพันธุ์เชื้อ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมพร้อมข้อมูลเบื้องต้นในการวินิจฉัยด้วย

หลักการวินิจฉัยลักษณะอาการแล้วจะต้องนำตัวอย่างอาการโรคดังกล่าวมาทำการแยกเชื้อจากบริเวณแผลและทำให้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามขั้นตอนมาตรฐานสากล คือ (Schaad, 2001)

- 1) การทดสอบแกรมโดยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ
- 2) การทดสอบปฏิกิริยา Hypersensitive response (HR) โดยจะเกิดอาการเซลล์ตายหลังจากฉีดเชื้อเข้าไปในใบพืช 24-48 ชั่วโมงในพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย
- 3) การทดสอบการเป็นเชื้อก่อโรคบนพืชอาศัยตามขั้นตอน Koch's Postulation
- 4) การศึกษาคุณสมบัติและลักษณะทาง สรีรวิทยา ชีวเคมี เชื้อร่วมวิทยา และชีวโมเลกุลเพื่อการจำแนกแบคทีเรีย
- 5) การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อแยกความแตกต่างทางสายพันธุ์เชื้อ

การศึกษาคูณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืช เป็นหลักการและขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญในการวินิจฉัยและจำแนกชนิดซึ่งจำเป็นต้องใช้วิธีการหลายวิธี เพื่อยืนยันความถูกต้อง โดยเฉพาะกรณีที่ต้องการศึกษาวิจัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่มีข้อมูลน้อย เป็นเชื้อชนิดใหม่ การศึกษาคูณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียประกอบด้วย 3 ระดับการศึกษาได้แก่ การศึกษาคูณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางสรีรวิทยาหรือชีวเคมี และการศึกษาคูณสมบัติความจำเพาะในระดับ โมเลกุล ดีเอ็นเอหรือโปรตีน

คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการศึกษาลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง ผิว และขอบ โดยสามารถเปรียบเทียบได้ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำเพาะ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาหรือลักษณะทางโครงสร้างเซลล์ การมี flagella และตำแหน่ง flagella

การผลิต/สังเคราะห์สารบางชนิด การปลดปล่อยออกนอกเซลล์ การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตกรด ด้วยคุณลักษณะเฉพาะซึ่งผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค ต่างมีการพิสูจน์ยืนยันอีกระดับโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล เช่น ELISA, PCR, dot-blot assay, hybridization เป็นต้น

5. คุณลักษณะจำเพาะเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรค

5.1 การจำแนกระดับสัณฐานวิทยา (Morphology) และสรีรวิทยา (Physiology)

โดยทั่วไปการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคที่แยกจากพืชยูคาลิปตัสซึ่งมีอาการใบจุดน้ำจนถึงอาการใบไหม้ ในการจำแนกขั้นแรกจะต้องทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อซึ่งมีลักษณะรูปร่างท่อนสั้น ดิสคัสแกรมลบ ลักษณะโคโลนีกลม นูน มันวาว มีสีเหลือง ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (general medium) ที่ใช้กันเช่น Blood agar, Nutrient agar และ Tryptic soy agar หรืออาหารที่จำเพาะเจาะจงเพื่อใช้แยกเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น Mac Conkey และ Hektoen agar (Grimont and Grimont, 2005)

5.2 การจำแนกระดับชีวเคมี (Biochemistry)

อาหารที่ใช้มีการปรับปรุงเป็นอาหาร selective สำหรับใช้แยก *P. ananatis* (Hasegawa *et al.*, 2003) มีอาหาร NSCV เป็นอาหารจำเพาะใช้แยกเชื้อซึ่งก่อโรคในต้นข้าวและอาหาร PA20 ใช้แยกเชื้อในหัวหอม (Goszczyńska *et al.*, 2006) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ saprophytes ที่พบส่วนใหญ่ซึ่งในอาหารก็จะมีน้ำตาล arabinol เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวมีความจำเพาะกับเชื้อนี้โดยลักษณะโคโลนีหลังจากเลี้ยงได้ 6-7 วัน จะมีสีเหลืองใส ตรงกลางมีจุดสีเข้มขนาด 3-4 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ *Xanthomonas* sp. ในการแยกเชื้อส่วนใหญ่ใช้อาหารทั่วไป ซึ่งยังคงต้องการใช้อาหารที่จำเพาะ (Mwangi *et al.*, 2006) เช่น อาหาร MD5A medium (Cubeta and Kuan, 1986) อาหาร KM-1 medium (Kim *et al.*, 1982) อาหาร KC และ NCTM3 (Pruvost *et al.*, 2005) อาหาร YTSA-CC medium (Leena *et al.*, 2005) ต้องทำการทดสอบเพื่อยืนยันทางชีวเคมี (Table 4) โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E และ API 50CHE หรือใช้ระบบ Biolog พิสูจน์ซึ่งมีความแม่นยำเพื่อคุณลักษณะพิเศษต่างๆ ของเชื้อ (Stackebrand and Goebels, 1994) ในการเป็นเชื้อโรคพืชต้องผ่านผลการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน Hypersensitive response (HR) จะเกิดอาการเซลล์

ตายในพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย เช่น ในยาสูบ มะเขือเทศ พริก งาม และพืชตระกูลแตง (Kaewnum *et al.*, 2005) ซึ่งการพิสูจน์เชื้อสาเหตุโรคจะดำเนินการอย่างเป็นระบบ (Azad *et al.*, 2000; Cortesi and Pizzatti, 2007)

Table 4 Morphological and biochemical characteristics of *Pantoea* sp. and *Xanthomonas* sp.

Test	Bacterial strain					
	<i>P. ananatis</i>	<i>P. dispersa</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>P. stewartii</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. campsetris</i>
Yellow pigment	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	-	-	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-	+	+	+	+
Production of acid						
Inositol	+	-	+	-	+	+
Melibiose	+	+	-	+	+	+
Xanthomonadin	-	-	-	-	+	+

5.3 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในระดับโมเลกุล (Molecularbiology)

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสจำเพาะ บริเวณ 16S rDNA Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มโมเลกุลของดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆ เท่าในหลอดทดลองผลทำให้ได้ยีนจำเพาะในปริมาณมาก (สุรินทร์, 2545) การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA หรือตำแหน่งที่มีความจำเพาะเจาะจง เช่น ยีนควบคุมการเกิดโรคของเชื้อ ได้แก่ *hrp* gene ในการจำแนกนั้นเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และบริเวณดังกล่าวยังเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) และมีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่ง (specific loci) ในเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดทั้งในระดับจีโนม สปีชีส์ และระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เช่น ระดับสายพันธุ์ (strain) ระดับความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยของสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคพืช (race cultivar specific) (Claudio *et al.*, 2002) ในการจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี สรีรวิทยา และยืนยันผลการจำแนกด้วยการศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ในระดับชนิดและสายพันธุ์ (Towner and Cockayne, 1993) กรณีของเชื้อ *P. ananatis* สาเหตุโรคใบไหม้ มีการใช้ 16S rRNA ของกลุ่มแบคทีเรียซึ่งเป็นบริเวณ

อนุรักษของเชื้อโดยระหว่างเชื้อแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (Coutinho *et al.*, 2002) นำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะจากลำดับเบส (species-specific PCR primer) ในส่วนของ 16S-23S ITS rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ PanITS1 (5'-GTCTGATAG AAAGATAAAGAC-3') กับ EC5 (5'-CGGTGGATGCCCTGGCA-3') (Walcott *et al.*, 2002) และไพรเมอร์ PanITS sn2b (5'-GTCTGATAGAAAGAAAAG AAG -3') กับ PanITS as2b (5'-TTCATATCACCTTAC CGGCGC -3') (Coutinho *et al.*, 2002) สำหรับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* sp. มีรายงานการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณยีนที่ควบคุมการก่อโรคของเชื้อ (*hrp* genes) ในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย เช่น การใช้ไพรเมอร์ RST2 (5'-AGGCCCTGGAAGGTGCCCTG GA-3') และ RST3 (5'-ATCGCACTGCGTACCGCGCGCGA-3'); RST9 (5'-GGCACTAGCAATGACTG -3') และ RST10 (5'-AA TACGCTGGAAGTCTG3'); RST21 (5'-GCACGTCCAGATCAGC ATCGAGG -3') และ RST22 (5'-GGCATCTGCATGCGTGCTCTCCGA-3') ที่จำเพาะต่อบริเวณ *hrpB*, *hrpC* และ *hrpD* ของ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ตามลำดับ สามารถใช้เป็นไพรเมอร์ต้นแบบสำหรับการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* sp. ของยูคาไลปต์สได้

วสันต์ และคณะ (2539) เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นเทคนิคระดับอนุวิทยา ซึ่งใช้สำหรับการตรวจตามกรณินวคลีอกเป้าหมายที่สนใจจากตัวอย่าง ซึ่งมีหลายวิธีขึ้นกับวิธีการติดฉลากตัวตรวจและการเลือกวิธีตรวจตาม Gilbertson *et al.* (1991) ตรวจหาเจมินีไวรัสที่เข้าทำลายถั่วและถ่ายทอดโรคโดยการทาน้ำคั้น ทำการทดสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization และ squash blot hybridization พบว่าดีเอ็นเอตัวตรวจที่จำเพาะเจาะจง (specific probe) สามารถตรวจเจมินีไวรัสได้

วิมล (2553) ทำการตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* โดยเทคนิค Dot blot hybridization ใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ทำให้เกิดโรคแผลจุดแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะไม่เกิดผลบวกกับเชื้ออื่น และจากการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่มีความเข้มข้น DNA ต่ำสุด 3 นาโนกรัม

6. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค Repetitive DNA PCR-based method

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยทั่วไปจะศึกษาจากฐานวิทยาของเชื้อ การเข้าทำลายพืชอาศัย แหล่งที่เก็บตัวอย่าง ความจำเพาะและความหลากหลายของอาการ (typical and variation of symptoms) เป็นหลักได้มีการนำเทคนิคขั้นสูงอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกเพื่อให้ได้ความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในปัจจุบันแบ่งได้กว้างๆ 2 แนวทางคือ ศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype characteristics) และศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากคุณสมบัติทางพันธุกรรม (genetic characteristics) (อัญชนา, 2550) เช่น การวิเคราะห์เปรียบเทียบไอโซไซม์ หรือการจำแนกเชื้อต่ำกว่าระดับสปีชีส์ เช่น physiological race การใช้พืชอาศัยมาตรฐานซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อม

ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ประกอบด้วยหลายเทคนิคที่อาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Ersek *et al.*, 1994; Hegedus and Khachatourians, 1996) การศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITSs) ของ ribosomal DNA (rDNA) มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆ ของ 16S rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้

การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืช มุ่งศึกษาเชื้อสาเหตุในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เช่น pathotype physiological race ความผันแปรของเชื้อสาเหตุโรคพืชในธรรมชาติ การตรวจสอบเชื้อการจำแนกเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วแม่นยำ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของเชื้อเป็นแนวทางในการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (molecular marker) สำหรับใช้ในการติดตามเชื้อสาเหตุโรค วิธีการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่นิยมใช้กันในปัจจุบันได้มาจาก 2 แหล่ง คือ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาบางส่วนของจีโนม ได้แก่ การเพิ่มปริมาณส่วน 16S rDNA gene หรือ 18S rDNA gene จากนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่เรียกว่าเทคนิค Amplified Ribosomal-DNA Restriction Analysis (ARDRA) และเทคนิคที่เพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะแล้วตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่เรียกว่าเทคนิค PCR-RFLP และการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดของจีโนม (สุรินทร์, 2545) ได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplify Fragment Length Polymorphism (AFLP), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ repetitive-PCR (rep-PCR) เป็นต้น

การศึกษาความผันแปรของลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค repetitive element PCR (rep-PCR) เป็นเทคนิคทางอณูวิทยาที่นำมาใช้ในงานด้านอนุกรมวิธาน ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) และพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic) ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมถึงแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วย ซึ่งเทคนิค rep-PCR ถือเป็นเทคโนโลยีการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ความรู้ทางดีเอ็นเอเป็นพื้นฐาน (DNA base technology) เป็นเทคโนโลยีที่ถูกค้นพบและได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์โดยการศึกษาเกี่ยวกับ repetitive DNA sequence (อัญชนา, 2550) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นส่วนของ repetitive sequence 3 ชนิด คือ REP (repetitive extragenic palindromic) ERIC (enterobacterial consensus) และ BOX (interspersed repetitive BOX sequence) โดยแต่ละไพรเมอร์จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง repetitive sequence (Martin *et al.*, 1992) การศึกษามีอยู่ 3 ชุด ประกอบด้วย

1) REP (repetitive extragenic palindromic) เป็นส่วนของ palindromic units (PU) พบ ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* มีขนาด 38 bp มีความสำคัญในการจัดเรียงลำดับเบสบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสสร้างโครงสร้าง stem loop ที่มีความเสถียรในการคัดลอก RNA และมีบทบาทในการช่วยให้ mRNA มีความเสถียรด้วยซึ่ง Versalovic *et al.* (1991) ออกแบบไพรเมอร์ REP จากดีเอ็นเอตัวตรวจ REPALL โดยใช้ลำดับเบสทางปลายแต่ละข้างของ palindrome sequence ของดีเอ็นเอตัวตรวจนี้จากการทำ PCR ในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดพบว่าจะได้แถบดีเอ็นเอเฉพาะในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (strain specific) เช่น *E.coli* สายพันธุ์ 4038 มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 300 1636 1400 800 และ 700 bp ตามลำดับ

2) ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) หรืออาจเรียกว่า intergenic repeat units (IRUs) พบใน *E. coli* และ *S. typhimurium* เช่นเดียวกับ REP แต่มีขนาดใหญ่กว่าพบว่า ERIC มีขนาด 126 bp แพร่กระจายทั่วไปบริเวณที่มีการถอดรหัส (transcribe region) ระหว่าง polycistronic operon และ upstream และ downstream ของ open reading frames (Hulton *et al.*, 1991)

3) BOX (interspersed repetitive BOX sequence) เป็น repetitive sequence ที่มีลักษณะอนุรักษ์สูง พบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* ประกอบด้วย 3 หน่วย คือ BOX A, B และ C มีขนาด 59 45 และ 50 bp ตามลำดับ จากการศึกษาลำดับเบสพบว่าเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างโปรโมเตอร์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *S. pneumoniae* ถึงแม้ลำดับเบสในแต่ละหน่วยย่อยของ BOX จะแตกต่างกันบ้างแต่โดยทั่วไปแล้วมีลำดับเบสคล้ายกับ ERIC และ REP ที่พบในแบคทีเรียพวก enterobacteria (Martin *et al.*, 1992)

จากข้อมูลลำดับเบสของ repetitive element ทั้ง 3 ชนิด จึงมีการนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์ BOX AIR (Louws *et al.*, 1994) ไพรเมอร์ ERIC 1R กับ ERIC 2 และ REP 1R กับ REP 2 (Versalovic *et al.*, 1991) เพื่อใช้ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียโรคพืชหลายชนิดเนื่องจากให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และมีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีต่างๆ เช่น การจำแนกทางเซรุ่มวิทยา, genomic, fatty acid profile, plasmid DNA และ protein analysis รวมทั้งสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงระดับสายพันธุ์ และ pathovar ซึ่งไพรเมอร์ REP ERIC และ BOX มีลำดับเบส (sequence) ดังนี้

BOX	(BOXAIR)	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
ERIC	(ERIC1R)	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
	(ERIC2)	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
REP	(REP1RI)	5'-IIICG(AGCT)ICGICATCIGGC-3'
	(REP2I)	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

I = Inosine

ทั้งนี้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำปฏิกิริยา rep-PCR สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์กับลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่างๆ ได้ เช่น ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ระดับความรุนแรงของโรค ลักษณะอาการโรค (กุลชนา, 2546) และกลุ่มประชากรของเชื้อจากแหล่งต่างๆ (Tika *et al.*, 1999)

7. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีและวิธีผสมผสาน

เป็นวิธีการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ หรือสารธรรมชาติในการควบคุม ช่วยทำลายหรือลดประชากรของเชื้อสาเหตุโรคให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อสาเหตุโรค มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเพื่อครอบครองพื้นที่ผิวใบ การสร้างสารปฏิชีวนะมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค การส่งเสริมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาตินั้น (resident antagonist) เพิ่มปริมาณและเกิดกิจกรรมการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (Tronsmo, 1992) การป้องกันพื้นผิวส่วนต่างๆ ของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเข้าทำลายพืชทางชีววิธี ซึ่งวิธีการนี้ต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญและสามารถแข่งขันการใช้อาหารบนผิวใบหรือส่วนต่างๆ ของพืชได้ดี สภาพแวดล้อมจะเข้ามามีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ฯลฯ การดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์มีทั้งที่เป็นแบบ epiphytes และ endophytes (Andrews, 1992; Tronsmo, 1992) การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพจากส่วนของพืชที่มีในธรรมชาติ มีสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์หลายชนิดที่นำมาใช้ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในการเป็นปฏิปักษ์ โดยสรุปแล้วจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกหรือวิธีการเป็นศัตรูต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญมีอยู่ 5 กลไกหลัก ประกอบด้วย การผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรค (antibiosis) การเจริญแข่งขันครอบครองพื้นผิวพืช การจำกัดพื้นที่และอาหารของเชื้อโรค (competition) การเป็นปรสิตและตัวห้ำโดยการกินและใช้อาหารจากตัวเชื้อโรค (parasitism and predation) การชักนำและการกระตุ้นให้พืชให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) การกระตุ้นหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชให้เพิ่มขึ้น (plant growth promoting rhizobacteria) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ยังมีคุณสมบัติทางอ้อมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและยับยั้งเชื้อโรค ได้แก่ การผลิตสารส่งเสริมประสิทธิภาพการยึดติดแนบแน่นกับผิวพืช (biosurfactant) การรักษาและแก้ไขความผิดปกติตลอดจนปรับความสมดุลให้พืช (bioremediators) การส่งเสริมควบคุมกระบวนการทางชีวเคมีหรือเมตาบอลิซึมของพืชให้เกิดความสมดุลเต็มพิสัยตามลักษณะพันธุกรรมพืช ตลอดจนการกระตุ้นและชักนำขีดความสามารถของลักษณะทางสรีรวิทยาให้แสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ (physiostimulator) การผลิตสารไซเดอร์โรฟอว์ (siderophore) ในการแย่งยึดจับธาตุเหล็ก (Fe^{+3}) ในดินมาใช้ประโยชน์ เป็นสาเหตุให้เชื้อโรคพืช ขาดธาตุเหล็กในการทิวจำนวน มีคุณสมบัติในการส่งเสริมและการสนับสนุนการใช้ธาตุอาหารของพืช (biofertilizers) (สุตฤดี, 2553)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส

เก็บตัวอย่างใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุดเหลี่ยมจากแหล่งผลิตกล้ายูคาลิปตัสในจังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งเป็นแหล่งปลูกต้นยูคาลิปตัสที่สำคัญ สุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในโรงเรือนปักชำกล้า แปลงต้นพันธุ์ และลานวางกล้าโดยการสุ่มตัวอย่างเป็นระยะในทุกฤดู การสุ่มแต่ละครั้งทำในพื้นที่ที่สุ่มสำรวจแบบกระจายขึ้นอยู่กัลักษณะพื้นที่การเก็บได้แก่ การเก็บในสภาพโรงเรือนปักชำกล้าใน 1 โรงมีจำนวน 8 โต๊ะ สุ่มเก็บบนโต๊ะที่มีขนาด 2x19.5 เมตร หรือบนลานวางกล้าสุ่มเก็บบนโต๊ะที่มีขนาด 2x12 เมตร จะสุ่มเป็นจุดรวม 10 จุด แต่ละจุดมีพื้นที่ 1 ตารางเมตร (สุ่มจำนวนต้น 10 ต้น) ต่อพื้นที่หนึ่งแปลงหรือโรงเรือน โดยเลือกเก็บตัวอย่างต้นกล้ายูคาลิปตัสที่มีอาการแผลจุดน้ำกระจายอยู่ทั่วไป อาการจุดเหลี่ยม และอาการแห้งตายลงมาจากปลายยอด (Rivadave et al., 2008) รวมทั้งกลุ่มอาการใบจุด แผลไหม้ มี halo ล้อมรอบ เส้นกลางใบหรือก้านใบดำ และขอบใบไหม้ นำตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการโรคเก็บใส่ถุงพลาสติก และรักษาสภาพใบในกล่องเย็นหรือกล่องน้ำแข็ง บันทึกข้อมูลในรายละเอียดเกี่ยวกับสถานที่พบโรค ลักษณะอาการ โดยละเอียด อายุพืช และสายพันธุ์ของยูคาลิปตัส โดยถ่ายภาพประกอบเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปแยกเชื้อในการวินิจฉัยโรคในขั้นตอนต่อไป

ทั้งนี้จากตัวอย่างพืชทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างมาจะมีการนำไปแยกเชื้อสาเหตุ และการวิเคราะห์การระบาดที่แท้จริงจากสมการ

$$\% \text{ การระบาด} = 100 \times \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบโรค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมจากใบพืช

นำตัวอย่างใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุดเหลี่ยม และอาการที่แตกต่างกันจากการสุ่มในขั้นตอนที่ 1.1 มาตรวจวินิจฉัยลักษณะอาการเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo

microscope จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าว มาแยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี tissue transplanting และวิธี cross streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA)

1.2.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting

ตัดเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่แสดงอาการโรคสีเหลืองลักษณะเหลี่ยม ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แช่ sodium hypochlorite 0.1% นาน 5 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นใช้คีมคีบ (forceps) ปลูกเชื้อคืบขึ้นพืชชั้นลงบนกระดาษกรองปลูกเชื้อซึ่งเตรียมไว้ใน plate วางชิ้นพืชบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังบ่มเชื้อ

1.2.2 การแยกเชื้อด้วยวิธี cross- streak plate

นำชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคแช่ sodium hypochlorite 0.1% นาน 5 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งแล้วนำมาใส่ใน microcentrifuge tube ซึ่งมีน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิตร แล้วบดชิ้นส่วนพืชให้ละเอียดใช้ loop ปลูกเชื้อแต่ละน้ำมา streak บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เช็การเจริญที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

สุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียลักษณะ โคโลนีสีเหลือง กลม มันวาว ที่คาดว่า เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมนำมา cross streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ใหม่ ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์นำเชื้อที่ได้เก็บรักษาบนอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะสั้น และเก็บใน glycerol 20% ใส่ใน microcentrifuge tube เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น stock culture ไว้ศึกษาต่อไป

1.3 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.3.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำ

นำตัวอย่างดินบริเวณรากยูลิปัสต้นที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรคมารทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี soil dilution plate โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ผสมลงในน้ำหนึ่งฆ่า

เชื้อ 90 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเคลื่อนออกมาอยู่ในน้ำผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ปล่อยให้ดินตกตะกอนและเก็บเฉพาะส่วนของน้ำมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อด้วยวิธี 10-fold dilution ความเข้มข้นจนถึงระดับที่ 10^{-8} เท่า ส่วนตัวอย่างน้ำส้มเก็บจากบริเวณโรงเรือน และลานวางกล้า และนำตัวอย่างเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution โดยเจือจางที่ 10^{-8} จากนั้นใช้ micropipette คูด suspension ตัวอย่างดินและน้ำ ที่ความเข้มข้น 10^{-4} 10^{-6} และ 10^{-8} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดและเกลี่ยกระจาย (spread) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ NA และ King's medium B ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง จนเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการ cross streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหาร NA 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อในระยะสั้นในหลอดอาหารเลี้ยง และเก็บด้วย glycerol 20% ที่แช่ไว้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในระยะยาว และทำการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

1.3.2 การแยกเชื้อจากผิวใบและผิวราก

แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบและผิวรากยาลิปดัสที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรค ด้วยวิธี leaf wash technique (Chase *et al.*, 1992) ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผิวรากมีขั้นตอนเดียวกัน โดยนำตัวอย่างใบและราก ปริมาณ 10 กรัม แช่ลงในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร หยดสารลดแรงตึงผิว (Tension-T7) ลงไป 1-2 หยด แช่ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาทีประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียออกมาอยู่ในน้ำและใช้เป็น stock suspension ทำการเจือจางความเข้มข้นของ suspension ด้วยวิธี 10-fold dilution ที่ 10^{-7} จากนั้นใช้ micropipette คูด suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-5} และ 10^{-7} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดและเกลี่ยกระจาย (spread) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ NA และ King's medium B อย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak บนอาหาร NA 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อในระยะสั้นและในระยะยาวเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

2. การศึกษาชีววิทยาและความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม

2.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (Hypersensitive response: HR)

เนื่องจากการชักนำให้พืชเกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (Hypersensitive response) เป็นคุณสมบัติหนึ่งที่ใช้ทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงนำ

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการ โรค และให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาแกรมเป็น แกรมลบมาทดสอบโดยใช้พืชทดสอบตามมาตรฐานด้านโรคพืช 3 ชนิด คือ มะเขือเทศ พริก และ ยาสูบ (Braun-Kiewnick and Sands, 2001) ขั้นตอนการทดสอบโดยนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ที่เลี้ยงเป็นโคโลนีเดี่ยวย้ายลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุใน หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าในอัตราเร็ว 120 รอบ/ นาที หลังจากนั้นมาเตรียม cell suspension ปรับด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นให้มีค่า optical density (O.D.) 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ประมาณ 10^8 cfu/ml จากนั้นใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ไม่ใช่เข็มฉีดยา คูด cell suspension ของเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกแล้วฉีดเข้าสู่เนื้อ ใบของพืชทดสอบ ได้แก่ มะเขือเทศ พริก และยาสูบ จนเกิดอาการเซลล์เต่งตรงบริเวณฉีดเชื้อและ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เนื้อเยื่อพืชจะกลับสู่สภาพปกติตรวจสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่าง เียบพลัน ซึ่งถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชจะเกิดอาการตายของเซลล์ (necrotic) บนใบพืชบริเวณที่ฉีด เชื้อให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังฉีด cell suspension เชื้อสาเหตุโรค (Klement *et al.*, 1990)

2.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัยยูคาลิปตัส

นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้พืชทดสอบเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่าง เียบพลันบนพืชทดสอบตามการทดลองที่ 2.1 มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบน ดันยูคาลิปตัสตามหลัก Koch's postulation โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคใน อาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 300 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าใน อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียม cell suspension โดยปรับความเข้มข้น ของเซลล์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.1 และทำการปลูกเชื้อลงบนดันยูคาลิปตัสสายพันธุ์อ่อนแอ คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* ในระยะต้นกล้า (อายุ 1-2 เดือน) วางแผนทดลองแบบ CRD โดย เปรียบเทียบกรรมวิธีปลูกเชื้อ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การพ่นเชื้อโดยนำ cell suspension ที่ได้มาผสมกับ สารจับใบและพ่นให้ทั่วต้น (spray) จากนั้นนำดันยูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อไปไว้ในโรงพลาสติกใสคลุม ทั้งต้นเพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้อยู่ระหว่าง 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ (Klement *et al.*, 1990) และวิธี ที่ 2 ใช้หลอดฉีดยาพลาสติกหนึ่งฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) โดยไม่ใช่เข็มฉีดยา คูด cell suspension ของเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกแล้วฉีดเข้าสู่เนื้อ ใบของพืชในลักษณะเดียวกับการศึกษา HR (ข้อที่ 2.1) แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 5 ซ้ำ ประเมิน การเกิดโรคโดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อพ่นต้นและฉีดเข้าใบแทนเชื้อ

สาเหตุโรค จากวิธีการฉีดเชื้อ cell suspension เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อโรคของสายพันธุ์ เชื้อทดสอบโดยประเมินจาก ระยะเวลาการเกิดโรค การพัฒนาอาการโรค ลักษณะอาการโรคและ การลุกลามของโรค ส่วนการประเมินการเกิดโรคโดยวิธีการฟ้นไบจะประเมินจากความเสียหายของ พื้นที่ไบที่ถูกทำลาย

นำต้นยูคาลิปตัสที่ได้รับการปลูกเชื้อและแสดงอาการของโรคใบจุดเหลี่ยมมาแยกเชื้อ อีกครั้ง (re-isolation) บนอาหาร NA และปลูกเชื้อลงบนต้นยูคาลิปตัสปกติอีกครั้งเพื่อยืนยันการเป็น เชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง

2.3 การประเมินระดับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อในการเข้าทำลายพืชอาศัยยูคาลิปตัส

จากการศึกษาตามขั้นตอน ข้อ 2.1 และ 2.2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบยูคา ลิปตัสเกิดเป็นโรคกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มเป็นเชื้อก่อโรคที่แท้จริง เนื่องจากชักนำให้พืช ทดสอบเกิดโรคได้หลังปลูกเชื้อ โดยเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มที่ 1 โคโลนีมีสีเหลืองอ่อนใส กลมมนูน มันวาว ขอบเรียบ สามารถแยกได้มากกว่ากลุ่มที่ 2 และแสดงอาการ โรคใบจุดเหลี่ยมที่ชัดเจนและ รวดเร็ว จึงทำการทดสอบเชิงลึกโดยการประเมินระดับความรุนแรงของระดับสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้ ของกลุ่มดังกล่าว ในการชักนำให้พืชเกิดโรคในสภาพควบคุมเดียวกัน จึงนำเชื้อทั้ง 190 ไอโซเลท มาทดสอบปลูกเชื้อลงบนต้นยูคาลิปตัสพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* อายุ 1-2 เดือน ด้วย วิธีการฟ้นไบและทำการประเมินความรุนแรงของโรคที่ 14 วัน จะแบ่งการประเมินตามระดับความ รุนแรงเป็น 4 ระดับตามความเสียหายของพื้นที่ไบที่ถูกทำลาย (กฤษณา และคณะ, 2553) ได้แก่ ระดับความรุนแรงโรค ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการโรค 0% ระดับ 1 = แสดงอาการจุดเล็กน้อย 1-30% ของพื้นที่ไบ ระดับ 2 = แสดงอาการจุดแผลปานกลาง 31-60% ของพื้นที่ไบ และระดับ 3 = แสดง อาการจุดแผลรุนแรง 61-100% ของพื้นที่ไบ

3. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัส

จากการศึกษาเบื้องต้นในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคตาม ขั้นตอนในข้อ 2 โดยใช้หลักการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชักนำการเกิดปฏิกิริยาตอบสนอง อย่างเฉียบพลัน (HR) และความสามารถในการก่อโรคนบนพืชทดสอบ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 2 กลุ่ม

ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อก่อโรค จึงนำเชืวดังกล่าวมาทำการจำแนกชนิดโดยวิธีการมาตรฐานดังนี้

3.1 การศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหารกึ่งคัดเลือก

เชื้อที่แยกได้มีโคโลนีแตกต่างกันและมีแนวโน้มเป็นเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* sp. และ *P. ananatis* จึงได้ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการเจริญบนอาหารกึ่งคัดเลือก ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อจัดแบ่งกลุ่มเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรค โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ NA และ yeast extract dextrose-calcium carbonate agar (YDC) (Schaad, 2001) และอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเลือกจำเพาะที่ปรับปรุง (modified medium) สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonad* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัส คือ อาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin 50 ppm + Bacitracin 10 ppm) (Harveson and Schwartz, 2007) และอาหาร PA20 agar ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะต่อเชื้อ *Pantoea ananatis* (Goszczyńska *et al.*, 2006)

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยการใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่แยกได้มาทำการ cross streak บนอาหารทดสอบแต่ละชนิดบ่มเชื้อที่มีสภาพอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตและลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญบนอาหารที่ 24-48 ชั่วโมงหลังบ่มเชื้อ

3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีจัดเป็นข้อมูลสำคัญในการใช้ประกอบการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จึงนำตัวแทนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ที่ผ่านการยืนยันเป็นเชื้อก่อโรคด้วยวิธีการข้างต้น มาทำการศึกษาคูณสมบัติต่างๆ ได้แก่ xanthomonadin production (Schaad, 2001) (กรณีเชื้อมีแนวโน้มเป็น *Xanthomonas* sp.) starch hydrolysis, acid production, methyl red test, voges - proskauer, indole production, motility test และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน จากนั้นนำข้อมูลที่ทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition (Holt *et al.*, 1994) ทั้งนี้การศึกษาคูณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีดังกล่าวมีการทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ *Xanthomonas* spp. และ *P. ananatis* จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และจากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์การเกษตรกองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีอนุวิทยา

3.3.1 การเตรียมเชื้อและการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับการเป็นเชื้อสาเหตุของอาการโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัสจากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหาร NA จนได้โคโลนีเดี่ยว ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 5 มิลลิตร เขย่าเชื่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี miniprep (Lazar, 1994) โดยแบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม lysis buffer (40 mM Tris-acetate pH 7.8, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสลงหลอด microcentrifuge หลอดใหม่เติมด้วย chloroform: isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตรเท่ากับน้ำส่วนใส (V/V) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที ดูดน้ำส่วนใสด้านบนของหลอดใสหลอดใหม่ วัดปริมาตรแล้วเติม isopropanol ที่แช่เย็นจัด (-20 °C) ปริมาตรเท่ากับส่วนใสผสมให้เข้ากันจะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสโดยใช้ universal primer บริเวณยีน 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์

บริเวณต่างๆ ตามวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการศึกษา มี 3 คู่ คือ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 Forward (5' AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') Reward (3' TGG GAC GAA GTC GTA ACA AGG TA 5') (De Baere *et al.*, 2004) ไพรเมอร์คู่ที่ 2 27F (5' AGT AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG 3') 1492R (3' TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 5') (Lane, 1991) ไพรเมอร์คู่ที่ 3 6F (5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3') 1510R (3' AGT CGT AAC AAC GTA ACC CTG CAG CAC 5') (van der Meer *et al.*, 1998) โดยใช้ PCR mixture ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย sterile water 16.5 μ l, 10X Taq buffer 2.5 μ l, 2.5 μ M dNTPs 2 μ l, MgCl 0.5 μ l, Taq DNA - polymerase 0.5 μ l, 10 μ M primer mix 2 μ l, DNA Template 1 μ l จากนั้น นำ PCR mixture ดังกล่าวเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycles) รุ่น My Genie 32 Thermal Block PCR (Bioneer, Korea) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	1 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95	1 นาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	56	1 นาที	35
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที	1

ตรวจสอบผลของ PCR products โดยการแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่าน กระแสไฟฟ้าบนเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) ใช้ 1% อะกาโรส ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ประมาณ 60 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide 10 นาที และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นสกัด PCR Product ที่ได้ออกจากเจล (DNA elution) สกัดสายดีเอ็นเอ ให้บริสุทธิ์ (purification) วัดความเข้มข้นได้ 40 นาโนกรัม นำตัวอย่างดีเอ็นเอส่งวิเคราะห์ลำดับสาย นิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท Macrogen ของประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับสาย นิวคลีโอไทด์ sequence ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสโดยใช้ฐานข้อมูล NCBI ด้วย โปรแกรม BLAST และ Alignment จากนั้นวิเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม BioEdit เพื่อ หาค่าความใกล้เคียงของเชื้อเป้าหมาย และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA5 เพื่อ เปรียบเทียบและจัดกลุ่มเชื้อกับสายพันธุ์ใกล้เคียง

3.3.3 การยืนยันการจำแนกเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. ananatis* pv. *ananatis* สายพันธุ์อ้างอิงจากกรมวิชาการ และเชื้อ *Xanthomonads* สายพันธุ์ต่างๆ โดยตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนบริเวณ 16S-23S ITS ของเชื้อ *P. ananatis* ใช้ไพรเมอร์ PanITS sn2b (5' GTC TGA TAG AAA GAA AAG AAG 3') กับ PanITS as2b (5' TTC ATA TCA CCT TAC CGG CGC 3') (Coutinho *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีรายงานในการใช้ตรวจสอบเชื้อ *P. ananatis* โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เป็นเชื้อ *P. ananatis* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 389 bp เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ 100 ng, sterile water 16.5 μ l, 10X Taq buffer 2.5 μ l, 2.5 μ M dNTPs 2 μ l, MgCl 0.5 μ l, Taq DNA - polymerase 0.5 μ l, 10 μ M primer mix 2 μ l ผสมสารให้เข้ากันจากนั้นนำ PCR mixture ดังกล่าวเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycles) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ (Coutinho *et al.*, 2002)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	1 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	30 นาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	56	30 นาที	30
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที	1

ตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร แยกขนาดของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสใช้ 1.2% อะกาโรส ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมด้วยเอทidiumโบรไมด์ 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย ultraviolet transilluminator

3.3.4 การพัฒนาไพรเมอร์จากยีนบริเวณ *hrpF* สำหรับการจำแนกและตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas* spp. สายพันธุ์จากยูคาลิปตัส

เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามข้อ 3.3.2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดยูคาลิปตัสมีสาเหตุจากเชื้อที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่มคือ *P. ananatis* และ *Xanthomonas* sp. และผลการใช้ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS ตามข้อ 3.3.3 พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ที่จำแนกเป็น *P. ananatis* เท่านั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อกลุ่มที่ 1 ที่เป็น *Xanthomonads* ได้ และยังไม่มียางานการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการตรวจสอบเชื้อดังกล่าว จึงได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะยีนบริเวณ *hrpF* สำหรับจำแนกเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวในยูคาลิปตัส โดยการออกแบบไพรเมอร์ *hrpF* เพื่อให้สามารถตรวจพิสูจน์การเป็นเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวในยูคาลิปตัสพัฒนาจาก *Xanthomonas* spp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการระบาดในประเทศไทยและที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ของยีนก่อโรคที่ตำแหน่ง *hrpF* ได้แก่ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (NC_003919), *X. campestris* pv. *campestris* (AE008923), *X. campestris* pv. *vasicatoria* (NC_007508) และ *X. axonopodis* pv. *glycines* (AF499777) ทำการออกแบบโดย degenerate primer หลังจากนั้นพิสูจน์และยืนยันผลการเป็นเชื้อสาเหตุโรคด้วยไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยนำแบคทีเรียเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นมาตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค PCR ใช้ PCR mixture ที่มีปริมาตรรวม 25 μ l (ประกอบด้วย sterile water 16.75 μ l, 10X Taq buffer 2.5 μ l, dNTPs 1.5 μ l, MgCl 0.75 μ l, Taq DNA – polymerase 0.5 μ l, 10 μ M primer mix 2 μ l, DNA Template 1 μ l) จากนั้นนำ PCR mixture ดังกล่าวเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycles) โดยตั้งอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	5 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1 นาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	56	1 นาที	30
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที	1

ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยการเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

นำผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อ *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ไปศึกษาความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) กับเชื้อ *Xanthomonads* ชนิดต่างๆ ที่มีในฐานข้อมูล (GenBank) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *hrpF* ด้วยวิธี ClustalW2 Multiple Alignment เพื่อหาคำแหน่งบนสาย DNA sequence ที่มีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสมากที่สุด เพื่อใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) สำหรับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* และตรวจสอบยืนยันความจำเพาะของไพรเมอร์โดยเทคนิค PCR เช่นเดียวกับข้อที่ 3.3.3

Table 5 Primers for *Xanthomonas* sp. and *Pantoea ananatis* identification

No.	Primer	Sequence (5'-3')	bp	Tm°C	Primer set	Product size (bp)	Identify	Designed in
1	XHrpF-F	GAC AAG ATC AAC	21	57.3	HrpF	900	<i>Xanthomonas</i> spp.	This study
		GAY CCT TCC						
	XHrpF-R	CTR TTG ATG GTG	20	54.5				
		TCC AGA GT						
2	HrpFS-F	TCT CAG CAA GTT CGT	22	54.8	Specific	360	<i>X.axonopodis</i>	This study
		TTC CCA C			HrpF		pv. <i>eucalypti</i>	
	HrpFS-R	GGT GCA TCT GGG AGC	20	55.9				
		TGG AT						
3	PanITS sn2b	GTC TGA TAG AAA GAA AAG	18	52	16S-23S ITS	398	<i>P.ananatis</i>	Coutinho et al., 2002
	PanITS as2b	TTC ATA TCA CCT TAC CGG	18	69.8				
4	6F	GGA GAG TTA GAT CTT	22	60.3	16S	1500	Eubacterial	van der Meer et al., 1998
		GGC TCA G			rRNA			
	1510R	GTG CTG CAG GGT TAC	30	66.5				
		CTT GTT ACG ACT						

