



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีด
ข้าวโพด

Identification and Genetic Diversity of Bacterial Leaf Streak of Corn

นามผู้วิจัย นางสาวนันทิยา เตชะติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุฤติ ประเทืองวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, M.S.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D. Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด

Identification and Genetic Diversity of Bacterial Leaf Streak of Corn

โดย

นางสาวนันทยา เตชะติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร)

พ.ศ. 2551

นันทิยา เตชะดิ 2551 : การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีด
ข้าวโพด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์สุฤติ ประเทืองวงศ์, Ph.D, 105 หน้า

ในระยะเวลา 2 ปีที่ผ่านมา พบโรคข้าวโพดที่ปลูกเป็นการค้าแสดงอาการหลายแบบปะปนกัน ได้แก่ การเกิดหรือไม่เกิด
อาการน้ำน้ำ การมีหรือไม่มี halo ล้อมรอบแผล รวมทั้งขนาดและรูปร่างของแผล ซึ่งอาการโดยรวมมีลักษณะคล้ายคลึงโรคใบขีดที่
เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Acidovorax* จึงทำการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุที่แยกได้จากแผลที่แสดงอาการต่าง ๆ ดังกล่าวด้วย
วิธีมาตรฐานทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมี และยืนยันความถูกต้องแม่นยำระดับ species ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสาร
พันธุกรรมบริเวณ 16S-23S rDNA ITS region ตลอดจนศึกษาการเรียงตัวของสารพันธุกรรมของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว ผลการ
ทดลองนี้พบว่าเชื้อสาเหตุที่ส่งมาจากทุกอาการเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนิลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวนวล
เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร บนอาหาร NGA เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค เชื้อสามารถก่อให้เกิดอาการ
เช่นเดียวกับที่พบในสภาพธรรมชาติ เมื่อส่งตัวแทนเชื้อจากกลุ่มที่แสดงลักษณะอาการที่แตกต่างกันนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดี
เอ็นเอที่บริเวณ 16s-23s ITS ของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาด 615 bp ในเชื้อ
ทดสอบทุกสายพันธุ์ และเมื่อนำไปศึกษาการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) พบว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสาย
พันธุ์ Aaa1 Aaa9 Aaa84 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99, 100 และ 99% (% identity) กับ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ FC-320
ต่อมาได้ศึกษายืนยันความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุ โดยใช้เทคนิค rep-PCR พบว่าเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae*
รวม 109 สายพันธุ์ สามารถแยกได้ 2 กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับอาการและระดับความรุนแรงโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าประชากร
เชื้อในกลุ่มแสดงอาการโรคไม่รุนแรงมีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการในกลุ่มพีโนไทป์ A ที่แสดงลักษณะอาการใบขีดสั้น สี
น้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่เรียบ และพันธุกรรมของประชากรเชื้อในกลุ่มแสดงอาการก่อโรครุนแรงมีความสัมพันธ์กับกลุ่มลักษณะ
อาการพีโนไทป์ B ประชากรกลุ่มนี้ ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดน้ำ มี halo ล้อมรอบ ขยายยาวตามเส้นใบ และสัมพันธ์กับกลุ่ม
ลักษณะอาการพีโนไทป์ C ซึ่งข้าวโพดจะแสดงอาการแผลขีดยาวสีน้ำตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำ
ให้แผลเชื่อมติดกันจนเกิดอาการใบไหม้ คิดเป็น 72.4 และ 22.8% ของประชากรเชื้อในกลุ่มรุนแรงตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเชื้อ
A. avenae subsp. *avenae* ทุกสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 750 และ 1000 bp จากไพรเมอร์ BOX และพบว่าใน
กลุ่มพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะขนาด 1500 bp ขณะเดียวกันพบว่าลักษณะทาง
พันธุกรรมของเชื้อสาเหตุที่ได้จากการศึกษาทดลองในครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาและพันธุ์พืชอาศัย นอกจากนี้การ
ทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลเฉพาะของปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อสาเหตุโรคด้านเทคนิคการปลูกเชื้อ พันธุ์พืชต้านทาน และ
สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มีความจำเป็นต่อการเฝ้าระวังการระบาดและการคัดเลือกตลอดจนปรับปรุงพันธุ์ต้านทานและกลยุทธ์
การป้องกันกำจัดโรค โดยนำเชื้อสายพันธุ์ Aaa9 คัดเลือกจาก 109 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุด มา
ทดสอบศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคปลูกเชื้อ 3 วิธี บนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ผลการทดลองพบว่าเทคนิคการปลูกเชื้อด้วยการ
พ่นเซลล์ suspension ของเชื้อสาเหตุโรคและให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง ด้วยการคลุมถุงพลาสติก เป็นวิธีที่เหมาะสม สะดวก
รวดเร็ว และสามารถสังเกตพัฒนาการการเกิดโรคได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น เมื่อนำวิธีนี้มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการคัดเลือก
พันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคใบขีด สามารถแบ่งกลุ่มระดับความต้านทานได้ 3 กลุ่ม คือ พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคต่ำ ได้แก่ พันธุ์
บ้านสวน ชูการ์75 KSSC915 Ki39, Ki40, Ki44, Ki45, Ki32, Ki35, Ki37, Ki38, Ki43, Ki46, Ki49, Ki50 และ Ki กลุ่มพันธุ์ที่มี
ระดับการเป็นโรคปานกลาง ได้แก่ พันธุ์ KSSC904, 14004, ไสบริกซ์10 KSSC604 Ki31, Ki33, Ki36, Ki41, Ki42, Ki47, Ki48,
Ki51, Ki33 และ Ki36 กลุ่มพันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคสูง ได้แก่ พันธุ์ KSSC903, อินทรี2, KSSC901 และ ไสบริกซ์3

Nantiya Techati 2008 Identification and Genetic Diversity of Bacterial Leaf streak of Corn. Master of Science (Agriculture), Major Field : Plant Pathology , Department of Plant Pathology. Thesis Advisor : Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 105 pages.