Table 5 Continued

No.	Primer	Sequence (5'-3')	bp	Tm°C	Primer set	Product size (bp)	Identify	Designed in
5	Forward	AGT TTG ATC CTG GCT	18	53.8	16S	700	Universal	De Baere
		CAG			rRNA		bacterial	<i>et al.</i> ,
	Reward	TAC CTT GTT ACG ACT	23	55.3				2004
		TCG TCC CA						
6	27F	AGA GTT TGA TC(A/C)	17	52.4	16S	1200	Specific	Lane,
		TGG CTC AG			rRNA		bacteria	1991
	1492R	TAC GG(C/T) TAC CTT	16	45.7			universal	
		GTT ACG ACT T						

3.3.5 การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค Dot blot hybridization

3.3.5.1 การสังเคราะห์ Probe โดยวิธี PCR

การติดฉลาก probe ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยไพรเมอร์จำเพาะ *hrpFS* ของจุลินทรีย์ *HrpFS-F* (5' TCT CAG CAA GTT CGT TTC CCA C 3') และ *HrpFS-R* (3' GGT GCA TCT GGG AGC TGG AT 5') (Table 5) ทำการสังเคราะห์ probe จากดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* (RTDNO1-2) ทำการติดฉลากด้วย DIG High Prime labeling (Roche, Germany) สำหรับผลควบคุมผลบวกใช้ dNTPs ปกติแทน DIG High Prime labeling สำหรับผลควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นแทน DNA แล้วนำเข้าเครื่อง PCR ผลควบคุมบวกจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp จากการวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์ DNA โดยนำ PCR product 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye 1 ไมโครลิตร มาแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ 30-45 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการใช้ ultraviolet transilluminator เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

3.3.5.2 ตรวจสอบเชื้อ Xanthomonads ด้วยวิธี Dot blot hybridization

การตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวของกล้วยไม้ปัดส โดยตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนตามขนาดที่ต้องการ กำหนดจุดสำหรับหยด DNA ของแต่ละตัวอย่างให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย 20X SSC (3M NaCl, 0.3M trisodium citrate) เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนมาวางบนกระดาษกรอง (whatman) ให้แห้งพอหมาดแล้วจึงหยด DNA ที่สกัดจากตัวอย่างปริมาณ 5 ไมโครลิตร (~50 ng) แล้วหยดสารละลาย 2X SSC ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตามรอยที่หยดตัวอย่างไว้ จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนด้านที่หยดตัวอย่างไปฉายแสงอุลตราไวโอเลต นาน 2 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาทำการ Pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (5X SSC, 0.1% w/v N-lauroylsarcosine, 0.02% w/v SDS, 1% w/v blocking reagent) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อแผ่นเมมเบรน ขนาด 100 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DIG-*hrp*FS-probe ที่เตรียมโดยใส่ 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ ddH₂O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่หลอดในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติม ในละลาย hybridization ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันเปลี่ยนสารละลาย hybridization ในครั้งแรกออกจากแล้วเติมสารละลาย hybridization ที่มีดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) เข้าไป hybridization ต่อที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง

จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization มาล้างด้วยสารละลาย washing I (2X SSC, 0.1% SDS) 2 ครั้งๆละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างต่อในสารละลาย washing II (0.1X SSC, 0.1% SDS) 2 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เข้าสู่ขั้นตอนการตรวจผลของปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันโดยนำแผ่นเมมเบรนมาล้างใน buffer I (0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH 7.5) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายมาแช่ใน buffer II (1% w/v blocking reagent ใน buffer I) ใส่ถุงพลาสติกปิดถุงให้สนิทไม่มีฟองอากาศเข้าไปแช่เบาๆในน้ำที่อุณหภูมิห้องเวลา 30 นาที แล้วเติม Anti-digoxigenin conjugate AP อัตราส่วน 1 : 10,000 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน buffer I เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้งๆละ 15 นาที แล้วย้ายมาแช่ต่อใน buffer III (0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH 9.5) นาน 2 นาที ย้ายแผ่นเมมเบรนใส่ถุงพลาสติกเติม CDP star อัตรา 1/ 500 H₂O ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เคลี่ยให้ทั่วผิวหน้าแผ่นเมมเบรน ตรวจผลปฏิกิริยาโดยนำไปประกบฟิล์ม 30-45 นาที แล้วนำมาล้างฟิล์มเพื่อตรวจสอบจุดคำที่ปรากฏขึ้น

4. การศึกษาชนิดพืชอาศัย

4.1 การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อต่อสายพันธุ์ยูคาลิปตัส

นำเชื้อสาเหตุโรค *X. axonopodis* pv. *eucalypti* (RTDNO1-2) ที่แยกได้จากใบยูคาลิปตัสเกิดโรคลูกกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ที่ทำให้พืชทดสอบเกิดโรคได้รุนแรงและรวดเร็วหลังปลูกเชื้อ ในขั้นตอนข้อที่ 2.2 จึงทำการทดสอบกับสายพันธุ์ยูคาลิปตัสต่างๆ ที่มีจำหน่ายเป็นการค้า จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. grandis*, *E. urophylla* (N.1), *E. urophylla* (N.2), *E. camaldulensis* x *E. pellita*, *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.1), *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.2) และ *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.3) อายุ 1-2 เดือน ปลูกเชื้อด้วยวิธีการพ่นใบ และทำการประเมินความรุนแรงของโรคที่ 7, 14, และ 21 วัน หลังปลูกเชื้อจะแบ่งการประเมินตามระดับความรุนแรงตามความเสียหายของพื้นที่ใบที่ถูกทำลาย

4.2 การศึกษาการเข้าทำลายข้ามบนพืชอาศัยต่างชนิด

การศึกษานิตพืชอาศัย (plant species) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เพื่อตรวจสอบ pathovars โดยนำเชื้อที่ผ่านการพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมทุกสายพันธุ์ ซึ่งผ่านการจำแนกแล้วว่าเป็นเชื้อ *X. axonopodis* มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนพืชอาศัยใกล้เคียง (cross inoculation) ที่มีรายงานการแพร่ระบาดของโรคในปัจจุบัน ได้แก่ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ถั่วเหลือง (*Glycine max*) มะกรูด (*Citrus hystrix*), มะนาวแป้น (*Citrus aurantifolia*) และมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) เปรียบเทียบกับเชื้อสาเหตุโรคของพืชแต่ละชนิด คือ *X. campestris* pv. *vasicatoria* (สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ), *X. axonopodis* pv. *glycines* (สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง), *X. axonopodis* pv. *citri* (โรคแคงเกอร์พืชตระกูลส้ม) และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* (โรคใบไหม้มันสำปะหลัง) โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร NB นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าในอัตราเร็ว 120 รอบ/นาที เตรียม cell suspension ที่ 10^8 cfu/ml แล้วปลูกเชื้อลงบนต้นพืชทดสอบโดยวิธีการพ่นใบและฉีดเข้าสู่ผิวใบตามวิธีการข้อ 2.2 บันทึกผลการทดลองโดยตรวจสอบลักษณะการเกิดโรคเปรียบเทียบกับ control ที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน cell suspension

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม

เนื่องด้วยวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR เป็นที่นิยมในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อและความสัมพันธ์ในระดับฟีโนไทป์ต่างๆ จึงนำเทคนิคดังกล่าวมาทำการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และระดับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสโดยนำเชื้อที่รวบรวมได้และผ่านขั้นตอนการพิสูจน์ตามขั้นตอนต่างๆ แล้วมาเลี้ยงบนอาหาร NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว และย้ายลงเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื่อนาน 18-24 ชั่วโมง นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี miniprep (Lazar, 1994) ตามวิธีการในข้อ 3.3.1

นำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วมาศึกษาความหลากหลายด้วยวิธี rep-PCR จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด (Vauterin *et al.*, 2000) คือ

1. ไพรเมอร์ REP ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ repetitive extragenic palindromic (REP)
2. ไพรเมอร์ ERIC ซึ่งจำเพาะกับ enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC)
3. ไพรเมอร์ BOX ซึ่งจำเพาะกับ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) ซึ่งมีลำดับเบสในไพรเมอร์ดังนี้ (Louws *et al.*, 1994)

BOX	(BOXA1R)	5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
ERIC	(ERIC1R)	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -3'
	(ERIC2)	5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
REP	(REP1RI)	5'- IIIICG(AGCT)ICGICATCIGGC-3'
	(REP2I)	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

I = Inosine

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ 50 นาโนกรัม ผสมกับ 1X PCR buffer, 2mM MgCl₂, dNTPs ชนิดละ 125 μM, เอนไซม์ *Taq* polymerase 1.0 unit และไพรเมอร์ ERIC หรือ REP สายละ 50 pmol และ BOX จำนวน 100 pmol แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

My Genie 32 Thermal Block PCR (Bioneer, Korea) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาให้มีการ
สังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ (Vauterin *et al.*, 2000)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1 นาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	53 (BOX)	1 นาที	
	52 (ERIC)	1 นาที	35
	40 (REP)	1 นาที	
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	65	8 นาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15 นาที	1

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร มาผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ใช้ 1.5% agarose ใน 1X TBE ใช้ กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ตรวจสอบ แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

วิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ข้างเคียงโดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและชัดเจน โดย ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเท่ากับ 1 ถ้าไม่ปรากฏให้คะแนนเท่ากับ 0 จากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ โดยการใช้โปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System (NTSYS) (Rohlf, 1993) จัดกลุ่มโดยใช้ SAHN Clustering และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA (unweighted pair-group method with averages) คำนวณค่า cophenetic correlation (r) วิเคราะห์ dendrogram ที่ได้เปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มของเชื้อตามแหล่งที่มาของเชื้อและความสามารถหรือความรุนแรง ในการก่อให้เกิดโรค

6. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม

6.1 การคัดเลือกในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งผลิตกล้าแยกจากบริเวณ ราก ใบ ดิน และน้ำ จากวิธีการข้อ 1.3 มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์/ชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดยูคาลิปตัสโดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

6.1.1 ทดสอบด้วยวิธี dual culture

โดยนำเชื้อมา cross streak บนอาหาร NA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงลงในอาหารเหลว NB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาทิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับค่าความขุ่นของ cell suspension เชื้อด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม โดยการใช้ลูป (loop) เผลาไฟเพื่อฆ่าเชื้อจุ่ม cell suspension ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ขีด (streak) เป็นแนวตรงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะคู่ขนานลงบนอาหาร NA ให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48-72 ชั่วโมง ประเมินลักษณะการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เป็นคู่กันในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อประเมินการเจริญร่วมกัน บันทึกผลการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจะประกอบด้วย 4 ซ้ำ ต่อเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ control ที่ใช้เฉพาะเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมไป streak ขนานกันทั้ง 2 เส้น แทนการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

6.1.2 ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อทดสอบคุณสมบัติการผลิตสาร secondary metabolites ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม โดยนำเชื้อมา cross streak บนอาหาร NA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB แยกกันระหว่างเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาทิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ cell suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นนิ่ง

ฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ micropipette คูด suspension ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมลงอาหาร NA ที่ห่อด้วยอุณหภูมิตั้งที่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้แห้งผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง ใช้ micropipette คูด suspension แบคทีเรียที่เตรียมข้างต้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยวางกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จานละ 4 จาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) หลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง

$$\text{บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของโคโลนี}}{2}$$

เปรียบเทียบผลความกว้างของบริเวณยับยั้งในแต่ละวิธีเพื่อใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งดีที่สุดไปประเมินต่อในระดับเรือนทดลองต่อไป

6.1.3 ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion

เลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 120 รอบ/นาที บ่มเชื้ออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ cell suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ด้วยเครื่อง spectrophotometer คูด cell suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในขวดบรรจุอาหาร NA ที่ห่อด้วยอุณหภูมิตั้งที่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมลงให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้แห้งผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้ micropipette คูดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง

ทั้งนี้ทุกขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ ของระบบการผลัดกลายคาบัตยมีการเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพของภาควิชาโรคพืชหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Pseudomonas fluorescens* SP007s, *Paenibacillus pabuli* SW01/4 และ *Serratia marcescens* SPt360 (Prathuangwong *et al.*, 2005; 2010)

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพในระดับเรือนทดลอง

6.2.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลท G15, T5, G16, T20 ซึ่งผ่านการคัดเลือกจากการทดสอบข้อ 6.1 และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่ *B. amyloliquefaciens* (KPS46) และ *P. fluorescens* (SP007s) เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสที่คัดเลือกโดยทำการเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคในอาหารเหลว NB บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ประมาณ 10^8 cfu/ml) และตรวจสอบปริมาณเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA

6.2.2 การเตรียมต้นพืชทดสอบและการวางแผนการทดลอง

เตรียมต้นยูคาลิปตัสพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* อายุ 20 - 30 วัน ความสูงต้น 10-15 เซนติเมตร โดยให้ปุ๋ยสูตรเสมอ (16-16-16) 1 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ช่วงเวลา 5 วัน ก่อนปลูกเขื่อนำต้นยูคาลิปตัสมาเข้าบริเวณผิวใบโดยพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่วทั้งต้นแล้วปล่อยให้แห้ง พ่นน้ำเพื่อให้ความชื้นต้นไม้ ก่อนพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การทดสอบความสามารถจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและลดการเกิดโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในโรงเรือน กำหนดกรรมวิธี โดยเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลท สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด และวิธีการกำหนดช่วงเวลานีดพ่นทั้ง 6 วิธี ได้กำหนดกรรมวิธี จำนวน 29 กรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยละเอียดดังนี้

[illegible]

6.2.3 การประเมินการเกิดโรค

การประเมินโรคใบจุดเหลี่ยมบนที่กผลโดยประเมินการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อทุก 5 วัน จำนวน 6 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน ทำการประเมิน 2 แบบ คือ ประเมินอัตราการเกิดโรค (disease incidence) จากข้อมูลสำรวจจำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดโรค โดยประเมินทุกคู่ใบ และการประเมินระดับความรุนแรง (disease severity) ข้อมูลวัดระดับความรุนแรงทุกต้น วัดระดับความรุนแรงของใบที่เกิดโรค โดยใช้เกณฑ์ประเมินระดับความรุนแรงของโรคต่อพื้นที่ใบแบ่งได้ 5 ระดับ ระดับ 0 = ไม่มีอาการใบจุดเหลี่ยม 0% ระดับ 1 = พบอาการใบจุดเหลี่ยม 1-25% ระดับ 2 = พบอาการใบจุดเหลี่ยม 26-50% ระดับ 3 = พบอาการใบจุดเหลี่ยม 51-75% ระดับ 4 = พบอาการใบจุดเหลี่ยม 76-100% (ภาพที่ 2)

6.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมในระบบการผลิตลำไยยุคาลิปดัส

6.3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ประกอบด้วย 14 กรรมวิธี ที่เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์คุณภาพที่แยกได้จากยุคาลิปดัสคือ T5 และแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์คุณภาพของภาควิชาโรคพืช 2 สายพันธุ์คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่แยกได้จากบริเวณรากถั่วเหลืองและกะหล่ำตามลำดับซึ่งมีรายงานการใช้และพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์ควบคุมโรคสำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (Prathuangwong *et al.*, 2005; 2010) และสารเคมีสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ สารสเตรปโตมัยซินซัลเฟต และคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ โดยกรรมวิธีการทดลองทั้งหมดแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยต้นพืช 144 ต้น รวมพืชทดสอบทั้งหมด 6,048 ต้น ซึ่งวางเรียงบนโต๊ะลานวางกล้ารวมจำนวน 3 โต๊ะ ขนาดพื้นที่ของโต๊ะเท่ากับ 2 x 12 ตารางเมตร ต้นกล้ายุคาลิปดัสที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบจุดเหลี่ยมคือ *E. grandis* อายุ 3 สัปดาห์ ซึ่ง *E. grandis* เป็นพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อโรคใบจุดเหลี่ยมในระดับที่ใกล้เคียงกับพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* และมีความต้องการสูงในตลาดรับซื้อจึงใช้พันธุ์ดังกล่าวเป็นพันธุ์ทดสอบในสภาพแปลง และการทดลองนี้ไม่มีการปลูกเชื้อแต่ใช้การระบาดของโรคตามธรรมชาติ เนื่องจากการทดลองปฏิบัติในช่วงฤดูฝนปี 2555 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรคใบจุดเหลี่ยม

6.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบและสารเคมี

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่คัดเลือก ผ่านการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง จากการทดลองที่ 6.2 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ T5, *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ส่วนสารเคมีที่ใช้ ทดสอบเปรียบเทียบ 2 ชนิด ใช้ในอัตราแนะนำ คือ สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ($ai = 77\%$ WP) ใช้อัตรา 15-20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และสารสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ใช้อัตรา 6-12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

6.3.3 การเตรียมพืชทดสอบและกรรมวิธีทดสอบ

จากการวางแผนการทดลองตามรายละเอียดในข้อ 6.3.1 การทดลองมีการวางแผนการควบคุมตั้งแต่ระยะปักชำในโรงเรือน โดยใช้กิ่งพันธุ์จำนวน 13,681 ต้นมีระยะเวลาการปักชำกล้าให้ออกรากใช้เวลารวม 20 วัน จึงกำหนดให้มีการควบคุมโรคโดยการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์แต่ละสายพันธุ์ และสารเคมีทดสอบแต่ละชนิดรวม 3 ครั้ง คือ ที่ 0, 7 และ 14 วัน ช่วงปักชำกล้า หลังจากนั้นจึงย้ายกล้าไปพักที่ลานวางกล้า ใช้ต้นจำนวน 6,048 ต้น (ที่คัดเลือกต้นผ่านเกณฑ์) โดยการพ่น cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์แต่ละสายพันธุ์ และสารเคมีทดสอบแต่ละชนิด จำนวน 7 ครั้ง ตลอดช่วงเวลาที่วางกล้าบุคลากรปฏิบัติงานพ่นกล้า ทดสอบแต่ละชนิด จำนวน 7 ครั้ง ตลอดช่วงเวลาที่วางกล้าบุคลากรปฏิบัติงานพ่นกล้า คือ ที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วันหลังวางกล้า และประเมินผลที่ 45 วัน ส่วนการดูแลต่างๆ เช่น ให้น้ำ ปุ๋ยทางใบและการควบคุมแมลงเป็นไปตามกำหนดของระบบการผลิต โดยรายละเอียดแต่ละกรรมวิธีทดลองแสดงดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ *B. amyloliquefaciens* (KPS46)

กรรมวิธีที่ 2 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ KPS46 สลับกับสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

กรรมวิธีที่ 3 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ KPS46 สลับกับสารสเตรปโตมัยซินซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 4 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ *P. fluorescens* (SP007s)

กรรมวิธีที่ 5 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ SP007s สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

กรรมวิธีที่ 6 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ SP007s สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 7 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ *B. licheniformis* (T5)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นแบคทีเรียปฏิบัณท์ T5 สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

กรรมวิธีที่ 9 ฟันแบคทีเรียปฏิบัฏ T5 สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 10 ฟันคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

กรรมวิธีที่ 11 ฟันสเตรปโตมัยซินซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 12 ฟันคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์สลับกับสเตรปโตมัยซินซัลเฟต

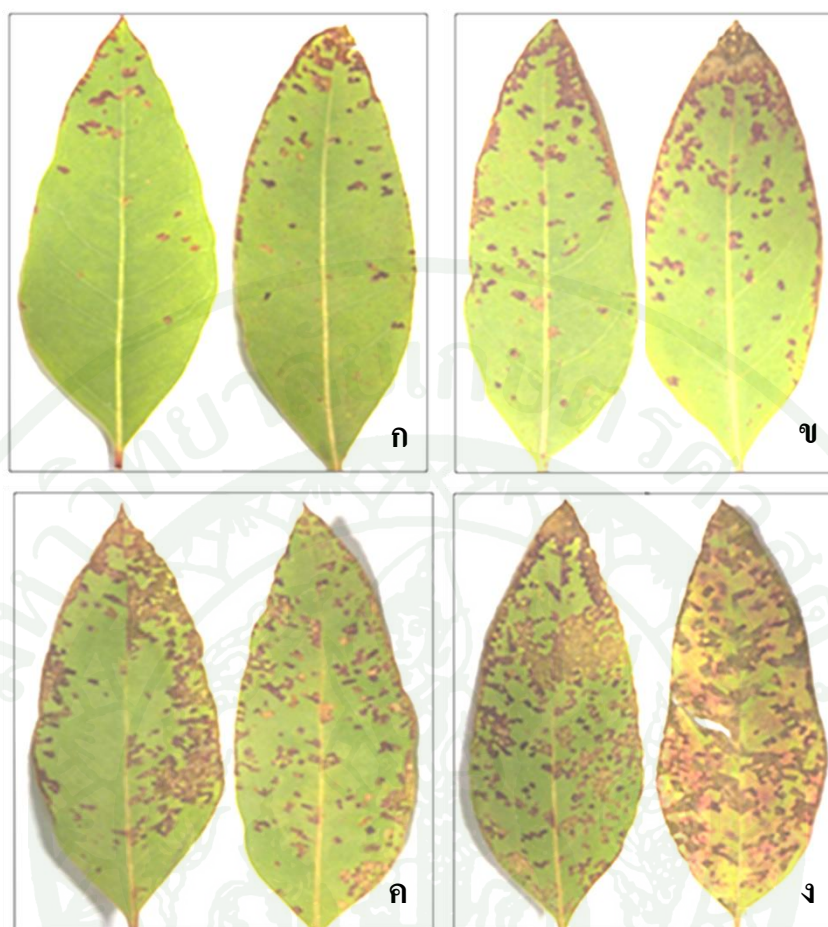
กรรมวิธีที่ 13 กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้เชื้อปฏิบัฏและสารเคมีในการควบคุม

กรรมวิธีที่ 14 กรรมวิธีควบคุมที่ใช้สารเคมีตามปกติที่ผู้ผลิตกล้ายาลิปตัสได้แก่ คาร์เบนดาซิมและคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

6.3.4 การประเมินผล

1) ประเมินอัตราการเกิดโรค (disease incidence) จากข้อมูลสำรวจจำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดโรค โดย 1 ต้น ประเมิน 3 คูโบ นับจากคูโบบนลงมา ซึ่งโบบนต้องมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโบบุ้ดต่อไป

2) ประเมินระดับความรุนแรง (disease severity) ข้อมูลวัดระดับความรุนแรงของโรค โดยสุ่มจำนวน 10 ต้นต่อ 1 ซ้ำ โดยวัดจำนวน 4 คูโบ นับจากคูโบบนลงมา โดยใช้เกณฑ์ประเมินระดับความรุนแรงโรคต่อพื้นที่โบบแบ่งเป็น 5 ระดับ ระดับ 0 = ไม่มีอาการโบบจุดเหลือง ระดับ 1 = พบอาการโบบจุดเหลือง 1-25% ระดับ 2 = พบอาการโบบจุดเหลือง 26-50% ระดับ 3 = พบอาการโบบจุดเหลือง 51-75% ระดับ 4 = พบอาการโบบจุดเหลือง 76-100% (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดเหี่ยวยูคาลิปตัส โดยแบ่งตามระดับความรุนแรงของโรคจากพื้นที่ใบที่ถูกทำลายเป็น 5 ระดับ; ระดับ 0 = ไม่พบอาการโรค, ระดับ 1 = พบอาการใบจุดเหี่ยว 1-25% (ก), ระดับ 2 = พบอาการใบจุดเหี่ยว 26-50% (ข), ระดับ 3 = พบอาการใบจุดเหี่ยว 51-75% (ค) และระดับ 4 = พบอาการใบจุดเหี่ยว 76-100% (ง)

7. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

7.1 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดเหี่ยว โดยตรวจลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA การศึกษารูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ด้วยการย้อมสีแบบ simple stain และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า การทดสอบแกรมด้วยการย้อมสี (Gram's staining) และการตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore forming) นอกจากนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ทางสรีรวิทยาและชีวเคมี โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติบนอาหาร NA ให้มีอายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง นำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ catalase production, oxygen relationship, starch hydrolysis และ motility test การทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ sucrose, lactose และ manitol และการใช้คุณสมบัติเฉพาะอื่นๆ ตามความเหมาะสมของกลุ่มเชื้อ เช่น เชื้อ *Pseudomonas* sp. จะใช้อาหาร Kings B Medium ในการจำแนกกลุ่ม หรือเชื้อ *Bacillus* sp. จะใช้อาหาร HiCrome Bacillus Agar แยกความแตกต่างของเชื้อและนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การเจริญในอาหาร NB+3%, 6.5%, 10% NaCl และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถยืนยันในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่งนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลการจำแนกเชื้อในกลุ่มที่มีรายงานอ้างอิงจากหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition (Holt *et al.*, 1994) เพื่อจำแนกเบื้องต้น

7.2 จำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์

จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติโดยใช้ universal primer บริเวณยีน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรมอร์ 6F (5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3') 1510R (3' AGT CGT AAC AAC GTA ACC CTG CAG CAC 5') (van der Meer *et al.*, 1998) เพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์บริเวณต่างๆ ตามวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ PCR mixture ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย sterile water 16.5 μ l, 10X Taq buffer 2.5 μ l, 2.5 μ M dNTPs 2 μ l, MgCl 0.5 μ l, Taq DNA - polymerase 0.5 μ l, 10 μ M primer mix 2 μ l, DNA Template 1 μ l จากนั้นนำ PCR mixture ดังกล่าวเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycles) รุ่น My Genie 32 Thermal Block PCR (Bioneer, Korea) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาตามขั้นตอนข้อ 3.3.2

7.3 การใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบเชื้อ *Bacillus*

7.3.1 ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *Bacillus subtilis* group

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี นำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่ใช้จำแนกชนิดระดับ species บริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus subtilis* group ซึ่งประกอบด้วย *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* ใช้ไพรเมอร์ Bsub5F (5' AAG TCG AGC GGA CAG ATG G 3') กับ Bsub3R (5' CCA GTT TCC AAT GAC CCT CCC C 3') มาเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์อ้างอิงต่างๆ ซึ่งไพรเมอร์ใช้ตรวจสอบเชื้อ *Bacillus subtilis* group จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 595 bp (Wattiau *et al.*, 2001) นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร และตรวจวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Wattiau *et al.*, 2001) ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	1 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	30 วินาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65	2 นาที	30
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	2 นาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที	1

7.3.2 ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. licheniformis*

ไพรเมอร์นี้ออกแบบจากยีน *adk* อยู่บริเวณ cytoplasm ใช้สร้างโปรตีน adenylate kinase สามารถนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ *B. licheniformis* จากคู่ไพรเมอร์ *adk1L* (5' GGT AAA GGG ACA CAG GCT GA 3') กับ *adk1R* (5' TCG AGT AAA GGC TGG GTT TG 3') ที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อ *B. licheniformis* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 518 bp (Madslien *et al.*, 2012) โดยนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์อ้างอิงต่างๆ นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร และตรวจวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Madslien *et al.*, 2012) ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	5 นาที	1
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95	10 วินาที	
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	56	10 วินาที	35
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	30 วินาที	
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	7 นาที	1

8. สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลองของ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

2. แปลงผลิตกล้าไม้ บริษัทยูคาลิปตัส เทคโนโลยี จำกัด อำเภอบางบาล จังหวัดฉะเชิงเทรา

9. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือน มกราคม พ.ศ. 2556

ผลและวิจารณ์

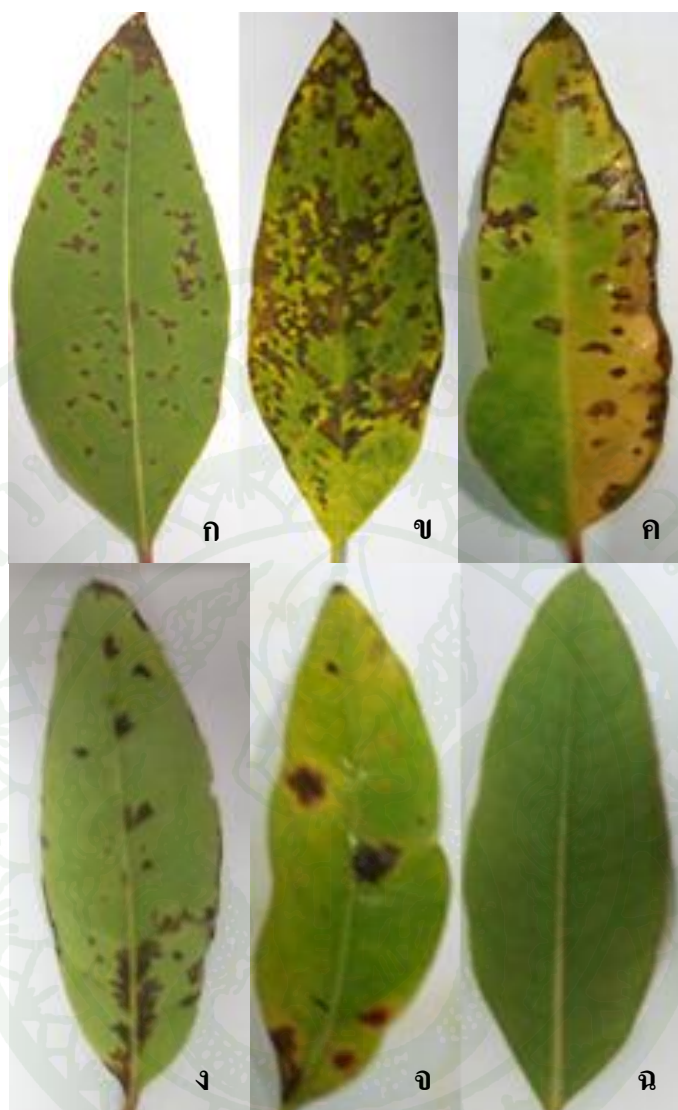
ผล

1. รวบรวมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 การสำรวจการระบาดของโรคใบจุดเหลี่ยมและการเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างใบยูคาลิปตัสและส่วนต่างๆ ที่มีลักษณะสอดคล้องกับโรคใบจุดเหลี่ยมจากพื้นที่ผลิตกล้าไม้ยูคาลิปตัส จังหวัดฉะเชิงเทรา ช่วงระยะเวลาที่สำรวจเริ่มตั้งแต่ เดือน ธันวาคม 2552 - มิถุนายน 2555 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ปลูกในโรงเรือนปักชำกล้า แปลงต้นพันธุ์ และลานวางกล้า พบอาการโรคใบจุดเหลี่ยมเกิดกับยูคาลิปตัสพันธุ์ต่างๆ คือ *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. urophylla* x *E. brassiana* *E. urophylla* และ *E. camaldulensis* x (*E. grandis* x *E. urophylla*) โดยลักษณะอาการหลักที่พบและเก็บตัวอย่าง คือ แผลจุดเซลล์ตาย น้ำน้ำ แผลเป็นจุดเหลี่ยมล้อมรอบด้วยอาการเหลืองแบบ halo กระจายทั่วไป แผลถูกจำกัดด้วยเส้นใบ อาการจุดแผล แสดงให้เห็นทั้งด้านหน้าใบและด้านหลังใบ ซึ่งลักษณะอาการโรคและสปีบริเวณแผลของใบยูคาลิปตัสมีลักษณะแตกต่างกัน แบบที่ 1 อาการเซลล์ตายมีลักษณะแผลเป็นจุดเหลี่ยมจำกัดด้วยเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ ขนาดแผล 1-4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3 ก-ข) แบบที่ 2 เซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุด กลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีเขียว ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตรและบริเวณเส้นกลางใบดำ (ภาพที่ 3 ค-ง) และแบบที่ 3 เซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุดไหม้ กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 4-7 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3 จ)

ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุพืช หรืออายุใบ พบอาการโรคใบจุดเหลี่ยมมีการระบาดเฉลี่ย 73.8% จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่มีการระบาดโดยยูคาลิปตัสที่พบการระบาดรุนแรงมาก คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* และ *E. grandis* เกิดระยะพักอยู่บนลานวางกล้านอกโรงเรือนซึ่งมีสภาพร้อนชื้นและแสดงอาการโรครุนแรงมากในช่วงระยะกล้าอายุ 1-6 เดือน (Table 6)



ภาพที่ 3 ใบยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* แสดงอาการใบจุดที่เกิดตามธรรมชาติในหลายลักษณะ; ลักษณะที่ 1 มีลักษณะเซลล์ตาย แผลเป็นจุดเหลี่ยมจำกัดด้วยเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ (ก-ข), ลักษณะที่ 2 อาการเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุดกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีเข้ม (ค) และบริเวณเส้นกลางใบดำ (ง), และลักษณะที่ 3 แสดงอาการเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุดใหม่ กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง (จ) เปรียบเทียบกับใบปกติที่ไม่แสดงอาการโรค (ฉ)

Table 6 Samples and sources of eucalyptus leaf spot collection

Sample No.	Source	Host	Plant age (month)	Group ^{1/}	No. of collected sample	No. of sample with pathogen
1-8	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	2	1	8	8
9-14	Outdoor	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	2	1	6	6
15-26	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	2	1	12	10
27-30	Outdoor	Unknow	2	1	4	4
31-35	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	2	5	1
36-43	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	8	3
44-46	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	3	3	1
47-52	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	6	6
53-57	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	5	5
58-59	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	1	1	2	1
60-61	Outdoor	<i>E. grandis</i>	1	1	2	2
62-66	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	2	4	4
67-72	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	6	6
73-76	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	4	4
77-78	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	2	2
79-85	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	7	7
86-88	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	3	3
89-98	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	10	10
99-106	Greenhouse	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	1	1	8	8
107-110	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	4	4
111-118	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	8	8
119-133	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	15	15
134-141	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	8	8
142-147	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	6	6
148-153	Outdoor	Unknow	2	1	6	6
154-159	Greenhouse	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	1	1	6	6
160-162	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	3	3

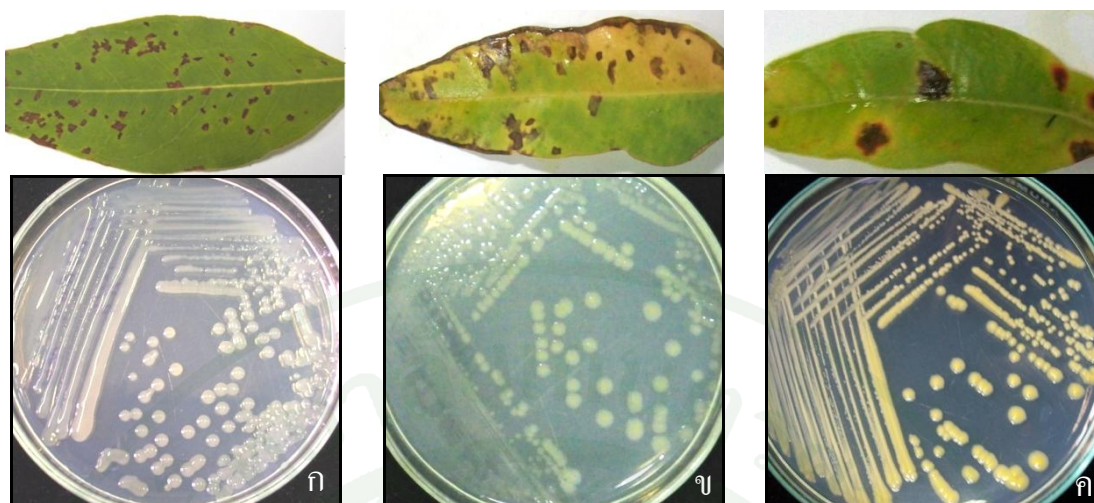
Table 6 Continued

Sample No.	Source	Host	Plant age (months)	Group ^{1/}	No. of collected sample	No. of sample with pathogen
163-167	Stock	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	4-7	1	5	5
168-169	Outdoor	<i>E. grandis</i>	2	1	2	2
170-175	Stock	<i>E. camaldulensis</i>	4-7	1	6	6
176-185	Stock	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	4-7	1	10	10
186-196	Outdoor	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	2	1	11	11
197-201	Greenhouse	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	1	1	5	5
202-205	Outdoor	<i>E. urophylla</i>	2	1	4	4
206-207	Outdoor	<i>E. urophylla</i>	2	1	2	2
208-213	Stock	<i>E. grandis</i>	4-7	1	6	6
Total					213	199

^{1/} Disease samples collected with 3-symptom types (groups): Group1 angular leaf spot with yellow halo, Group 2 leaf spot or blight, with black midrib, and Group 3 leaf blight with yellow halo.

1.2 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

การแยกเชื้อจากใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรคใบจุด สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่า เป็นเชื้อสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 245 สายพันธุ์ตามลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาโคโลนี บนอาหาร NA โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแกรมลบจากการทดสอบด้วย KOH และการย้อมสีแกรม และ จำแนกกลุ่มเบื้องต้น สามารถจำแนกแบคทีเรียเป็น 3 กลุ่ม ตามอาการและลักษณะของโคโลนีที่ แตกต่างกันดังนี้อาการโรคแบบที่ 1 แผลจุดเหลี่ยมมี halo ล้อมรอบ ได้ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน ใส กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ จำนวน 190 สายพันธุ์ อาการโรคแบบที่ 2 แผลจุด ขอบไหม้สีเข้ม ก้านใบดำ ได้ลักษณะโคโลนีเหลืองอ่อนค่อนข้างใส โปร่งแสง กลม นูน ขอบเรียบ จำนวน 22 สายพันธุ์ และอาการโรคแบบที่ 3 แผลไหม้มี halo ล้อมรอบ ได้ลักษณะโคโลนีเหลืองเข้ม กลม นูน ตรงกลาง ขอบเรียบ จำนวน 13 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4) เก็บรวบรวมเชื้อดังกล่าวในหลอดอาหารแข็ง NA เพื่อการศึกษาคุณสมบัติในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการโรคใบจุดและใบไหม้ของพริกจาก 3 ลักษณะอาการที่แตกต่างกัน; อาการ โรคแบบที่ 1 แผลจุดเหลี่ยมมี halo ล้อมรอบ โคโลนีสีเหลืองอ่อนใส กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ (ก), แบบที่ 2 อาการแผลจุด ขอบไหม้ สีเข้ม ก้านใบดำ โคโลนีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างใส โปร่งแสง กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ (ข), และแบบที่ 3 อาการแผลไหม้มี halo ล้อมรอบ โคโลนีสีเหลืองครีม กลม นูน ขอบเรียบ (ค)

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณแปลงปลูกและส่วนต่างๆของยูคาลิปตัสเพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดเหี่ยว

1.3.1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างดินและน้ำ

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณ โคนต้นยูคาลิปตัส และตัวอย่างน้ำ จากแหล่งเพาะกล้ายูคาลิปตัส (กลุ่ม G) พบว่าสามารถแยกได้เชื้อที่แตกต่างกัน การศึกษาเน้นทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งสามารถแยกและมีความหลากหลายแบคทีเรียได้ทั้งหมด 217 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 131 ไอโซเลต แกรมลบ 87 ไอโซเลต โดยเชื้อทั้งหมดสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 16 กลุ่ม (Table 7 และ ภาพที่ 5) โดยกลุ่มที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือ กลุ่มที่ 16 จำนวน 55 ไอโซเลต ลักษณะสีขาวขุ่น กลม นูนเล็กน้อย ขอบขาว ร่องลงมา คือ กลุ่มที่ 15, 14, 4, 6, 12, 7, 3, 10, 13, 11, 1, 5, 8, 2 และกลุ่มที่ 9 ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีต่างๆ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 สีส้ม กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 2 สีเหลืองส้มกลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 3 สีเหลือง กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 4 สีขาว รี มันวาว ขอบหยักเล็กน้อย กลุ่มที่ 5 สีส้มอ่อน กลม มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 6 สีขาว กลม ด้าน ขอบหยักเล็กน้อย กลุ่มที่ 7 สีขาว ก่อนข้างกลม ด้าน แบน ขอบหยัก กลุ่มที่ 8 สีขาวครีม ก่อนข้างกลม มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 9 สีน้ำตาลอ่อน ก่อนข้างกลม แบน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 10 สีขาวครีม กลมมนันวาว ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย กลุ่มที่ 11 สีส้มอ่อนกลมนูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 12 สีขาว ขอบหยัก มันวาว กลุ่มที่ 13 สีเหลือง กลมนูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 14 สีขาว ก่อนข้างกลม ผิวด้าน ขอบเรียบ และกลุ่มที่ 15 สีใส กลม ขอบเรียบ โปร่งแสง เปลี่ยนสีอาหารสีฟ้า

Table 7 Colony morphology of bacteria isolated from water and rhizosphere soil collected from eucalyptus plantation

Group	Isolate	Colony morphology ^{1/}	Gram ^{2/}	Number ^{3/}
1	G1/1-3	Orange shiny circular raised entire	G+	3
2	G2/4-5	Orange and yellow shiny circular raised entire	G+	2
3	G3/6-13	Yellow shiny circular convex entire	G+	8
4	G4/14-35	White dull circular raised entire	G+	22
5	G5/36-38	Orange light circular shiny raised entire	G+	3

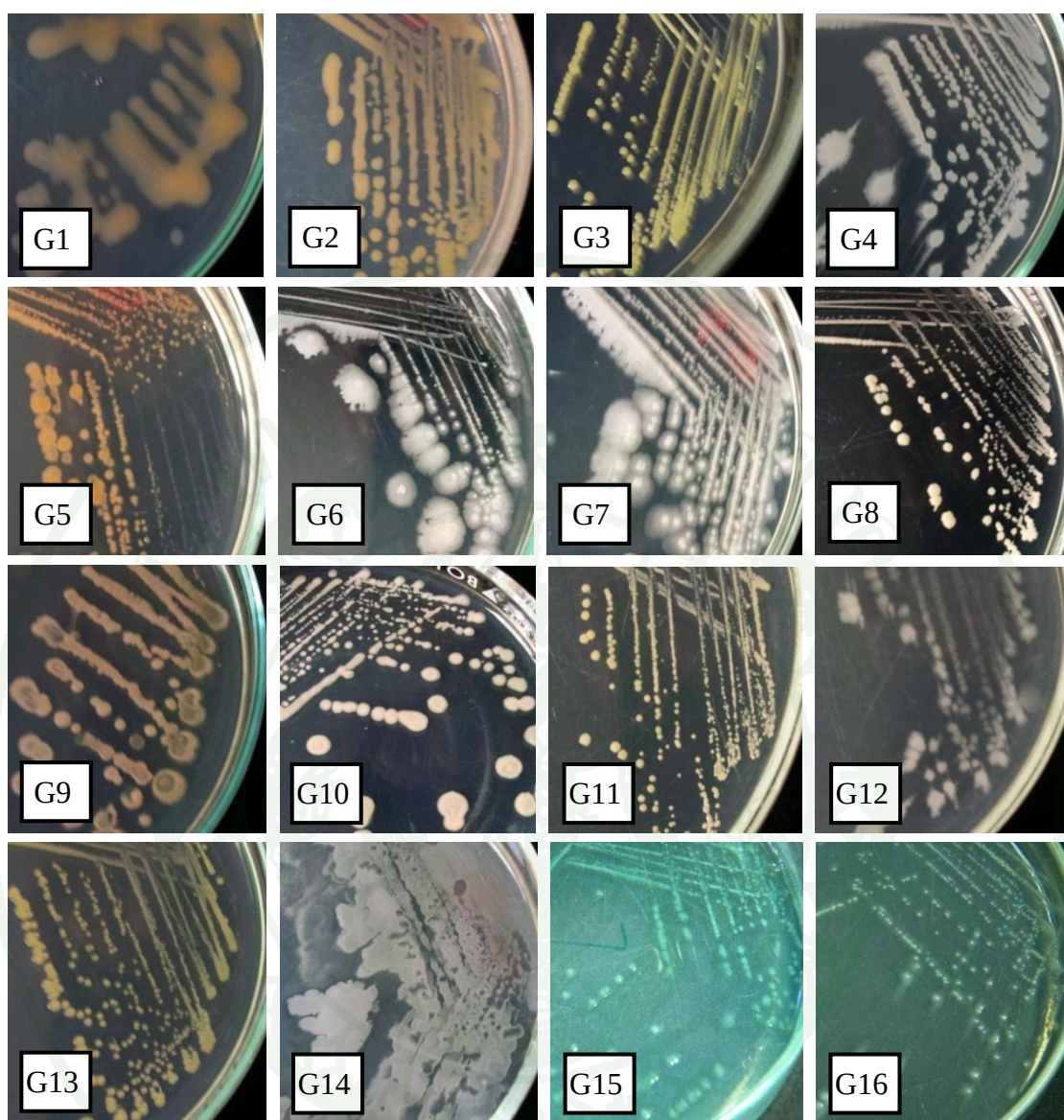
Table 7 Continued

Group	Isolate	Colony morphology ^{1/}	Gram ^{2/}	Number ^{3/}
6	G6/39-55	White dull irregular umbonate entire	G+	17
7	G7/56-64	White dull circularr umbonate entire	G+	9
8	G8/65-67	White cream shiny circularr pulvinate entire	G+	3
9	G9/68	Brownish shiny circularr crateriform entire	G+	1
10	G10/69-75	White cream shiny circularr convex undulate	G+	7
11	G11/76-79	Orange light shiny circular pulvinate entire	G+	4
12	G12/80-94	White dull irregular flat entire	G+	15
13	G13/95-101	Yellow shiny circular raised entire	G+	7
14	G14/102-130	White dull irregular flat entire	G+	29
15	G15/131-162	Clear white shiny circular translucent raised entire change blue medium	G-	32
16	G16/163-217	Clear white shiny circular translucent raised entire	G-	55
		Total		217

^{1/} Morphological characterization on NA medium.

^{2/} Gram reaction tested by 3% KOH and staining method; G+ = Gram positive and G- = Gram negative.

^{3/} Number of bacterial isolates obtained from each groups.



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแหล่งปลูกและดินบริเวณรอบรากยูคาลิปตัสบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง โดยแยกความแตกต่างของโคโลนีได้ทั้งหมด 16 กลุ่ม (G1-G16) (รายละเอียดเพิ่มเติมอธิบายตาม ตารางที่ 7)

1.3.2 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบและผิวราก

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบและผิวรากของยูคาลิปตัสที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรค สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้แบคทีเรียทั้งหมด 168 ไอโซเลท แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 164 ไอโซเลท และแกรมลบ 4 ไอโซเลท แบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้จำนวน 20 กลุ่ม (Table 8 และ ภาพที่ 6) โดยกลุ่มที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือ กลุ่มที่ 12 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบนด้านขอบหยัก รองลงมาคือกลุ่มที่ 5, 6, 10, 8, 9, 13, 17, 3, 11, 20, 15, 19, 7, 16, 1, 2, 4, 14 และกลุ่มที่ 18 ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังนี้ กลุ่มที่ 1 สีส้ม กลม มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 2 สีเหลือง กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 3 สีเหลือง กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 4 สีขาว ครีมน ค่อนข้างกลม มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 5 สีขาวขุ่น แบนเรียบ ด้าน ค่อนข้างกลม ขอบหยัก กลุ่มที่ 6 สีขาว แบนเรียบแผ่เป็นสาย กลุ่มที่ 7 สีขาวขุ่น นูนตรงกลางเล็กน้อย ขอบเรียบใส กลุ่มที่ 8 สีขาว แบนขุ่นด้าน ขอบหยัก กลุ่มที่ 9 สีขาวขุ่น ลักษณะแบนเรียบ ด้าน ขอบหยัก กลุ่มที่ 10 สีขาว ขุ่น แบนขอบหยัก แผ่เป็นสาย กลุ่มที่ 11 สีขาว แบนด้าน แผ่เป็นคลื่น กลุ่มที่ 13 สีขาว แบน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 14 สีขาว แบนด้านรูปไข่ขาว ขอบหยัก กลุ่มที่ 15 สีขาวครีม กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 16 สีขาว แบนด้าน แผ่เป็นสาย กลุ่มที่ 17 สีขาว แบนกลม มันวาว ขอบเรียบ กลุ่มที่ 18 สีขาวครีม แบนมันวาว ขอบหยัก กลุ่มที่ 19 สีขาว แบนมันวาว ขอบหยักเล็กน้อย และกลุ่มที่ 20 สีขาว แบนด้าน ขอบเรียบ แผ่เป็นสาย

Table 8 Colony morphology of bacteria isolated from leaves and roots of eucalyptus

Group	Isolate	Colony morphology ^{1/}	Gram ^{2/}	Number ^{3/}
1	T1/1-2	Orange shiny circular convex entire	G+	2
2	T2/3-4	Yellow shiny circular convex entire	G+	2
3	T3/5-11	Cream shiny circular umbonate entire	G+	7
4	T4/12-13	White cream shiny circular pulvinate entire	G+	2
5	T5/14-34	White dull circular raised entire	G+	21
6	T6/18-46	White dull irregular flat entire	G+	12
7	T7/30-50	White translucent shiny circular flat entire.	G-	4
8	T8/51-66	White dull irregular flat entire.	G+	16

Table 8 Continued

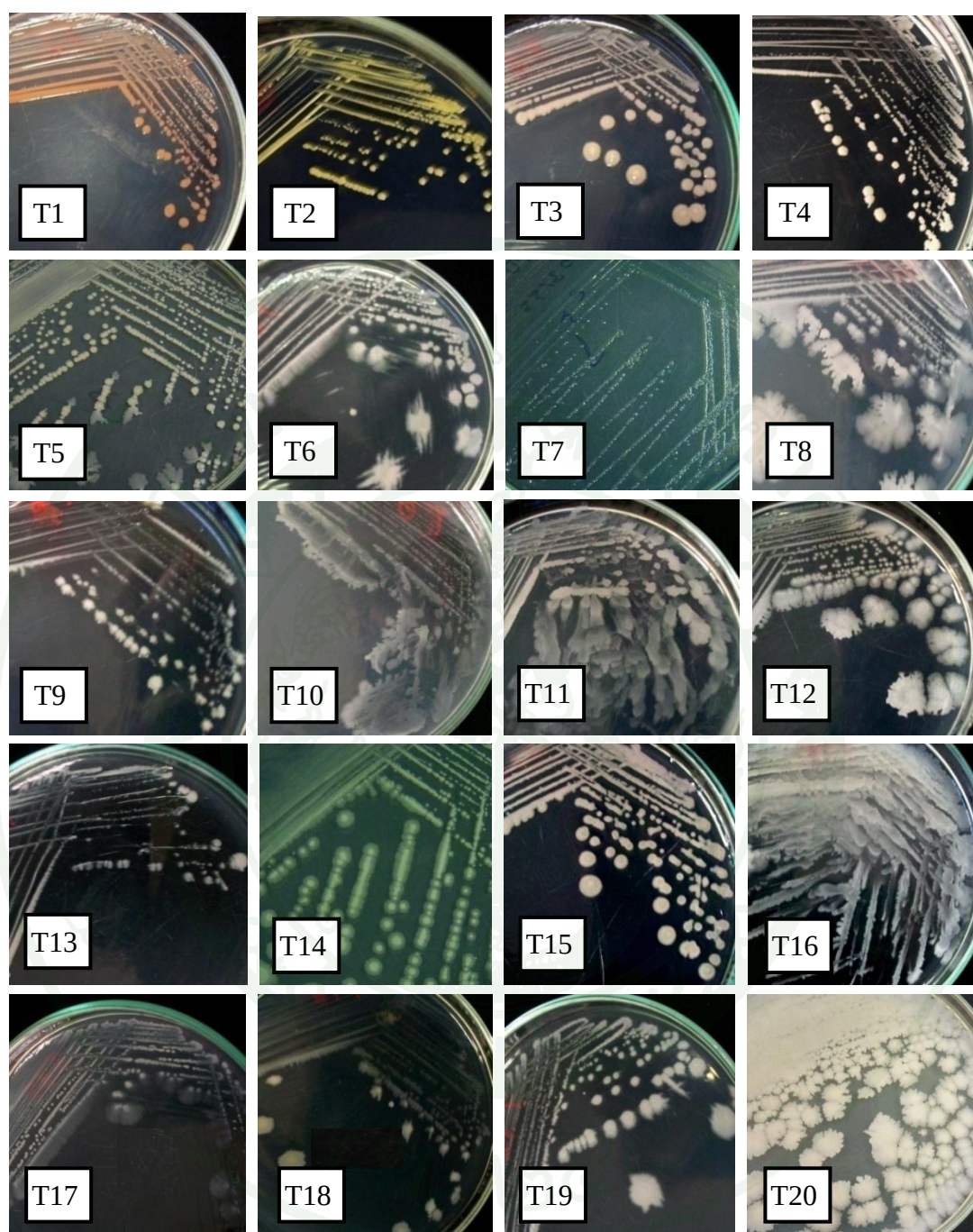
Group	Isolate	Colony morphology ^{1/}	Gram ^{2/}	Number ^{3/}
9	T9/67-81	White cream shiny circular flat entire	G+	15
10	T10/82-98	White shiny irregular flat entire	G+	17
11	T11/99-104	White dull irregular flat entire	G+	6
12	T12/105-128	White dull irregular raised entire	G+	24
13	T13/129-137	White shiny circular flat entire	G+	9
14	T14/138-139	White shiny circular flat entire	G+	2
15	T15/140-144	White cream shiny circular umbonate entire	G+	5
16	T16/145-147	White dull spread lines entire	G+	3
17	T17/148-155	White shiny circular flat entire	G+	8
18	T18/156-157	White and yellow shiny circular umbonate entire	G+	2
19	T19/158-162	White shiny circular raised entire	G+	5
20	T20/163-168	White dull irregular raised entire	G+	6
		Total		168

^{1/} Morphological characterization on NA medium.

^{2/} Gram reaction tested by 3% KOH and staining method; G+ = Gram positive and G- = Gram negative.

^{3/} Number of bacterial isolates obtained from each groups.

ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน น้ำ ผีดิบ และผีรอก จากแหล่งปลูกชาลิปะดัส รวมจำนวน 385 ไอโซเลท ได้ทำการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาในหลอดอาหารแข็ง NA และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10-15 °C เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อ ปฏิบัณยค์ ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากผิวใบและผิวรากยูคาลิปตัส บนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง โดยแยกความแตกต่างของโคโลนีได้ทั้งหมด 20 กลุ่ม (T1-T20) (รายละเอียดเพิ่มเติมอธิบายตามตารางที่ 8)

2. การศึกษาชีววิทยาและความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย

2.1 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน

เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีแนวโน้มเป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลืองของยูคาลิปตัสจึงนำเชื้อทั้งหมดจากที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันทั้ง 3 กลุ่มมาทำการทดสอบคุณสมบัติการชักนำการเกิดปฏิกิริยา HR บนพืชทดสอบต่างชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ พริก และยาสูบ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบจากทั้ง 3 กลุ่ม สามารถชักนำให้พืชทดสอบเกิดปฏิกิริยา HR ได้แตกต่างกันโดยสามารถแบ่งกลุ่มการเกิดปฏิกิริยา HR ได้จาก 3 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 7)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มโคโลนีสีเหลืองอ่อนในสี กลมมน มันวาว ขอบเรียบ ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุดเหลืองมี halo ล้อมรอบ จำนวน 190 สายพันธุ์ เกิด HR บนใบมะเขือเทศ และบนใบยาสูบ แต่ไม่เกิดบนใบพริก

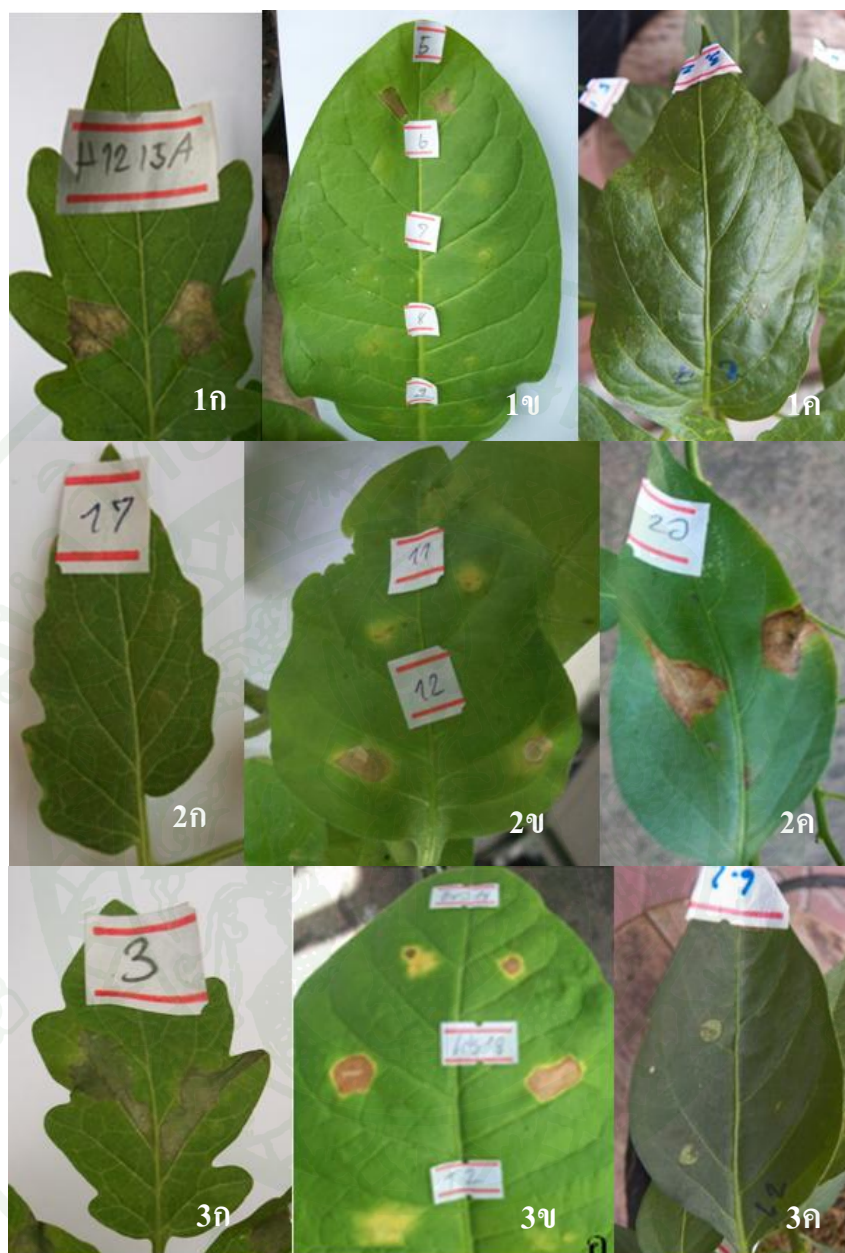
กลุ่มที่ 2 กลุ่มโคโลนีเหลืองอ่อนค่อนข้างใส โปร่งแสง กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุด ขอบไหม้สีเข้ม ก้านใบดำ จำนวน 22 สายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยา HR บนใบพริก และบนใบยาสูบ ไม่เกิดใบมะเขือเทศ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มโคโลนีเหลืองขุ่นเข้ม กลม นูนตรงกลาง ขอบเรียบ โคโลนีแยกได้จากกลุ่มอาการแผลไหม้มี halo ล้อมรอบ จำนวน 13 สายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยา HR เฉพาะบนใบยาสูบ และใบมะเขือเทศ ไม่เกิดบนใบพริก

แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการแผลที่แตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่มอาการ และลักษณะพื้นฐานของโคโลนีมีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชและพบว่าการเกิดปฏิกิริยา HR มีความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มอาการแผล ลักษณะพื้นฐานของโคโลนีและปฏิกิริยา HR โดยพบว่าประชากรเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่มีลักษณะพื้นฐานโคโลนีเดียวกันมีความสามารถในการชักนำการเกิดปฏิกิริยา HR ในพืชทดสอบชนิดเดียวกัน (Table 9)

Table 9 The hypersensitive response (HR) induction on different index plants at 48 hour after infiltration

Group/Colony	Number of strain	HR-test		
		Tomato	Tobacco	Pepper
1) Colony pale yellow color, circular, convex, shiny, and entire (isolated from symptom of angular leaf spot with yellow halo)	190	+	+	-
2) Colony pale yellow color, circular, translucent, convex shiny, and entire (isolated from symptom of leaf spot or blight, with black midrib)	22	-	+	+
3) Colony yellow color, opaque, circular, convex, and entire (isolated from symptom of leaf blight with yellow halo)	13	+	+	-



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการเซลล์พืชตายที่เกิดจากปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) ด้วยการฉีด cell suspension ของเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 กลุ่ม; กลุ่มที่ 1 (1), กลุ่มที่ 2 (2), และกลุ่มที่ 3 (3) บนพืชทดสอบได้แก่ มะเขือเทศ (ก), ยาสูบ (ข), และพริก (ค)

2.2 การทดสอบความสามารถในการชักนำพิษอาศัยยูคาลิปตัสแสดงอาการโรค

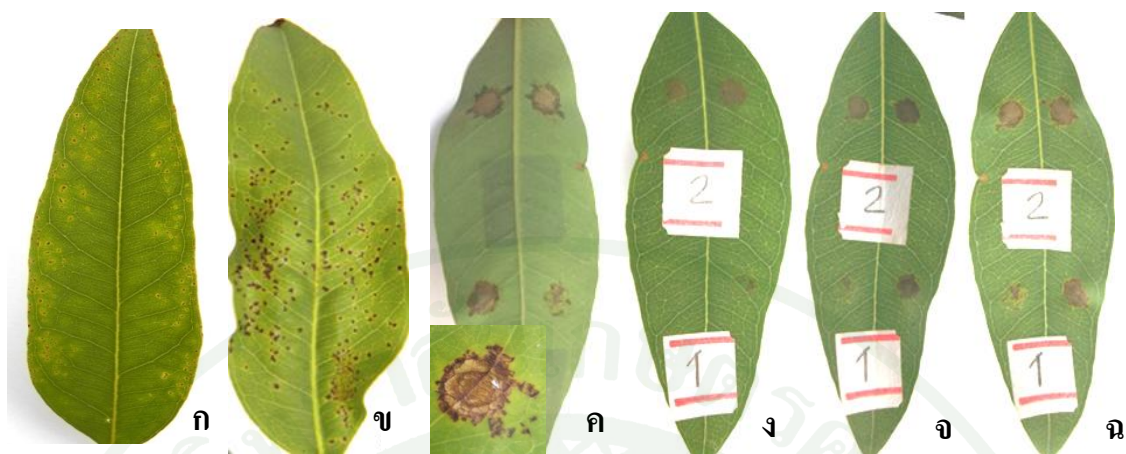
การพิสูจน์ความสามารถในการชักนำให้เกิดโรคบนยูคาลิปตัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 กลุ่มลักษณะโคโลนี โดยการทดสอบบนต้นยูคาลิปตัสสายพันธุ์อ่อนแอ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* ระยะต้นกล้า อายุ 1-2 เดือน เปรียบเทียบลักษณะของแผลจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยการปลูกเชื้อ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ปลูกเชื้อโดยการพ่น cell suspension ร่วมกับการให้ความชื้นต่อเนื่อง และวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีด cell suspension เข้าใบพืชผลทดลองพบว่าการปลูกเชื้อโดยเชื้อกลุ่มที่ 1 จากปลูกเชื้อด้วยวิธีพ่น cell suspension (ภาพที่ 8 ก-ข) ส่งผลให้เกิดอาการโรคที่ใบอ่อนและลามลงมาใบคู่ที่ 2 -3 ซึ่งเริ่มแสดงอาการให้เห็นในช่วง 7-14 วันหลังปลูกเชื้อ ใบยูคาลิปตัสจะแสดงอาการจุดเหลืองกระจายอยู่ทั่วไป หลังจากนั้นแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลน้ำ มีขนาดใหญ่ขึ้นตามเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ (ภาพที่ 8 ก) และที่อายุ 15-30 วันหลังปลูกเชื้อ ลักษณะแผลที่เกิดบนยูคาลิปตัสจะขยายขนาดเพิ่มขึ้น และทำให้เซลล์พืชตายเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 8 ข) สำหรับการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีด cell suspension เข้าใบ (ภาพที่ 8 ค-ง) ด้วยเชื้อกลุ่มที่ 1 พบว่าใบพืชทดสอบจะเกิดลักษณะของอาการแผลน้ำตาล อาการเริ่มในวันที่ 3 หลังปลูกเชื้อ (ภาพที่ 8 ง) และแผลจะลุกลามจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่ฉีดเชื้อเกิดอาการเซลล์ตายภายในเวลา 15 วัน (ภาพที่ 8 ฉ) จากนั้นยูคาลิปตัสจะเกิดการลุกลามกระจายรอบๆ รอยแผล ที่ 21-30 วันหลังฉีดเชื้อ (ภาพที่ 8 ค)

ผลการศึกษาเชื้อกลุ่มที่ 2 พบว่าการปลูกเชื้อด้วยวิธีพ่น cell suspension พืชทดสอบแสดงอาการเริ่มแรกมีลักษณะอาการไหม้ร่วมกับอาการเส้นกลางใบดำ ส่วนมากจะเกิดที่ใบแก่ อาการจะปรากฏให้เห็นในช่วง 20-30 วันหลังปลูกเชื้อ และจะเกิดรอยสีน้ำตาลที่เส้นกลางใบ ขอบใบ แผลจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นตามเส้นใบ (ภาพที่ 9 ข) และจะพบอาการไหม้ที่บริเวณส่วนยอดอ่อนที่เริ่มแตกใหม่ (ภาพที่ 9 ก) ส่วนการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีด cell suspension เข้าใบพืช จะเกิดลักษณะของอาการเซลล์ตายหลังจากวันที่ 3 แผลจะน้ำตาลสีน้ำตาลเข้ม อาการแผลจะไม่ลุกลามออก เกิดอาการเซลล์ตายบริเวณฉีดเชื้อที่ 10-15 วันหลังปลูกเชื้อ (ภาพที่ 9 ค)

ผลการศึกษาเชื้อกลุ่มที่ 3 พบว่าการปลูกเชื้อด้วยวิธีพ่น cell suspension แสดงอาการโรคไม่ชัดเจน และการปลูกด้วยวิธีฉีด cell suspension เข้าใบพืชไม่ปรากฏอาการเซลล์ตายบนใบยูคาลิปตัส ผลการทดสอบข้างต้นแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม 1 และ 2 เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริงของยูคาลิปตัส ซึ่งสาเหตุหลักของโรคใบจุดคือ เชื้อในกลุ่มที่ 1 เนื่องจากทำให้พืชแสดงอาการโรคใบจุดเหลืองได้ชัดเจนรวดเร็ว ส่วนเชื้อกลุ่มที่ 2 ก่อโรคซ้ำเกิดอาการไหม้เล็กน้อยบริเวณเส้นกลาง

ใบและส่วนขอบใบ และเชื้อกลุ่มที่ 3 ไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสซึ่งไม่แสดงอาการโรคและไม่เกิดเซลล์ตายกับใบพืช จึงสรุปได้ว่าอาการโรคใบจุดเหลี่ยมมีแนวโน้มที่เกิดจากเชื้อสาเหตุแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุดเหลี่ยมมี halo ล้อมรอบ และอาการโรคใบไหม้เกิดขึ้นจากเชื้อสาเหตุแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุด ขอบไหม้สีเข้ม เส้นกลางใบดำ





ภาพที่ 8 ลักษณะอาการโรคจากการปลูกเชื้อกลุ่มที่ 1 บนยูคาลิปตัสด้วยวิธีปลูกเชื้อโดยพ่นใบด้วย cell suspension ที่ 10 วัน (ก) และ 15 วัน (ข) และอาการที่เกิดจากการฉีดเชื้อเข้าสู่ผิวใบพืช (ค) โดยมีอาการลุกลามกระจายออกกรอบรอยที่ฉีดเชื้อ หลังฉีดเชื้อ 3 วัน (ง), 6 วัน (จ), และ 15 วัน (ฉ)



ภาพที่ 9 ลักษณะอาการโรคจากการปลูกเชื้อกลุ่มที่ 2 โดยวิธีการพ่นใบ พืชจะแสดงอาการก้านใบดำ (ก), อาการแผลไหม้ตามเส้นกลางและขอบใบ (ข), และลักษณะเซลล์ตายจากการฉีดเชื้อเข้าสู่ผิวใบพืช (ค)

2.3 การประเมินระดับความรุนแรงสายพันธุ์เชื้อในการเข้าทำลายพืชอาศัยยูคาลิปตัส

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มที่ 1 ที่มีโคโลนีสีเหลืองอ่อน มันวาว กลม นูน ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุดเหลี่ยมมี halo ล้อมรอบ มีความชัดเจนในการก่อโรคบนพืชทดสอบ ทุกสายพันธุ์เชื้อที่แยกจากตัวอย่างพันธุ์ยูคาลิปตัส ฤดู และแหล่งเก็บที่แตกต่างกัน และเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการโรคใบจุดเหลี่ยม จึงนำมาศึกษาเพิ่มเติมโดยประเมินระดับความรุนแรงของเชื้อทดสอบทั้ง 190 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. campestris* pv. *vasicatoria*, *X. campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *P. ananatis* pv. *ananatis*, *P. ananatis* และ *A. avenae* subsp. *avenae* (Table 10) ปลุกเชื้อด้วยวิธีการพ่นลงบนต้นยูคาลิปตัสพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* อายุประมาณ 1-2 เดือน พบว่าเชื้อทั้ง 190 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดอาการโรคทุกสายพันธุ์สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อตามระดับความรุนแรงของการเกิดโรคได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มที่ 1 จำนวน 32 สายพันธุ์ (16.8%) เป็นสายพันธุ์รุนแรงระดับ 1 มีความสามารถในการก่อโรคระดับต่ำแสดงอาการจุดเล็กน้อย 1-30% เชื้อในกลุ่มที่ 2 จำนวน 113 สายพันธุ์ (59.5%) เป็นสายพันธุ์รุนแรง ระดับ 2 มีความสามารถในการก่อโรคบนพืชปานกลางแสดงอาการใบจุด 31-60% และกลุ่มที่ 3 จำนวน 45 สายพันธุ์ (23.7%) เป็นสายพันธุ์รุนแรงระดับ 3 มีความสามารถในการก่อโรคบนพืชระดับรุนแรงแสดงอาการใบจุด 61-100% เปรียบเทียบกับเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดอาการโรคใบจุดเหลี่ยม และเนื่องจากประชากรเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมเป็นสายพันธุ์รุนแรงมีจำนวนสูงกว่า 80% ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้โรคนี้มีการระบาดรุนแรงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เพื่อยืนยันผลของ pathotypic strain ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยระดับความรุนแรงที่เกิดขึ้นจากการทดลองนี้สามารถพัฒนาเป็นโมเดล (Model) ในการวัดระดับความรุนแรงของโรคและใช้ประเมินความเสียหายของยูคาลิปตัสเพื่อพัฒนาการจัดการโรคพืชได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

Table 10 Severity of angular leaf spot on tested eucalyptus (*E. camaldulensis* x *E. deglupta*)
artificially inoculated by 190- eucalyptus strains compared to 12-reference strains

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease severity ^{2/}
1	H1215A1	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	3
2	H1215A2	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	2
3	H1215A3	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	3
4	H1215A4	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	2
5	H1215T5	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	2
6	H1215T6	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	3
7	H1215T7	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	2
8	H1215T8	<i>E. camaldulensis</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	winter	OD	2
9	H878A1	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	2
10	H878A2	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	2
11	H878A3	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	2
12	H878A4	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	2
13	H878T5	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	2
14	H878T6	(<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>) x <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i>	winter	OD	1
15	H951A1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	3
16	H951A2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	3
17	H951A3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	2
18	H951A4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	2
19	H951T5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	3
20	H951T6	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	2
21	H951A7	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	winter	OD	3

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease serverity ^{2/}
22	X92A1	Unknow	winter	OD	3
23	X92A2	Unknow	winter	OD	3
24	X92A3	Unknow	winter	OD	3
25	X92A4	Unknow	winter	OD	2
26	RTDNO 1-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
27	RTDNO 1-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
28	RTDNO 1-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
29	RTDNO 2-1	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	3
30	RTDNO 2-2	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	3
31	RTDNO 2-3	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	2
32	RK7N1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
33	RK7N2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
34	RK7N3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
35	K76/10st1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
36	K76/10st2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
37	K76/10st3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
38	K76/10st4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
39	K7st1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
40	K7st2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
41	K7st3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
42	K7st4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	1
43	TDNO1st1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
44	TDNO1st2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
45	TDNO1st3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
46	TDNO1st4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
47	K76/10ap1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	3
48	K76/10 ap2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
49	K76/10 ap3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	3
50	K76/10 a4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
51	K7 ap1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
52	K7 ap2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease serverity ^{2/}
53	K7 ap3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	1
54	K7 ap4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
55	TDNO1 ap1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
56	TDNO1 ap2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
57	TDNO1 ap3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	1
58	TDNO1 ap4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
59	TDNO2 ap1	<i>E. grandis</i>	winter	OD	2
60	TDNO2 ap2	<i>E. grandis</i>	winter	OD	3
61	TDNO2 ap3	<i>E. grandis</i>	winter	OD	2
62	P1J	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	3
63	P1J	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	3
64	P3J	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	3
65	DSTK3-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
66	DSTK3-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
67	DSTK3-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
68	DSTK3-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
69	DAP3-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	1
70	DAP3-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
71	DAP3-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	winter	OD	2
72	EK7-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
73	EK7-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
74	EK7-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	1
75	EK7-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
76	EK7st-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
77	EK7st-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
78	EK7st-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
79	EK7st-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
80	RTDNO1-1/1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
81	RTDNO1-1/2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	3
82	RTDNO1-2/1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
83	RTDNO1-2/2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	1

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease serverity ^{2/}
84	RTDNO2-1/1	<i>E. grandis</i>	summer	OD	2
85	RTDNO2-1/2	<i>E. grandis</i>	summer	OD	2
86	RTDNO2-2/1	<i>E. grandis</i>	summer	OD	2
87	RTDNO2-2/2	<i>E. grandis</i>	summer	OD	3
88	Re1-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	1
89	Re1-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
90	Re1-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	3
91	Re1-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
92	Re1-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
93	Re2-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
93	Re2-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
95	Re2-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	3
96	Re2-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
97	Re2-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	3
98	Re2-6	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
99	Re3-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
100	Re3-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	1
101	Re3-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
102	Re3-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
103	Re3-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
104	Re4-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
105	Re4-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
106	Re4-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	1
107	Re4-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
108	Re4-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
109	Re5-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
110	Re5-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	1
111	Re5-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	3
112	Re5-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
113	Re5-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
114	TDNO1-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease serverity ^{2/}
115	TDNO1-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
116	TDNO1-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
117	TDNO1-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
118	TDNO1-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
119	TDNO1-6	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	1
120	TDNO1-7	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	1
121	TDNO2-1	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	1
122	TDNO2-2	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	2
123	TDNO2-3	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	1
124	TDNO2-4	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	1
125	TDNO2-5	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	1
126	TDNO2-6	<i>E. grandis</i>	rainy	OD	2
127	AH17-1	Unknow	rainy	OD	1
128	AH17-2	Unknow	rainy	OD	2
129	BH17-1	Unknow	rainy	OD	1
130	BH17-2	Unknow	rainy	OD	1
131	EAK-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	1
132	EAK-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
133	EAK-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	2
134	EAK-4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	1
135	EAK-5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	1
136	EAK-6	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	GH	1
137	K7-1/1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
138	K7-1/2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
139	K7-1/3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	OD	2
140	K7-2/1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	ST	1
141	K7-2/2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	ST	2
142	K7-2/3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	ST	1
143	K7-2/4	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	ST	1
144	K7-2/5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	summer	ST	2
145	Y38-1	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	2

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease severity ^{2/}
146	Y38-2	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	2
147	Y38-3	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	2
148	Y38-4	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	2
149	Y38-5	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	1
150	Y38-6	<i>E. camaldulensis</i>	summer	ST	2
151	Y65-1	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	3
152	Y65-2	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	2
153	Y65-3	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	2
154	Y65-4	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	2
155	Y65-5	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	3
156	Y65-5	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	2
157	Y65-7	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	summer	ST	2
158	K62-1	<i>E. urophylla</i>	summer	ST	3
159	K62-2	<i>E. urophylla</i>	summer	ST	2
160	K62-3	<i>E. urophylla</i>	summer	ST	3
161	K62-4	<i>E. urophylla</i>	summer	ST	2
162	K62-5	<i>E. urophylla</i>	summer	ST	2
163	K7A1A-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
164	K7A1A-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
165	K7A2A-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
166	K7A2A-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	3
167	K7A2Y-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
168	K7A3A-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
169	K7A3N-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
170	K7A3Y-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
171	K7A4A-1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	1
172	K7A4N-2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	2
173	K7A4Y-3	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	OD	1
174	K7N1A1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	2
175	K7N1Y2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	2
176	K7N2A1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	2

Table 10 Continued

No.	Isolate	Host	Collected season	Location ^{1/}	Disease serverity ^{2/}
177	K7N2Y2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	1
178	K7N3A1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	1
179	K7N3Y2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	rainy	GH	2
180	K62n2-5A1	<i>E. urophylla</i>	rainy	OD	3
181	K62n2-5N2	<i>E. urophylla</i>	rainy	OD	3
182	K62n2-5Y3	<i>E. urophylla</i>	rainy	OD	2
183	K62n2-5Y4	<i>E. urophylla</i>	rainy	OD	3
184	K62n2-5Y5	<i>E. urophylla</i>	rainy	OD	2
185	G2SA-1	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	3
186	G2SN-2	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	2
186	G2SN-3	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	2
188	G2SA-4	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	3
189	G2SN-5	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	3
190	G2SY-6	<i>E. grandis</i>	rainy	ST	2
191	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)			KU	0
192	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (Xag)			KU	0
193	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> (Xad)			DOA	0
194	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vasicatoria</i> (Xcv)			DOA	0
195	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (Xcm)			DOA	0
196	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc)			KU	0
197	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)			KU	0
198	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Xoc)			DOA	0
199	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)			KU	0
200	<i>Pantoea ananatis</i> pv. <i>ananatis</i> (Eaa)			DOA	0
201	<i>Pantoea ananatis</i> (Paa)			OD	1
202	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> (Aaa)			KU	0

^{1/} KU = Department of Plant Pathology, Kasetsart University, DOA = Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, OD = outdoor, GH = greenhouse, ST = stock

^{2/} Disease severity provided into 4 index levels: 0 = no symptoms (A), 1 = a few necrotic spots with 1-30% (B), 2 = moderate with 31-60% (C), and 3 = high with 61 - 100% (D).

3. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารกึ่งคัดเลือกจำเพาะเพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้อ

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแผลโรคใบจุดเหลี่ยมและมีเนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค มีลักษณะที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ตามลักษณะแผลและลักษณะวิทยาโคโลนิบนอาหาร NA และมีเนวโน้มสูงในการจำแนกเป็น *Pantoea* sp. และ *Xanthomonas* sp. จึงทำการศึกษาคูณสมบัติการเจริญของเชื่อดังกล่าวบนอาหารทดสอบ 3 ชนิด คือ YDC, PA20 และ NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+Bacitracin) โดยอาหาร YDC และ NA ผสมสารปฏิชีวนะ เป็นอาหารสำหรับจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* sp. ส่วนอาหาร PA20 เป็นอาหารคัดเลือกกึ่งจำเพาะสำหรับเชื้อในกลุ่ม *P. ananatis* โดยผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้ง 3 กลุ่มที่แยกได้สามารถเจริญได้บนอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันคือ

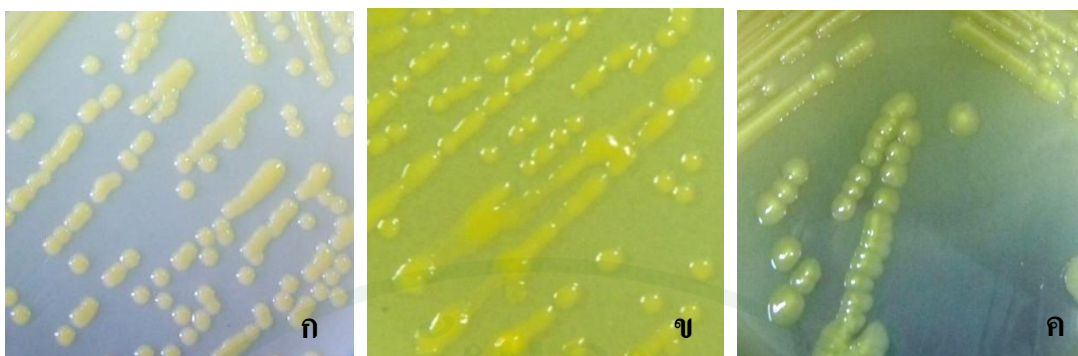
การเจริญของเชื่อบนอาหาร YDC พบว่าลักษณะโคโลนิบนอาหาร อายุ 48 ชั่วโมง ของเชื้อกลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนิสีเหลืองเข้มปุ่น กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ เชื้อกลุ่มที่ 2 มีลักษณะโคโลนิเหลืองอ่อน กลม นูนเล็กน้อย มันวาว ขอบเรียบ และเชื้อกลุ่มที่ 3 มีลักษณะโคโลนิสีเหลืองอ่อน กลม นูนตรงกลาง มันวาว ขอบเรียบ (ภาพที่ 10)

การเจริญของเชื่อบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+Bacitracin) พบว่าลักษณะโคโลนิ อายุ 48 ชั่วโมง เชื้อกลุ่มที่ 1 สามารถเจริญได้ตามปกติ มีลักษณะโคโลนิสีเหลืองอ่อน มันวาว ขอบเรียบ กลม นูน (ภาพที่ 11 ก) ส่วนเชื้อกลุ่มที่ 2 และ 3 จะไม่เจริญบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ

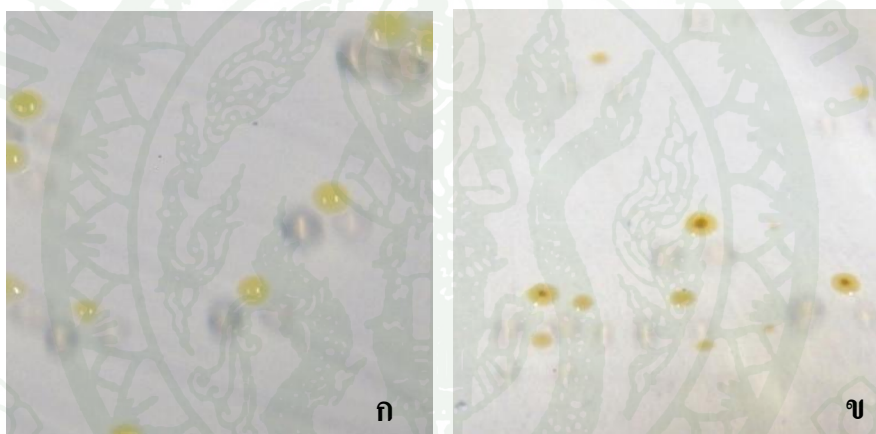
การเจริญของเชื่อบนอาหาร PA20 ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะของเชื้อ *P. ananatis* พบว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 และ 3 จะไม่มีการเจริญส่วนกลุ่มที่ 2 สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 11 ข) ลักษณะโคโลนิจะต่างจากอาหารทั่วไปจะมีสีเหลืองส้ม กลม นูนเล็กน้อย เป็นมันวาว ตรงกลางจะมีจุดสีเข้มลักษณะรวมกันเป็นเม็ดเล็ก ๆ ซึ่งตรงกับลักษณะที่อ้างอิงของ Goszczynska *et al.*, 2006 เชื้อ *P. ananatis* ใน

อาหารจำเพาะ PA20 จะมีขนาด 3-4 มิลลิเมตร สีเหลืองใส เป็นมันวาว คล้ายหยดน้ำ ตรงกลางจะมี สีเข้มลักษณะรวมกันเป็นจุดเล็กๆ สีอาหารรอบโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีลักษณะโคโลนี เช่นเดียวกันกับเชื้อ *P. ananatis* สายพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการ เกษตร

ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 มีแนวโน้มจัดจำแนก เป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. เนื่องจากสามารถเจริญบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ ที่เดิมเพื่อยับยั้ง การเจริญของเชื้ออื่นๆ ส่วนเชื้อในกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Pantoea* sp. เนื่องจากพบว่าเชื้อ ดังกล่าวมีลักษณะการเจริญบนอาหาร YDC ไม่สอดคล้องกับเชื้อกลุ่ม *Xanthomonads* และไม่สามารถเจริญบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ แต่สามารถเจริญได้บนอาหาร PA20 ซึ่งเป็นอาหาร จำเพาะที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *P. ananatis* ส่วนเชื้อกลุ่มที่ 3 ยังไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ และ PA20 ผลการศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรค แต่เป็นเชื้อคนละชนิด โดยกลุ่มที่ 1 มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. และมีอัตราการพบใน ตัวอย่างพืชสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Pantoea* sp. จึงได้ทำการศึกษา คุณสมบัติในระดับต่างๆ เพื่อยืนยันการจำแนกต่อไป



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มที่ 1 (ก), กลุ่มที่ 2 (ข), และ กลุ่มที่ 3 (ค) ที่แยกได้จากใบยูคาลิปตัสที่แสดงลักษณะอาการใบจุดแผลไหม้บนอาหาร YDC agar



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มที่ 1 บนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+Bacitracin) (ก) และลักษณะ โคโลนีเชื้อกลุ่มที่ 2 เจริญบนอาหารจำเพาะ PA20 (ข)

3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ผลการทดลองพบว่าเชื้อสาเหตุโรคแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 จำนวน 190 สายพันธุ์มาทำการศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อสาเหตุโรคลักษณะที่ 1 มีลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหาร NA สีเหลืองอ่อน กลมมน มันวาว ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.8 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างค่อนข้างกลม (shot rod) พบว่าสามารถสร้าง enzyme catalase เคลื่อนที่ได้ เจริญแบบใช้ออกซิเจน (aerobe) ผลทดสอบ citrate, starch hydrolysis การใช้น้ำตาล sucrose, arabinose, lactose และ maltose ให้ผลเป็นบวก (positive reaction) ผลทดสอบ indole production, methyl red, voges - proskauer, urease การใช้ น้ำตาล sorbitol, manitol และ arabitol ให้ผลเป็นลบ (negative reaction) ซึ่งผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีให้ผลตรงกับเชื้อ *Xanthomonas* sp. และเมื่อทำการตรวจสอบการผลิตสาร Xanthomonadin (Schaad, 2001) พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสารดังกล่าวได้เช่นเดียวกับ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ที่ใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ (Table 11) แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 มีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp.

ส่วนผลการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลักษณะที่ 2 จำนวน 22 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA สีเหลืองใส โปร่งแสง กลมมนเล็กน้อย มันวาว ซึ่งติดสีแกรมลบ เซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างท่อนสั้น อยู่แบบเดี่ยว ให้ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระและชีวเคมี คือสามารถสร้าง enzyme catalase เจริญแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน (facultative anaerobes) สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลิต indole การทดสอบ methyl red, voges – proskauer, citrate การใช้ น้ำตาล sucrose, arabinose, lactose, maltose, sorbitol, manitol และ arabitol ให้ผลเป็นบวก (positive reaction) การทดสอบ urease, starch hydrolysis และ Xanthomonadin ให้ผลเป็นลบ (negative reaction) เมื่อนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวมาเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าผลการทดสอบทุกชนิดให้ผลตรงกับเชื้อ *Pantoea* sp. แสดงว่าเชื้อกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Pantoea* sp. (Table 11)

Table 11 Physiological and biochemical properties of test bacteria isolated from eucalyptus leaves compared to the reference strains

Test	Reaction ^{1/}				
	Strain ^{2/}				
	Group 1	Group 2	Xac	Xam	<i>P. ananatis</i>
1. Gram reaction	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
2. Cell morphology	short rods	short rods	short rods	short rods	small rods
3. Cell arrangement	Single	Chain	Single	Single	Chain
4. Catalase production	+	+	+	+	+
5. Oxygen relationship	A	F	A	A	F
6. Indole production	-	+	+/-	+/-	+
7. Methyl red test	-	+	-	-	+
8. Voges – Proskauer test	-	+	-	-	+
9. Motility test	+	+	+	+	+
10. Citrate utilization	+	+	+	+	+
11. Urease test	-	-	-	-	-
12. Starch hydrolysis	+	-	+	+	-
13. Carbon utilization					
13.1 Sorbitol	-	+	-	-	+
13.2 Sucrose	+	+	+	+	+
13.3 Arabinose	+	+	+	+	+
13.4 Lactose	V	+	+	+	+
13.5 Maltose	+	+	+	+	+
13.6 Manitol	-	+	V	-	+
13.7 Arabitol	-	+	-	-	+
14. Xanthomonadin production	+	-	+	+	-

^{1/} + = positive reaction, - = negative reaction, V = variable, A = aerobe, and F = facultative.

^{2/} Group 1= isolated from symptom of angular leaf spot with yellow halo, Group 2= isolated from symptom of leaf spot, blight, and black midrib, Xac= *X. axonopodis* pv. *citri* and Xam= *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีอนุวิทยา

เนื่องจากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นทั้งในระดับสถานวิทยาโคโลนีการเจริญบนอาหารคัดเลือกเฉพาะ คุณสมบัติทางสถานวิทยา และชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบยูคาลิปตัส ซึ่งมีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุหลักนั้นมีความเป็นไปได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ *Xanthomonas* sp. จากประชากรเชื้อกลุ่มที่ 1 และ *Pantoea* sp. จากประชากรเชื้อกลุ่มที่ 2 จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลด้วยวิธีวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริเวณยีน 16S rDNA ที่ออกแบบเป็น universal primer สำหรับจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีรายงานมาก่อนและที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกออกจากยูคาลิปตัส (Table 5)

3.3.1 จำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคยูคาลิปตัสโดยใช้ universal primer bacterial เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rDNA ของคู่ไพรเมอร์ 6F (5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3') กับ 1510R (3' AGT CGT AAC AAC GTA ACC CTG CAG CAC 5') (van der Meer *et al.*, 1998) ผลของยีนดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp จากผลการวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ (BLAST) เชื้อกลุ่มที่ 1 ตรงกับเชื้อ *X. axonopodis* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99% และเชื้อกลุ่มที่ 2 ตรงกับเชื้อ *P. ananatis* LMG 20103 สาเหตุโรคใบไหม้ในยูคาลิปตัส และ die back โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100% (Table 12)

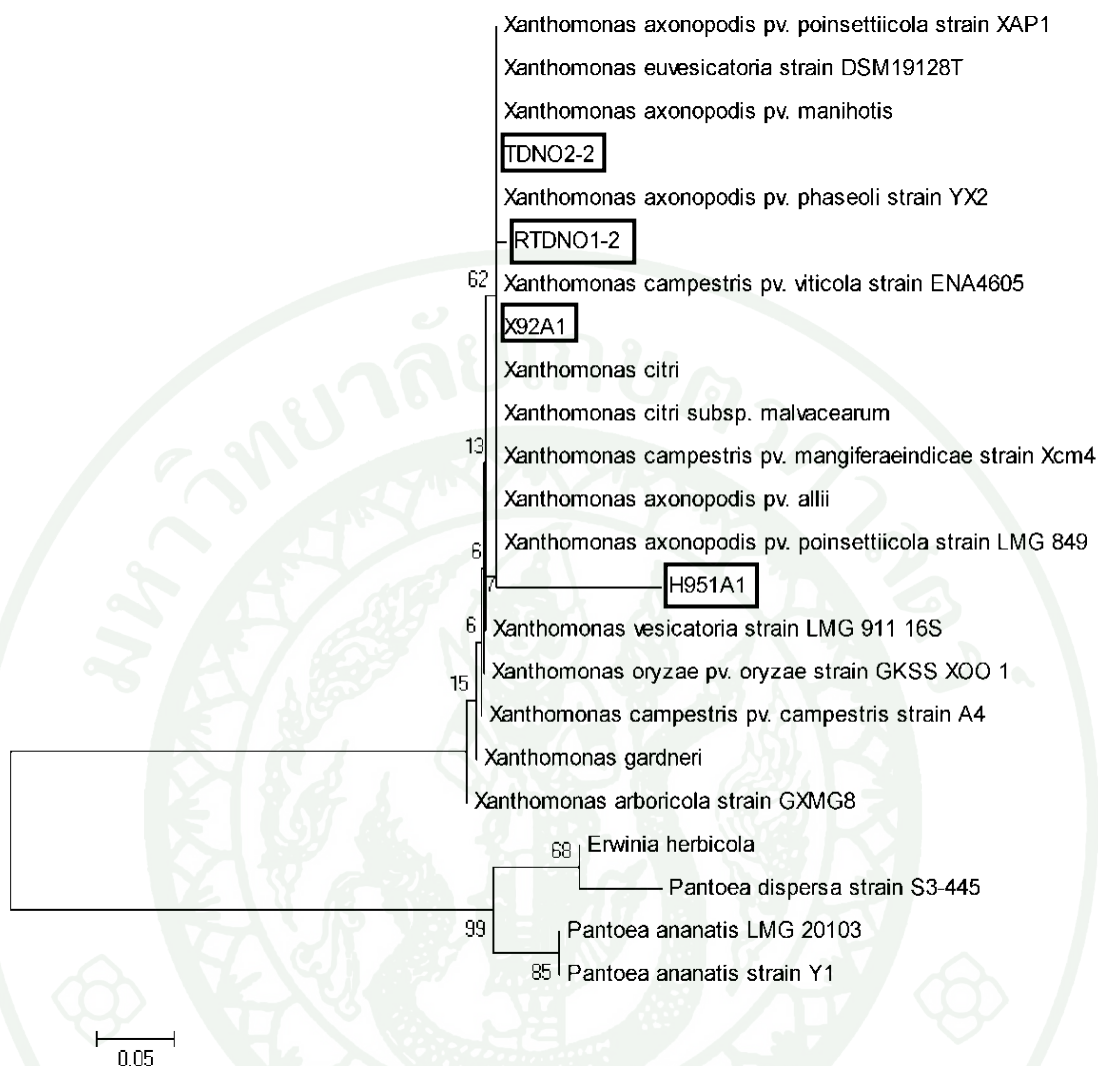
Table 12 Sequence analysis of the 16S rDNA from bacterial pathogens Group 1 and 2 compared with the sequencing data in GenBank

Group	Primer	Amplicon size (bp)	Identity (%)	Sequence test isolates	GenBank accession No.
1	16S rDNA	1046	99	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	HM582883.1
2	16S rDNA	1149	100	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	FJ611814.1

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกลุ่มที่ 1 สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยูคา
ลิปดัสโดยใช้ universal primer บริเวณยีน 16S rDNA เพื่อทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่แยก
ได้จากยูคาลิปตัสต่างสายพันธุ์ จำนวน 3 คู่ ดังนี้ คู่ที่ 1 Forward (5' AGT TTG ATC CTG GCT
CAG 3') Reward (3' TGG GAC GAA GTC GTA ACA AGG TA 5') (De Baere *et al.*, 2004) ได้
แถบดีเอ็นเอขนาด 700 bp ใช้ทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ H951A1 แยกจากสายพันธุ์ *E. camaldulensis*
x E. grandis ไพรเมอร์คู่ที่ 2 27F (5' AGT AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG 3') 1492R (3'
TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 5') (Lane, 1991) ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1200 bp ใช้
ทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ TDNO2-2 แยกจากสายพันธุ์ *E. grandis* และ ไพรเมอร์คู่ที่ 3 6F (5' GGA
GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3') 1510R (3' AGT CGT AAC AAC GTA ACC CTG CAG
CAC 5') (van der Meer *et al.*, 1998) ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์
X92A1 และ RTDNO1-2 แยกจากสายพันธุ์ *E. camaldulensis x E. deglupta* พบว่าผลการวิเคราะห์
ทุกไพรเมอร์ตรงกับกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* โดยมีค่าความเหมือนกับเชื้อสาเหตุโรคในกลุ่ม
X. axonopodis pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* โดยมี
เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99% (Table 13 และ ภาพที่ 12)

Table 13 Sequence analysis of the 16S rDNA of *X. axonopodis* caused angular leaf spot
compared to sequencing data in GenBank

Tested strain	Primer	Amplicon size (bp)	Identity (%)	Sequence test isolates	GenBank accession No.
H951A1	16S rDNA	354	99	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	NR_026388.1
X92A1	16S rDNA	1421	99	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	AE008923.1
RTDNO1-2	16S rDNA	1046	99	<i>X. axonopodis</i>	HM582883.1
TDNO2-2	16S rDNA	1151	99	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	FR839635.1



ภาพที่ 12 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม
 ยูคลิปต์สกับเชื้อ *Xanthomonas* spp. และ *Pantoea* spp. ด้วยโปรแกรม MEGA5 วิธี
 neighbor-joining (NJ)

อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นยังไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อเป้าหมายได้ถึงระดับ pathovar แต่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 ที่แยกได้จากยูคาลิปตัสมีความใกล้เคียงระดับสปีชีส์กับเชื้อ *X. axonopodis* ซึ่งต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเชิงลึกทั้งชีววิทยาการเข้าทำลายพืชอาศัยและพืชอื่นข้างเคียง การศึกษาในระดับอนุวิทยา ตลอดจนพัฒนาวิธีการตรวจสอบจากไพรเมอร์จำเพาะ เพื่อสามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้มีความจำเพาะกับการเกิดโรคในยูคาลิปตัสเท่านั้น

3.3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *P. ananatis* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS

ทำการวินิจฉัยเพื่อยืนยันการเป็นเชื้อ *P. ananatis* จากคู่ไพรเมอร์ PanITS sn2b (5' GTC TGA TAG AAA GAA AAG 3') กับ ไพรเมอร์ PanITS as2b (3' GCG CCG GTA AGG TGA TAT GAA 5') ที่ออกแบบจำเพาะกับเชื้อ *P. ananatis* ในส่วนบริเวณ 16S-23S ITS (Coutinho *et al.*, 2002) โดยนำแบคทีเรียเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ที่ผ่านการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีมาตรวจสอบยืนยัน โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

การใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 16S-23S ITS (ภาพที่ 13) พบว่าเชื้อกลุ่มที่ 2 (Lane 2-11) สาเหตุโรคใบไหม้ทุกสายพันธุ์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 398 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะของเชื้อ *P. ananatis* (Coutinho *et al.*, 2002) เปรียบเทียบกับเชื้อ *Pantoea ananatis* pv. *ananatis* สายพันธุ์จากกรมวิชาการ (Lane 1) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตรงกัน จึงสามารถยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเชื้อ *P. ananatis* โดยที่เชื้อสายพันธุ์อื่นไม่สามารถปรากฏแถบดีเอ็นเอได้จากผลเปรียบเทียบกับเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Lane 12) เชื้อ *X. campestris* pv. *glycines* (Lane 13) เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lane 14) เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* (Lane 15) เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Lane 16) เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Lane 17) และเชื้อ *Xanthomonas* sp. กลุ่มที่ 1 จากยูคาลิปตัส (Lane 18 -25) จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งไพรเมอร์นี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อ *P. ananatis* ที่ออกแบบจากตำแหน่งของ 16S-23S ITS เป็นส่วนอนุรักษ์ที่สามารถใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย



ภาพที่ 13 การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS ของเชื้อ *Pantoea ananatis* สาเหตุโรคใบไหม้ในยูคาลิปตัสที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 398 bp

Lane M = 1 kb standard DNA marker

Lane 1 = *Pantoea ananatis* pv. *ananatis*

Lane 2 - 11 = *Pantoea* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ในยูคาลิปตัสกลุ่มที่ 2

Lane 12 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Lane 13 = *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*

Lane 14 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 15 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Lane 16 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 17 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

Lane 18 - 25 = *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัสกลุ่มที่ 1

3.3.3 การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas* spp. โดยการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะ

3.3.3.1 จำแนกชนิดของเชื้อ *Xanthomonas* spp. โดยวิธี degenerate primer

จากการผลการทดสอบทางชีวเคมีและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชี้ให้เห็นว่าเชื้อในกลุ่มที่ 1 ที่แยกได้จากยูคาลิปตัสที่แสดงอาการใบจุดเหลี่ยมมีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. เนื่องจากในฐานข้อมูล (GenBank) ไม่มีลำดับสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส จึงทำการทดลองออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ตำแหน่งของยีนก่อโรค *hrpF* บริเวณลำดับเบสที่ 820 - 1730 ของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* spp. โดยทำการ degenerate เบสที่แตกต่างกันของแต่ละเชื้อได้ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบดังนี้ (Table 14)

Table 14 Degenerated primers from *hrpF* genes of *Xanthomonas* spp.

Primer HrpF-F	Primer HrpF-R
5' GACAAGATCAACGACCCTTCC 3' 820	5' ACGCTGGACACCATCAACAG 3' 1730
T	T
Y	Y
5' GACAAGATCAACGAYCCTTCC 3'	5' ACGCTGGACACCATCAAYAG 3'
Degenerated primer for <i>Xanthomonas</i> from eucalyptus	3' CTRTTGATGGTGTCCAGAGT 5'

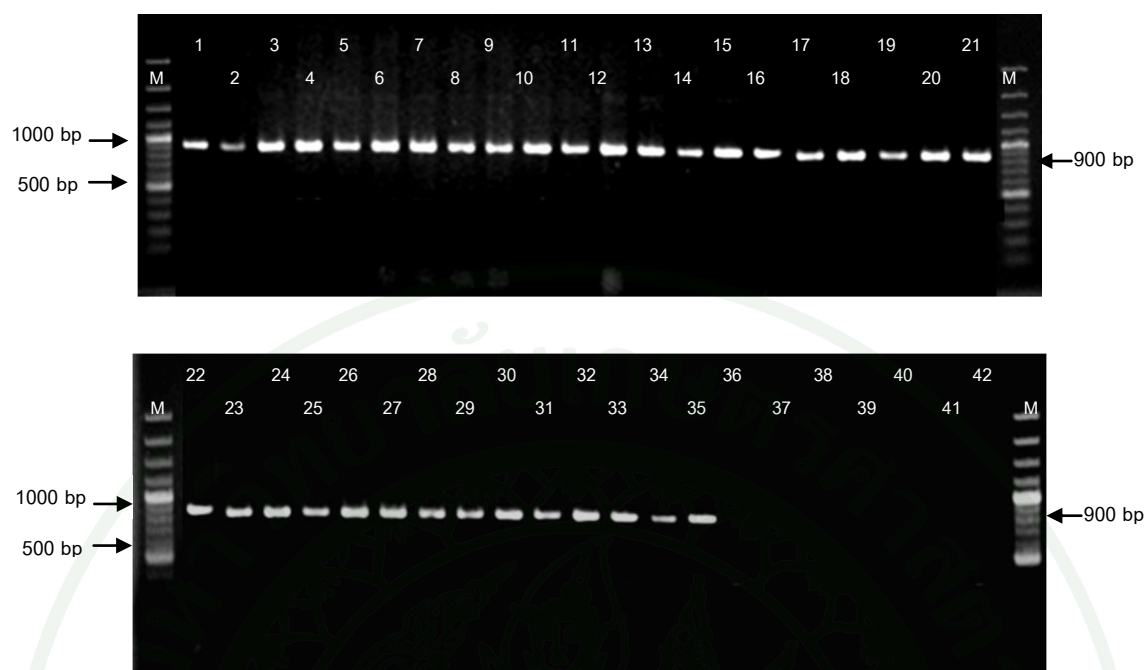
H = A, T, C; N = A, C, G, T; R = A, G; Y = C, T.

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas* sp.

ในยูคาลิปตัสโดยทำ Degenerate primer ได้คู่ไพรเมอร์ คือ HrpF-F (5' GAC AAG ATC AAC GAY CCT TCC 3') กับ HrpF-R (3' CTR TTG ATG GTG TCC AGA GT 5') หลังจากนั้นทำการพิสูจน์และยืนยันผลการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคยูคาลิปตัสด้วย polymerase chain reaction (PCR) ผลการทดลองพบว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้จากยูคาลิปตัสทุกสายพันธุ์จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 900 bp (Lane ที่ 1-30) และนอกจากนี้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. campestris* pv. *vasicatoria* และ *X. campestris* pv. *manihotis* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp (Lane ที่ 31-35) ส่วนเชื้อ

X. campestris pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *P. ananatis* pv. *ananatis*, *P. ananatis* และ *A. avenae* subsp. *avenae* จะไม่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ (Lane ที่ 36-41) (ภาพที่ 14)

ผลการทดลองนี้แสดงว่าการพัฒนาไพรเมอร์โดยใช้ตำแหน่งของ ยีน *hrpF* ของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อ ในกลุ่ม *Xanthomonads* จริงโดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ จำแนกชนิดของเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคในพืชต่างๆ ในเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 14 การทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งของ *hrpF* เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ

Xanthomonas sp. ได้สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp

Lane M = Marker

Lane 1 – 30 = *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัส

Lane 31 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 32 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Lane 33 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

Lane 34 = *Xanthomonas campestris* pv. *vasicatoria*

Lane 35 = *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Lane 36 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Lane 37 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 38 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane 39 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Lane 40 = *Pantoea ananatis* pv. *ananatis*

Lane 41 = *Pantoea ananatis*

3.3.3.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *Xanthomonas*

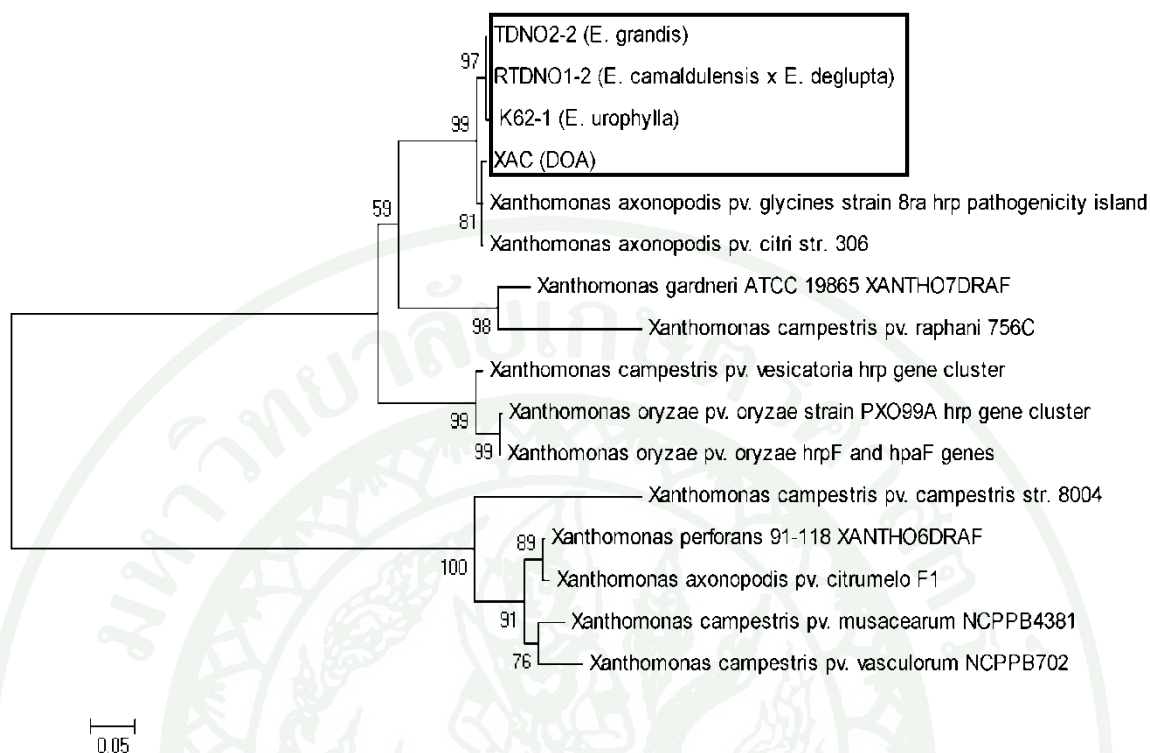
axonopodis pv. *eucalypti* จากบริเวณ *hrpF*

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) กับยีนบริเวณ *hrpF* เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* โดยทำการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสที่แสดงอาการโรครุนแรงบนยูคาลิปตัสทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ RTDNO1-2, TDNO2-2 และ K62-1 แยกจากยูคาลิปตัส 3 พันธุ์ คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. grandis* และ *E. urophylla* ตามลำดับเปรียบเทียบกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ให้ค่าความเหมือนตรงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* (AF499777.1) ; *X. axonopodis* pv. *citri* (AE008923.1) มากที่สุด เท่ากับ 98 ; 98, 98 ; 98, 97 ; 97 และ 99 ; 99% ตามลำดับ (Table 15) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยวิธี ClustalW2 Multiple Alignment เพื่อหาตำแหน่งที่มีความจำเพาะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส (ภาพที่ 16)

Table 15 Nucleotide sequencing analysis of the *hrpF* of bacteria caused eucalyptus angular leaf spot compared with data in the GenBank

Tested strain	Primer	Amplicon size (bp)	Identity (%)	Sequence tested isolates	GenBank accession No.
RTDNO1-2	HrpF	889	98	1. <i>X. a.</i> pv. <i>citri</i> strain 306,	AE008923.1
TDNO2-2	HrpF	893	98	complete genome	
K62-1	HrpF	893	97	2. <i>X. a.</i> pv. <i>glycines</i> strain	AF499777.1
Xac	HrpF	875	99	8ra hrp pathogenicity island	

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* จากผลวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้บริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัสทั้ง 3 สายพันธุ์ และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (กรมวิชาการ) ข้อมูลที่ได้แสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) เห็นได้ว่าเชื้อนี้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่สุดกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และ *X. axonopodis* pv. *citri* ในฐานข้อมูลของ GenBank (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์บริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เปรียบเทียบกับเชื้อ *Xanthomonas* spp. กลุ่มต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 วิธี neighbor-joining (NJ)

จากความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมทั้ง 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Xanthomonas* spp. ที่มียีน *hrpF* จำนวน 12 สายพันธุ์ (ภาพที่ 15) ซึ่งเชื้อมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่สุด 2 สายพันธุ์ คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และ *X. axonopodis* pv. *citri* มาทำการเปรียบเทียบสายนิวคลีโอไทด์ โดยใช้วิธี ClustalW2 Multiple Alignment (ภาพที่ 16) กับเชื้อสายพันธุ์ RTDNO1-2, TDNO2-2, K62-1 และ Xac (ที่ได้ส่งวิเคราะห์ sequencing) เพื่อหาตำแหน่งที่จำเพาะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส สำหรับออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อนี้ ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *hrpF* ได้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ คือ HrpFS-F (5' TCT CAG CAA GTT CGT TTC CCA C 3') และ HrpFS-R (3' GGT GCA TCT GGG AGC TGG AT 5') (ภาพที่ 16)

```

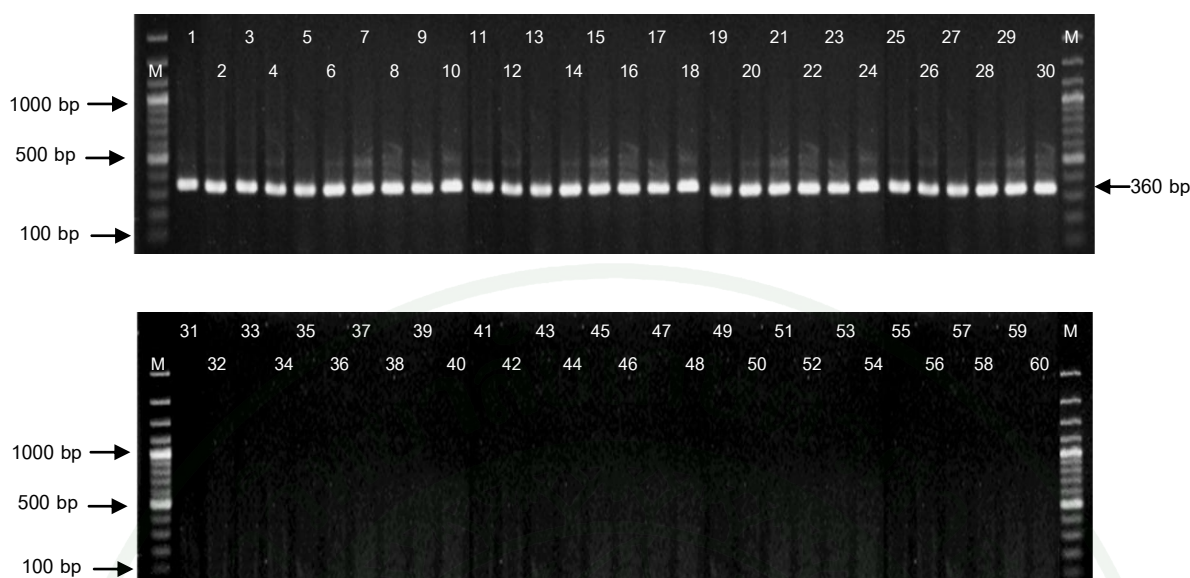
TDN02      CGATCTCAGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 540
PJ1        CGATCTCAGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 539
K62        CGATCTCAGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 539
X.a.glycines CGATCTCGGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 539
X.axonopodis CGATCTCGGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 539
Xac        CGATCTCGGCAAGTTCGTTCCCACCATGCGCAGGTCGCCGAGTACGCCGACAAGCAAGC 539
          *****
TDN02      GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 840
PJ1        GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 839
K62        GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 838
X.a.glycines GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 839
X.axonopodis GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 839
Xac        GGCAGGAGACTCCGGCTCGATGAGCAAACCGGACTTCCTGCAGAAATCCAGCTCCGAGAT 839
          *****
TDN02      GCACCTGACGGCGGACGAGCAGAAGACTCTGGACAC 876
PJ1        GCACCTGACGGCGGACGAGCAGAAGACTCTGGACAC 875
K62        GCACCTGACGGCGGACGATCAGAAGACTCTGGACAC 874
X.a.glycines TCACCTGACGGCGGACGAGCGGAAGACGCTGGACAC 875
X.axonopodis TCACCTGACGGCGGACGAGCAGAAGACGCTGGACAC 875
Xac        TCACCTGACGGCGGACGAGCAGAAGACTCTGGACAC 875
          *****

```

ภาพที่ 16 การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*
บริเวณยีน *hrpF* ด้วยโปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment

ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *X. axonopodis* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมจากยูคาลิปตัสจำนวน 190 สายพันธุ์สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 360 bp (Lane ที่ 1-30) (ภาพที่ 17) ส่วน *X. axonopodis* pv. *citri* (Lane ที่ 31-40), *X. axonopodis* pv. *glycines* (Lane ที่ 41-50), *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. campestris* pv. *vasicatoria*, *X. campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *P. ananatis* pv. *ananatis*, *P. ananatis* และ *A. avenae* subsp. *avenae* (Lane ที่ 51-60 ตามลำดับ) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 360 bp ได้ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้จากยูคาลิปตัสนั้นเป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสจริง เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะคือ HrpFS-F (5' TCT CAG CAA GTT CGT TTC CCA C 3') และ HrpFS-R (3' GGT GCA TCT GGG AGC TGG AT 5') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ขนาด 360 bp ได้ ในขณะที่เชื้อ *Xanthomonas* spp. กลุ่มอื่นๆ ไม่สามารถปรากฏแถบดีเอ็นเอได้ การใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดระดับ pathovars (pv. *eucalypti*)

ไพรเมอร์จำเพาะที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมจากยูคาลิปตัสได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสและใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบพันธุ์ต้านทานโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสต่อไปได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้ถือเป็นรายงานแรกที่จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่ถูกต้อง และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่มีประสิทธิภาพเพื่อการจัดการโรคยูคาลิปตัสอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน



ภาพที่ 17 การตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน *hrpF* (HrpFS-F และ HrpFS-R) ที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp

Lane M = Marker

Lane 1 – 30 = *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยว

Lane 31-40 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 41-50 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Lane 51 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

Lane 52 = *Xanthomonas campestris* pv. *vasicatoria*

Lane 53 = *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Lane 54 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Lane 55 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 56 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane 57 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Lane 58 = *Pantoea ananatis* pv. *ananatis*

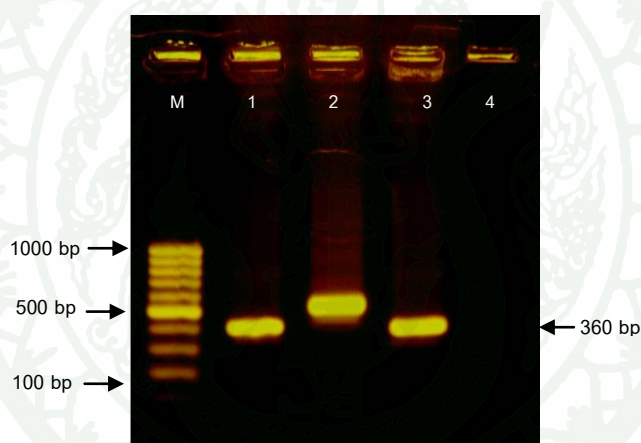
Lane 59 = *Pantoea ananatis*

Lane 60 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

3.3.4 การจำแนกเชื้อด้วยเทคนิค Dot blot hybridization

3.3.4.1 การสังเคราะห์ Probe

การเตรียม DNA probe ด้วยปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์จำเพาะ *hrpFS* ทำการสังเคราะห์ probe จากดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* (RTDNO1-2) ที่ติดฉลากด้วย DIG High Prime labeling (Roche, Germany) จะมีขนาด 500 bp โดยขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเพิ่มเบสที่ติดฉลากของสายดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR สำหรับผลควบคุมผลบวก (control PCR) ใช้ dNTPs ปกติเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp และสำหรับผลควบคุมลบจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การสังเคราะห์ DNA probe จากไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* (RTDNO1-2) สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส ด้วยเทคนิค PCR

Lane M = Marker

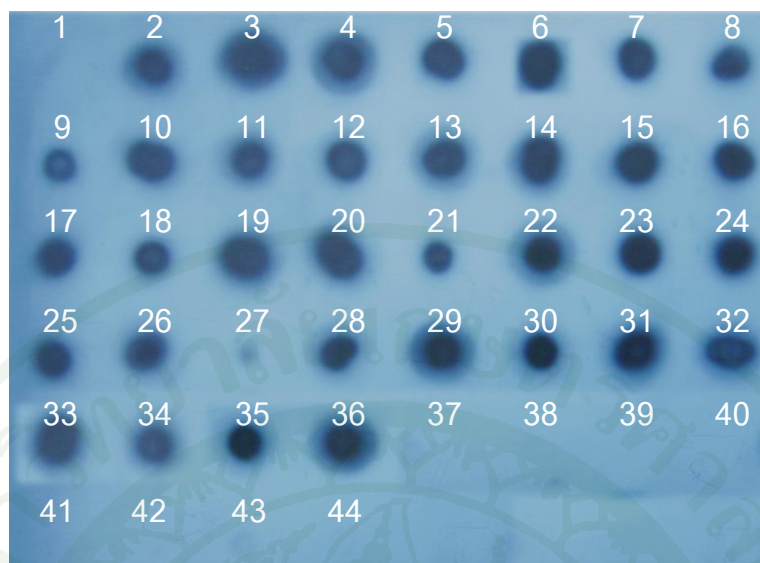
Lane 1, 3 = ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา PCR ปกติพบแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp

Lane 2 = ดีเอ็นเอ Probe ที่สังเคราะห์โดยใช้ DIG-dUTP (alkali-labile) ในปฏิกิริยา PCR

Lane 4 = กรรมวิธีควบคุมน้ำกลั่น

3.3.5.2 ตรวจสอบเชื้อ Xanthomonads ด้วยวิธี Dot blot hybridization

การตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวของกล้วยาลิปตัส จากการสังเคราะห์ตัวตรวจสอบ (*hrpFS*-probe) มาใช้ตรวจสอบกับเชื้อสาเหตุที่แยกได้จากอาการโรคใบจุดเหี่ยวจำนวน 190 สายพันธุ์ (หมายเลข 3-12) *X. axonopodis* pv. *citri* 10 สายพันธุ์ (หมายเลข 13-22) *X. axonopodis* pv. *glycines* 10 สายพันธุ์ (หมายเลข 23-32) *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. campestris* pv. *vasicatoria*, *X. campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* (หมายเลข 33-36 ตามลำดับ) พบว่า Probe ที่พัฒนาไม่สามารถแยก/จำแนกชนิดเชื้อ *Xanthomonas* spp. ได้ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบทั้งหมดโดยปรากฏปรากฏจุดสีดำเข้มในตัวอย่างทั้งหมดในกลุ่ม *X. axonopodis* และ *X. campestris* ซึ่งมีขนาดของจุดที่แตกต่างกันส่วนเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *P. ananatis* pv. *ananatis*, *P. ananatis*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (หมายเลข 37-44) จะไม่ปรากฏจุดสีดำขึ้น แสดงว่า probe ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความจำเพาะในเชื้อกลุ่ม Xanthomonads ระดับสปีชีส์และเกิด crossing over ระหว่าง *X. axonopodis* และ *X. campestris* จึงไม่สามารถใช้ probe นี้ยืนยันในระดับ species และ pathovar ได้ เนื่องจากบริเวณ *hrpFS* ที่นำมาใช้สามารถพบได้ทั่วไปในเชื้อ Xanthomonads จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกันผลจึงทำให้เชื้อในกลุ่ม Xanthomonads ส่วนใหญ่สามารถเข้าคู่ได้กับ probe ที่ออกแบบและพัฒนาขึ้นซึ่งจะได้มีการศึกษาหาตำแหน่งที่แตกต่างและพัฒนาการจำแนกต่อไป (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization; 1 = Control ddH₂O, 2= DNA Probe, 3-12 = *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัส 190 สายพันธุ์, 13-22 = *X. axonopodis* pv. *citri*, 23-32 = *X. axonopodis* pv. *glycines*, 33 = *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, 34 = *X. campestris* pv. *vasicatoria*, 35 = *X. campestris* pv. *manihotis*, 36 = *X. campestris* pv. *campestris*, 37 = *X. oryzae* pv. *oryzae*, 38 = *X. oryzae* pv. *oryzicola*, 39 = *E. carotovora* subsp. *carotovora*, 40 = *P. ananatis* pv. *ananatis*, 41 = *P. ananatis*, 42 = *A. avenae* subsp. *avenae*, 43 = *B. amyloliquefaciens* และ 44 = *P. fluorescens*

4. การศึกษาชนิดพืชอาศัย

4.1 ความรุนแรงต่อพันธุ์ยูคาลิปตัส

จากการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัสจำนวน 8 สายพันธุ์ อายุ 15 วันหลังปลูกเชื้อ เกิดโรคจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. grandis* เริ่มแสดงอาการที่ 7 วัน ส่วน *E. urophylla* (N.1) และ *E. urophylla* (N.2) เริ่มแสดงอาการที่ 10 วัน มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 75, 60, 30 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 16 และ ภาพที่ 20) โดยอาการโรคเริ่มแรกจะแสดงอาการจุดเหลือง ต่อมาจุดเหลืองจะขยายขนาดออกและเกิดอาการเซลล์ตายสีน้ำตาลอ่อน มีบริเวณเหลืองล้อมรอบ (halo) ต่อมาอาการจุดจะชัดเจนขยายขนาดขึ้นเป็นสีน้ำตาลเข้มที่ 15-20 วัน และสายพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการโรค มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *E. camaldulensis* x *E. pellita*, *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.1), *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.2) และ *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.3) (Table 16) แสดงว่าเชื้อสาเหตุโรคมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ยูคาลิปตัสที่สามารถเข้าทำลาย และมีความรุนแรงมากหรือน้อยในสายพันธุ์และสายต้นที่แตกต่างกัน จากข้อมูลที่ได้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดพันธุ์ยูคาลิปตัสต่อไป

Table 16 Disease severity of angular leaf spot artificially inoculated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* strain RTDNO1-2 on different clones of *Eucalyptus* spp.