In the past two years, a bacterial disease of corn exhibited complex symptoms was observed on commercial fields. Infected plants seemed to be a bacterial leaf streak caused by genus *Acidovorax*, but disease development was varied among with or without water soaking and halo, and lesion size and shape. Bacterial isolated and cultured from the lesions were identified using standard physiological and biochemical tests and confirmed by species-specific polymerase chain reaction of the 16S-23S rDNA ITS and DNA sequencing analysis. Gram reaction, aerobic, rod-shaped bacterium that produced creamy white, circular smooth with entire margins, glistening colonies with 1-2 mm in diameter on NGA medium was isolated consistently from those diseased plants. Pathogenicity tests established symptoms similar to those observed on corn plants in the fields. Confirming the 16S-23S ITS PCR analysis resulted in fragment about 615 bp belonging to *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* from all randomly representative strains of different symptoms and result of DNA sequencing of Aaa1, Aaa9 and Aaa84 representative isolates have been 99, 100 and 99% identity with *A. avenae* subsp. *avenae* FC-320, resembling bacterial leaf streak approaches. The strains were also identified in term of their DNA fingerprinting profiles using repetitive-PCR analysis. Result showed the existence of two differentiated groups within 109 strains of *A. avenae* subsp. *avenae*, one included non-aggressive strains group that were more associated with phenotypic symptoms: short streak lesions and irregular margin (Group A). The other groups as aggressive strains that consisting of strains that were usually associated with phenotypic symptoms: long streak lesions, water soaking and haloes parallel with leaf vein (Group B) and long streak lesions and leaf blight observed (Group C). The fingerprints were distinctly different by BOX primer that 1500 bp was detected by strains belonging to Group B and C (72.4 and 22.8% respectively), and 750 and 1000 bp belonging to all group. These strain groups were not associated with either geographic distribution or corn cultivars. The investigation of specificity between host-parasite interaction including pathogen strain, inoculation technique, resistance germplasm and favored condition is necessary for monitoring epidemics, breeding material, and control strategy. The three methods of inoculation techniques were studies using the most virulence strain Aaa9, and cv Insee2 with varying inoculation periods. The inoculation method on 7 days old plant with 48-h bacterial suspension, handle spray and covered with plastic bag for 48-h, has been resulted in significantly highest level of disease severity ($p \leq 0.05$). This developed method was use to evaluate the 33 sweet and field corn cultivars that could be identified their resistance level into 3 groups including group I: Sugar75, Ban-Souan, KSSC915, Ki39, Ki40, Ki44, Ki45, Ki32, Ki35, Ki37, Ki38, Ki 43, Ki46, Ki49, Ki 50 and Ki52; group II: Hybrid10, KSSC904,14004, Ki31, Ki33, Ki36, Ki41, Ki42, Ki47, Ki48, and Ki51; and group III: KSSC903, Insee2, KSSC901 and Hybrid3 showed resistant, moderately resistant, and susceptible infection by *A. avenae* subsp. *avenae* respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านการงานวิจัย ตลอดจนการใช้
ชีวิตอยู่ร่วมกันในสังคม พร้อมทั้งแนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดระยะเวลาระหว่าง
การศึกษาดำเนินงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศิริ แสงโชติ กรรมการ
ร่วมสาขาวิชาเอก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศาวิตร ตรีภูมิตัดสิน กรรมการร่วมสาขาวิชา
รอง ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณอาจารย์ประชุม จุฑาวรรณะ ที่คอยให้คำปรึกษาและแนะนำสถานที่ในการเก็บ
รวบรวมตัวอย่างโรค และขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สรรเสริญ จำปาทอง อาจารย์ ดร. โชคชัย เอกทัต
นารวรรณ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์เมล็ด
พันธุ์ข้าวโพด และ พี่จิรนนท์ แหยมสูงเนิน ที่อำนวยความสะดวกช่วยเหลือในระหว่างที่ทำงาน
วิจัยและการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคในศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติและไร่เกษตรกร
และขอขอบคุณอาจารย์ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียและ
ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอบคุณอาจารย์ ดร.สุพจน์ กาเข้ม และ ดร. ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ ที่ให้กำลังใจทั้งการ
เรียน และงานวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่บุคลากรภาควิชาโรคพืช พี่ ๆ และ
น้อง ๆ ชาวโรคพืชทุกคน และพี่จันทร์เพ็ญ ภาควิชาจุลชีววิทยาที่มอบความเป็นมิตรและเป็น
กำลังใจในการเรียนและการทำวิจัยมาโดยตลอด

และที่สำคัญยิ่งประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใดขอบแต่
คุณพ่ออินสม เตชะดี คุณแม่บัวเขียว อุดทาปง น้องทศพล เตชะดี คุณอาณิษกานต์ เตชะดี คุณอา
อัมพวัน และคุณอาสุเทพ จันทาพูน และ ดร. จิรายุ ทัพพุม ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่ง
สอนให้มีความรู้มา ณ ปัจจุบัน

นันทิยา เตชะดี

ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	38
ผล	38
วิจารณ์	70
สรุป	79
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	81
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	90
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ	94
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทาง	
สรีระวิทยา ชีวเคมี และอนุพันธุศาสตร์	98
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	104