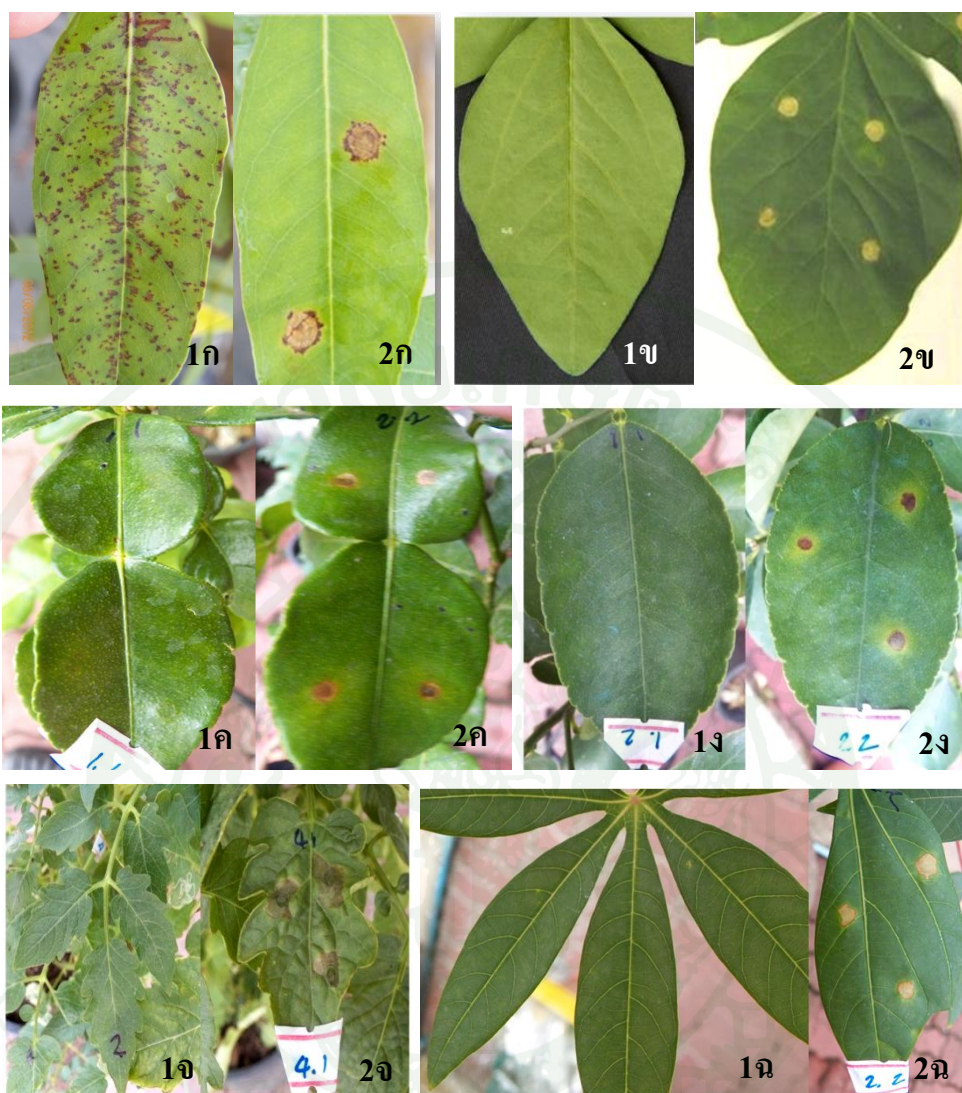
No.	Plant species	Disease severity (%)
1	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. deglupta</i>	75
2	<i>E. grandis</i>	60
3	<i>E. urophylla</i> (N.1)	30
4	<i>E. urophylla</i> (N.2)	12
5	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. pellita</i>	0
6	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i> (N.1)	0
7	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i> (N.2)	0
8	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. brassiana</i> (N.3)	0



ภาพที่ 20 อาการของโรคใบจุดเหลืองจากการปลูกเชื่อมยูลิปตัสสายพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* (ก), *E. grandis* (ข), *E. urophylla* (N.1) (ค) และ *E. urophylla* (N.2) (ง)

4.2 การทดสอบการเข้าทำลายพืชต่างชนิดของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

จากการศึกษาวิจัยข้างต้นบ่งชี้ความเป็นไปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรค คือ *X. axonopodis* นั้น pathovars ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) 16S rDNA และ *HrpF* ซึ่งตรงกับสายพันธุ์เชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทยได้แก่ โรคแคงเกอร์พืชตระกูลส้ม โรคใบไหม้มันสำปะหลัง โรคใบจุดหนูนวลเหลือง และโรคใบจุดมะเขือเทศ จึงทดสอบการเข้าทำลายข้ามพืชอาศัย (cross inoculation) ระหว่างพืชอาศัยดังกล่าว พบว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลืองมูคาลิปตัสจำนวน 190 สายพันธุ์ ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนพืชทดสอบชนิดอื่นได้ในทุกวิธีการปลูกเชื้อ ทั้งการปลูกเชื้อโดยวิธีการพ่นและการฉีด cell suspension เข้าสู่เนื้อเยื่อใบ รวมทั้งชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (24-48 ชั่วโมง) บน 5 ชนิดพืชคือ มะเขือเทศ ถั่วเหลือง มะกรูด มะนาว และมันสำปะหลัง และเชื้อ *X. campestris* pv. *vasicatoria*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. campestris* pv. *manihotis* ไม่สามารถทำให้มูคาลิปตัสเกิดโรคได้ จากผลการศึกษาจึงยืนยันและสรุปได้ว่าเชื้อทดสอบทุกสายพันธุ์ที่แยกจากมูคาลิปตัสสามารถก่อให้เกิดอาการโรคใบจุดเหลืองที่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัยมูคาลิปตัส (pv. *eucalypti*) เท่านั้นจึงยืนยันการบ่งชี้การจำแนกเชื้อเป็น *X. axonopodis* pv. *eucalypti* (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลักษณะใบพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยวิธีการพ่นเชื้อ (1) และการฉีดเชื้อเข้าผิวใบ (2) บนพืชทดสอบต่างชนิด; ยูคาลิปตัส (ก), ถั่วเหลือง (ข), มะกรูด (ค), มะนาว (ง), มะเขือเทศ (จ) และมันสำปะหลัง (ฉ)

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยเทคนิค rep-PCR

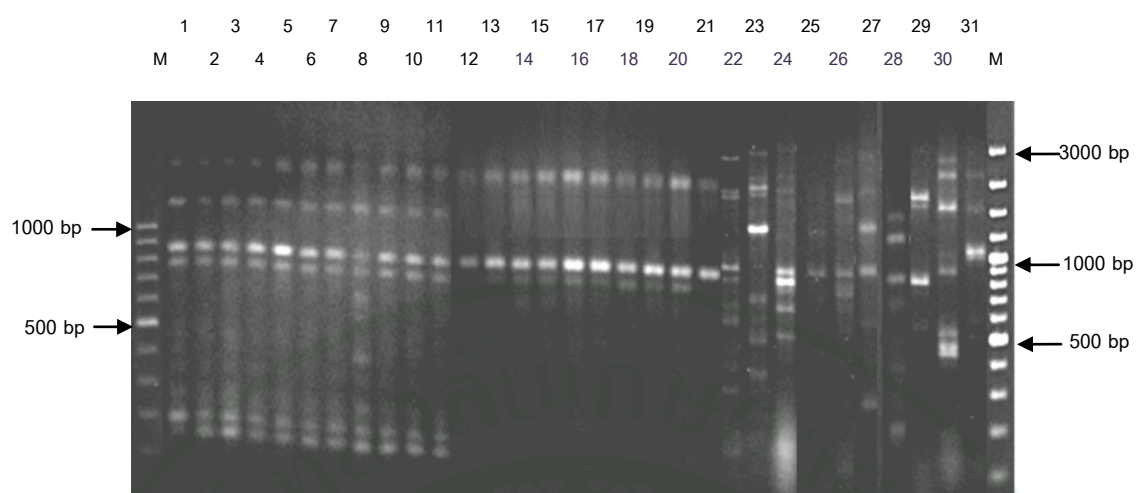
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากยูคาลิปตัส นำมาศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรม ด้วยวิธี rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด นำผลที่ได้มาพิจารณาจากข้อมูลต่างๆ (Table 10) ดังนี้

- 1) แหล่งเก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 แหล่ง คือ โรงเรือน แปลงแม่พันธุ์ และลานวางกล้า
- 2) ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ต่างๆ คือ *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* x *E. grandis*, *E. camaldulensis* x *E. deglupta*, *E. camaldulensis* x (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. urophylla* x *E. brassiana* และ *E. urophylla*
- 3) ช่วงเวลา วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างมาแยกเชื้อ
- 4) ระดับความรุนแรงของสายพันธุ์ในการก่อโรคใบจุดเหลี่ยมแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ ระดับ 0 = ไม่พบอาการโรค 0% ระดับ 1 = อาการใบจุด 1-30% ระดับ 2 = อาการใบจุดปานกลาง 31-60% ระดับ 3 = อาการใบจุดรุนแรง 61-100%
- 5) ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อเปรียบเทียบกับ *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *vasicatoria*, *X. campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *P. ananatis* และ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

จากขั้นตอน rep-PCR นำผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ทดสอบ โดยกำหนดให้เป็น binary data คือ เมื่อเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ขนาดเท่ากันได้ให้ค่าเป็น 1 และเมื่อเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ขนาดเท่ากันได้ให้ค่าเป็น 0 นำมาทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* จำนวน 190 สายพันธุ์ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1 สามารถจัดกลุ่มเชื้อจากทุกไพรเมอร์ได้ดังนี้

5.1 การวิเคราะห์ด้วยไพรมอร์ REP

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรมอร์ REP (ภาพที่ 22) พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยแสดงลักษณะของแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ มีจำนวน 22 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอพบมีขนาดตั้งแต่ 200-3000 bp สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* มีตำแหน่งดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp และ 900 bp นำข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.1 เพื่อสร้าง dendrogram จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ทั้ง 190 สายพันธุ์ ได้ 2 กลุ่มชัดเจน มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.79 (ภาพที่ 23) คือ กลุ่ม A และ B (Table 17) ในกลุ่มสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรง (aggressive strains) และไม่รุนแรง (non-aggressive strains) โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 112 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 13.2% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 42.1% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 3.6% กลุ่ม B ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 80 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 10.5% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 17.4% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 13.2% (จากผลข้อมูลระดับความรุนแรงในข้อที่ 2.3) โดยความแตกต่างจะพบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มอาการ โรครุนแรงที่ขนาด 200 bp, 300 bp และ 1500 bp



ภาพที่ 22 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ REP

Lane M = Marker

Lane 1 – 21 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

Lane 22 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 23 = *Xanthomonas campestris* pv. *vasicatoria*

Lane 24 = *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Lane 25 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Lane 26 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

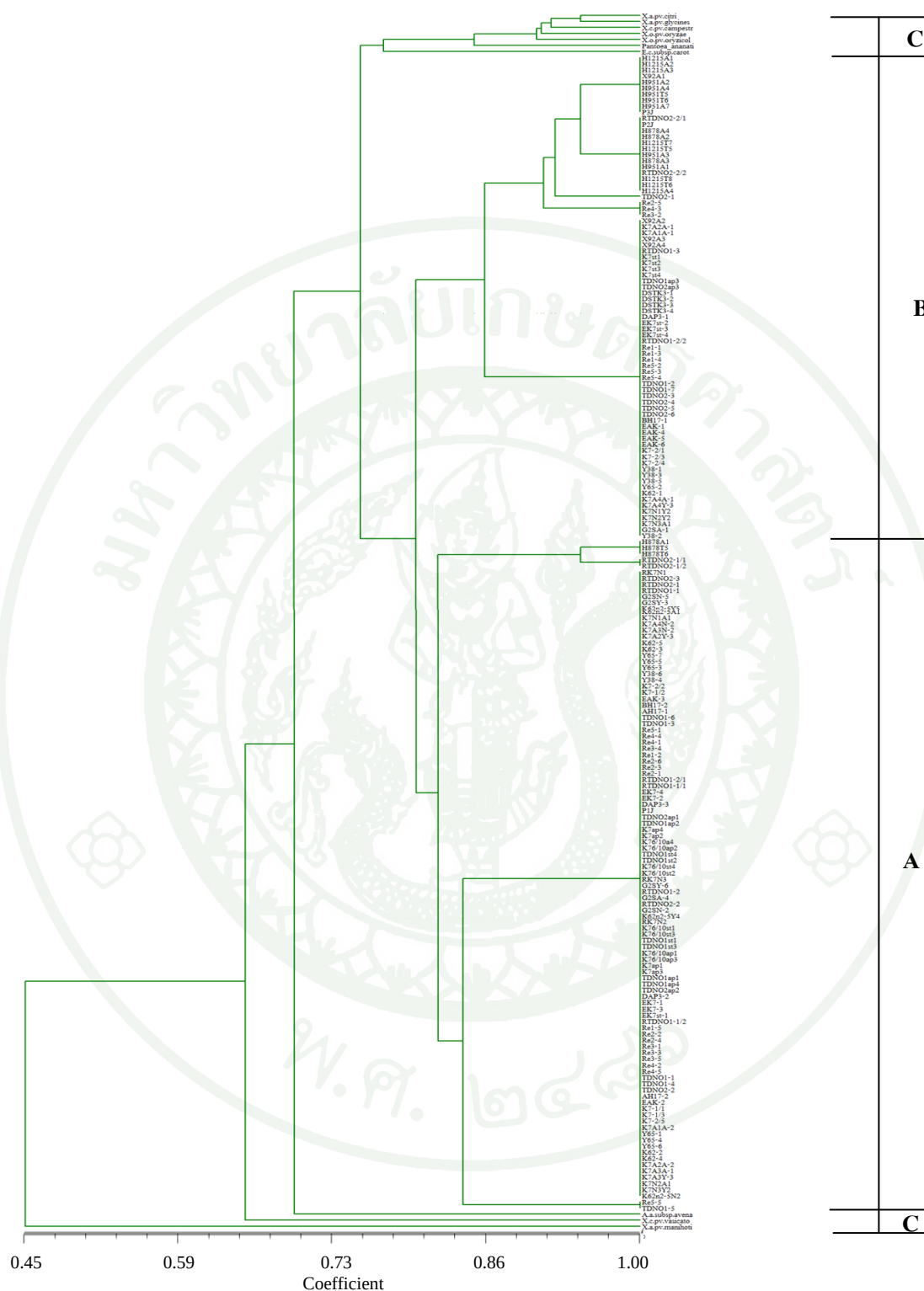
Lane 27 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane 28 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 29 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

Lane 30 = *Pantoea ananatis*

Lane 31 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*



ภาพที่ 23 Dendrogram จากผลการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม REP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.1

Table 17 Grouping strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* obtained from the analysis of DNA fingerprinting with REP primers using NTSYSpc 2.1

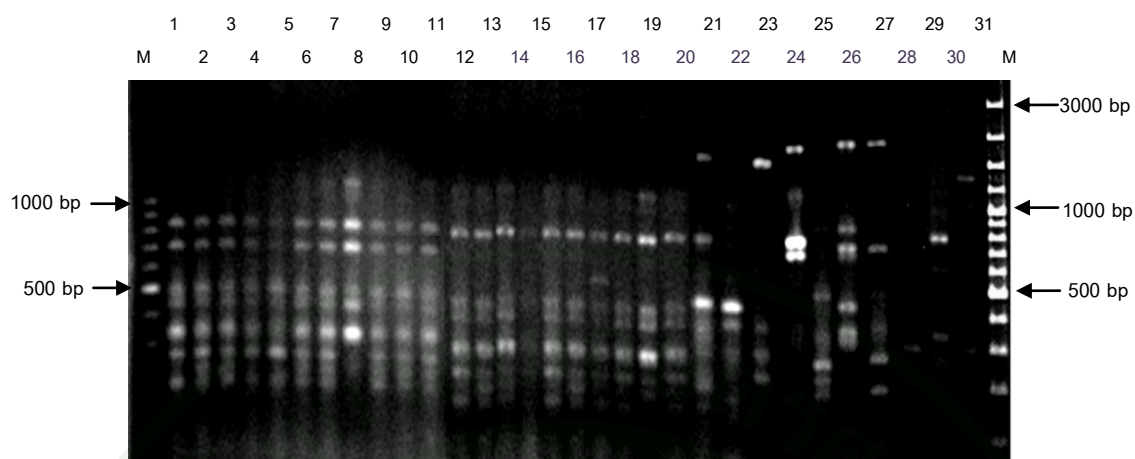
Group ^{1/}	Isolate ^{2/}	Number
A	H878A1, H878T5, H878T6, RTDNO 1-1, RTDNO 1-2, RTDNO 2-1, RTDNO 2-2, RTDNO 2-3, RK7N1, RK7N2, RK7N3, K76/10st1, K76/10st2, K76/10st3, K76/10st4, TDNO1st1, TDNO1st2, TDNO1st3, TDNO1st4, K76/10ap1, K76/10 ap2, K76/10 ap3, K76/10 a4, K7 ap1, K7 ap2, K7 ap3, K7 ap4, TDNO1 ap1, TDNO1 ap2, TDNO1 ap4, TDNO2 ap1, TDNO2 ap2, P1J, P3J, DAP3-2, DAP3-3, EK7-1, EK7-2, EK7-3, EK7-4, EK7st-1, RTDNO1-1/1, RTDNO1-1/2, RTDNO1-2/1, RTDNO2-1/1, RTDNO2-1/2, Re1-2, Re1-5, Re2-1, Re2-2, Re2-3, Re2-4, Re2-6, Re3-1, Re3-3, Re3-4, Re3-5, Re4-1, Re4-2, Re4-4, Re4-5, Re5-1, Re5-5, TDNO1-1, TDNO1-3, TDNO1-4, TDNO1-5, TDNO1-6, TDNO2-2, AH17-1, AH17-2, BH17-2, EAK-2, EAK-3, K7-1/1, K7-1/2, K7-1/3, K7-2/2, K7-2/5, Y38-4, Y38-6, Y65-1, Y65-3, Y65-4, Y65-5, Y65-6, Y65-7, K62-2, K62-3, K62-4, K62-5, K7A1A-2, K7A2A-2, K7A2Y-3, K7A3A-1, K7A3N-2, K7A3Y-3, K7A4N-2, K7N1A1, K7N2A1, K7N3Y2, K62n2-5A1, K62n2-5N2, K62n2-5Y3, K62n2-5Y4, K62n2-5Y5, G2SN-2, G2SY-3, G2SA-4, G2SN-5, G2SY-6	110
B	H1215A1, H1215A2, H1215A3, H1215A4, H1215T5, H1215T6, H1215T7, H1215T8, H878A2, H878A3, H878A4, H951A1, H951A2, H951A3, H951A4, H951T5, H951T6, H951A7, X92A1, X92A2, X92A3, X92A4, RTDNO 1-3, K7st1, K7st2, K7st3, K7st4, TDNO1 ap3, TDNO2 ap3, P2J, DSTK3-1, DSTK3-2, DSTK3-3, DSTK3-4, DAP3-1, EK7st-2, EK7st-3, EK7st-4, RTDNO1-2/2, RTDNO2-2/1, RTDNO2-2/2, Re1-1, Re1-3, Re1-4, Re2-5, Re3-2, Re4-3, Re5-2, Re5-3, Re5-4, TDNO1-2, TDNO1-7, TDNO2-1, TDNO2-3, TDNO2-4, TDNO2-5, TDNO2-6, BH17-1, EAK-1, EAK-4, EAK-5, EAK-6, K7-2/1, K7-2/3, K7-2/4, Y38-1, Y38-2, Y38-3, Y38-5, Y65-2, K62-1, K7A1A-1, K7A2A-1, K7A4A-1, K7A4Y-3, K7N1Y2, K7N2Y2, K7N3A1, G2SA-1	80
C	Xac, Xag, Xcv, Xcm, Xcc, Xoo, Xoc, Ecc, Aaa, Paa	10

^{1/}Group A= virulence strains, Group B = avirulence strains, and Group C= compared strains.

^{2/}Lists of strains detailed in Table 10.

5.2 การวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ ERIC

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ERIC (ภาพที่ 24) พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยแสดงลักษณะของแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์มีจำนวน 20 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอพบมีขนาดตั้งแต่ 250-2000 bp สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* มีตำแหน่งดีเอ็นเอขนาด 850 bp และ 500 bp นำข้อมูลดีเอ็นเอ ที่ได้ทั้งหมดมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.1 เพื่อสร้าง dendrogram จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ทั้ง 190 สายพันธุ์ ได้ 2 กลุ่มชัดเจนมีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.77 (ภาพที่ 25) คือ กลุ่ม A และ B (Table 18) ในกลุ่มสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการ โรครุนแรง (aggressive strains) และไม่รุนแรง (non-aggressive strains) โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 130 แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 17.9% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 44.7% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 5.8% กลุ่ม B ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 60 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 5.8% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 14.7% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 11.1% (จากผลข้อมูลระดับความรุนแรงในข้อที่ 2.3) โดยความแตกต่างจะพบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มอาการ โรครุนแรงที่ขนาด 250 bp และ 700 bp



ภาพที่ 24 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC

Lane M = Marker

Lane 1 – 21 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

Lane 22 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 23 = *Xanthomonas campestris* pv. *vasicatoria*

Lane 24 = *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Lane 25 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Lane 26 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

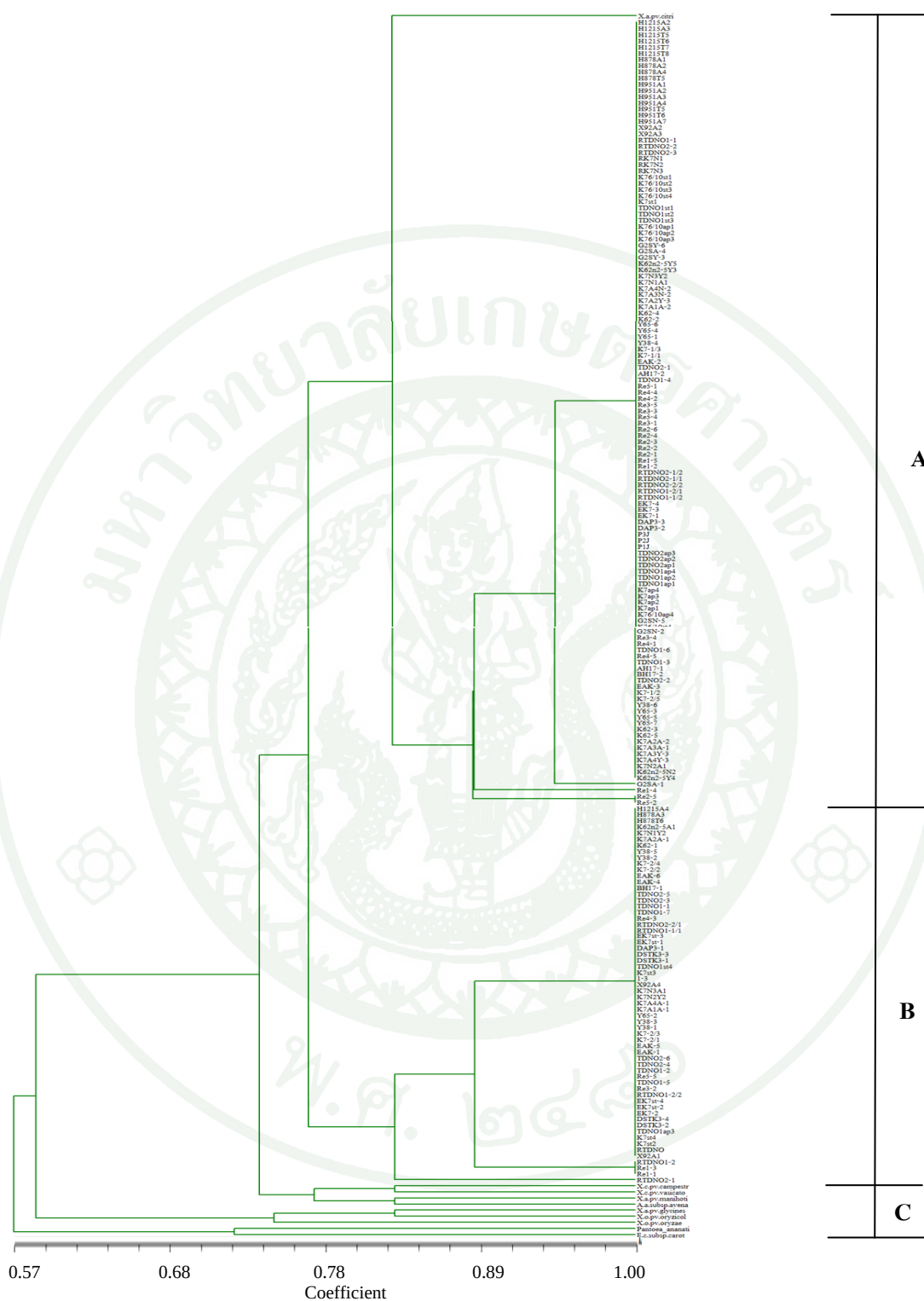
Lane 27 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane 28 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 29 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

Lane 30 = *Pantoea ananatis*

Lane 31 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*



ภาพที่ 25 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ERIC ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.1

Table 18 Grouping strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* obtained from the analysis of DNA fingerprinting with ERIC primers using NTSYSpc 2.1

Group ^{1/}	Isolate ^{2/}	Number
A	H1215A1, H1215A2, H1215A3, H1215T5, H1215T6, H1215T7, H1215T8, H878A1, H878A2, H878A4, H878T5, H951A1, H951A2, H951A3, H951A4, H951T5, H951T6, H951A7, X92A2, X92A3, RTDNO 1-1, RTDNO 1-2, RTDNO 2-1, RTDNO 2-2, RTDNO 2-3, RK7N1, RK7N2, RK7N3, K76/10st1, K76/10st2, K76/10st3, K76/10st4, K7st1, TDNO1st1, TDNO1st2, TDNO1st3, K76/10ap1, K76/10 ap2, K76/10 ap3, K76/10 a4, K7 ap1, K7 ap2, K7 ap3, K7 ap4, TDNO1 ap1, TDNO1 ap2, TDNO1 ap3, TDNO1 ap4, TDNO2 ap1, TDNO2 ap2, P1J, P2J, P3J, DAP3-2, DAP3-3, EK7-2, EK7-3, EK7-4, RTDNO1-1/2, RTDNO1-2/1, RTDNO2-1/1, RTDNO2-1/2, RTDNO2-2/2, Re1-2, Re1-4, Re1-5, Re2-1, Re2-2, Re2-3, Re2-4, Re2-5, Re2-6, Re3-1, Re3-3, Re3-4, Re3-5, Re4-1, Re4-2, Re4-4, Re4-5, Re5-1, Re5-2, Re5-4, TDNO1-3, TDNO1-4, TDNO1-6, TDNO2-1, TDNO2-2, AH17-1, AH17-2, BH17-2, EAK-2, EAK-3, K7-1/1, K7-1/2, K7-1/3, K7-2/5, Y38-4, Y38-6, Y65-1, Y65-3, Y65-4, Y65-5, Y65-6, Y65-7, K62-2, K62-3, K62-4, K62-5, K7A1A-2, K7A2A-2, K7A2Y-3, K7A3A-1, K7A3N-2, K7A3Y-3, K7A4N-2, K7A4Y-3, K7N1A1, K7N2A1, K7N3Y2, K62n2-5N2, K62n2-5Y3, K62n2-5Y4, K62n2-5Y5, G2SA-1, G2SN-2, G2SY-3, G2SA-4, G2SN-5, G2SY-6	129
B	H1215A4, H878A3, H878T6, X92A1, X92A4, RTDNO 1-3, K7st2, K7st3, K7st4, TDNO1st4, TDNO2 ap3, DSTK3-1, DSTK3-3, DSTK3-4, DAP3-1, EK7-1, EK7st-1, EK7st-2, EK7st-3, EK7st-4, RTDNO1-1/1, RTDNO1-2/2, RTDNO2-2/1, Re1-1, Re1-3, Re3-2, Re4-3, Re5-3, Re5-5, TDNO1-1, TDNO1-2, TDNO1-5, TDNO1-7, TDNO2-3, TDNO2-4, TDNO2-5, TDNO2-6, BH17-1, EAK-1, EAK-4, EAK-5, EAK-6, K7-2/1, K7-2/2, K7-2/3, K7-2/4, Y38-1, Y38-2, Y38-3, Y38-5, Y65-2, K62-1, K7A1A-1, K7A2A-1, K7A4A-1, K7N1Y2, K7N2Y2, K7N3A1, K62n2-5A1	61
C	Xac, Xag, Xcv, Xcm, Xcc, Xoo, Xoc, Ecc, Aaa, Paa	10

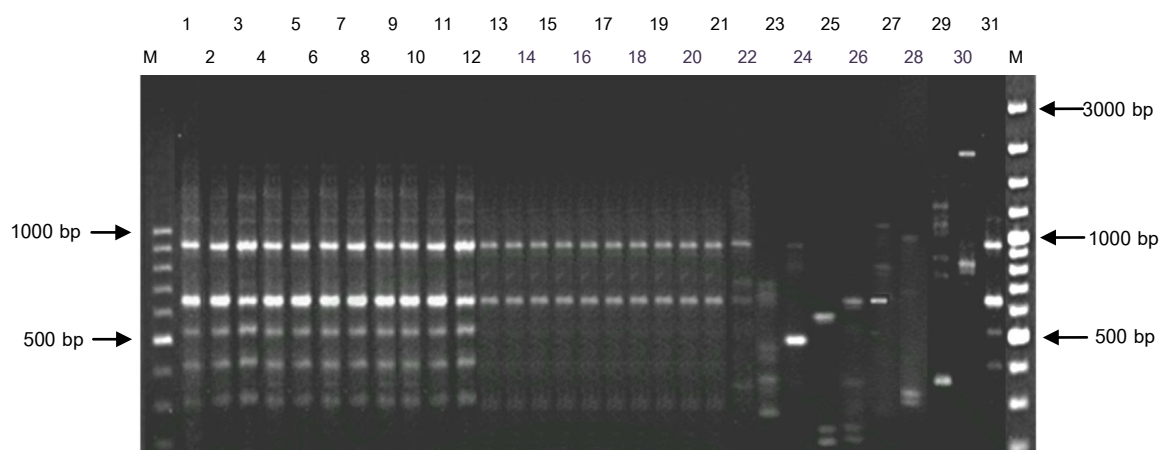
^{1/}Group A= virulence strains, Group B = avirulence strains, and Group C= compared strains.

^{2/}Lists of strains detailed in Table 10.

5.3 การวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ BOX

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BOX (ภาพที่ 26) พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อโดยแสดงลักษณะของแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์มีจำนวน 19 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอพบมีขนาดตั้งแต่ 200-2000 bp สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* มีตำแหน่งดีเอ็นเอขนาด 950 bp และ 650 bp นำข้อมูลดีเอ็นเอ ที่ได้ทั้งหมดมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.1 เพื่อสร้าง dendrogram จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ทั้ง 190 สายพันธุ์ ได้ 2 กลุ่มชัดเจนมีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.84 (ภาพที่ 27) คือ กลุ่ม A และ B (Table 19) ในกลุ่มสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการ โรครุนแรง (aggressive strains) และไม่รุนแรง (non-aggressive strains) โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 129 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 16.9% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 45.8% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 5.2% กลุ่ม B ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 61 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก 5.8% สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง 13.7% และสายพันธุ์ไม่รุนแรง 12.6% (จากผลข้อมูลระดับความรุนแรงในข้อที่ 2.3) โดยความแตกต่างจะพบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มอาการ โรครุนแรงที่ขนาด 300 bp, 400 bp และ 500 bp

จากผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ของไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ผลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม นำมาเปรียบเทียบกับแหล่งพื้นที่เก็บ ช่วงฤดู วันเวลา ที่เก็บตัวอย่างโรค อายุ และสายพันธุ์ของยูคาลิปตัส ไม่บ่งบอกความแตกต่างในรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แต่มีความสัมพันธ์ในระดับความของ ความรุนแรงโรค แบ่งออกได้เป็นสายพันธุ์มีความรุนแรง และสายพันธุ์ไม่รุนแรง ในการก่อโรค ซึ่งประชากรเชื้อส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มที่เป็นสายพันธุ์รุนแรง แสดงว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่แตกต่างของแหล่งบริเวณที่อาศัย ฤดูที่มีการระบาด อายุของพืช และสายพันธุ์ของยูคาลิปตัส (species) ส่วนความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับเชื้อ Xanthomonads สายพันธุ์อื่นๆ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์นี้ สามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค บอกความแตกต่างในระดับ pathovar และจัดกลุ่มความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อได้



ภาพที่ 26 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX

Lane M = Marker

Lane 1 – 21 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

Lane 22 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Lane 23 = *Xanthomonas campestris* pv. *vasicatoria*

Lane 24 = *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Lane 25 = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Lane 26 = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

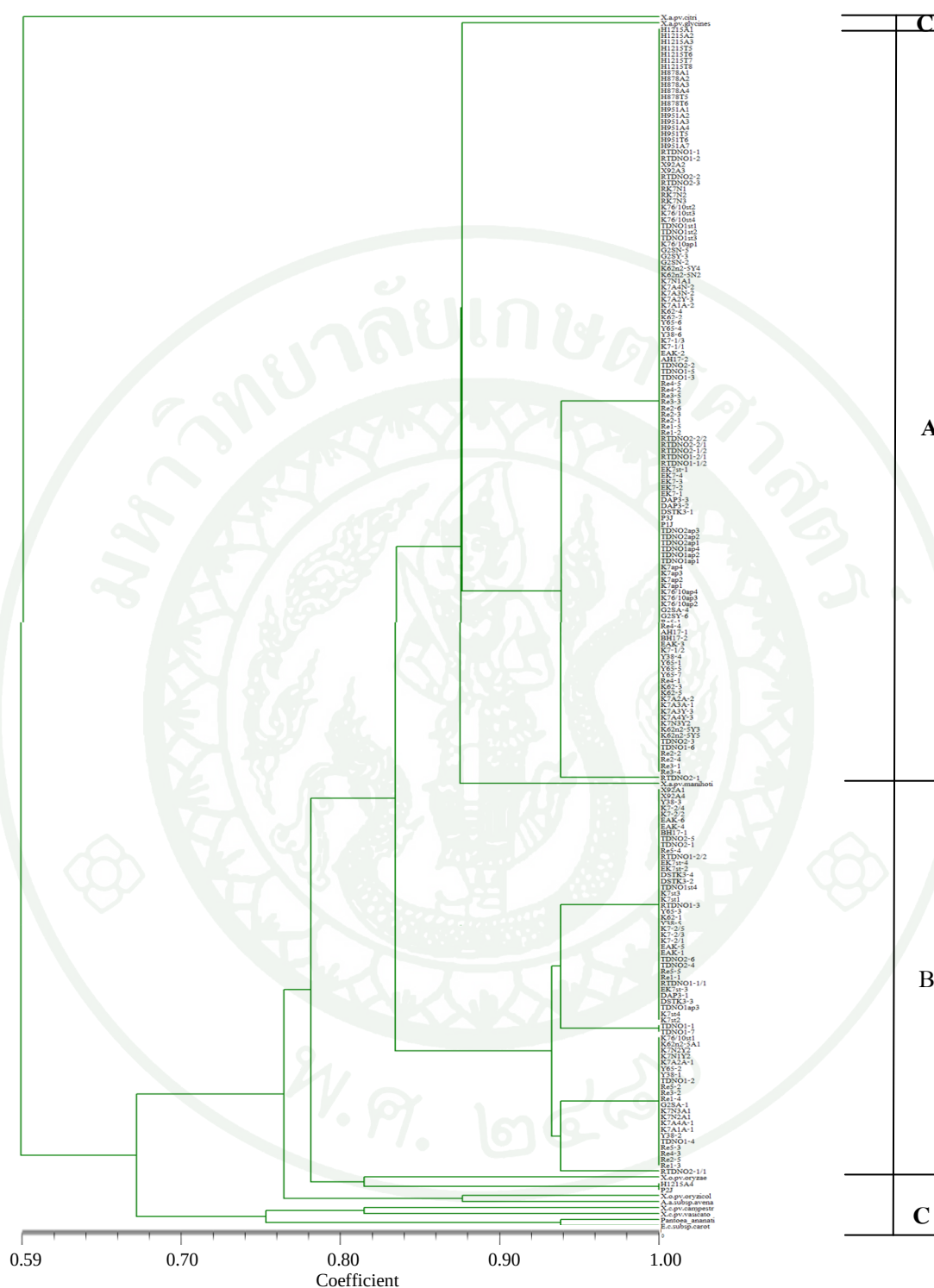
Lane 27 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Lane 28 = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lane 29 = *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

Lane 30 = *Pantoea ananatis*

Lane 31 = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*



ภาพที่ 27 Dendrogram จากการวิเคราะห์หลายพหุคูณของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* จำนวน 190 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม BOX วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc.2.1

Table 19 Grouping strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* obtained from the analysis of DNA fingerprinting with BOX primers using NTSYSpc 2.1

Group ^{1/}	Isolate ^{2/}	Number
A	H1215A1, H1215A2, H1215A3, H1215T5, H1215T6, H1215T7, H1215T8, H878A1, H878A2, H878A3, H878A4, H878T5, H878T6, H951A1, H951A2, H951A3, H951A4, H951T5, H951T6, H951A7, X92A2, X92A3, RTDNO 1-1, RTDNO 1-2, RTDNO 2-1, RTDNO 2-2, RTDNO 2-3, RK7N1, RK7N2, RK7N3, K76/10st1, K76/10st2, K76/10st3, K76/10st4, TDNO1st1, TDNO1st2, TDNO1st3, K76/10ap1, K76/10 ap2, K76/10 ap3, K76/10 a4, K7 ap1, K7 ap2, K7 ap3, K7 ap4, TDNO1 ap1, TDNO1 ap2, TDNO1 ap4, TDNO2 ap1, TDNO2 ap2, TDNO2 ap3, P1J, P2J, P3J, DSTK3-1, DAP3-2, DAP3-3, EK7-1, EK7-2, EK7-3, EK7-4, EK7st-1, RTDNO1-1/2, RTDNO1-2/1, RTDNO2-1/1, RTDNO2-1/2, RTDNO2-2/1, RTDNO2-2/2, Re1-2, Re1-5, Re2-1, Re2-2, Re2-3, Re2-4, Re2-6, Re3-1, Re3-3, Re3-4, Re3-5, Re4-1, Re4-2, Re4-4, Re4-5, Re5-1, TDNO1-3, TDNO1-4, TDNO1-5, TDNO1-6, TDNO2-2, TDNO2-3, AH17-1, AH17-2, BH17-2, EAK-2, EAK-3, K7-1/1, K7-1/2, K7-1/3, Y38-4, Y38-6, Y65-1, Y65-3, Y65-4, Y65-5, Y65-6, Y65-7, K62-2, K62-3, K62-4, K62-5, K7A1A-2, K7A2A-2, K7A2Y-3, K7A3A-1, K7A3N-2, K7A3Y-3, K7A4N-2, K7A4Y-3, K7N1A1, K7N3Y2, K62n2-5N2, 62n2-5Y3, K62n2-5Y4, K62n2-5Y5, G2SN-2, G2SY-3, G2SA-4, G2SN-5, G2SY-6	126
B	H1215A4, X92A1, X92A4, RTDNO 1-3, K7st1, K7st2, K7st3, K7st4, TDNO1st4, TDNO1 ap3, DSTK3-2, DSTK3-3, DSTK3-4, DAP3-1, EK7st-2, EK7st-3, EK7st-4, RTDNO1-1/1, RTDNO1-2/2, Re1-1, Re1-3, Re1-4, Re2-5, Re3-2, Re4-3, Re5-2, Re5-3, Re5-4, Re5-5, TDNO1-1, TDNO1-2, TDNO1-7, TDNO2-1, TDNO2-4, TDNO2-5, TDNO2-6, BH17-1, EAK-1, EAK-4, EAK-5, EAK-6, K7-2/1, K7-2/2, K7-2/3, K7-2/4, K7-2/5, Y38-1, Y38-2, Y38-3, Y38-5, Y65-2, K62-1, K7A1A-1, K7A2A-1, K7A4A-1, K7N1Y2, K7N2A1, K7N2Y2, K7N3A1, K62n2-5A1, G2SA-1	64
C	Xac, Xag, Xcv, Xcm, Xcc, Xoo, Xoc, Ecc, Aaa, Paa	10

^{1/}Group A= virulence strains, Group B = avirulence strains, and Group C= compared strains.