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 พันธุ์ข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ที่ทดสอบระดับความต้านทานต่อโรคใบ ขีดแบคทีเรีย	36
2 การประเมินลักษณะความต้านทานที่ประเมินจากลักษณะอาการโรค ความ รุนแรงโรคและระยะเวลาการแสดงอาการโรค	37
3 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด ที่เก็บรวบรวมและแยกจาก ตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบขีด และลักษณะอาการของโรคที่ ทดสอบ ในระดับห้องปฏิบัติการที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ	40
4 สันฐานวิทยา สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง	49
5 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Aaa1 เปรียบเทียบกับนิว คลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST GenBank (accession number of comparative strain)	56
6 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Aaa 9 เปรียบเทียบกับนิว คลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST GenBank (accession number of comparative strain)	56
7 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Aaa84 เปรียบเทียบกับนิว คลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST GenBank (accession number of comparative strain)	57
8 การประเมินระดับความต้านทานของข้าวโพดหวานต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย ข้าวโพด ที่เกิดจากเชื้อคล้าย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ในระดับ ห้องปฏิบัติการ	66
9 การประเมินระดับความต้านทานของข้าวโพดไร่ต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อคล้าย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ในระดับ ห้องปฏิบัติการ	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังการสุ่มเลือกเก็บตัวอย่างโรคใบขีดข้าวโพด โดยสุ่มเก็บจำนวน 39 จุด ภายในพื้นที่ 1 ไร่ โดยแต่ละจุดมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างโรค จำนวน 5 จุด แบบ W วนซ้าย ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีของ Delp <i>et al.</i> , 1986	22
2	แสดงการประเมินระดับความรุนแรงของโรคใบขีดแบคทีเรีย ประยุกต์วิธีการ ประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการ เกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของ พื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบน ใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ ใบ	28
3	แสดงลักษณะอาการใบขีดข้าวโพด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มลักษณะอาการฟิ โนไทป์ชนิด A ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดสั้น สีนํ้าตาลอ่อน ขนาดแผลยาว ประมาณ 5-10 ซม. และกว้างประมาณ 2-3 ซม. กระจายทั่วใบข้าวโพด (ก) กลุ่ม ลักษณะอาการฟิโนไทป์ชนิด B ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดนํ้านํ้า ขยายยาวตาม เส้นใบ (ข) กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ชนิด C ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดยาวสี นํ้าตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำให้แผลเชื่อม ติดกันจนเกิดอาการใบไหม้ (ค)	39
4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่เจริญบนอาหารกึ่ง จำเพาะ sorbitol neutral red (SNR) ที่มีลักษณะโคโลนี สีขาวใส กลม นูน ขอบ เรียบเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ก) และลักษณะโคโลนีสีขาวนูน กลม นูน ขอบเรียบ บนอาหาร NGA (ข)	46
5	ลักษณะและรูปร่างเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดโอโซเลทที่ Aaa9 การทดสอบ แกรมด้วยวิธี Gram's strain พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (shot rod) เป็นแกรมลบ ติดสีแดงของ safranin-o (ก) และรูปร่างเซลล์และตำแหน่งของ แฟลกเจลลาแบบ monotrichous flagella ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(transmission electron microscope : TEM)	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
6	แสดงอาการแผลไหม้ ที่เกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบหลังทดสอบ 24 ชั่วโมง ของเชื้อแบคทีเรียโอโซเลท Aaa1 Aaa9 Aaa12 และ Aaa84 เปรียบเทียบกับ control ที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 51
7	แสดงอาการโรคใบขีดขาวโพดโอโซเลท Aaa9 เกิดโรคที่ 4 วันหลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการหยด suspension ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนข้าวโพดหวานพันธุ์อ่อนแอ อินทรี2 โดย: ข้าวโพดปกติ (ก) ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดขาว น้ำน้ำขนานตามเส้นใบ ซึ่งแสดงลักษณะอาการฟิโนไทป์ B (ข) และแสดงอาการทั้งต้น (ค) 52
8	การตรวจสอบเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 16s-23s rDNA ITS region บน 0.8% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder: ช่องที่ 1-3 = เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดโอโซเลท Aaa1 Aaa9 Aaa84 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 615 bp จำนวน 1 แถบ 55
9	การวิเคราะห์ Phylogeny ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S-23S ITS region ขนาด 615 bp ของแบคทีเรีย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> โอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank แบคทีเรียโอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 มีความเหมือน 99 100 และ 99 เปอร์เซ็นต์ กับ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> สายพันธุ์ FC-320 57
10	การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ AcAVF และ AcAVR ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S ITS บน 0.8% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder: lane 1= เชื้อแบคทีเรีย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> โอโซเลท Aaa9 ; lane 2 = เชื้อแบคทีเรีย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> ; lane 3 = เชื้อแบคทีเรีย <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ; lane 4 = เชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i> ; lane 5 = เชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกจากใบข้าวโพด 58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวแทนกลุ่มเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ที่แสดงลักษณะความรุนแรงโรค 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่แสดงอาการโรครุนแรง (Aaa14, Aaa15,Aaa35, Aaa51 และ Aaa80) และกลุ่มที่แสดงอาการโรคไม่รุนแรง (Aaa37, Aaa40, Aaa11, Aaa86 และ Aaa 101) จากไพรเมอร์ REP ERIC และ BOX บน 1.5% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder ; lane 1-10= Aaa14, Aaa15,Aaa35, Aaa51, Aaa80,Aaa37, Aaa40, Aaa11, Aaa86 และ Aaa 101 61
12	ภาพ dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพันธุกรรมเชื้อและการจัดกลุ่มทางฟีโนไทป์ของลักษณะอาการโรคใบขีดแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> รวม 109 ไอโซเลท ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ภาพ dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพันธุกรรมเชื้อและการจัดกลุ่มทางฟีโนไทป์ของลักษณะอาการโรคใบขีดแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> รวม 109 ไอโซเลท ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Treeconw สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 แสดงอาการโรครุนแรง ประกอบประชากรเชื้อที่แสดงอาการโรคลักษณะฟีโนไทป์ B และ C และกลุ่มที่ 2 แสดงอาการโรคไม่รุนแรง ประกอบด้วยประชากรเชื้อที่แสดงอาการโรคลักษณะฟีโนไทป์ A และ B 62
13	ลักษณะอาการโรคใบขีดบนข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 14 วัน ที่ความรุนแรงของโรคระดับต่าง ๆ ด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรควิธีที่ 1 ที่ให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง : แสดงอาการรุนแรงของโรค 10% ของพื้นที่ใบ (ก) แสดงอาการรุนแรงของโรค 25% ของพื้นที่ใบ (ข) แสดงอาการรุนแรงของโรค 50% ของพื้นที่ใบ ขึ้นไป จนกระทั่งแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น (100%) (ค) และข้าวโพดปกติที่ใช้น้ำกลั่นแทนการปลูกเชื้อ (ง) 64

การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคราใบขีด ข้าวโพด

Identification and Genetic Diversity of Bacterial Leaf Streak of Corn

คำนำ

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีแหล่งปลูกกระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ ซึ่งจะทำให้ผลผลิตดีที่สุดในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนและ/หรือระบบชลประทานที่เหมาะสม สำหรับพื้นที่ปลูกข้าวโพดทั่วโลกมีประมาณ 915 ล้านไร่ มีผลผลิตรวม 826.9 ล้านตัน ซึ่งประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดของโลก รองลงมาได้แก่ จีน บราซิล เม็กซิโก และอาร์เจนตินา (สำนักงานเศรษฐกิจ, 2550) สำหรับประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดในเชิงพาณิชย์มานานกว่า 40 ปี มีพื้นที่ปลูก 8.683 ล้านไร่ ผลผลิตโดยรวม 3,842 ล้านตันต่อปี ปัจจุบันปริมาณผลผลิตข้าวโพดไม่เพียงพอต่อความต้องการในประเทศซึ่งมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทุกปี ในขณะที่ศักยภาพในการผลิตยังมีขอบเขตจำกัดทั้งทางด้านพันธุ์พืช เทคโนโลยีการผลิต และพื้นที่ปลูก นอกจากนี้ปัญหาหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ปริมาณผลผลิตข้าวโพดต่อพื้นที่อยู่ในเกณฑ์ต่ำ คือ การถูกรบกวนจากศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะการเกิดโรคระบาดของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ได้แก่ โรคใบไหม้แผลเล็ก (southern leaf blight) โรคใบไหม้แผลใหญ่ (northern leaf blight) โรคราน้ำค้าง (downy mildew) โรคราสนิม (rust) โรคกาบและใบไหม้ (banded leaf and sheath blight) โรคใบจุด (leaf spot) โรคราเขม่าดำ (smut) โรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* f.sp. *zeae* (สุคฤดี, 2518) โรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย (bacterial stalk rot) และโรคเหี่ยว (Stewart's wilt) ที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanthemi* และ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ตามลำดับ (สุคฤดี และคณะ, 2547; Jeamvijit et al., 2005) โรคใบขีดของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (นันทยา และคณะ, 2550) โรคไวรัสใบด่างลาย เกิดจากเชื้อ sugarcane mosaic virus (SCMV) โรคใบด่างแฉะ เกิดจากเชื้อ maize dwarf mosaic virus (MDMV) (พิสสุวรรณ และคณะ, 2549) โรคใบด่างแถบขาว เกิดจากเชื้อ brome mosaic virus (BMV) และโรค maize rough dwarf เกิดจากเชื้อ maize rough dwarf (MRDE) (Sontirat, 1994) ตามลำดับ เชื้อสาเหตุเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตข้าวโพดเนื่องจากสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และโรคบางชนิดสามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะโรคแบคทีเรียในข้าวโพดที่นับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตและการส่งออกในปัจจุบัน และมีแนวโน้มที่เป็นปัญหารุนแรงต่อเนื่องใน

อนาคต เนื่องจากขาดแคลนวิธีการในการควบคุมป้องกันกำจัด และข้อจำกัดของการใช้สารเคมี เป็นเหตุให้เชื้อแบคทีเรียสามารถพัฒนาการระบาดได้อย่างกว้างขวางและรุนแรงมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันโรคแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สำคัญหรือไม่เคยพบระบาดในประเทศไทยกลับทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การแพร่ระบาดของโรคพืชชนิดต่าง ๆ เป็นกลไกที่ยู่ยากซับซ้อน เนื่องด้วยมีปัจจัยที่ผันแปรได้มาเกี่ยวข้อง เช่น ชนิดและพันธุ์ของพืช สายพันธุ์เชื้อโรค และสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นดิน หรือ สภาพอากาศ ถ้าแหล่งปลูกพืชแตกต่างกัน สภาพแวดล้อม และบทบาทของสาเหตุโรคแต่ละชนิดก็จะเปลี่ยนแปลงไป (สุทธติ และคณะ, 2547) ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงได้ศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม และการระบาดของเชื้อสาเหตุโรค โดยเฉพาะโรคใบขีดของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการโรคพืชและป้องกันกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพด
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพด
3. พัฒนาวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคใบขีด

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของข้าวโพดหวาน

ข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความจำเป็นต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์ในชีวิตประจำวัน ในด้านของอาหาร มนุษย์มีการบริโภคและใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้าวโพดในรูปของข้าวโพดฝักสด (ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดเทียน และข้าวโพดข้าวเหนียว) ข้าวโพดแปรรูปบรรจุกระป๋อง ครีมข้าวโพด น้ำมันปรุงอาหาร กาว และน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ข้าวโพดฝักสดที่สำคัญต่อเศรษฐกิจโลกและของประเทศไทย ได้แก่ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดฝักอ่อน สำหรับข้าวโพดเทียนและข้าวโพดข้าวเหนียวยังเป็นพืชที่นิยมบริโภค แต่ยังคงอยู่ในระดับท้องถิ่นตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยเท่านั้น โดยเกษตรกรยังไม่นิยมปลูกเป็นการค้าเพื่อส่งขายในระดับอุตสาหกรรม

ปัจจุบันข้าวโพดหวานจัดได้ว่าเป็นพืชอายุสั้นที่ให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรผู้ปลูกค่อนข้างสูง สามารถจำหน่ายได้ในตลาดบริโภคสดและโรงงานอุตสาหกรรม ผลผลิตข้าวโพดหวานประมาณร้อยละ 50 จะถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ ในปี 2550 มีปริมาณ 320,198 ตัน คิดเป็นมูลค่า 701,234 ล้านบาท ซึ่งจัดอยู่ในลำดับที่ 3 ของประเทศผู้ส่งออกข้าวโพดหวานของตลาดโลก รองจากฮังการี และสหรัฐอเมริกา (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550) นอกจากนี้พบว่าปี 2550 ประเทศไทยได้ส่งออกในรูปของข้าวโพดหวานฝักสดและต้ม (แช่แข็ง) เป็นมูลค่า 220,311,320 บาท โดยมีประเทศญี่ปุ่นเป็นลูกค้าอันดับ 1 รองลงมา ได้แก่ ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา เป็นข้าวโพดหวานแปรรูป 527,409,072 บาท นอกจากนี้ยังส่งออกเป็นเมล็ดข้าวโพดหวานมูลค่า 136,007,354 บาท (กรมศุลกากร, 2550) ซึ่งปัจจุบันปริมาณผลผลิตข้าวโพดไม่เพียงพอต่อความต้องการในประเทศซึ่งมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทุกปี ในขณะที่ศักยภาพในการผลิตมีขอบเขตจำกัดทั้งทางด้านพันธุ์พืช เทคโนโลยีการผลิต และพื้นที่ปลูก ปัจจัยหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ปริมาณผลผลิตข้าวโพดต่อพื้นที่อยู่ในเกณฑ์ต่ำ คือ การถูกรบกวนจากศัตรูพืชต่าง ๆ ในช่วงปี 2546-2549 มีการศึกษาพบว่าปัญหาสำคัญอันดับต้นของการผลิตข้าวโพดหวาน คือ โรคข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และโรคไวรัส ที่แพร่ระบาด สูงถึง 30-90% (พิสวรณ์ และคณะ, 2549 : สุดฤดี และคณะ 2547) ซึ่งทำความเสียหายอย่างหนักแก่ผลผลิตข้าวโพดของประเทศไทย

2. โรคที่สำคัญของข้าวโพดหวาน

ปัญหาโรคพืช (plant disease) นับเป็นปัญหาหลักที่สำคัญของการผลิตพืชรวมทั้งการผลิตข้าวโพดหวาน เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อศักยภาพการผลิตทั้งทางด้านคุณภาพ (quality) และปริมาณ (quantity) ซึ่งการเกิดและการระบาดของโรคข้าวโพด จะมีความผันแปรแตกต่างกันไปตามสภาพปัจจัยการปลูกพืช ได้แก่ ชนิดและพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ปลูก สภาพแวดล้อมหรือพื้นที่ปลูก และการดูแลรักษา ชนิดโรค ความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคและโอกาสในการแพร่ระบาดของโรค เป็นต้น

ปัจจุบันพบว่า สถานการณ์การระบาดของโรคข้าวโพดบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายประการ คือ สภาพอากาศ หรือสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงส่งผลต่อการพัฒนาการและการปรับตัวของเชื้อสาเหตุโรค การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กรรมของข้าวโพด และระบบการปลูกข้าวโพดที่มีผลต่อการปรับตัวของเชื้อสาเหตุ หรือการระบาดจากแหล่งอื่น เป็นต้น ทำให้โรคข้าวโพดบางชนิด เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ โรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanthemi* subsp. *zeae* โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* (สุตฤดี และคณะ, 2547) และโรคใบขีดของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* (นันทิยา และคณะ, 2550) ซึ่งแต่เดิมไม่มีความสำคัญหรือไม่เคยพบการระบาดในประเทศไทยมาก่อน ซึ่งกลับมาระบาดและทำความเสียหายกับข้าวโพด และมีแนวโน้มเป็นโรคระบาดสำคัญชนิดใหม่ต่อไป สำหรับในปัจจุบันโรคสำคัญที่ทำความเสียหายกับการผลิตข้าวโพดหวาน ได้แก่

2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew)

เชื้อสาเหตุ *Peronosclerospora sorghi*

ลักษณะของเชื้อราจะมีก้านชูสปอร์ตั้งตรง แผ่ขยายออกด้านปลาย สีใส แทงทะลุออกมาจากปากใบข้าวโพดแบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มจากใต้ใบและด้านบนของใบ สปอร์สีขาวหรือสีขาว

ลักษณะอาการ

อาการเฉพาะแห่งพบในระยะต้นกล้า จะเกิดจุดสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนบนใบเลี้ยงและใบจริงสองสามใบแรก ต่อมาจุดแผลจะขยายออกเป็นทางสีขาวขนานตามเส้นใบ ข้าวโพดจะเกิดอาการแคะแกระอย่างรุนแรง และอาจทำให้ต้นกล้าแห้งตายในที่สุด ส่วนอาการแบบทั้งต้น จะพบได้ในทุกระยะเจริญของข้าวโพด โดยใบที่ผลิออกมาจะเกิดเป็นทางหรือแถบสีเขียวอ่อน เขียวปนเหลืองหรือสีขาว ตามความยาวของใบจากโคนถึงด้านปลายใบ แถบดังกล่าวนี้ขอบจะไม่เรียบ ความกว้างไม่แน่นอน แผลอาจขยายจนกันเป็นปื้นใหญ่คลุมพื้นที่ถึงครึ่งหรือเต็มใบ ความยาวอาจขาดเป็นช่วงหรือติดต่อกัน

วงจรโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

เชื้อราจะพักตัวโดยสร้าง oospore ที่มีผนังหนา รูปร่างยาวรี สีใส ผนังสีเหลือง ฝังตัวอยู่ในเนื้อใบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารในเศษซากหรือในดิน เพื่ออยู่ข้ามฤดูและถ่ายทอดติดไปกับเมล็ดได้เป็นเวลานานหรืออาจอยู่บนพืชอาศัยอื่น เช่น ข้าวฟ่าง หรือหญ้าชนิดต่าง ๆ เมื่อสภาวะอากาศเหมาะสม คือ อุณหภูมิต่ำประมาณ 20-26 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสูง หรือมีน้ำค้างจัด เชื้อราจะสร้าง conidia เป็นผงหรือขุยสีขาว ๆ กระจายบนใบบริเวณที่เกิดโรค ซึ่งผงสปอร์นี้จะเป็นแหล่งก่อโรคใหม่ (secondary inoculum) ที่สามารถแพร่กระจายและก่อให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรง ตามประวัติการแพร่ระบาด โรคนี้จะเริ่มระบาดตอนต้นฤดูฝนประมาณเดือนพฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม ไปจนถึงต้นฤดูฝนเมื่อฝนตกต้องตามฤดูกาล

2.2 โรคราสนิม (Rust)

เชื้อสาเหตุ *Puccinia polysora*

สปอร์ที่พบมากในต้นข้าวโพดเป็นโรคและแพร่ระบาดได้ดีคือ uredospore มีสีเหลืองทอง รูปร่างกลมรี ผนังสีเหลืองหรือสีทองบางและเป็นหนาม เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจะสร้าง teliospore เพื่ออยู่ข้ามฤดู รูปร่างกลมหรือทรงกระบอก หัวท้ายมน

ลักษณะอาการ

จะเกิดแผลเป็นตุ่มสีน้ำตาลแดงนูนจากผิว ลักษณะค่อนข้างกลมถึงรูปไข่ แต่ละแผลยาวประมาณ 0.2 – 0.5 มิลลิเมตร ตุ่มแผลนี้จะปรากฏให้เห็นทั้งสองด้านของใบ แผลที่นูนออกมาคือ กลุ่มสปอร์ของเชื้อสาเหตุ (uredial stage) ซึ่งจะสร้างขึ้นภายใต้ผิวพืช เมื่อเกิดมากเข้าก็จะคัน

โป่งออก และเมื่อเจริญเต็มที่ตรงกลางแผลก็จะแตกแยก สปอร์จะถูกลมพัดพาแพร่ระบาดไปเป็นระยะทางไกล ๆ ใบข้าวโพดที่เกิดแผลมากจะซีดเหลืองและแห้งตาย

วงจรโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

เชื้อจะแพร่ออกไปจากบริเวณที่เกิดโรคเริ่มต้น (primary inoculum) เช่น แผลที่ใบ แผลที่กาบใบ และเปลือกหุ้มฝัก เมื่อเชื้อปลิวไปตกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับเชื้อโรคก็จะทำให้ข้าวโพดต้นใหม่เป็นโรคได้ (secondary inoculum) เชื้อสาเหตุสามารถพักตัวหรืออาศัยในพืชอื่น ซึ่งเป็นพืชอาศัยชั่วคราว (lateral host) และพืชอาศัยที่ทำให้เชื้อเจริญครบชีพจักร (alternate host) เมื่อมีการปลูกข้าวโพดในฤดูถัดไปและมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะปลิวจากพืชอาศัยกลับมาที่ข้าวโพดและก่อให้เกิดโรครุนแรงได้อีก สปอร์เชื้อโรคราสนิมสามารถปลิวไปได้ไกล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของ uredospore คือ 23-28 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 13 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส การงอกของสปอร์จะลดลง