^{2/}Lists of strains detailed in Table 10.

6. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติควบคุมโรคใบจุดเหี่ยว

6.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

6.1.1 การทดสอบเชื้อด้วยวิธี dual culture

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture โดยทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากทุกกลุ่ม เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยว จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมด 386 ไอโซเลต แบ่งเป็น 36 กลุ่ม ตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน และคัดเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 30% ของทุกกลุ่มมาทำการทดสอบ ผลทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 กลุ่ม คือ T5, T6, T14, G7, G15 และ G16 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวของยูคาลิปตัสได้ในระดับดี และจำนวน 4 กลุ่ม คือ T9, T11, T20 และ G6 มีการยับยั้งในระดับปานกลางโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพ 4 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. fluorescens* SP007s, *P. pabuli* SW01/4 และ *S. marcescens* SPt360 พบว่าเชื้อ KPS46 และ SP007s มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ในระดับปานกลาง (Table 20) จึงคัดเลือกไอโซเลตที่ดีที่สุดของแต่ละกลุ่มที่มีความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์เพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

Table 20 Efficacy of antagonistic bacteria on growth inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* tested by dual culture method under laboratory conditions

Level of inhibition ^{3/}			
Group ^{1/}	<i>X. a. pv. eucalypti</i>	Group ^{2/}	<i>X. a. pv. eucalypti</i>
T1	-	G1	-
T2	-	G2	+
T3	-	G3	+
T4	-	G4	+
T5	+++	G5	-
T6	+++	G6	++
T7	+	G7	+++
T8	+	G8	+
T9	++	G9	-
T10	+	G10	-
T11	++	G11	-
T12	+	G12	+
T13	-	G13	-
T14	+++	G14	+
T15	-	G15	+++
T16	+	G16	+++
T17	+	KPS46	++
T18	+	SP007s	++
T19	+	SW01/4	+
T20	++	SPt360	+

^{1/} Group T= antagonistic bacteria isolated from the leaves and roots of eucalyptus.

^{2/} Group G = antagonistic bacteria isolated from water, soil, and rhizosphere of eucalyptus compared with strains *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Pseudomonas fluorescens* SP007s, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, and *Serratia marcescens* SPt360.

^{3/} - = No inhibition, + = slightly inhibition, ++ = moderate inhibition, +++ = clearly inhibition.

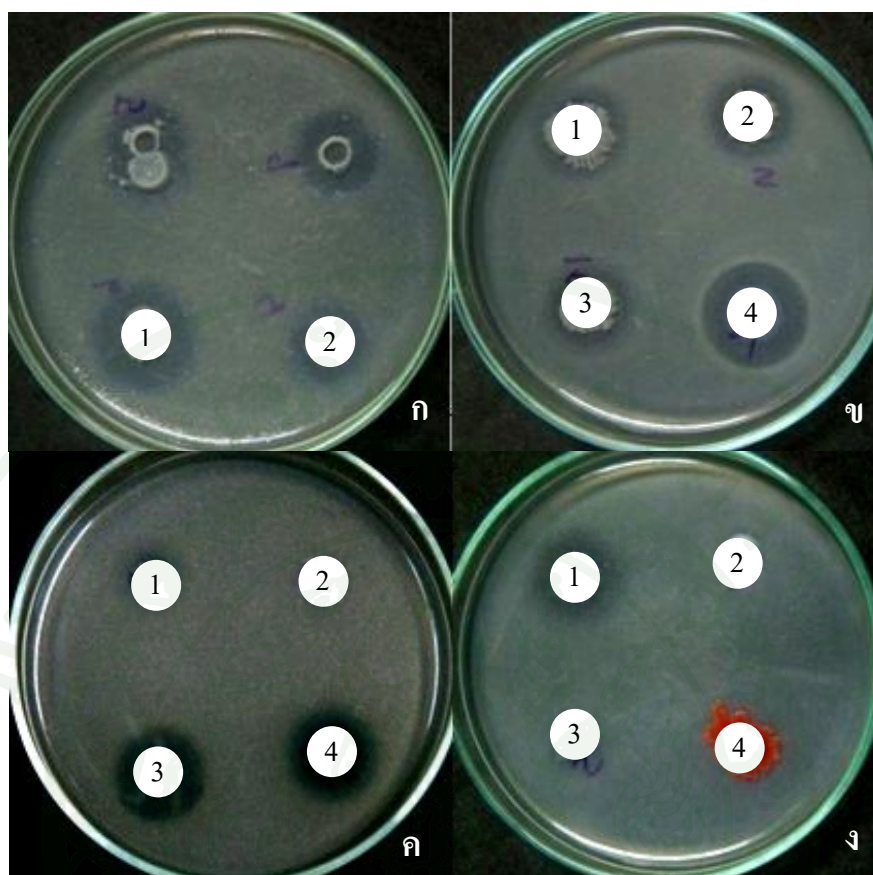
6.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จาก 36 กลุ่ม คัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ จำนวน 10 กลุ่ม จากข้อ 6.1.1 เลือกตัวแทนที่ดีที่สุดจากทุกกลุ่มได้ 10 ไอโซเลต มาทำการทดสอบ ประสิทธิภาพ การยับยั้งด้วยวิธี agar diffusion และ paper disc diffusion (ภาพที่ 28 และ ภาพที่ 29) เช็ผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งด้วยวิธี agar diffusion ตรวจสอบบริเวณยับยั้ง (clear inhibition zone) ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่มีการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต T20, T5, G15 และ G16 มีบริเวณยับยั้งได้ดีเท่ากับ 8.0, 7.0, 6.5 และ 6.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต G15, T5, T20 และ G16 มีบริเวณยับยั้งได้ดีเท่ากับ 6.0, 5.0, 5.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่พบว่าการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ทั้ง 2 วิธีการทดสอบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ได้ดีมาก วิธี agar diffusion และวิธี paper disc diffusion มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 8.0 และ 7.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้เล็กน้อย ผล การทดสอบด้วยวิธี agar diffusion และวิธี paper disc diffusion มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 3.0 และ 4.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 21) เห็นได้ว่าเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคจะมีการแข่งขันระหว่าง กัน จึงได้คัดเลือกเชื้อที่มีการยับยั้งที่ดีเพื่อทำการทดสอบการควบคุมโรคบนต้นพืชเพื่อ ดู ประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัสของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ใน ระดับเรือนทดลองต่อไป

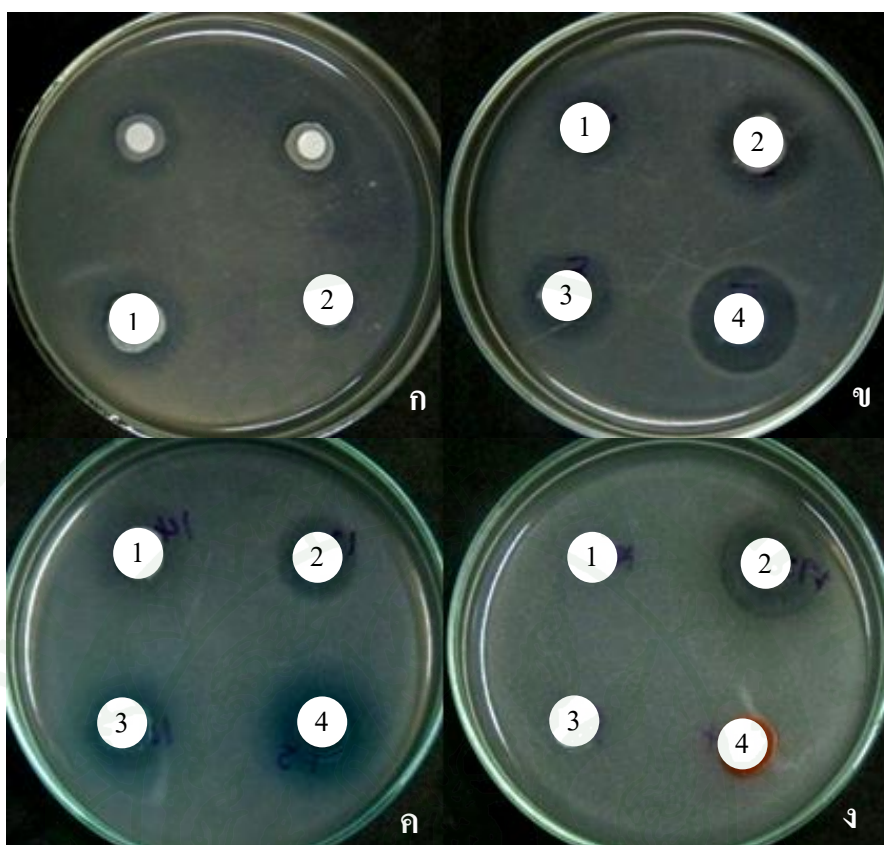
Table 21 Efficacy of antagonistic bacteria on growth inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* tested by agar diffusion and paper disc diffusion methods^{1/}

Bacterial isolate	Inhibition zone (mm)	
	Agar diffusion	Paper disc diffusion
T5	7.0a	5.0b
T6	1.0e	2.0d
T9	1.5d	2.0d
T11	1.5d	1.0d
T14	4.5c	5.0b
T20	8.0a	5.0b
G6	5.0bc	2.0d
G7	5.0bc	1.5d
G15	6.5ab	6.0b
G16	6.5ab	5.0b
SP007S	8.0a	7.5a
KPS46	3.0d	3.5c
SW01/4	1.0e	2.0d
SPt360	1.0e	2.0d

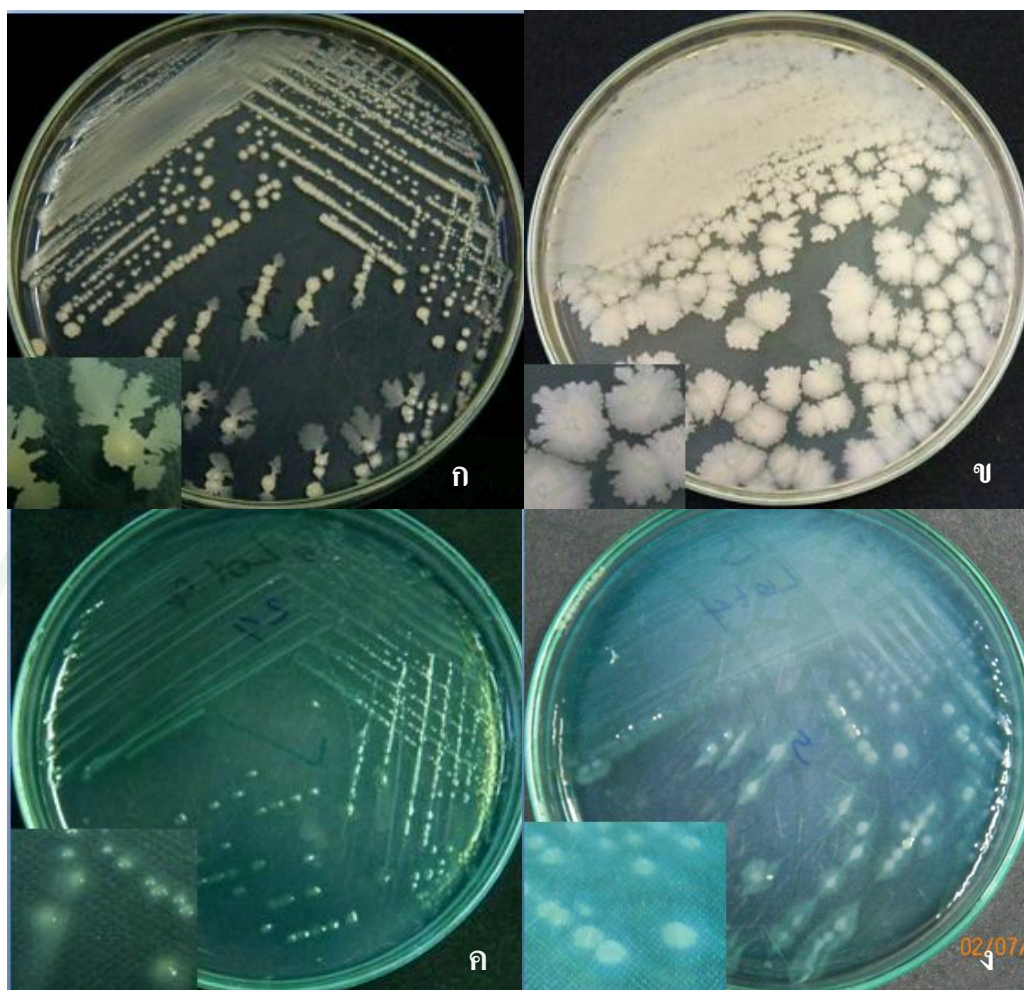
^{1/} Means in the column followed by the same letters are not significantly different by Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)



ภาพที่ 28 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 (ก1), T6 (ก2), T9 (ข1), T11 (ข 2), T14 (ข3), T20 (ข4), G6 (ค1), G7 (ค2), G15 (ค3), G16 (ค4), SP007s (ง1), SW01/4 (ง2), KPS46 (ง3) และ SP1360 (ง4) ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยวิธี agar diffusion หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 29 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 (ก1), T6 (ก2), T9 (ข1), T11 (ข 2), T14 (ข3), T20 (ข4), G6 (ค1), G7 (ค2), G15 (ค3), G16 (ค4), SW01/4 (ง1), SP007s (ง2), KPS46 (ง3) และ SPt360 (ง4) ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยวิธี paper disc diffusion หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 30 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ T5 (ก), T20 (ข), G15 (ค), G16 (ง) ที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

6.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในสภาพโรงเรือน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะตามวิธีการในข้อ 6.1 สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัส จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ T5, T20, G15 และ G16 (ภาพที่ 30) จึงนำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในสภาพโรงเรือน เปรียบเทียบกับแบคทีเรียคุณภาพ 2 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s และสารเคมี 2 ชนิด คือ สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และสเตรปโตมัยซินซัลเฟต พบว่ากรรมวิธีการควบคุมโรคด้วยเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน และระยะเวลาการใช้ มีผลต่อการควบคุมโรคที่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่ 14 การควบคุมโดยการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถควบคุมโรคได้ 95% โดยมีอัตราการเกิดโรคได้ดีเท่ากับ 16% ช่วงวันที่ 10 - 25 วัน และมีระดับความรุนแรงของโรคที่ปรากฏต่ำสุดเท่ากับ 5% ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมโรคที่มีอัตราการเกิดโรค 100% และมีระดับความรุนแรงของโรค 87.5% (Table 22 และ Table 23) รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อปฏิชีวนะ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน สามารถควบคุมโรคได้ 83.3% โดยมีอัตราการเกิดโรค เท่ากับ 50% ช่วงวันที่ 10 - 25 และมีระดับความรุนแรงของโรคที่ปรากฏเท่ากับ 16.7% ทั้งนี้กรรมวิธีการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 พบว่าให้ผลดีกว่าการควบคุมจากสารเคมีในทุกกรรมวิธี โดยสารเคมีที่ดีที่สุด คือ กรรมวิธีที่ 28 พ่นสเตรปโตมัยซินซัลเฟต หลังปลูกเชื้อ 1, 7 วัน ซึ่งมีระดับการเกิดโรค 67% และระดับความรุนแรงของโรค 21.7% ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ T5 ที่แยกได้จากยูคาลิปตัส มีประสิทธิภาพสูงและมีแนวโน้มในการนำไปพัฒนาปรับใช้ในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมในระดับแปลงผลิดกล้าต่อไปได้

ทั้งนี้จากการทดลองพบว่าการประเมินการเกิดโรค (disease incidence) เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีผลต่อช่วงการเข้าทำลายเชื้อโรคทั้ง 29 กรรมวิธี (Table 22) โดยเลือก 4 อันดับที่มีการควบคุมโรคที่ดี โดยผลการประเมินอัตราการเกิดโรคทุกๆ 5 วัน พบว่าในช่วงวันที่ 5 ยังไม่แสดงอาการโรค ช่วงวันที่ 10 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 2 และ 15 ควบคุมได้ดี อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 17 และ 18 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 15 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 13, 14 และ 24 ซึ่งการพ่นเชื้อ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน และ เชื้อปฏิชีวนะ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 1 วัน และ หลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลควบคุมได้ดีที่สุด

วันที่ 15 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 18 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 7 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 2, 5, 13, 26, และ 28 แสดงว่า การพ่นปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลควบคุมดีที่สุด รองลงมาคือ การพ่นเชื้อปฏิปักษ์ G16 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 20 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 และ 25 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 13, 28 และ 5 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 16 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน และการพ่นสารเคมี copper hydroxide หลังปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 25 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 25 และ 28 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 5 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 30 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 28 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 16 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ; พ่นสารเคมี Streptomycin หลังปลูกเชื้อ 1, 7 วัน ; พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 หลังปลูกเชื้อ 1 และ 7 วัน

การประเมินระดับความรุนแรง (disease severity) (Table 23) วันที่ 10 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 2, 15, 17, และ 18 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 22, 7, 13, 14 และ 16 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 25 และ 26 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 8 และ 10 ซึ่งวิธีการที่ดีในการควบคุมโรคระยะ 10 วันแรก คือ พ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน พ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 1, 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ; พ่นเชื้อปฏิปักษ์ G16 ก่อนปลูกเชื้อ 1 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ; พ่นเชื้อปฏิปักษ์ G16 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 15 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 18 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 25 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 16 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 2 และ 14 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ G16 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นสารเคมี copper hydroxide หลังปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 20 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 และ 25 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 10 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 16 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน กับ พ่นสารเคมี copper hydroxide หลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 25 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 10 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 16 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน

วันที่ 30 อันดับ 1 กรรมวิธีที่ 14 อันดับ 2 กรรมวิธีที่ 2 อันดับ 3 กรรมวิธีที่ 10 อันดับ 4 กรรมวิธีที่ 22 แสดงว่าพ่นเชื้อปฏิปักษ์ T5 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือพ่นเชื้อปฏิปักษ์ KPS46 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน; พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ G15 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน; พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T20 ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วันตามลำดับ

Table 22 Effectiveness of antagonistic bacterial strains to reduce disease incidence of angular leaf spot on eucalyptus under greenhouse experiments

Treatment ^{1/}	Disease incidence (%) ^{2/}					
	Evaluation time (day after inoculation) ^{3/}					
	5	10	15	20	25	30
1	5	92o	100j	100h	100i	100f
2	0	0a	50d	50b	50b	67b
3	0	67k	100j	100h	100i	100f
4	0	67k	100j	100h	100i	100f
5	5	50i	50d	58c	66de	100f
6	0	58j	75g	92g	100i	100f
7	0	25f	42c	92g	100i	100f
8	0	92o	100j	100h	100i	100f
9	0	42h	83h	92g	92h	83d
10	0	42h	83h	83f	100i	100f
11	0	15c	83h	92g	100i	100f
12	0	75l	100j	100h	100i	100f
13	0	16d	50d	58c	75f	92e
14	0	16d	16a	16a	16a	42a
15	0	0a	67f	83f	83g	92e
16	0	33g	58e	67d	67e	83d
17	0	8b	83h	100h	100i	100f
18	0	8b	33b	100h	100i	100f
19	0	75l	100j	100h	100i	100f
20	0	91n	91i	100h	100i	100f
21	0	58j	67f	100h	100i	100f
22	0	42h	83h	92g	100i	100f
23	0	83m	100j	100h	100i	100f
24	0	16d	100j	100h	100i	100f
25	0	50i	67f	50b	58c	100f
26	0	42h	50d	75e	75f	100f

Table 22 Continued

Treatment ^{1/}	Disease incidence (%) ^{2/}					
	Evaluation time (day after inoculation) ^{3/}					
	5	10	15	20	25	30
27	0	91n	91i	100h	100i	100
28	0	17e	50d	58c	58c	67c
29	10	100p	100j	100h	100i	100f

^{1/} Details of treatment are described in 6.2.2.

^{2/} Disease incidence = (100 x number of infected plants) / number of tested plants.

^{3/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05).

Table 23 Effectiveness of antagonistic bacterial strains to reduce disease severity of angular leaf spot on eucalyptus under greenhouse experiments

Treatment ^{1/}	Disease severity (%) ^{2/}					
	Evaluation time (day after inoculation) ^{3/}					
	5	10	15	20	25	30
1	0	30.0l	67.5v	79.2u	79.2v	83.3x
2	0	0a	8.3d	8.3b	8.3b	16.7b
3	0	16.7j	58.3u	53.3r	64.2r	59.2u
4	0	12.5h	20.0j	32.5o	32.5o	41.7r
5	0	5.0e	25.0n	30.8n	30.8n	40.8q
6	0	6.7f	15.0h	30.8n	36.7n	25.8h
7	0	1.7b	9.2e	25.8l	25.8l	41.7r
8	0	4.2d	25.8o	41.0q	41.7q	33.3k
9	0	13.3i	20.8k	41.0q	41.7q	34.2l
10	0	4.2d	27.5p	12.5c	14.2c	17.5c
11	0	0a	18.3i	53.3r	53.3r	59.2u
12	0	6.7f	22.5l	22.5i	22.5i	35.8m
13	0	1.7b	13.3g	20.8g	25.0g	32.5j
14	0	1.7b	8.3d	8.3a	8.0a	5.0a
15	0	0a	18.3i	26.7m	26.7m	40.0p
16	0	1.7b	7.5c	13.3d	13.3d	22.5f
17	0	0a	11.7f	25.0k	25.0k	36.7n
18	0	0a	1.7a	15.0e	15.0e	25.0g
19	0	21.7k	40.8s	59.2s	59.2t	61.7v
20	0	8.3g	30.8r	54.2s	54.2s	51.7t
21	0	8.3g	23.3m	41.0q	41.7q	38.3o
22	0	0a	11.7f	21.7h	20.8h	20.8d
23	0	13.3i	30.0q	39.2p	39.2p	45.8s
24	0	1.7b	48.3t	66.7t	66.7u	64.2w
25	0	3.3c	6.7b	8.3a	15.0e	33.3k
26	0	3.3c	20.8k	23.3j	23.3j	31.7i

Table 23 Continued

Treatment ^{1/}	Disease severity (%) ^{2/}					
	Evaluation time (day after inoculation) ^{3/}					
	5	10	15	20	25	30
27	0	13.3i	9.2e	20.8f	20.8f	34.2l
28	0	8.3g	18.3i	22.5i	22.5i	21.7e
29	20	40.8m	75.0w	83.0v	84.0w	87.5y

^{1/} Details of treatment are described in 6.2.2.

^{2/} Disease severity angular leaf spot was separated into 5 levels: level 0 = no symptoms (0% disease severity), level 1 = 1-25%, Level 2 = 26-50%, Level 3 = 51-75%, and Level 4 = 76-100% disease severity.

^{3/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05).

จากข้อมูลทั้ง 6 ครั้ง ระยะเวลา 30 วัน ผลการประเมินการเกิดโรค และระดับความรุนแรงของโรค ทั้ง 29 กรรมวิธี (Table 22 และ Table 23) พบว่าวิธีที่ให้ผลในการควบคุมความรุนแรงของโรคได้ดีคือ วิธีการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อ 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน มีช่วงระยะเวลาห่างในการพ่น 14 วัน ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกับเชื้อ KPS46, T5, T20, G15 และ G16 วิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อ 1, 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 วัน มีช่วงระยะเวลาห่างในการพ่นทุก 7 วัน ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกับ เชื้อ SP007s และ G15 ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ในกลุ่มนี้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ดีช่วง 7 วันหลังจากพ่นเชื้อ ซึ่งถ้าไม่ได้พ่นอย่างต่อเนื่องโรคจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรุนแรงและรวดเร็ว เมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp. ระดับของโรคจะค่อนข้างคงที่จนระยะเวลาถึง 14 วัน โดยระดับของ โรคจะเพิ่มขึ้น ซึ่งระยะเวลาความถี่ในการพ่นเชื้อมีผลต่อปริมาณของเชื้อที่มีอยู่ จึงควรมีการฉีดพ่นอย่างต่อเนื่อง ในการควบคุมที่ดีจึงควรใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 สามารถควบคุมการเกิดโรค และความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุดโดยวิธีการที่ใช้ คือพ่นเชื้อปฏิปักษ์อย่างต่อเนื่องทุก 7 วัน

6.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในสภาพแปลง

ในระบบผลิตกล้าไม้ยูคาลิปตัสเป็นระบบการผลิตที่มีขนาดใหญ่ควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ยากมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการก่อให้เกิดโรค จากผลการทดสอบและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระดับโรงเรือนทดลองเพื่อนำไปใช้ในแหล่งปลูกจริงจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในสภาพโรงเรือน ตามวิธีการในข้อ 6.2 สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T5 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัสสาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมของในสภาพแปลงผลิตกล้า เปรียบเทียบกับแบคทีเรียคุณภาพ 2 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เปรียบเทียบการใช้เชื้อเดี่ยว และวิธีการใช้แบบสลับกับสารเคมี 2 ชนิด คือ สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ซึ่งผลที่ได้เมื่อเทียบกับผลการควบคุมในโรงเรือนทดลองที่ผ่านมาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KPS46 และ T5 ให้การควบคุมได้ดีที่สุด ดีกว่าการใช้สารเคมี แต่เมื่อมาทดลองกับสภาพของระบบการผลิตที่มีปัจจัยต่างๆ เอื้ออำนวยต่อเชื้อโรค การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s ให้การควบคุมการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด (Table 24)

ผลในโรงเรียนประเมินจำนวนต้นที่เกิดโรค วิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือกรรมวิธีที่ 4 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 8 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 สลับกับ สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 9 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 สลับกับสารเคมี สเตรปโตมัยซินซัลเฟต ให้ผลควบคุมการเกิดโรคได้ 97.23, 96.34 และ 96.35% ตามลำดับ ที่อายุพืช 20 วัน ได้ดีเท่าเทียมกัน

การประเมินความรุนแรงของโรควิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ กรรมวิธีที่ 4 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 9 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 สลับกับ สารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต และกรรมวิธีที่ 6 ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s สลับกับ สารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ควบคุมความรุนแรงโรคได้ 99.7, 99.5 และ 99.1% ตามลำดับ ซึ่งผล เห็นได้ว่ากรรมวิธีที่ฟันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s สามารถลดการเกิดโรคและระดับความรุนแรง ของโรคได้ดี จึงควรใช้เชื้อ SP007s มาใช้ในการควบคุมโรคในโรงเรียน

Table 24 Efficacy of antagonistic bacterial strains to reduce disease incidence and severity of angular leaf spot on 20-day-old eucalyptus seedlings under greenhouse conditions

Treatment ^{1/}	Total number	No. of diseases	Disease incidence (%) ^{2/}	Disease severity (%) ^{3/}
plant				
1	959	61	6.36i	3.3f
2	960	64	6.67j	10.0k
3	985	37	3.76c	3.8g
4	1011	28	2.77a	0.3a
5	948	36	3.80cd	7.5i
6	876	43	4.91g	0.9c
7	985	45	4.57e	2.5e
8	1066	39	3.66b	6.7h
9	958	35	3.65b	0.5b
10	968	48	4.96g	9.2j
11	943	52	5.51h	2.5e
12	984	49	4.98g	10.8l
13	964	46	4.77f	2.5e
14	1074	47	4.38d	2.5e

^{1/} Details of treatment are described in 6.3.3.

^{2/} Disease incidence = (100 x number of infected plants) / number of tested plants.

^{3/} Disease severity angular leaf spot was separated into 5 levels: level 0 = no symptoms (0% disease severity), level 1 = 1-25%, Level 2 = 26-50%, Level 3 = 51-75%, and Level 4 = 76-100% disease severity.

ผลต่อเนื่องมาจากการควบคุมโรคในโรงเรียน ซึ่งได้ฉีดพ่นควบคุมโรคมาแล้วจำนวน 3 ครั้ง มาทำการศึกษาต่อบนลานวางกล้าเพื่อให้ได้กรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการควบคุมโรคกล้าไม้ ทำการประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดเหลี่ยมทุกคู่ใบ (Table 25) ในคู่ใบระดับที่ 1 จะไม่พบอาการของโรค จะเริ่มแสดงอาการในใบคู่ที่ 2 และรุนแรงมากขึ้นในใบคู่ถัดไป

ประเมินโดยใช้เกณฑ์ระดับคัดขาศึกษาในระดับความรุนแรงคู่ใบที่ 1- 3 ผลควบคุมกรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ การควบคุมโดยกรรมวิธีที่ 9 พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟตควบคุมได้ 97.88% และกรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ควบคุมได้ 97.81% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ KPS46 สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟตควบคุมได้ 97.58% ; กรรมวิธีที่ 10 พ่นสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ควบคุมได้ 97.08% และกรรมวิธีที่ 8 พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ควบคุมได้ 96.5% ตามลำดับ ซึ่งการควบคุมโดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทั้ง 3 ชนิด การใช้แบบเชื้อเดี่ยวยังควบคุมได้ไม่ดี เท่ากับการใช้สารเคมี แตกต่างจากผลในโรงเรียนการใช้เชื้อเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ให้ผลควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคบนลานวางกล้าเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดจะต้องมีการใช้สลับกับสารเคมี และชนิดของจุลินทรีย์ โดยสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ควรใช้สลับกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 หรือ KPS46 และสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ควรใช้สลับกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ SP007s ซึ่งควบคุมได้ในระดับใกล้เคียงกัน (Table 25) แต่วิธีการที่เหมาะสมที่สุดคือการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ T5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกมาจากต้นยูคาลิปตัสนำมาใช้สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟตให้การควบคุมโรคได้ดีที่สุด

Table 25 Efficacy of antagonistic bacterial strains to reduce disease severity of angular leaf spot on 45-day-old eucalyptus seedlings under outdoor nursery conditions

Treatment ^{1/}	Disease severity ^{2/}				Standard sale ^{3/}
	2 nd leaf from tip	3 rd leaf from tip	4 th leaf from tip		
1	1.00	13.00	30.15		7.00j
2	0.00	8.07	24.91		4.04e
3	0.00	4.83	26.39		2.42b
4	1.17	12.33	40.33		6.75i
5	0.00	4.37	21.90		2.19a
6	1.07	14.60	29.35		7.84k
7	0.17	8.27	30.70		4.22f
8	0.00	7.00	23.00		3.50d
9	0.00	4.23	22.17		2.12a
10	0.00	5.83	20.53		2.92c
11	0.50	12.33	24.20		6.42h
12	0.50	9.83	25.11		5.17g
13	1.17	15.67	34.73		8.42l
14	0.17	6.83	32.17		3.50d

^{1/} Details of treatment are described in 6.2.3.

^{2/} Disease severity angular leaf spot was separated into 5 levels: level 0 = no symptoms (0% disease severity), level 1= 1-25%, Level 2 = 26-50%, Level 3 = 51-75%, and Level 4 = 76-100% disease severity.

^{3/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05).

7. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

7.1 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

จากการทดลองควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในกล้ายูคาลิปตัสคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ทดสอบทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และแหล่งผลิตกล้า คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง มีโคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะแบนเรียบ ด้านค่อนข้างกลม ขอบหยักเล็กน้อย (ภาพที่ 30) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (bacilli) สร้างเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 31) เจริญแบบใช้และไม่ใช้การออกซิเจน (facultative anaerobes) สร้าง enzyme catalase ย่อยแป้งได้ สามารถใช้น้ำตาล sucrose, lactose และ manitol เป็นแหล่งคาร์บอน (Table 26) จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าเชื้อนี้อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp.

7.2 การจำแนกชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการจำแนกโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์บริเวณ 16S rDNA เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล (GenBank) โดยโปรแกรม BLAST จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) 99 เปอร์เซ็นต์ตรงกับเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. 3 ชนิด ได้แก่ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* (Table 27)

เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ทราบว่าเชื้อนี้ตรงกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* จึงนำทั้ง 3 เชื้อนี้มาใช้เปรียบเทียบเพื่อ ยืนยันชนิด โดยการทดสอบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ไม่สามารถเจริญในอาหาร NB ผสม 10% NaCl และเจริญที่อุณหภูมิ 55 °C ซึ่งผลที่ได้จะตรงข้ามกับเชื้ออื่นที่ทดสอบเทียบ (Table 26) เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้แยกความแตกต่าง ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ให้ผลการทดสอบตรงกับเชื้อ *B. licheniformis*

Table 26 Physiological and biochemical properties of new bacterial antagonistic strain T5

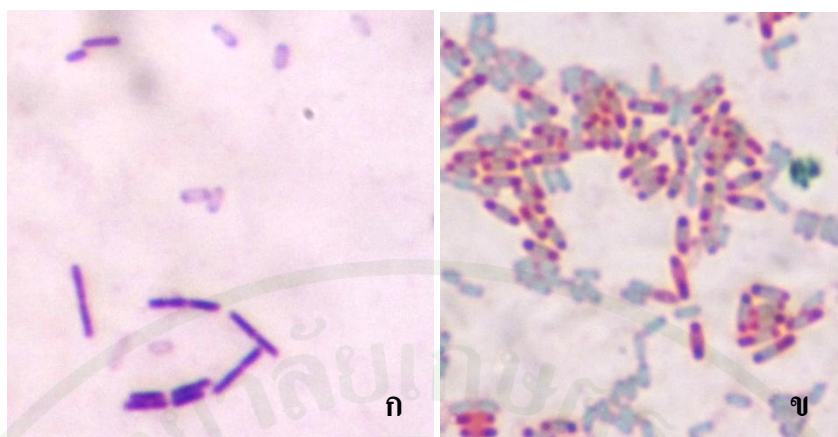
Tested properties	Reaction ^{1/}			
	Antagonist strain			
	T5 ^{2/}	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
1. Gram reaction	positive	positive	positive	positive
2. Cell morphology	bacilli	bacilli	bacilli	bacilli
3. Endospore production	+	+	+	+
4. Endospore morphology	central	central	central	central
5. Catalase production	+	+	+	+
6. Oxygen relationship	F	A	A	F
7. Starch hydrolysis	+	+	+	+
8. Motility test	+	+	+	+
9. NB+3% NaCl	+	+	+	+
10. NB+6.5% NaCl	+	+	+	+
11. NB+10% NaCl	-	+	+/-	-
12. Growth at 55°C	+	-	-	+
13. Carbon utilization				
13.1 Sucrose	+	+	+	+
13.2 Lactose	+	+	+	+
13.3 Mannitol	+	+	+	+

^{1/} + = positive reaction, - = negative reaction, A = aerobe and F = facultative.

^{2/} New antagonistic bacteria isolated from root eucalyptus.