2.3 โรคใบไหม้แผลเล็กของข้าวโพด (Southern leaf blight)

เชื้อสาเหตุ *Bipolaris maydis*

เชื้อมีสปอร์ยาวโค้ง ปลายเรียวมน ไม่มี hilum สีเขียวมะกอก มีผนังกัน 3-13 เซลล์ การงอก germ tube ออกทางปลายทั้งสองด้าน เมื่อนำใบข้าวโพดเป็นโรคมานำที่ความชื้น ในอุณหภูมิห้องจะสร้างสปอร์ในเวลา 24-48 ชั่วโมง ก้านชูสปอร์ยาว เจริญออกมาจากปากใบ

ลักษณะอาการ

ระยะแรกเกิดจุดเล็ก ๆ สีเขียวอ่อนจาง ๆ ต่อมาจุดจะขยายออกตามความยาวของใบ โดยจำกัดด้านกว้างของแผลขนานไปตามเส้นใบ ตรงกลางแผลจะมีสีเทา ขอบแผลมีสีเทาน้ำตาล ขนาดของแผลไม่แน่นอน แผลที่ขยายใหญ่เต็มที่มียาวกว้าง 6 – 12 มิลลิเมตร และยาว 6 – 27 มิลลิเมตร อาการของโรคเมื่อเกิดในต้นระยะกล้าจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันทุกใบ อาจจะเหี่ยวและแห้งตายภายใน 3 – 4 สัปดาห์หลังปลูก แต่ถ้าเกิดกับต้นแก่อาการจะเกิดบนใบล่าง ๆ ก่อน นอกจากจะเกิดบนใบแล้วยังเกิดกับต้น กาบใบ ฝักและเมล็ด

วงจรโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

สปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายทางลม ผ่น จากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นอื่นๆ และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่มาจากต้นที่เป็นโรคในลักษณะปนเปื้อน เมื่อสปอร์ปลิวไปเข้าทำลายพืชจนเกิดแผลก็จะสามารถสร้างสปอร์เพิ่มอีกมากมายแพร่กระจายในแหล่งปลูกข้างเคียง ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือ ความชื้นสูง อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 20-32 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้หลายครั้งในแต่ละฤดู จากสปอร์ใหม่ที่เกิดขึ้นแพร่กระจายไปกับลม และฝนแล้วเข้าทำลายข้าวโพดอีกหลายรอบ เชื้อราสามารถมีชีวิตได้ในใบข้าวโพดนานถึง 8 เดือนและมีชีวิตในเมล็ดข้าวโพดได้นานกว่า 1 ปี นอกจากนี้ยังพบว่าหญ้าเดือยเป็นพืชอาศัยของเชื้อราชนิดนี้

2.4 โรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด (Northern leaf blight)

เชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum*

สปอร์มีสีเขียวอมเทา ขาวเรียวหัวท้ายแหลม ส่วนกลางกว้างโค้งเล็กน้อย มีผนังกัน 3-8 เซลล์ มีฐานสปอร์สีเข้มชัดเจน การงอกออกทางปลายของสปอร์ ก้านชูสปอร์สีเขียวมะกอกมีผนังกัน 2-4 เซลล์ เมื่อนำตัวอย่างโรคมานับที่ความชื้นจะสร้างสปอร์ได้ดี

ลักษณะอาการ

เกิดได้ทุกส่วนของลำต้นโดยเฉพาะบนใบ นอกจากนั้นยังพบที่กาบใบ ลำต้น และฝัก โดยเกิดเป็นแผลมีขนาดใหญ่อันยาว หรือสีน้ำตาลแผลมีลักษณะยาวตามใบ หัวท้ายเรียวคล้ายรูปกระสวย แผลมีขนาดระหว่าง 2.5 – 20.0 เซนติเมตร แผลที่เกิดบนใบอาจเกิดเดี่ยว ๆ หรือหลายแผลซ้อนรวมกันขยายเป็นขนาดใหญ่ ถ้าแผลขยายรวมกันมาก ๆ จะทำให้ใบแห้งตายได้ ในสภาพไร่พบที่ส่วนล่างของข้าวโพดก่อนแล้ว อาการของโรคจะพัฒนาไปส่วนบนของต้นข้าวโพด เมื่อมีความชื้นสูงเชื้อราจะสร้างสปอร์สีดำบนแผลและขยายออกเห็นเป็นวงชั้น โรคนี้พบตลอดฤดูเพาะปลูก พันธุ์อ่อนแออาการรุนแรงทำให้ผลผลิตลดลงได้

วงจรโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

เชื้อราจะสร้างสปอร์บนแผล และแพร่ไปโดยลม ผ่น เมื่อมีความชื้น สปอร์จะงอกเข้าทำลายใบข้าวโพดและแสดงอาการของโรคในส่วนอื่น ๆ ต่อไป โรคจะเป็นรุนแรงในสภาพที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิสูงประมาณ 18-27 องศาเซลเซียส โรคนี้พบได้ตลอดฤดูเพาะปลูก พันธุ์

อ่อนแออาการรุนแรงทำให้ผลผลิตลดลงได้ ถ้าเข้าทำลายพืชก่อนออกดอกทำให้ผลผลิตสูญเสียมาก แต่ถ้าเข้าทำลาย 6-8 สัปดาห์หลังจากข้าวโพดออกดอกแล้วไม่มีผลกระทบต่อผลผลิต เชื่อสามารถอยู่ข้ามฤดูในเศษซากพืชในรูปของสปอร์ผนังหนา (chlamydospore)

2.5 โรคไวรัสใบด่างลาย (Sugarcane Mosaic Virus)

เชื้อสาเหตุ Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)

อนุภาคของเชื้อไวรัสมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกล และเพลี้ยอ่อน

ลักษณะอาการ

ใบเหลืองซีดทั่วทั้งใบหรือเป็นจุดสั้น ๆ ยอดอ่อนมีสีเหลืองต้นแคระแกรน ถ้าเชื้อเข้าทำลายต้นข้าวโพดที่โตแล้วฝักจะไม่สมบูรณ์ ซึ่งลักษณะอาการคล้ายโรคน้ำค้าง แต่ใบข้าวโพดที่เป็นราน้ำค้างจะพบผงสีขาวของสปอร์ได้ใบในเวลาเช้า หากอาการรุนแรงทำให้เกิดอาการไหม้บนใบ ลำต้น ช่อดอก ฝัก และฝักไม่ติดเมล็ด

2.6 โรคไวรัสใบด่างประจุดเหลือง (Maize Chlorotic Mottle Virus)

เชื้อสาเหตุ Maize Chlorotic Mottle Virus (MCMV)

ลักษณะอาการ

ใบและยอดไหม้ ฝักหดสั้น และผลผลิตลดลง ถ้าเชื้อไวรัสเข้าทำลายในระยะ 30 วันแรกของการปลูกจะทำให้ผลผลิตเสียหายมาก เนื่องจากการผสมไม่ติดและฝักไม่พัฒนาอย่างสมบูรณ์

2.6 โรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย (Bacterial stalk rot)

เชื้อสาเหตุ *E. chrysanthemi* subsp. *zeae*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) มีขนาดระหว่าง 0.6-0.9 x 0.8-1.7 ไมครอน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาหลายรอบตัว (peritrichous flagella) ไม่สร้างแคปซูล ไม่ติดสี ย้อมที่เป็นกรด การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) สร้างโคโลนีสีขาวอมเทา นูน วาว

เรียบ ขอบสม่ำเสมอ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ pH 6.5 นาน 3-6 วัน โคโลนีจะมีลักษณะคล้ายไข่ดาว โดยตรงกลางโคโลนีจะมีลักษณะกลม นูน สีเหลืองเข้ม ล้อมรอบด้วยโคโลนีสีขาว

ลักษณะอาการ

พบอาการใบไหม้จากปลายใบมาที่โคนใบ ยอดข้าวโพดมีสีซีด เหี่ยวเฉา ต่อมาลุกลามเป็นยอดเน่า บริเวณข้อเหนือดินเป็นรอยฉ่ำน้ำสีน้ำตาล เมื่อผ่าดูพบท่อลำเลียงเป็นสีน้ำตาล เนื้อเยื่อภายในถูกย่อยสลาย มีเมือกไหลเยิ้มกลืนเหนียว ในที่สุดต้นหักล้มพับ หากพบในช่วงติดฝักจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์และลีบ

วงจรโรคและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

เชื้อสาเหตุโรสดังกล่าวจะเข้าทำลายและทำความเสียหายกับต้นข้าวโพด โดยจะเริ่มเข้าทำลายเมื่อข้าวโพดอายุ 3 สัปดาห์ หากโรคเข้าทำลายในระยะก่อนออกดอกจนถึงระยะออกดอก ต้นจะตายอย่างรวดเร็ว และจะระบาดรุนแรงในสภาพอากาศร้อนและมีความชื้นสูงติดต่อกัน หรือในสภาพที่ข้าวโพดอ่อนแอ รวมถึงการได้รับธาตุอาหารไม่สมดุล เช่น การได้รับธาตุไนโตรเจนสูงจะทำให้ความรุนแรงของโรคสูงขึ้น

3. โรคใบขีดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในข้าวโพด (Bacterial leaf streak)

โรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* ซึ่งมีชื่อเดิมว่า *Pseudomonas avena* Manns 1909, *P. alboprecipitans* (Rosen 1926) อยู่ใน Phylum Proteobacteria, Class Betaproteobacteria, Order Burkholderiales, Family Comamonadaceae โรคนี้จัดเป็นโรคที่มีการระบาดเป็นครั้งคราว (sporadic disease) บนข้าวโพดในประเทศอินเดีย เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจน้อย (minor economic importance) โรคนี้พบครั้งแรกในปี 1920s ซึ่งเข้าทำลายในอ้อยที่มลรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา (Dang *et al.*, 1978) รัฐควีนแลนด์ ออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทย สุดฤดี และคณะ (2547) พบการระบาดของโรคนี้ในข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสม 30% ของแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญ ซึ่งพบมากในพื้นที่ปลูกข้าวโพดภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย

3.1 ลักษณะอาการของโรคใบขีดแบคทีเรีย

พบอาการแผลขีดแฉก สีขาวถึงเหลืองซีด จะพบอาการน้ำและโป่งใส แผลจะถูกจำกัดด้วยเส้นใบ (vein) และแผลจะขยายยาวไปตามความยาวของใบ บางครั้งจะพบแผลเป็นจุดหรือเป็นแถบมีขนาดแผลไม่เท่ากันจากนั้นแผลจะพัฒนามารวมกันเกิดเป็นแผลขีดขนาดใหญ่ เมื่อนำใบข้าวโพดที่เป็นโรคมัดควางไว้ในน้ำจะพบ bacterial exudates (Ullasa *et al.*, 1967) นอกจากนี้พบว่าโรคนี้จะมีลักษณะอาการคล้ายกับโรคเหี่ยว (stewart's wilt) โรคใบไหม้แผลใหญ่ และโรคราน้ำค้างทำให้สับสนในการวินิจฉัยโรคได้ (OPPO/EPPO, 2006)

3.2 ลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิด aerobic bacteria มีรูปร่างเป็นท่อนตรงจนถึงโค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา แบบ monotrichous flagella บางครั้งอาจมีแฟลกเจลลา 2-3 เส้น อยู่ที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์แบบ polar flagella (Saddles, 1994) ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาวแกมเทา นูน กลม ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป nutrient glucose agar (NGA) และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร YDC จะพบลักษณะโคโลนีสีขาวครีม เรียบ นูน ไม่สร้างสารเรืองแสง นอกจากนี้เชื่อดังกล่าวจะเจริญได้ดีบนอาหารกึ่งเลือกจำเพาะ SNR และแสดงลักษณะโคโลนีสีขาวใส กลม นูน ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจาก glucose arabinose fructose manitol และ ethanol แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจาก sucrose arginine และ sobitol สามารถริควิชีไนเตรดให้เป็นไนไตรต์ และสามารถย่อยสลายแป้งได้

3.3 การเข้าทำลายและการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรีย

เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าทำลายและทำความเสียหายกับข้าวโพดในระยะต้นกล้าจนถึงระยะก่อนออกดอก (seedling to pre-flowering stage) เชื้อนี้จะเข้าทำลายทางช่องเปิดธรรมชาติ หรือปากใบ และมักจะเข้าทำลายใบข้าวโพดที่ยังอ่อนอยู่ โดยเฉพาะบริเวณใบธงหรือใบยอดของข้าวโพด นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่ระบาดไปได้ทั่วโลก และพบว่าแหล่งที่มีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรง คือ ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศออสเตรเลีย และประเทศอินเดีย เป็นต้น

3.4 พืชอาศัย

เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดข้าวโพดมีพืชอาศัยกว้าง โดยสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

3.4.1 พืชอาศัยหลัก (major hosts) ได้แก่ ข้าว อ้อย ข้าวฟ่าง และข้าวโพด

3.4.2 พืชอาศัยรอง (minor hosts) ได้แก่ ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เล่ย์ flinger millet, millet, pearl millet, foxtail millet, green foxtail, และ ข้าวสาลี