Table 27 Nucleotide sequence analysis of new antagonistic bacterial strain T5 isolated from root eucalyptus compared to nucleotide data base in GenBank

Sequences tested	GenBank accession No.	Identity (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<u>JX491658.1</u>	99
<i>Bacillus subtilis</i>	<u>JX489606.1</u>	99
<i>Bacillus licheniformis</i>	<u>AY530960.1</u>	99
<i>Bacillus</i> sp.	<u>JX276739.1</u>	99

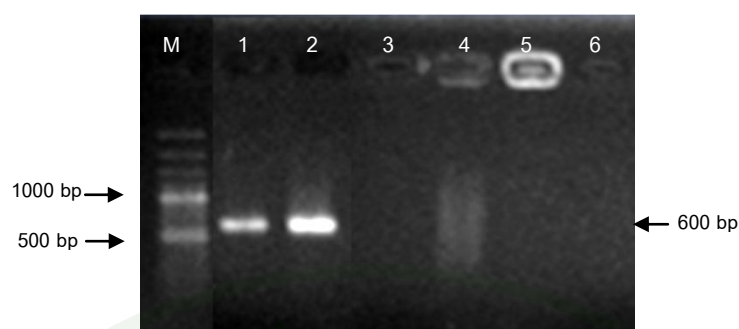


ภาพที่ 31 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ทดสอบด้วยวิธีการย้อมสีแกรม (ก) และการย้อม
สีเอนโดสปอร์ (ข) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

7.3 การใช้ไพรเมอร์จำเพาะเพื่อจำแนกชนิดเชื้อ *Bacillus* species

7.3.1 ไพรเมอร์จำเพาะกับ *Bacillus subtilis* group

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 ที่ผ่านการทดสอบวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ข้อที่ 7.2) ทำให้ทราบว่าเชื้อนี้ตรงกับเชื้อในกลุ่ม *Bacillus subtilis* group จึงนำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์เพื่อยืนยันผลจำแนกชนิดระดับ species ในกลุ่มนี้จากบริเวณยีน 16S rDNA ใช้ไพรเมอร์ Bsub5F (5' AAG TCG AGC GGA CAG ATG G 3') กับ Bsub3R (5' CCA GTT TCC AAT GAC CCT CCC C 3') พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 600 bp (Lane 2) ตรงกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* KPS46 (Lane 1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ได้มีการรายงานไว้ (Wattiau *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อ *P. pabuli* SW01/4, *P. fluorescens* SP007s และ *S. marcescens* SPt360 (Lane 3-5) จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 32) แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 นี้อยู่ในกลุ่ม *Bacillus subtilis* group ซึ่งตรงกับผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และผลทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถนำไพรเมอร์นี้มาใช้จำแนกกลุ่มเชื้อได้สะดวกและรวดเร็ว



ภาพที่ 32 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *Bacillus subtilis* group บริเวณยีน 16S rDNA

Lane M = Marker

Lane 1 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46

Lane 2 = แบคทีเรียสายพันธุ์ T5

Lane 3 = *Paenibacillus pabuli* SW01/4

Lane 4 = *Pseudomonas fluorescens* SP007s

Lane 5 = *Serratia marcescens* SPt360

Lane 6 = กรรณวิธีควบคุมน้ำกลั่น

7.3.2 ไพรมเมอร์จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. licheniformis*

ไพรมเมอร์นี้ใช้ตรวจสอบเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งออกแบบส่วนบริเวณยีน *adk* จากคู่ไพรมเมอร์ *adk1L* (5' GGT AAA GGG ACA CAG GCT GA 3') กับ *adk1R* (5' TCG AGT AAA GGC TGG GTT TG 3') ที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อ *B. licheniformis* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 518 bp (Madslien *et al.*, 2012) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 518 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ได้รายงานไว้ ส่วนเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *P. fluorescens* SP007s และ *S. marcescens* SPt360 (Lane 2 -5) จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 33)

ผลจากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 ด้วยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA และจำแนกด้วยไพรมเมอร์จำเพาะกับ *Bacillus subtilis* group บริเวณ 16S rDNA ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ T5 อยู่ในกลุ่ม *Bacillus subtilis* group ซึ่งตรงกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงยืนยันการเป็นเชื้อด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี แล้วยืนยันการเป็นเชื้อนี้ด้วยไพรมเมอร์จำเพาะของเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งให้ผลการทดสอบตรงกับเชื้อ *B. licheniformis*



ภาพที่ 33 ไพรมอร์จำเพาะบริเวณยีน *adk* ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่สามารถผลิตแถบ ดีเอ็นเอขนาด 518 bp

Lane M = Marker

Lane 1 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46

Lane 2 = แบคทีเรียสายพันธุ์ T5

Lane 3 = *Paenibacillus pabuli* SW01/4

Lane 4 = *Pseudomonas fluorescens* SP007s

Lane 5 = *Serratia marcescens* SPt360

Lane 6 = กรรมวิธีควบคุมน้ำกลั่น

วิจารณ์

การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดเหี่ยวของยูคาลิปตัส เพื่อทำการศึกษาสาเหตุของโรคหลัก ดำเนินการอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2552 ถึง 2555 เพื่อให้ได้ตัวแทนของโรคในทุกสภาพอากาศ ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่เก็บจะมีความแตกต่างของลักษณะอาการโรคที่พบ 3 กลุ่ม อาการคือแบบที่ 1 อาการเซลล์ตายมีลักษณะแผลเป็นจุดเหี่ยวจำกัดด้วยเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ ขนาดแผล 1-4 มิลลิเมตร แบบที่ 2 เซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุด กลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีเข้ม ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตรและบริเวณเส้นกลางใบดำ และแบบที่ 3 เซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุดไหม้ กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 4-7 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นถึงความน่าจะเป็นที่อาจมีความหลากหลายของเชื้อที่เข้าทำลายและ/หรือความจำเพาะในการเข้าทำลายพืชที่แตกต่างกันโดยมีรายงานว่าลักษณะอาการของโรคมีความสัมพันธ์กับกลไก (mechanism) และปัจจัยความรุนแรง (virulence factors) ของเชื้อแต่ละชนิด จึงมีแนวโน้มว่าอาการโรคที่แตกต่างกันน่าจะมีสาเหตุต่างกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดและความรุนแรงของโรคทั้ง 3 กลุ่มอาการจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลโดยพบอาการจุดเหี่ยวกระจายทั่วไปในทุกฤดูปลูก ส่วนอาการเส้นใบดำและจุดเหี่ยวขนานกับเส้นกลางใบจะพบระบาดรุนแรงในฤดูฝนและพบการเกิดโรคที่ใบสมบูรณ์ (ใบล่าง) และพัฒนาสู่ใบคู่กลางและคู่บนตามลำดับ แสดงว่าช่วงฤดูฝนมีความชื้นสูงอุณหภูมิค่อนข้างเย็นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อโรคที่พบดังกล่าว ที่ช่วยให้เกิดการแพร่กระจายของโรคได้ดี และเมื่อนำอาการโรคดังกล่าวมาทำการแยกเชื้อและพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค สามารถชี้วัดได้ว่าอาการที่แตกต่างกันดังกล่าวเกิดจากเชื้อสาเหตุต่างชนิดโดยเบื้องต้นเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาโคโลนี การทดสอบแกรม พิสูจน์ HR และการพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม สามารถชักนำต้นพืชทดสอบเกิดโรคได้และมีลักษณะอาการสอดคล้องกับอาการที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นไปตามหลักการพิสูจน์โรค (Koch's postulation) (Schaad, 2001)

โรคใบจุดเหี่ยวของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* (เทคโน และคณะ, 2556) เป็นรายงานแรกของโลกที่พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคทางใบ ในปี 1974 Truman ได้รายงานว่าเชื้อ *X. campestris* pv. *eucalypti* ก่อให้เกิดโรค die-back ซึ่งเป็นโรคสำคัญที่เกิดกับลำต้นของยูคาลิปตัส โดยโรคใบจุดเหี่ยวเป็นโรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของยูคาลิปตัส อายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ หลังจากนำออกจากโรงเรือนปักชำกล้าไม้เพื่อรอการปลูกลงแปลง ซึ่งการศึกษาวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าโรคใบจุด

แบคทีเรียของยูคาลิปตัส เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea ananatis* (Coutinho *et al.*, 2010) และมีการตรวจพบการเกิดและการระบาดของโรคนี้นี้ในแหล่งปลูกยูคาลิปตัสที่สำคัญทั้งในต่างประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย บราซิล (Pomella *et al.*, 1995) อูรุกวัย ยูกันดา (Coutinho *et al.*, 2002) อาร์เจนตินา (Ferreira *et al.*, 2001) และในประเทศไทย (เทคโน และคณะ, 2556) อาการโรคใบจุดเหลี่ยมดังกล่าวอาจมีการผันแปรหลายรูปแบบเช่น อาการใบไหม้ เส้นกลางใบดำ ขอบใบไหม้ และยอดไหม้ ขึ้นอยู่กับสภาพการระบาดของโรค ความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ พันธุ์พืช อายุพืช และสภาพอากาศ เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีรายงานเช่นกันว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่สำคัญทางใบของยูคาลิปตัสอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียอื่น เช่น เชื้อ *Pseudomonas cichorii* สาเหตุโรคใบไหม้ (leaf blight) (Pomella *et al.*, 1995) และ *X. axonopodis* (Rivadave *et al.*, 2008) สาเหตุโรคใบไหม้ และ die-back ตามลำดับ และส่วนมากจะพบอาการเกิดโรคในโรงเรือนอนุบาลกล้า (nursery) และในสภาพแปลงปลูก (field conditions) อายุต้นพืชประมาณ 1-6 เดือน แต่ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยอย่างละเอียดเกี่ยวกับโรคใบจุดเหลี่ยมและเชื้อสาเหตุที่แท้จริง ซึ่งจากรายงานทั้งข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับรูปแบบที่หลากหลายและแตกต่างของอาการข้างต้น อาจเป็นการเกิดโรคแบบร่วมกันและความหลากหลายในการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่างชนิดกัน การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายหลักในการศึกษาการวิจัยและจำแนกชนิดเพื่อยืนยันการเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุหลักของอาการโรคใบจุดเหลี่ยม (หรือใบจุดไหม้) ของยูคาลิปตัสทั้งในระดับพื้นฐานและอนุวิทยา

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการโรคใบจุด ใบไหม้ของยูคาลิปตัสในแหล่งผลิตกล้า อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา ซึ่งจากข้อมูลการสำรวจลักษณะอาการโรคในยูคาลิปตัส โดยเฉพาะ *X. axonopodis* และ *P. ananatis* อาจก่อให้เกิดอาการแผลจุดเหลี่ยมที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เพียงแต่เชื้อ *X. axonopodis* ก่อให้เกิดจุดเหลี่ยมกระจุกกระจายทั่วไป และอาจรวมกันเป็นแผลใหญ่กลายเป็นอาการใบไหม้ ในขณะที่เชื้อ *P. ananatis* จะพบแผลจุดเกาะกลุ่มเรียงขนานตามเส้นกลางใบ (สุทธดิ และคณะ, 2554) และจากลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกันดังกล่าวอาจจะทำให้การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคผิดพลาด หรือจัดการโรคอย่างไม่ถูกต้องซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ยังทำให้โรคใบจุดในยูคาลิปตัสระบาดอย่างต่อเนื่อง และเพื่อให้การสุ่มเก็บตัวอย่างโรคใบจุดเหลี่ยมได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของโรคที่ครอบคลุมในการสุ่มเก็บตัวอย่างในแหล่งปลูกยูคาลิปตัสนั้น ผู้วิจัยได้วางแผนการสุ่มเก็บตัวอย่างโรคในเรือนเพาะกล้าและลานวางกล้าโดยเก็บตัวอย่างเป็นแบบซิกแซก สุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 20 จุด จุดละ 5 ต้น บนโต๊ะ โรงเรือนชำกล้าขนาด 39 ตารางเมตร และโต๊ะบนลานวางกล้าขนาด 24 ตารางเมตร ซึ่งจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเช่นนี้จะได้ตัวแทนที่ดีเทียบเท่ากับการเก็บตัวอย่างพืชทุกต้นเพื่อนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค (Preecha *et al.*, 2009) ต่อไป

ตัวอย่างโรคใบจุดเหลี่ยมที่สุ่มเก็บได้นั้น เมื่อนำมาประเมินความรุนแรงตามวิธีการของ กฤษณา และคณะ (2553) โดยแบ่งความรุนแรงโรคออกเป็น 4 ระดับ ประกอบด้วยระดับ 0 ความรุนแรงโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 1 ความรุนแรงโรค 1-35 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 2 ความรุนแรงโรค 36 - 65 เปอร์เซ็นต์ และระดับ 4 ความรุนแรงโรค 66-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการประเมินโรคดังกล่าวเป็นการประเมินโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อราของยูคาลิปตัส ซึ่งจะให้ผลการประเมินที่ไม่ถูกต้องเหมาะสมกับโรคใบจุดเหลี่ยมเนื่องจากรูปแบบการกระจายตัวของแผลไม่แน่นอน ดังนั้นเพื่อให้เหมาะกับการจัดระดับและแบ่งกลุ่มความรุนแรงของโรคใบจุดเหลี่ยม จึงได้ประยุกต์เกณฑ์และวิธีการวัดความรุนแรงของโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัสจาก กฤษณา และคณะ (2553) โดยใช้เกณฑ์การแบ่งระดับความรุนแรงโรคให้มีความละเอียดมากขึ้นซึ่งได้แบ่งระดับความรุนแรงโรคสำหรับการประเมินเป็น 5 ระดับ ตามความรุนแรงของพื้นที่ใบประกอบด้วย ระดับ 0 มีความรุนแรงโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 1 ความรุนแรงโรค 1-25 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 2 ความรุนแรงโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 4 ความรุนแรงโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ และระดับ 5 ความรุนแรงโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการประเมินความรุนแรงในแต่ละตัวอย่างจะใช้ตารางทาบโดยวางช่องตารางสำหรับประเมินขนาด 1 ช่อง เท่ากับขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร ซึ่งเป็นการประยุกต์จากตารางสำหรับใช้วาดกราฟ โดยถ่ายเอกสารตารางกราฟลงบนพลาสติกใส แล้วนำตารางกราฟในรูปแบบพลาสติกใสนี้ไปวางทาบบนตัวอย่างใบพืช จากนั้นนับช่องที่แสดงอาการโรค และพื้นที่ใบทั้งหมดเพื่อคำนวณความรุนแรงโรคของตัวอย่างพืชที่สุ่มเก็บได้และนำไปจัดกลุ่มตามระดับความรุนแรงข้างต้น (Kittipong *et al.*, 2012)

จากผลการสำรวจการระบาดของโรคใบจุดเหลี่ยมในแหล่งผลิตกล้ายูคาลิปตัสพบว่า จากตัวอย่างที่เก็บช่วงฤดูฝนมีการระบาดของโรคสูงสุด ในระยะต้นกล้าอายุ 3-9 สัปดาห์ หลังปักชำ โดยพบระบาดเฉลี่ย 73.8% ซึ่งการระบาดเกิดขึ้นกับต้นกล้าในเรือนปักชำกล้ามากกว่าบนลานวางกล้า เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย ต้นกล้าอ่อนแอ ความหนาแน่นของกล้าบนโต๊ะวางกล้า ทำให้ง่ายต่อการระบาดของโรค และเวลาที่เหมาะในการเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีสามเหลี่ยมโรคพืชที่ประกอบด้วยพืชเป็นพันธุ์อ่อนแอ เชื้อโรครุนแรง ในสภาพแวดล้อมและเวลาที่เหมาะสม (Agrios, 2005)

ตัวอย่างใบยูคาลิปตัสที่เก็บได้ทั้งหมดมีลักษณะอาการทั่วไป คือ เกิดแผลเซลล์ตาย น้ำน้ำ แผลเป็นจุดเหลี่ยม ล้อมรอบด้วยอาการเหลืองแบบ halo กระจายทั่วไป แผลถูกจำกัดด้วยเส้นใบ อาการจุดแผลแสดงให้เห็นทั้งด้านหน้าใบและด้านหลังใบ และลักษณะอาการและสัณนิเวศแผลของใบยูคาลิปตัสมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุพืช สภาพแวดล้อม และพันธุ์ยูคาลิปตัส โดยสายพันธุ์ที่พบการระบาดรุนแรงมาก คือพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* และ *E. grandis* (เทคโน

และคณะ, 2556) ซึ่งในประเทศอาร์เจนตินา และอุรุกวัย โรคใบจุดยูคาลิปตัส ในระยะกล้าเป็น ปัญหาหลักที่พบในยูคาลิปตัสพันธุ์ *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. globules* และ *E. maidenii* (Coutinho et al., 2011) เมื่อนำตัวอย่างใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการดังกล่าวข้างต้นมาแยกเชื้อสาเหตุโรคพบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 กลุ่ม โดยแยกได้จากทุกตัวอย่างจำนวน 93.4% โดยในเบื้องต้นเมื่อนำตัวอย่างใบพืชเป็นโรคมานำแยกเชื้อพบว่าลักษณะของเชื้อมีความแตกต่างกันด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคใบจุดในยูคาลิปตัสซึ่งอาการแต่ละกลุ่มสามารถจำแนกได้ดังนี้

อาการโรคกลุ่มที่ 1 ที่มีอาการเซลล์ตายมีลักษณะแผลเป็นจุดเหลี่ยมจำกัดด้วยเส้นใบและมี halo ล้อมรอบ ขนาดแผล 1-4 มิลลิเมตร แยกเชื้อได้จำนวน 84.4% มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนใส กลมมน นุ่มวาว ขอบเรียบ สามารถเจริญในอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+Bacitracin) ได้ตามปกติ ไม่สามารถเจริญบนอาหารจำเพาะ PA20 ได้

อาการโรคกลุ่มที่ 2 ที่มีเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุด กลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีเข้ม ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตร และบริเวณก้านใบดำ แยกเชื้อได้จำนวน 9.8% มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างใสโปร่งแสง กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ไม่สามารถเจริญบนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+ Bacitracin) แต่เจริญบนอาหารจำเพาะ PA20 ได้

และอาการกลุ่มที่ 3 ที่มีเซลล์ตายลักษณะแผลเป็นจุด กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 4-7 มิลลิเมตร แยกเชื้อได้จำนวน 5.8% มีลักษณะโคโลนีเหลืองนูน เข้ม กลม นูนตรงกลาง ขอบเรียบ ไม่สามารถเจริญในอาหารจำเพาะ PA20 และอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+ Bacitracin) ทั้งนี้จากข้อมูลข้างต้นได้มีการใช้อาหารกึ่งคัดเลือก 2 ชนิด คือ NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+ Bacitracin) และ PA20 ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อ *Xanthomonas* spp. และ *Pantoea ananatis* ศึกษาได้ตามลำดับ จึงมีแนวโน้มว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 จะเป็นเชื้อ *Xanthomonas* spp. และกลุ่มที่ 2 จะเป็นเชื้อ *Pantoea ananatis*

การพิสูจน์การเป็นเชื้อก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 กลุ่ม โดยวิธีการพ่นใบด้วยระดับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย 10^8 cfu/ml พบว่าอาการที่พบจากการปลูกเชื้อแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันโดยเชื้อกลุ่มที่ 1 แสดงอาการโรคทั้งต้นตั้งแต่ใบอ่อนลงมา เริ่มแสดงอาการให้เห็นอาการในช่วง 7-14 วันหลังปลูกเชื้อโดยแสดงอาการจุดเหลืองกระจายอยู่ทั่วไป หลังจากนั้นแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลน้ำตาลมีขนาดใหญ่ขึ้น และมี halo ล้อมรอบที่ 15-30 วันลักษณะแผลที่เกิดขึ้น ยูคาลิปตัสจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นและถูกจำกัดด้วย เส้นใบ ทำให้เซลล์พืชตายเป็นจุดเหลี่ยม

กลุ่มที่ 2 แสดงอาการเริ่มแรกมีแผลอาการไหม้ รวมทั้งอาการก้านและเส้นกลางใบดำเกิดขึ้น ส่วนมากจะเกิดอาการที่ใบล่าง เริ่มแสดงอาการให้เห็นในช่วง 20-30 วันหลังปลูกเชื้อ เกิดรอยแผล สีน้ำตาลที่เส้นกลางใบ ขอบใบ และส่วนยอดอ่อนที่เริ่มจะแตกออก แผลจะขยายขนาดเพิ่มขึ้น

กลุ่มที่ 3 ไม่ก่อให้เกิดอาการโรคจึงสรุปว่าเชื้อในกลุ่มที่ 3 นี้จึงไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสการศึกษานี้จึงเน้นการศึกษาเปรียบเทียบโรคจากเชื้อกลุ่มที่ 1 และ 2 ต่อไป

ผลการพิสูจน์โรคบนกล้วยาลิปตัสข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 ที่แยกได้จากกลุ่มอาการแผลจุดเหลี่ยมมี halo ล้อมรอบ เป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แท้จริงในยูคาลิปตัส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Swings and Civerolo (1993) ที่รายงานว่าโรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัสจะแสดงอาการจุดน้ำ (water-soaked leaf spot) บนใบ และเมื่อรุนแรงแผลจะรวมกันมีขนาดแผลใหญ่ขึ้น (bacterial leaf blight) และอาการไหม้จากใบอ่อนและแห้งลงมาจากปลาย (die-back) ซึ่งการเกิดโรคจะใช้ระยะเวลา ต้องการความชื้นที่สูงมาก ในการเข้าทำลายของเชื้อโรคผ่านทาง stomata, hydathodes และ lenticells ไปสู่ชั้น intercellular spaces เนื่องจากยูคาลิปตัสเป็นพืชป่าที่มีเนื้อไม้แข็งแรงยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (Melotto *et al.*, 2006)

นอกจากนี้หลังจากยืนยันกลุ่มเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมแล้ว จึงทำการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการใช้ต่อยอดในการศึกษาวิจัยและการคัดพันธุ์ด้านทานโรคโดยพบว่าการปลูกเชื้อด้วยวิธีการพ่น cell-suspension เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม โดยการพ่นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ให้ทั่วต้นพืช และให้ความชื้นสม่ำเสมอ (90-100% RH) ในยูคาลิปตัสพันธุ์อ่อนแอจะแสดงอาการโรคภายใน 7 วันหลังปลูกเชื้อ ซึ่งวิธีการปลูกเชื้อโดยการพ่นนี้สามารถนำมาใช้เพื่อการคัดพันธุ์ยูคาลิปตัสด้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมได้ด้วย โดยพบว่าหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมพบอาการบนยูคาลิปตัส 4 พันธุ์คือ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอมากเกิดโรครุนแรง 75% รองลงมาคือ *E. grandis* เป็นพันธุ์อ่อนแอปานกลางเกิดโรครุนแรง 60% และ *E. urophylla* (N.1) และ *E. urophylla* (N.2) เป็นพันธุ์อ่อนแอเล็กน้อยเกิดโรคปานกลาง-ต่ำที่ 30-12% ตามลำดับ และอีก 4 พันธุ์คือ *E. camaldulensis* x *E. pellita* และ *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.1), *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.2) และ *E. camaldulensis* x *E. brassiana* (N.3) พบว่าเป็นพันธุ์ด้านทานต่อโรคซึ่งไม่แสดงอาการโรคแต่อย่างใด และเมื่อทำการแยกเชื้อกลับจากยูคาลิปตัสทั้ง 8 พันธุ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อกลับได้เฉพาะ 4 พันธุ์ที่แสดงอาการโรคเท่านั้น ซึ่งการเกิดเหตุการณ์เช่นนี้จะเกิดจากปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างยีน *avr* กับโปรตีนจากพืช (Receptors) ที่ควบคุมการ

สังเคราะห์ด้วยยีน *R* โดยในขั้นตอนการส่งสัญญาณและการรับรู้จดจำนั้น หากพืชไม่สามารถรับรู้จดจำ elicitor ของเชื้อโรค กลไกปกป้องพืชเพื่อให้พืชเองนั้นรอดพ้นจากอันตราย หรือรอดพ้นจากการถูกเชื้อโรคโจมตีก็จะเกิดขึ้นอย่างล่าช้า ซึ่งพบในพืชพันธุ์อ่อนแอ และปรากฏอาการผิดปกติในช่วงเวลาการบ่มเชื้อหรือพักตัวตามขั้นตอนของวงจรการเกิดโรคติดเชื้อ ในขณะที่หากพืชเป็นพันธุ์ต้านทานพืชจะจดจำ elicitor จากเชื้อโรคนั้นได้พร้อมเกิดกลไกปกป้องตัวเองทันที พืชนั้นก็ไม่ใช่โรคหรือไม่ปรากฏอาการเป็นโรค และอาจมีปฏิสัมพันธ์แบบ HR เกิดขึ้น ซึ่งจะพบอาการที่เซลล์พืชตายเฉียบพลัน ณ จุดติดเชื้อนั้น ปฏิสัมพันธ์เช่นนี้เป็นไปตามหลักการของ gene-for-gene ที่อาจมีความจำเพาะเจาะจงต่อกันระหว่างสายพันธุ์เชื้อโรคและพันธุ์พืช ซึ่งต่างมีการสังเคราะห์สารชีวเคมีเพื่อเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน จึงอาจเรียกว่าเป็นปฏิสัมพันธ์ทางชีวเคมี หรือโปรตีน (Athinuwat *et al.*, 2007; 2009; Prathuangwong *et al.*, 2009; 2010) แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจนในโรคดังกล่าวจึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อนำข้อมูลมาใช้พัฒนาพันธุ์ต้านทานต่อไป

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยใช้เทคนิคการฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมเข้าสู่เนื้อเยื่อใบพืชทดสอบประกอบด้วย ฟริก ยาสูบ และมะเขือเทศพบว่าสามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR เฉพาะบนใบยาสูบ และมะเขือเทศภายใน 48 ชั่วโมง โดยอาการตายของเนื้อพืชแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ฉีดเข้าสู่ใบพืช สอดคล้องกับการรายงานของ ดุสิตและคณะ (2547) และ Kaewnum *et al.* (2005) พืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา HR ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม คือ ยาสูบ และมะเขือเทศในขณะที่ใบฟริกอาจต้องมีความจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียในอัตราสูงขึ้นในการชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR (Kaewnum *et al.*, 2005) แสดงให้เห็นว่าการชักนำการเกิดปฏิกิริยา HR ดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดเชื้อ ชนิดของพืชทดสอบ และความเข้มข้นของเชื้อซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งสัญญาณ (signal molecule) สู่พืชอาศัยและชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองจากพืชดังกล่าว

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้ทั้ง 190 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความรุนแรงโรคโดยการพ่นเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml บนต้นยูคาลิปตัสพันธุ์ *E. camaldulensis* x *E. deglupta* ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ และให้ความชื้นตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น เก็บต้นยูคาลิปตัสทดสอบไว้ในโรงเรือนที่ความคุมอุณหภูมิและความชื้น (โดยคัดแปลงสภาพแวดล้อมทั้งอุณหภูมิและความชื้นให้ใกล้เคียงกับสภาพโรงเรือนปักษ์กลาง) พบว่าเชื้อทั้งหมดมีความรุนแรงแตกต่างกันในการก่อโรคโดยเลือกเชื้อสายพันธุ์ RTDNO1-2 เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ มีช่วงเวลาตั้งแต่ปลูกเชื้อจนแสดงอาการ โรคสั้นกว่า (incubation

period) โดยพบว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมสายพันธุ์ RTDNO1-2 เป็นตัวแทนที่ดี (จำนวนเชื้อ 23.7% ที่เป็นสายพันธุ์รุนแรง) ที่มีความรุนแรงที่สุด และสม่ำเสมอในการแสดงออกเช่นเดิมทุกครั้ง (3 ซ้ำ) จึงเลือกใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาชีววิทยา และการทดสอบการควบคุมโรคตลอดการทดลอง

การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมโดยยืนยันการจำแนกเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน 3 ระดับ ประกอบด้วยการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยา ชีวเคมี และระดับอนุวิทยา (Holt *et al.*, 1994) โดยการศึกษาในระดับสัณฐานและสรีรวิทยาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการโรคบนใบยูคาลิปตัสที่ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยนั้น ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรค 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนใส กลมมน มันวาว ขอบเรียบ และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 นี้มีการเจริญแบบใช้ออกซิเจน (aerobe) สามารถย่อยแป้งได้ ใช้น้ำตาล sucrose, arabinose, lactose, maltose และผลิตสาร xanthomonadin เจริญได้บนอาหาร NA ผสมสารปฏิชีวนะ (Cephalexin+ Bacitracin) และมีแนวโน้มตรงกับเชื้อกลุ่ม *Xanthomonas* sp. ในส่วนที่กลุ่มที่ 2 มีลักษณะโคโลนีเหลืองอ่อนค่อนข้างใส โปร่งแสง กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกจำเพาะ PA20 ซึ่งเป็นอาหารคัดเลือกจำเพาะสำหรับ *P. ananatis* และเมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเชื้อกลุ่มที่ 2 นี้มีการเจริญแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ สร้างสารอินโดล ใช้น้ำตาล sucrose, arabinose, lactose, maltose, sorbitol, manitol และ arabitol ไม่ย่อยแป้ง ไม่สร้างสาร xanthomonadin ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับลักษณะของเชื้อ *P. ananatis* ตามข้อมูลตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)

เมื่อนำเชื้อในกลุ่มที่ 1 มาศึกษาและจำแนกในระดับโมเลกุลด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากบริเวณยีน *hrpF* เป็นยีนที่ควบคุมการก่อโรคและการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (pathogenicity and hypersensitivity) ของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม Xanthomonad (Leite *et al.*, 1994; Rossier *et al.*, 2000) สามารถนำมาใช้พัฒนาเป็นเครื่องมือและกระบวนการที่เหมาะสมในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัส ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับสายนิวคลีโอไทด์ (sequencing) มีความเหมือนตรงกับเชื้อ *X. axonopodis* เท่ากับ 99% เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมยังไม่มีข้อมูลของลำดับสายดีเอ็นเอในฐานข้อมูล (GenBank) จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้จากเชื้อในกลุ่ม Xanthomonads โดยพัฒนาออกแบบ degenerate primer เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *hrpF* ของเชื้อนี้ได้ โดยได้คู่ไพรเมอร์ *hrpF*-F 5' GAC AAG ATC AAC GAY CCT TCC 3' กับ *hrpF*-R 3' CTR TTG ATG GTG TCC AGA GT 5' ซึ่งการใช้ไพรเมอร์นี้สามารถเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอบริเวณ *hrpF* ของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมได้ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชัดเจน ที่ขนาด 900 bp และเมื่อวิเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีความเหมือน 98% ตรงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *glycines* ดังนั้นไพรเมอร์นี้สามารถใช้จำแนกได้ เพียงระดับ species เท่านั้น (species-specific primers) ซึ่งผลการจำแนกนี้ให้ผลสอดคล้องกับการ จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี (Holt *et al.*, 1994)

การจำแนกในระดับ pathovars โดยการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของไพรเมอร์ *hrpF* เลือกตำแหน่งที่มีความจำเพาะเจาะจงของเชื้อ *X. axonopodis* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมได้คู่ไพรเมอร์ *hrpFS-F* 5' TCT CAG CAA GTT CGT TTC CCA C 3' และ *hrpFS-R* 3' GGT GCA TCT GGG AGC TGG AT 5' จากผลการเพิ่มปริมาณด้วย ไพรเมอร์ *hrpFS* ที่ออกแบบใหม่นี้พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค ใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้เท่านั้น ที่แถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp จากการจำแนกชนิดเชื้อนี้สามารถยืนยัน การจำแนกได้ระดับหนึ่งว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้ pv. *eucalypti* แต่เนื่องจาก ฐานข้อมูลไม่มีข้อมูลของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม จึงทำการยืนยันการจำแนกในระดับ pathovars อีกครั้งด้วยการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคนพืชรอบต่าง ๆ ที่มีการรายงานเป็น โรคจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย Xanthomonad คือ มะนาว มะกรูด มะเขือเทศ มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และยูคาลิปตัส ด้วยวิธีการปั่นและการฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พบว่าทั้งการปั่น suspension เชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้สามารถก่อให้เกิดอาการโรคได้เฉพาะบนยูคา ลิปตัสเท่านั้น โดยแสดงอาการจุดเหลืองหลังปลูกเชื้อ 6 วัน และอาการโรคพัฒนาจนกลายเป็นใบ จุดเหลี่ยมหลังปลูกเชื้อ 15 วัน และการปลูกเชื้อด้วยการฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยม ให้ผลสอดคล้องกับการปั่นปลูกเชื้อโดยการปั่นใบ โดยพบว่าพืชทดสอบ มะนาว มะกรูด มะเขือเทศ มันสำปะหลัง และถั่วเหลืองแสดงอาการเซลล์ตายอย่างเฉียบพลันหลังฉีด suspension เชื้อสาเหตุ โรคใบจุดเหลี่ยมภายใน 48 ชั่วโมง ในขณะที่พืชยูคาลิปตัสแสดงอาการน้ำมีขนาดเท่ากับ เส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดฉีดมาต่อมาหลังจากฉีดเชื้อ 10 วันรอยน้ำนั้นเริ่มขยายวงกว้างออกเป็น รอยหยัก และเริ่มมีจุดน้ำกระจายรอบรอยฉีดหลัง 15 วัน และจุดน้ำนั้นได้พัฒนาเป็นแผลใบจุด เหลี่ยมอย่างสมบูรณ์หลังฉีดเชื้อ 20 วัน เนื่องจากผลของการตรวจสอบการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโร ใบจุดเหลี่ยมจะก่อให้เกิดอาการเฉพาะพืชยูคาลิปตัสเท่านั้นไม่ก่อให้เกิดอาการกับพืชอื่นๆ ที่มี สาเหตุโรคจากเชื้อกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมเกิดจาก *X. axonopodis* pv. *eucalypti*

เมื่อทำการแยกเชื้อกลับจากการปลูกเชื้อด้วยวิธีการพ่นและการฉีด suspension เชื้อเข้าสู่เนื้อใบพืชหลังปลูกเชื้อ 20 วัน (ใบพืชแสดงอาการโรคใบจุดเหลี่ยมอย่างสมบูรณ์) พบว่าสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมกลับมาได้จากใบยูคาลิปตัสโดยมีเชื้อประมาณ 10^{10} cfu/cm² และพบว่าสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมกลับมาได้เช่นกันจากพืชทดสอบอื่นแต่มีปริมาณที่น้อยกว่าโดยมีประมาณเชื้อ 10^1 - 10^3 cfu/cm² การที่ใบพืชไม่แสดงอาการโรคแต่ยังสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมกลับได้สอดคล้องกับ รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคจะมีวงจรชีวิตที่เป็นทั้งลักษณะ saprophyte เมื่ออยู่บนพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยโดยใช้อาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพจากการปลดปล่อยสารและธาตุอาหารจากพืชและจะมีลักษณะเป็นเชื้อสาเหตุโรค (หรือเป็น parasite) กับพืชอาศัยเท่านั้น (Lucas, 1998)

การตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* โดยใช้ hrpFS-probe ที่ออกแบบจากไพรเมอร์ hrpFS ที่สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสได้อย่างจำเพาะเมื่อนำมาใช้ตรวจสอบด้วยวิธี Dot blot hybridization สามารถยืนยันเชื้อได้ในระดับจีโนมเท่านั้นเนื่องจากยีนบริเวณนี้เป็นยีนที่พบได้ทั่วไปในเชื้อ Xanthomonads แต่เชื่นี้ยังไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งการออกแบบควรคัดเลือกยีนที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* เช่น ยีนที่ให้ ความจำเพาะกับพืชอาศัย (avr gene) (วิมล, 2553)

การจำแนกและการจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้ทั้งหมด 190 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค rep-PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ ไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX พบว่าเทคนิคนี้สามารถแยกเชื้อระดับ Genotype ของเชื้อทั้งหมดออกจากสายพันธุ์ที่เบี่ยงเบนจากในกลุ่ม Xanthomonad และเชื้อนอกกลุ่มได้ทั้งอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง polymorphic bands ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถแยกความแตกต่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้อย่างชัดเจน และเมื่อทำการจัดกลุ่มเชื้อทั้งหมดและเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก แหล่งที่มาของเชื้อ ช่วงฤดูที่เก็บ อายุพืชและสายพันธุ์ของยูคาลิปตัส พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ไม่มีความแตกต่างตามข้อมูลดังกล่าว แต่เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับความรุนแรงของการก่อให้เกิดโรคบนใบยูคาลิปตัส สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มสายพันธุ์อ่อนแอและกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งพบว่าเฉพาะกลุ่มสายพันธุ์รุนแรงเท่านั้นที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* โดยไพรเมอร์ REP สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอมีขนาด 200 bp และ 300 bp; ไพรเมอร์ ERIC สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 250 bp และ 700 bp; ไพรเมอร์ BOX สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 300 bp, 400 bp และ 500 bp ซึ่งเทคนิคนี้นอกจากจะสามารถจำแนกเชื้อเป้าหมายออกจากเชื้อกลุ่มอื่น (inter-specificity) ได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วยังสามารถแบ่งกลุ่มภายในกลุ่มเชื้อเป้าหมายได้

อย่างอย่างชัดเจน (intra-specificity) (กุลขนา, 2546) โดยสัมพันธ์สอดคล้องกับระดับความรุนแรงโรค ในขณะที่การใช้ไพรเมอร์ *hrpF-S* ในการจำแนกชนิดเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมพบว่าเป็นเครื่องมือที่มีคุณภาพ รวดเร็ว ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อแต่ไม่สามารถแยกความหลากหลายของเชื้อในกลุ่มนี้ออกจากกันได้ และความแม่นยำจะต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เทคนิค hybridization เนื่องจากเทคนิค PCR จะใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ ขนาด 18-30 เบส ในการเพิ่มปริมาณในขณะที่เทคนิค hybridization ใช้ probe หรือตัวตรวจสอบที่ออกแบบมาจาก PCR product ขนาด 360 bp จากการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่เกิดจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยวิธีการหลายระดับ (สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และระดับโมเลกุล) หลายวิธีการ (การตรวจสอบแกรม การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ การใช้ไพรเมอร์จำเพาะ การ hybridization และเทคนิค rep-PCR) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมที่แยกได้เป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ซึ่งเป็นรายงานแรกของประเทศไทยเกี่ยวกับโรคนี้และเชื้อสาเหตุโรคชนิดนี้

การศึกษาการจัดกลุ่มชนิดของ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยเทคนิค rep-PCR จะมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ โดยพบว่าไพรเมอร์ REP จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp และ 900 bp ไพรเมอร์ ERIC จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 850 bp และ 500 bp ไพรเมอร์ BOX จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 950 bp และ 650 bp ที่มีความจำเพาะกับ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* จากข้อมูลที่ได้ทั้ง 3 ไพรเมอร์ให้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่าลักษณะทาง genotype ดังกล่าวสัมพันธ์กับข้อมูลทาง phenotype ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรครุนแรง ซึ่งผลของไพรเมอร์ BOX ให้ผลได้ชัดเจนและใกล้เคียงกับลักษณะทาง phenotype มากที่สุดไม่มีความผันแปรทางพันธุกรรมหลังจากทดสอบแล้ว 2 ครั้ง โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะทาง phenotype คือ กลุ่มที่ 1 ก่อให้เกิดโรครุนแรงบนยูคาลิปตัส (66.3% คิดเป็น 126 สายพันธุ์) และกลุ่มที่ 2 ก่อให้เกิดโรครุนแรงน้อย (33.7% คิดเป็น 64 สายพันธุ์) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนอกจากจะใช้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังมีรายงานว่าสามารถใช้ในการวินิจฉัยชนิดเชื้อได้อย่างแพร่หลาย หากมีเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบ (Rademaker, 2000)

การศึกษาวิจัยชีววิธีการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยมโดยการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบและผิวรากของยูคาลิปตัสที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรคได้ทั้งหมด 168 ไอโซเลท แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินบริเวณต้นยูคาลิปตัส และตัวอย่างน้ำจากแหล่งเพาะกล้ายูคาลิปตัสได้ทั้งหมด 217 ไอโซเลท ตรวจกลุ่มเชื้อเบื้องต้นตาม

ลักษณะฐานฐานวิทยาโคโลนีได้ 36 กลุ่ม แสดงว่าพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสมีความหลากหลายของเชื้อค่อนข้างสูง จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหี่ยวด้วยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรียจำนวน 10 กลุ่ม มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ประกอบด้วย กลุ่ม T5, T6, T9, T11, T14, T20, G6, G7, G15 และ G16 จึงคัดเลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจากทั้ง 10 กลุ่ม รวม 10 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ด้วยวิธี agar diffusion และ paper disc diffusion พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 4 ไอโซเลท คือ T5 และ T20 (แยกจากฟิรรากของยูคาลิปตัส) G15 (แยกจากดิน) และ G16 (แยกจากน้ำ) เมื่อนำทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิบัติ T5 สามารถควบคุมการเกิดโรค และความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด โดยการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิบัติ T5 ก่อนปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* 7 วัน และหลังปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* 7 วัน พบว่าเป็นวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิบัติที่เหมาะสมโดยมีระยะในการพ่นทุก 7 วัน เพื่อนำไปปรับใช้ในแปลงผลิตต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในระบบการผลิตลำยูคาลิปตัส ขั้นตอนการปักชำกล้าในโรงเรือนซึ่งวางต้นพืชอย่างหนาแน่น ต้องการความชื้นและความร้อนที่สูง ทำให้มีการระบาดของโรค ส่งผลต่อต้นที่นำออกมาดูแลต่อบนลานวางกล้า ซึ่งกรรมวิธีที่มีผลในการควบคุมโรคได้ดีคือ การพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิบัติ SP007s สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 97.23% และความรุนแรงของโรคได้ 99.7% และการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติ T5 สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 96.35% และลดความรุนแรงของโรคได้ 99.5% และให้ผลต้นที่ผ่านเกณฑ์มากกว่า 23% จึงควรใช้กรรมวิธีผสมผสานนี้มาใช้ควบคุมโรคในโรงเรือนชำกล้า ซึ่งจากการควบคุมในโรงเรือนทดลองพบว่าการควบคุมของเชื้อ KPS46 และ T5 แบบเชื้อเดี่ยวให้การควบคุมได้ดีมากกว่าการใช้เชื้อ SP007s แต่เมื่อมาทดลองกับสภาพระบบโรงเรือนการผลิต การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ KPS46 และ T5 จึงไม่สามารถควบคุมโรคได้ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิบัติ SP007s จะมีศักยภาพในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็วแต่ด้วยโครงสร้างที่ไม่มี endospore จะทำให้การควบคุมโรคในระยะยาวไม่มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่า KPS46 ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคพืชจึงควรใช้เชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน สุนันทนาถ (2556)

การควบคุมโรคใบจุดเหี่ยวของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในระบบผลิตบนลานวางกล้า หลังจากอยู่ในโรงเรือนเวลา 20 วัน เพื่อกระตุ้นให้กล้ายูคาลิปตัสสร้างราก จากนั้นนำออกมาไว้บนลานวางกล้าเนื่องจากพืชต้องการแสงแดดมากขึ้น ซึ่งในพื้นที่ปลูกมีอุณหภูมิสูงมาก (~45 องศาเซลเซียส)

ในช่วงกลางวันจึงต้องให้น้ำตลอดเพื่อป้องกันวัสดุปลูกแห้ง โดยกล้ายูคาลิปตัสที่อยู่ในลานซึ่งมีพื้นที่กว้าง มีกล้ายูคาลิปตัสอยู่จำนวนมากและมีปลูกตลอดปี ทำให้พืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ไม่ขาดทำให้โรคเกิดระบาดรุนแรง ซึ่งจากการทดสอบป้องกันและควบคุมการเกิดโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัส โดยการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 สลับกับสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟตมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมโรคจากเกณฑ์ระดับการคัดกล้าขาย ซึ่งกระบวนการควบคุมโรคบนลานวางกล้าครั้งต่อไปโดยมีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s ใช้สลับกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ หรือแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 ใช้สลับกับกันสารเคมีสเตรปโตมัยซินซัลเฟต เพื่อป้องกันการดื้อสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค

การจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ T5 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดเหลี่ยม พบว่าการจำแนกด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา ชีวเคมี พบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำแนกด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA สามารถยืนยันการเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus subtilis* group (ซึ่งตรงกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis*) และทำการยืนยันการเป็นเชื้อนี้ด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณยีน *adk* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 518 bp ให้ผลสรุปว่าเชื้อสายพันธุ์ T5 เป็นเชื้อ *B. licheniformis*

ผลการวิจัยในครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่มีการศึกษาว่ามีโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti* ระบาดในประเทศไทยและได้ศึกษาถึงวิธีการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคที่รวดเร็ว และแม่นยำ ตลอดจนได้วิธีการควบคุมโรคที่เหมาะสมที่สามารถเผยแพร่เพื่อให้ผู้ที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง

สรุป

การศึกษาเรื่องนี้จัดเป็นรายงานแรกที่วิจัยโรคระบาดชนิดใหม่คือโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้วยคาลิปดัสที่มีการอธิบายวิธีการขั้นตอนการจำแนกชนิดสาเหตุทุกระดับ โดยเฉพาะในระดับโมเลกุลที่ยืนยันและตั้งชื่อ pathvars ใหม่ได้อย่างเฉพาะเจาะจงว่าเกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* โดยยืนยันจำเพาะ *hrpF* ที่จำแนกครั้งนี้ และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA โดย rep-PCR สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้ง 190 สายพันธุ์ออกจากเชื้อโรคชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกันอีก 10 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน รวมทั้งกระบวนการศึกษาพืชอาศัยก็แสดงความจำเพาะระดับ pathovars ได้แม่นยำ

นอกจาก rep-PCR จะจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุเป้าหมายออกจากกลุ่มอื่นได้ชัดเจนแล้ว (interspecificity) ยังแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ 190 สายพันธุ์ (intraspecificity) ระหว่างสายพันธุ์รุนแรง 126 สายพันธุ์ และอ่อนแอ 64 สายพันธุ์ ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคบนพืชคาลิปดัส แสดงถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคที่อย่างน้อยประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ (2-main genotypes) โดย 1 ใน 3 ไพรมเมอร์ rep-PCR คือ BOX จะบ่งบอกลักษณะลายพิมพ์เฉพาะระหว่างสายพันธุ์รุนแรงและอ่อนแอที่ขนาด 650 และ 950 bp ได้อย่างแม่นยำ ความจำเพาะของลายพิมพ์ DNA และยีน *hrpF* จึงมีความเหมาะสมที่ควรพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจสอบจำแนกชนิดและเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อศึกษาพันธุประวัติของเชื้อนี้ได้อย่างมีคุณภาพ

เชื้อสาเหตุสามารถพิสูจน์ตามหลักการ Koch's postulate บนยูคาลิปดัสพันธุ์อ่อนแอคือ *Eucalyptus camaldulensis* x *E. deglupta* ได้สมบูรณ์ทั้ง 190 สายพันธุ์ และเนื่องจากยังไม่มีรายงานการเกิดหรืออาการโรคในธรรมชาติกับพืชข้างเคียงมาก่อน ยูคาลิปดัสจึงเป็นพืชอาศัยชนิดเดียวที่เป็นแหล่งก่อกำเนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อนี้ โดยยูคาลิปดัสสายพันธุ์ hybrid จำนวน 4 พันธุ์ ที่มีความต้านทานโรคสูงนั้นมีแนวโน้มที่จะชักนำให้เชื้อสาเหตุเป็นสายพันธุ์อุบัติใหม่ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงยิ่งขึ้นในอนาคตต่อไป นอกจากนี้พบว่าพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยคือ มะเขือเทศ พริก มันสำปะหลัง และพืชตระกูลส้ม จัดเป็นเครื่องมือทดสอบเชื้อสาเหตุเพื่อชักนำให้เกิด HR ได้อย่างเหมาะสม

การควบคุมโรคโดยชีววิธีมีแนวโน้มลดการระบาดของสาเหตุได้ดี โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ที่ยกและจำแนกในครั้งนี้ *Bacillus licheniformis* T5 มีประสิทธิภาพควบคุมโรค

ได้ทดสอบกับสายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อน (*B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s) และหากโรคระบาดรุนแรงควรใช้ copper hydroxide หรือ streptomycin รวมทั้งการใช้พันธุ์ต้านทาน 4 พันธุ์ข้างต้น ผลดีเป็นการค้าร่วมด้วย จะส่งผลให้โปรแกรมการจัดการโรคนี้ประสบความสำเร็จมากขึ้น

รายละเอียดข้อมูลการศึกษาทั้งหมดมีผลกระทบต่อกลยุทธ์การจัดการโรคนี้โดยตรง และที่สำคัญคือข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคเพื่อเพิ่มผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพโดยควรมีการศึกษาวิจัยต่อยอดด้านการประเมินความเสี่ยง การระบาดระหว่างแหล่งผลิต การถ่ายทอดโรคผ่านท่อนพันธุ์ ชนิดพืชอาศัยในธรรมชาติ และโดยเฉพาะอนุวิทยา และโมเลกุลที่ศึกษายีนก่อโรคและยีนแสดงความรุนแรงของเชื้อตลอดจน resistance genes ของยูคาลิปตัส และการจำแนกชนิด races ของเชื้อสาเหตุ เพื่อความเข้าใจในปฏิสัมพันธ์ ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อโรคเพิ่มขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณา พงษ์พานิช. 2542. โรคของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทยและแนวทางในการลดผลกระทบ, น. 101-106. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4. สมาคมอารักขาพืชไทย, ชลบุรี.

กรมป่าไม้. 2544. ไม้ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

กุลชนา เกศสุวรรณ. 2546. การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทคโน โปธิลักษณ์, จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, สุพจน์ กาเข้ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2556. การจำแนกชนิดและความรุนแรงของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัส. น. 137-146. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มนตรี สนิทประชากร, สมศักดิ์ มนัสศรีสุขใจ และสัมฤทธิ์ กิตติธรกุล. 2529. การปลูกไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย. เอกสารส่งเสริมการปลูกป่าภาคเอกชน. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

วิมล ปิ่นประดับ. 2553. การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุของโรคใบจุดของมะเขือเทศภายในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ และดุสิต อธิณวัฒน์. 2548. การชักนำภูมิต้านทานและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดที่ผลิตเป็นการค้าด้วยแบคทีเรียควบคุมโรค. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7, เชียงใหม่.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. หนังสือคู่มือการเกษตร แบคทีเรียควบคุมโรคและส่งเสริมสุขภาพพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 61 หน้า.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, สุพจน์ กาเซ็ม, เทคโน โพธิ์ลักษณะ และนวลวรรณ ทองเสน. 2554. การวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสในระบบผลัดกล้ำไม้, ใน รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยร่วมระหว่าง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บริษัทยูคาลิปตัสเทคโนโลยีจำกัด และโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สมบัติ งามเสมอ. 2544. การผลิตปุ๋ยหมักจากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส. สยามทรีสาร.

อัญญา อินทรกำแหง. 2550. การพัฒนา Specific primer สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงด้วยเทคนิค Bio-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Athinuwat, D., T.J. Burr and S. Prathuangwong. 2007. Gene-for-gene specificity in bacterial pustule of soybean. In Proc. of RGJ-PH.D. Congress VIII Conference. Apr. 20-22, 2007. Jomtien Palm Beach Resort, Pattaya, Chonburi. 176.

Athinuwat, D., S. Prathuangwong and T.J. Burr. 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* – soybean cultivar virulence specificity determinate by *avrBs3* homolog, *avrXag1*. **Phytopathology** 99: 996-1004.

Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology**. 5rd ed. Academic Press, London.

- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology** 30: 603-35.
- Azad, H.R., G.J. Holmes and D.A. Cooksey. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii*. **Plant Disease** 84: 973-979.
- Bart, R., M. Cohn, A. Kassen, E.J. McCallum, M. Shybut, A. Petriello, K. Krasileva, D. Dahlbeck, C. Medina, T. Alicai, L. Kumar, L.M. Moreira, J. Neto. Rodrigues, V. Verdier, M.A. Santana, N. Kositcharoenkul, H. Vanderschuren, W. Gruissem, A. Bernal and B.J. Staskawicz. 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. **National Academies of Science** 109(32):13130.
- Brady, C.L. 2005. **Taxonomy of *Pantoea* associated with bacterial blight of *Eucalyptus***. University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
- Bell, A.A., E.G. Medrano, J.D. Lopez, and R.K. Luff. 2007. Transmission and importance of *Pantoea ananatis* during feeding on cotton buds (*Gossypium hirsutum* L.) by cotton fleahoppers (*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter). **World Cotton Research Conference-4**, Lubbock, TX, USA.
- Bogdanove, A.J., R. Koebnik, H. Lu, A. Furutani, S.V. Angiuoli, P.B. Patil, M.A. Van Sluys, R.P. Ryan, D.F. Meyer, S.W. Han, G. Aparna, M. Rajaram, A.L. Delcher, A.M. Phillippy, D. Puiu, M.C. Schatz, M. Shumway, D.D. Sommer, C. Trapnell, F. Benahmed, G. Dimitrov, R. Madupu, D. Radune, S. Sullivan, G. Jha, H. Ishihara, S.W. Lee, A. Pandey, V. Sharma, M. Sriariyanun, B. Szurek, C.M. Vera-Cruz, K.S. Dorman, P.C. Ronald, V. Verdier, J.M. Dow, R.V. Sonti, S. Tsuge, V.P. Brendel, P.D. Rabinowicz, J.E. Leach, F.F. White and S.L. Salzberg. 2011. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. **Journal of Bacteriology** 193 (19): 5450-5464.

Boland, D. J., M. I. H. Brooker, G. M. Chippendale, N. Hall, B. P. M. Hyland, R. D. Johnston, D. A. Kleining and J. D. Turner. 1997. **Forest Tree of Australian**. 4th ed. Nelson and CSIRO, Australian.

Brandl, M.T. and S.E. Lindow. 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology** 64:3256-3263.

Braun-Kiewnick and Sands. 2001. *Pseudomonas*, pp. 84-117. In: Schaad N.W., J.B. Jones and W. Chun (eds), **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**, 3rd edition. St. Paul, MN, USA: APS Press.

Bruton, B.D., J.M. Wells, G.E. Lester and C.L. Patterson. 1991. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a postharvest disease of cantaloupe fruit. **Plant disease** 75:180-183.

Chase, A.R., R.E. Stall, N.C. Hodge and J.B. Jones. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. **Phytopathology** 82:754-759.

Ceponis, M.J., J.M. Wells and R.A. Cappellini. 1985. Bacterial brown spot of honeydew melons. **HortScience** 20:302-303.

Claudio, T. S., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant and T. Popovic. 2002. Sequencing of 16S rDNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging Infectious Diseases** 8: 1117-1123.

Cortesi, P. and Pizzatti, C. 2007. Palea browning, a new disease of rice in Italy caused by *Pantoea ananatis*. **J. Plant Pathology** 89, S76.

- Cother, E.J., R. Reinke, C. McKenzie, V.M. Lanoiselet, and D.H. Noble. 2004. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. *Australas. Plant Pathology* 33: 495-503.
- Coutinho, T. A., and S. N. Venter. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* 10:325-335.
- Coutinho, T.A., O. Preisig, J. Mergaert, M.C. Cnockaert, K.H. Riedel, J. Swings and M.J. Wingfield. 2002. Bacterial blight and dieback of Eucalyptus species, hybrids and clones in South Africa. *Plant Disease* 86: 20-25.
- Coutinho, T., C. L. Brady, M. van der Vaart, S. N. Venter, N. Telechea, M. Rolfo, C. Perez and M. J. Wingfield. 2011. A new shoot and stem disease of Eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- Cubeta, M.S. and T.L. Kuan. 1986. Comparison of MD5 and XCS media and development of MD5A medium for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed, *Phytopathology* 76, 1109.
- Da Silva, A.C., J.A. Ferro, F.C. Reinach, C.S. Farah, L.R. Furlan, R.B. Quaggio, C.B. Monteiro-Vitorello, M.A. Sluys, N.F. Almeida, L.M. Alves, *et al.*, 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- De Baere, T., R. Verhelst, C. Labit, G. Verschraegen, G. Wauters, G. Claeys and M. Vanechoutte. 2004. Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42:4393-4395.

- De Maayer, P., S.N. Venter and T.A. Coutinho. 2008. **The genome sequence of *Pantoea ananatis* - a comparative approach**. Proceedings of the 20th Congress of the South African Genetics Society, South Africa. Department of Genetics, University of Pretoria, South Africa.
- Dye, D. W. 1978. Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. N. Z. J. **Agricultural Research** 21:153-177.
- Eldridge, K., J. Davidson, C. Hardwood and G. Van Wyk. 1997. ***Eucalyptus doemestica* and breeding**. Clarendon Press. Oxford, UK.
- Ersek, T., J.E. Schoelz and J.T. English. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 2616-2621.
- Enya, J., H. Shinohara, S. Yoshida, T. Tsukiboshi, H. Negishi, K. Suyamaand and S. Tsushima. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. **Microbiology Ecology** 53:524-436.
- Ferreira FA., JR. Oliveira and R. Romeiro. 2001. Uma bacteriose foliar em *Eucalyptus grandis* na Argentina e Paraguai. **Fitopatologia Brasileira** 26:281.
- Gitaitis, R.D., and J.D. Gay. 1997. First report of leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananatis* in Georgia. **Plant disease** 81: 1096.
- Gitaitis, R.D., R.R. Walcott, M.L. Well, J.C. Diaz Perez and F.H. Sanders. 2003. Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of centre of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. **Plant Disease** 87: 675-678.

- Grimont, P.A.D. and F. Grimont. 2005. **Genus: Pantoea. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T., eds), pp. 713–720. The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, 2nd edn. New York: Springer.
- Goszczynska, T., V.M. Moloto, S.N. Venter and T.A. Coutinho. 2006. Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. **Seed Science Technology** 34:655-668.
- Goszczynska, T., S.N. Venter and T.A. Coutinho. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of corn in South Africa. **Plant Disease** 91:711-718.
- Harveson, R. M. and H. F. Schwartz. 2007. Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains. **Plant Health Progress** 10:1094-1125.
- Hasegawa, M., K. Azegami, H. Yoshida, and H. Otani. 2003. Behaviour of *Erwinia ananas* transformed with bioluminescence genes on rice plants. **Journal of General Plant Pathology** 69:267-270.
- Hayward, A.C. 1993. **The hosts of Xanthomonas**. In: (Swings J.G. and Civerolo E.L. Eds.) *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, UK.
- Hegedus, D.D. and G.G. Khachatourians. 1996. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* within infected migratory grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) using polymerase chain reaction and DNA probes. *J. Invertebr. Pathology* 67: 21-27.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th**. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequence: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other eubacteria. **Molecular Microbiology** 59: 925-934.
- Jalan, N., V. Aritua, D. Kumar, F. Yu, J.B. Jones, J.H. Graham, J.C. Setubal and N. Wang. 2011. Comparative Genomic Analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, Which Causes Citrus Bacterial Spot Disease, and Related Strains Provides Insights into Virulence and Host Specificity. **Journal of Bacteriology** 193(22):6342-6357.
- Kaewnum S., S. Prathuangwong and T.J. Burr. 2005. Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by other plants. **Plant Pathology** 54: 409-415.
- Keane, P.J., G.A. Kile, F.D. Podger and B.N. Brown. 2000. **Diseases and pathogens of eucalypts**. CSIRO, Collingwood, Victoria.
- Kim, H.K., M. Sasserand and D.C. Sands. 1982. Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Phytopathology** 72, 936.
- Klement, L., K. Rudolph and D.S. Sands. 1990. **Inoculation of plant tissues, in Methods in Phytobacteriology, Part I**. Identification. Diagnosis. Akademiai Kiado, Budapest (Hungary).
- Kimbrel, J. A., S. Givan, T. Temple, K. Johnsonand and J. H. Chang. 2011. Genome Sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* M081, for insights into pathogenicity and molecular diagnostics. **Molecular Plant Pathology** 12(6):580-94.
- Kim, M.K., J.S. Ryu, Y.H. Lee and H.D. Yun. 2007. First report of *Pantoea* sp. induced soft rot disease of *Pleurotus eryngii* in Korea. **Plant Disease** 91:109.

- Lane, D.J. 1991. **16S/23S rRNA sequencing**, pp. 115-175. In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (Eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York.
- Lazar, J. G. 1994. **Advanced methods in PCR product detection**. *PCR Methods and applications* ;4:S1-S14.
- Lee, B.M., Y.J. Park, D.S. Park, H.W. Kang, J.G. Kim, E.S. Song, I.C. Park, U.H. Yoon, J.H. Hahn, B.S. Koo, G.B. Lee, H. Kim, H.S. Park, K.O. Yoon, J.H. Kim, C.H. Jung, N.H. Koh, J.S. Seo and S.J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice; **Nucleic Acids Research** 33(2):577-586.
- Lena, A.M., P. Giannetti and E. Sporeno. 2005. Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector. **Journal of Gene Medicine** 7:1086-96.
- Leite R.P. Jr., G.V. Minsavage, U. Bonas and R.E. Stall. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology** 60 (4) :1068–1077
- Louws, F. J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 2286-2295.
- Luangviriyasaeng, V. 2003. Eucalypt planting in Thailand, pp. 28-31. In J.W. Turnbull ed. **Eucalypts in Asia, Proceedings of an International Conference Held in Zhanjiang, Guangdong, People's Republic of China**, 7-11 April 2003. Elect Printing, Canberra.

- Lucas, J. A. 1998. **Plant Pathology and Plant Pathogens**, 3rd. Ed. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Madslien, E.H., J.S. Olsen, P.E. Granum and J.M. Blatny. 2012. Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. **BMC Microbiology** 12:230.
- Martin B, O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hackenbeck, D.A. Morrison, G.J. Boulnois and J-P. Claverys. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research** 20:3479-83.
- Mattinen, L., P. Somervuo, J. Nykyri, R. Nissenen, P. Kouvonen, G. Corthals, P. Auvinen, M. Aittamaa, J.P.T. Valkonen and M. Pirhonen. 2008. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. **Microbiology** 154: 2387-2396.
- Melotto, M., J. Koczan, K. Nomura and S.Y. He. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell** 126:969-980.
- Mergaert, J., L.Verdonck and K. Kersters. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia steartii* to the Genus *Pantoea* emend. As *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., Respectively, and Description of *Pantoea stewartii* subsp. Indologenes subsp. nov. Int. J. Syst. **Bacteriology** 43: 162-173.
- Midha, S., M. Ranjan, V. Sharma, A.K. Pinnaka and P.B. Patil. 2012. Genome sequence of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* strain LMG 941. **Journal of Bacteriology** 194(11):3031. doi: 10.1128/JB.00433-12.

- Moreira L.M., N.F. Almeida, N. Potnis, L.A. Digiampietri, S.S. Adi, J.C. Bortolossi, A.C. da Silva, A.M. da Silva, F.E. de Moraes, J.C. de Oliveira, R.F. de Souza, A.P. Facincani, A.L. Ferraz, M.I. Ferro, L.R. Furlan, D.F. Gimenez, J.B. Jones, E.W. Kitajima, M.L. Laia, R.P. Leite, M.Y. Nishiyama, J. Rodrigues Neto, L.A. Nociti, D.J. Norman, E.H. Ostroski, H.A. Pereira, B.J. Staskawicz, R.I. Tezza, J.A. Ferro, B.A. Vinatzer and J.C. Setubal. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics** 11:238. doi: 10.1186/1471-2164-11-238.
- Mwangi, M., M. Mwebaze, R. Bandyopadhyay, V. Aritua, S.J. Eden-Green, W. Tushemereirwe and J. Smith. 2006. Development of a semi-selective medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from insect vectors, infected plant material and soil. **Plant Pathology** (Accepted manuscript PP-06-122. In Press). National Academy of Science.
1980. Firewood Crop: Shrub and Tree Species of Energy Production. Woshington, D.C.
- National Academy of Science. 1980. **Firewood Crop: Shrub and Tree Species of Energy Production**. Woshington, D.C.
- Ochiai H., Y. Inoue, M. Takeya, A. Sasaki and H. Kaku. 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. **Japan Agricultural Research Quarterly** 39: 275–287.
- Old KM, M.J. Wingfield and Z.Q. Yuan. 2003. A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia. **Centre for International Forestry Research**, Jakarta, Indonesia.
- Paccola-Meirelles, L.D., A.S. Ferreira, W.F. Meirelles, I.E. Marriel and C.R.Casela.2001. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in brazil. **Phytopathology** 149: 275-279.

- Pieretti I., M. Royer, V. Barbe, S. Carrere, R. Koebnik, S. Cociancich, A. Couloux, A. Darrasse, J. Gouzy, M.A. Jacques, E. Lauber, C. Manceau, S. Mangenot, S. Poussier, B. Segurens, B. Szurek, V. Verdier, M. Arlat and P. Rott. 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. **BMC Genomics** 10: 616.
- Pomella A.W.V., R.S. Romeiro, F.A. Ferreira and J.R. Oliveira. 1995. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. **Fitopatologia Brasileira** 20:374.
- Pon, D.S., Townsend, C.E., Wessman, G.E., Schmitt, C.G. and Kingsolver, C.H. 1954. A *Xanthomonas parasitic* on uredia of cereal rust. **Phytopathology** 44:707-710.
- Potnis N, K. Krasileva, V. Chow, N.F. Almeida, P.B. Patil, R.P. Ryan, M. Sharlach, F. Behlau, J.M. Dow, M. Momol, F.F. White, J.F. Preston, B.A. Vinatzer, R. Koebnik, J.C. Setubal, D.J. Norman, B.J. Staskawicz and J.B. Jones 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. **BMC Genomics** 12: 146.
- Pomini, A.M., W.L Araujo and A.J. Marsaioli. 2006. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal Chemistry and Ecology** 32, 1769-1778.
- Pousajja, R. 1993. **Eucalypt plantation in Thailand**. Regional Expert Consultation on *Eucalyptus*, 4-8 October 1993, Bangkok. Bangkok, FAO/RAPA.
- Prathuangwong, S., C. Preecha, S. Kasem, J. Thowthampitak and D. Athinuwat. 2005. Integrating *Paenibacillus pabuli* SW01/4 and *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 to control soybean bacterial pustule. **In Proc. of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences (Scientific Meeting)**, Hanoi Agricultural University (HAU), Hanoi.

- Prathuangwong S., S. Kasem, J. Thowthampitak and D. Athinuwat. 2005. Multiple plant response to bacterial mediated protection against various diseases. **Journal of ISSAAS**. 11(3) : 79-87.
- Prathuangwong, S. T. Chatnaparat, W. Pupakdeepan, N. Hemsanit, S. Kasem, H. Hirata and S. Tsuyumu. 2010. Combining *Pseudomonas fluorescens* SP007s product and manure mixed SP007s improves disease control and effects defense related enzymes of rice. **In Proc. of the 2nd Joint Seminar in Asian Core Program**. Khon Kaen. 100.
- Prathuangwong, S., D. Athinuwat and T. J. Burr. 2009. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean is associated with *avrXg1* in *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Race 3. **Phytopatology** 99 (5, Supplement): S104.
- Prathuangwong, S. T. Chatanaparat, D. Athinuwat and S. Kasem. 2010. Expression of *luxR* and *Pip* in specific races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **In Proc. the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. 7-11 June 2010. Saint Denis in Réunion. 92.
- Pruvost, O., P. Roumagnac, C. Gaube, F. Chiroleu and L. Gagnevin. 2005. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. **Journal of Applied Microbiology** 99 (4) : 803-815.
- Pryor, L.D. and L. A. Johnson . 1971. **A Classification of Eucalyptus**. p. 5. Cited by Eldrico K., J. Davidson, C. Hardwood and G. VanWyk. *Eucalyptus Domestication and Breeding*. Clarendon Press, Oxford.

- Qian W., Y. Jia, S.X. Ren, Y.Q. He, J.X. Feng, L.F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D.J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B.L. Jiang, S. Zeng, W.Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G.P. Zhao, J.L. Tang and C. He. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research** 15(6):757-767.
- Rademaker, J. L., W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kersters, J. Swings, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50:665-677.
- Rivadalve, C., L. Douglas, R. Oliveira, A. Maffia, C.M. Cascardo and C.A. Alfenas. 2008. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. **Tropical Plant Pathology** 3:180-188.
- Rohlf, F. J. 1993. **Advances in computer methods for systematic biology**. Johns Hopkins Univ. Press: Baltimore.
- Rossier O., G. van den Ackerveken and U. Bonas. 2000. *HrpB2* and *HrpF* from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology** 38: 828–838.
- Samuel, B.J. and E.L. Arlene. 1987. **Plant Systematics**. McGraw - Hill. Inc., Singapore.
- Schaad, N.W. 2001. **Initial identification of common genera**. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edn. (Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., eds), pp. 1-16. St. Paul, MN: APS Press.

Serrano, F.B. 1928. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. **Philippine science journal** 36: 271-324.

Sharma V., S. Midha, M. Ranjan, A. Pinnaka and P.B. Patil. 2012. Genome sequence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, strain LMG 859. **Journal of Bacteriology** 194:2395.

Stackebrand, E. and B.M. Goebels. 1994. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriology* 44:846-849.

Stall, R.E., L.J. Alexander and C.B. Hall. 1969. Effect of tobacco mosaic virus and bacterial infections on occurrence of graywall of tomato (*Erwinia ananas*). **Florida State Horticultural Society** 81: 157-161.

Sigee, 1993. **Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects**. Cambridge University Press. Cambridge and New York.

Stackebrand, E., and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International journal of systematic bacteriology** 44: 846–849.

Swings J. and E.L. Civerolo. 1993. *Xanthomonas*. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.

Tabai, H., K. Azegami and T. Fukuda. 1988. Infection site of rice grain with *Erwinia herbicola*, the causal agent of bacterial palea browning of rice. *Ann. Phytopathological Society* 54: 637-639.

- Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Buettner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D.H. Nies, U. Niesbach-Kloesgen, T. Patschkowski, C. Rueckert, O. Rupp S. Schneicker, S.C. Schuster, F.J. Vorhoelter, E. Weber, A. Puehler, U. Bonas, D. Bartels and O. Kaiser. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence; **Journal of Bacteriology** 187(21):7254-7266.
- Tiyakhon, C. 2012. **The role of luxR homolog of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* is important for virulent in soybean.** Thesis Ph.D. (Plant Pathology) Kasetsart University.
- Tika, B.A., T.W. Mew and J.E. Leach. 1999. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology** 89: 687-694.
- Towner, K. J. and A. Cockayne. 1993. **Molecular methods for microbial identification and typing**, London.
- Tronsmo, A. 1992. Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological control agents. **In Biological Control of Plant Diseases**, Edited by E.S. Tjamos et al., Plenum Press, New York.
- Truman, R. 1974. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. **Phytopathology** 64:143-144.
- van der Meer, J.R., C.Werlen, S.F. Nishino and J.C. Spain. 1998. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation contaminated groundwater. **Applied and Environmental Microbiolog** 64: 4185-4193.
- Vauterin, L., B. Hoste K. Kersters and J.G. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45: 472-489.

- Vauterin, L., J. Rademaker and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology** 90:677-682.
- Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterium and application to fingerprinting of bacterium genomes. **Nucleic Acids Research** 19: 6823-6831.
- Walcott, R.R., R.D. Gitaitis, A.C. Castro, F.H. Jr. Sanders and J.C. Diaz-Perez. 2002. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. **Plant Disease** 86: 106-111.
- Walcott, R.R., R.D. Gitaitis and A.C. Castro. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology** 93: 528-534.
- Wells, J.M., W-S. Sheng, M.J. Ceponis and T.A. Chen. 1987. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology** 77: 511-514.
- Wattiau, P., ME. Renard, P. Ledent, V. Debois and G. Blackman. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56: 816-819.
- Yoshida, S., L.L. Kinkei, H. Shinohara, N. Numajiri, S. Hiradate, M. Koitabashi, K. Suyama, H. Negishi and S. Tsushima. 2006. Production of quorum-sensing-related signal molecules by epiphytic bacteria inhabiting wheat heads. **Canadian Journal of Microbiology** 52: 411-418.
- Yumiko, T., M. Toshiyuki and C. Yoshiaki. 2005. Bacterial rot of *Allium giganteum* caused by *Erwinia ananas* (= *Pantoea ananatis*), and basal rot of *Belamcanda chinensis* caused by *Aphanomyces* sp. Bull. **Toyama Agricultural Research Center** 22: 1-6.



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient glucose broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Nutrient glucose agar (NA)

Nutrient broth	1000	มิลลิลิตร
วุ้น	15.0	กรัม

เตรียมโดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นวุ้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมหงวุ้นนำไปหลอมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

YDC medium (Yeast extract dextrose calcium carbonate agar)

Dextrose	20.0	กรัม
Yeast	10.0	กรัม
CaCo ₃	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

PA 20 agar

NaCl	20	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม

เติม Bromothymol blue 1 มิลลิลิตร ของ 1.6% aq. และ Crystal violet ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ของ 0.075% aq. ปรับ pH 8.0 โดยใช้ 1.0 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเติม d (+) arabitol 3 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร และสาร thallium nitrate 1% aq ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว

PA 20 agar (modifily)

เตรียมตามสูตร PA 20 เติมน้ำตาล Sorbitol 3 กรัม หรือ glycerol 3 มิลลิลิตร Bromothymol blue 1 มิลลิลิตร ของ 1.6% aq. และ Crystal violet ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ของ 0.075% aq. ปรับ pH 8.0 โดยใช้ 1.0 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเติม สาร thallium nitrate 1% aq 2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว

LB medium

Bacto tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม

เตรียมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NA

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

Motility Test medium

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	5	กรัม

เตรียมอาหารดังกล่าวในปริมาณน้ำ 1000 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหาร ประมาณ 6.8 - 7 เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการ stab เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญออกนอกบริเวณรอยเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

Starch Agar (Starch hydrolysis)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	13	กรัม

เตรียมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้งได้โดยการหยดน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ รอยขีดแสดงว่าเชืื่อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

Nitrate broth (Nitrate reduction)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม

เตรียมอาหารในอัตราส่วน 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อทำการทดสอบโดยการย้ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน หยดสารทดสอบ (α - naphthylamine 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sulphanilic acid 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 N acetic acid อัตราส่วน 1:1) ประมาณ 10 หยด สังเกตการเกิดสีแดง

Simmon' s Sitrage Agar (Citrate utilization)

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัม
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	13	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารที่เตรียม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร (Bromthymol blue) ทุกวัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้

Salt tolerance medium test

เตรียมอาหาร NB ตามวิธีการข้างต้น ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (5 และ 7 เปอร์เซ็นต์) แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

Hydrolysis of Gelatin (gelatin hydrolysis)

Beef extract	10.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

Gelatine	12.0	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ gelatinase ย่อย gelatin เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้องย่อย หลอดเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาแช่ในในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส สังเกตการแข็งตัวของเจลาติน ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้อาหารที่ทดสอบจะไม่แข็งตัว

Christensen's Urea medium (Urease test)

Bacto-peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenol red 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เติมน้ำละลาย Urea เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร เตรียมเป็น slant (aseptic technique)

Christensen's Urea medium (Urease test)

Bacto-peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenol red 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เติมน้ำละลาย Urea เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร เตรียมเป็น slant (aseptic technique)

Tryptone yeast extract broth (Indole test)

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม

เตรียมสารละลายดังกล่าวในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ย้ายเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงในอาหาร Tryptone yeast extract broth ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน เติมน้ำละลายทดสอบ (Kovac's reagent) 0.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ดูการเกิดสีเปรียบเทียบกับ control

Nitrate broth (Nitrate reduction)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม

เตรียมอาหารในอัตราส่วน 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ

Carbon source

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Bromocresl purple	0.7	มิลลิลิตร

(1.5% ethanol solution)

Agar

12.0

กรัม

pH 6.8

เตรียมอาหารใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร เมื่อนึ่งมาเชื้อเสร็จแล้ว เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ให้เตรียมสารละลายความเข้มข้น 5% และทำให้ สารละลายปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรียที่มีเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ยกเว้น คาร์บอนบางชนิดจะต้องผสมในอาหารและนำไปนึ่งมาเชื้อด้วยกัน เช่น starch inulin salisin และ Esculin

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุพันธุศาสตร์

Gram's Crystal violet

สารละลาย ก.

Crystal violet	2.0	กรัม
95% Ethanol	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

Amminium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย ก. และ ข. (crystal violet ใน 95% ethanol 20 มิลลิลิตร และ สารละลาย 1% ammonium oxalate ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร) ผสมสารทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

Safranin solution

Safranin	2.5	กรัม
95% Ethanol	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ใน 95% ethanol แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนี้

Gram's iodine

Crystal iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย Potassium iodine ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Crystal iodine ลงในสารละลาย Potassium iodine ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บใส่ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

Malachite green solution

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร บดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันเติมน้ำกลั่นที่เหลือปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (wathman No.1)

วิธีย้อมเอนโดสปอร์

Smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 4-5 วัน ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง ฟิกซ์ smear โดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ย้อม smear ด้วย malachite green โดยหยดสีให้ท่วมนำสไลด์ไปอังบนไอน้ำเดือด หรืออังบนเปลวไฟ คอยเติมสี malachite green อย่าให้สีแห้ง เป็นเวลานาน 5 นาที ทิ้งสไลด์ให้เย็น จากนั้นนำไปล้างน้ำ แล้วย้อมด้วยสี safranin-0 1 นาที เทสีทิ้งล้างด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์จะติดสีแดงของ safranin-0 ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

สารเคมีสารละลายบัฟเฟอร์

0.1 M sodium phosphate buffer	100.0	มิลลิลิตร
0.2 M KH_2PO_4	39.0	มิลลิลิตร
0.2 M K_2HPO_4	61.0	มิลลิลิตร

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10X Tris buffer-EDTA (TBE)

Tris base	108.0	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
0.5 M EDTA	40.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5M NaCl

NaCl	292.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Lysis buffer

Tris-acetate pH 7.8	40.0	มิลลิโมลาร์
Sodium acetate	20.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์
1% SDS		

10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Chloroform/isoamyl alcohol (24 :1)(100 มิลลิลิตร)

ตัวสาร Chloroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ผสมกับสาร isoamyl alcohol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5X TBE (1 ลิตร)

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	20.0	มิลลิลิตร

Gel loading dye

Bromophenol blue	0.025	กรัม
Glycerol	3.0	กรัม

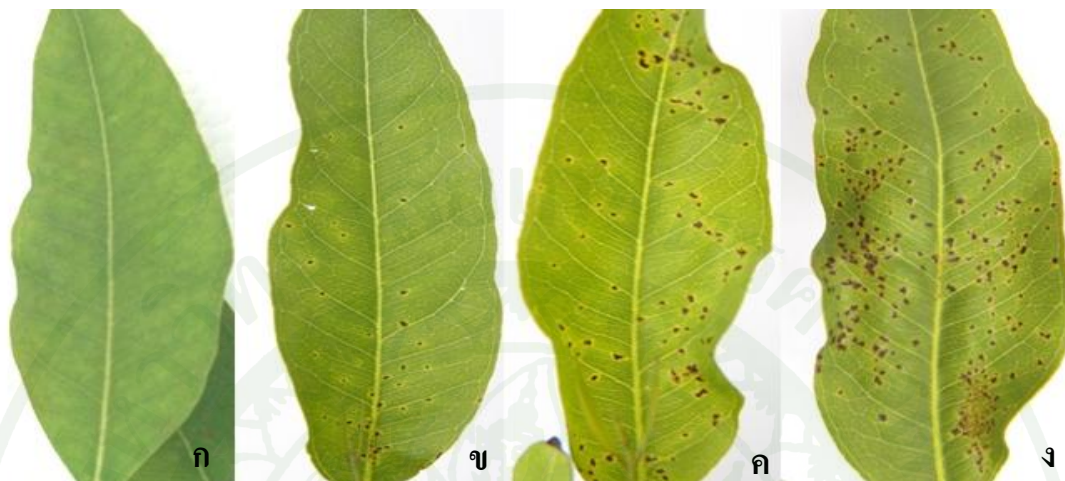
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร กรองตะกอนสีออกด้วยกระดาษกรอง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10 mg/ml Ethidium bromide (EtBr)

EtBr	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย EtBr ในน้ำกลั่น คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer แล้วเก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ง
ภาพประกอบการทำวิจัย



ภาพที่ 34 ระดับความรุนแรงของโรคจากการปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*

ความเสียหายบนพื้นที่ใบแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ ระดับ 0 = ไม่พบอาการโรค 0% (ก)

ระดับ 1 = พบอาการใบจุดเล็กน้อย 1-30% (ข) ระดับ 2 = พบอาการใบจุดปานกลางแผล

จุดกระจาย 31-60% (ค) ระดับ 3 = พบอาการใบจุดรุนแรงถึงไหม้ทั่วไป 61-100% (ง)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ (ภาษาไทย)	นายเทคโนโลยี โพธิ์ลักษณ์
(ภาษาอังกฤษ)	Mr.Techno Pothiluk
วัน เดือน ปี ที่เกิด	12 ธันวาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	หมู่ 5 ต. บางจัก อ. วิเศษชัยชาญ จ. อ่างทอง
ประวัติการศึกษา	ปริญญา วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักศึกษาปริญญาโทและนิสิตผู้ช่วยวิจัยโครงการ การวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคของ ยูคาลิปตัสในระบบผลิตกล้าไม้
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ชั้น 5 ตึกจรัสสุนทรสิงห์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์