3.4.3 พืชอาศัยทั่วไป (wild hosts) ได้แก่ วัชพืชนานาชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย wheat grass, prairie grass, mountain brome (grass), large crabgrass, barnyard grass, grasses และ teosinte

3.5 การควบคุมโรค

3.5.1 การเกษตรกรรมและสุขาภิบาลแปลงปลูก ได้แก่ การทำความสะอาดแปลงปลูกและการกำจัดวัชพืชบริเวณแปลงปลูก

3.5.2 ใช้พันธุ์ต้านทานโรค

3.5.3 ใช้สารเคมี เช่น streptomycin, copper oxychloride, agrimycin

4. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปต้องอาศัยลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเป็นแนวทางในการพิจารณา โดยแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันจะจัดอยู่ในหมู่เดียวกัน ลักษณะสำคัญที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristic) ความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity) ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา (serology characteristic) เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุกรรมมาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย เช่น การนำเทคนิคการตรวจลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอนุชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต ทั้งมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์

เทคนิคการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

1. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย ในระดับสถานวิทยา

การเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (cultural characteristic) จากเซลล์หนึ่งเซลล์ของแบคทีเรียจะเจริญรวมเป็นโคโลนี (colony) จนมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ทำให้สามารถศึกษาลักษณะของเชื้อจากโคโลนี เช่น ความมัน ความด้าน สี ขุ่น ทึบ ทำให้รังควันเป็นเม็ดละเอียดหรือหยาบ ขอบเขตการเจริญกระจายออกหรือเป็นจุดเล็ก ๆ มีลักษณะขอบเรียบหรือขรุขระ เป็นเมือกหรือแห้ง หรือเป็นเกล็ด เป็นต้น

คุณสมบัติทางสถานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย (morphological characteristic) เป็นคุณสมบัติที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และแบคทีเรียที่อยู่ในอันดับ Eubacteriales ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เราศึกษากันมากที่สุด มีขนาดเป็นไมครอน ต้องใช้กำลังขยายประมาณ 1000 เท่า จึงจะเห็นรูปร่างได้ว่าเป็นแท่ง ทรงกลม หรือเกลียว มีการจัดเรียงตัวแบบไหน รวมทั้งศึกษาว่าแบคทีเรียมีการจัดสร้างสปอร์ สร้างแคปซูล และคุณสมบัติของแฟลกเจลลา แต่ถ้าจะศึกษาถึงโครงสร้างภายในเซลล์ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ชลิตา และคณะ, 2544)

2. ศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารต่างกันมาก การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะของสารอาหารบางอย่างแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด-ด่าง การเกิดแก๊ส เกิดสารบางชนิด เป็นต้น ความต้องการทางด้านกายภาพ (physical requirement) สภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ อากาศ แสงแดด ความเป็นกรด-ด่าง ความต้องการแก๊สบางชนิด สภาพทางกายภาพสามารถใช้จัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียได้ เช่น แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน เรียกว่า aerobic bacteria ถ้าไม่สามารถเจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจน เรียกว่า anaerobic bacteria หรือถ้าหากสามารถเจริญได้ทั้งสองลักษณะ เรียกว่า facultative anaerobic bacteria หรือถ้าเจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนเล็กน้อย เรียกว่า microaerophilic bacteria ถ้าดูที่อุณหภูมิก็อาจแบ่งออกได้เป็น 3 พวก คือ พวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria ถ้า

สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าสามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ เรียกว่า psychophilic bacteria เป็นต้น (Schaad, 2001)

3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเป่าหมายด้วยวิธี MicroStation System™

การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยระบบไบโอล็อก (Biolog, Inc., Hayward, Calif.) เป็นวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนระหว่างการหายใจของเชื้อจุลินทรีย์ ในการออกซิไดซ์แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้งหมด 95 แหล่ง ตรวจสอบค่าโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ tetrazolium violet (Prathuangwong and Chankhan, 2002) และอ่านค่าการเปลี่ยนแปลงสีโดยใช้ computer-drive enzyme immunoassay การจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยระบบไบโอล็อกเป็นวิธีที่สามารถจำแนกได้อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง (Costas *et al.*, 1992) และเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์น้อย สะดวก และง่ายต่อการปฏิบัติ (Miller และ Rhoden, 1991)

4. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์สารพันธุกรรม

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืช เพื่อให้ได้ความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น (สุดฤดี และคณะ, 2547) ซึ่งการนำเทคนิคอณูชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืช มุ่งศึกษาเชื้อสาเหตุในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เช่น pathotype physiological race ความผันแปรของเชื้อสาเหตุโรคพืชในธรรมชาติ ทำให้การตรวจสอบเชื้อ การจำแนกเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ โดยการนำเทคนิคการตรวจลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR)

การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยการศึกษาสารพันธุกรรมหรือลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในการจำแนกนั้นเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และบริเวณดังกล่าวยังเป็นบริเวณอนุรักษ์ และมีความจำเพาะเจาะจงของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (Claudio *et al.*, 2002) Medical microbiology มีความเชื่อมั่นอย่างมากใน การจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี สรีรวิทยา และยืนยันผลการจำแนกด้วยการศึกษาลำดับเบส ในบริเวณ 16S rDNA ซึ่งสามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ในระดับชนิดและสายพันธุ์ (Towner และ Cockayne, 1993)

rDNA genes มีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต มีความอนุรักษ์สูง สามารถศึกษาและเพิ่มจำนวนในบริเวณดังกล่าวโดยใช้เทคนิคโพลีเมอร์เรส (Mullis และ Faloona, 1987) การตรวจสอบ โดยวิธีดังกล่าวจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์และข้อกำหนดภายใต้ปฏิกิริยา ลูกโซ่ในการตรวจสอบ (Gill *et al.*, 1944)

David และคณะ (2002) ได้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์มาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวในข้าวโพด โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ *hrpS*, *cpsDE*, 16S rRNA และ 16S-23S intergenic transcription spacer (ITS) region ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพด เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เช่น *P. agglumerans* pv. *herbicola*, *P. annanas*, *Erwinia amylovora* และ *E. carotovora* พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ คือ 900, 1,100, 290 และ 920 bp ขณะที่เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวได้

Gitaitis และคณะ (2002) จำแนกเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบจีดของ pearl millet พันธุ์ลูกผสม พบว่าวิธี gas-chromatography ไปโอล๊อค และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ คือ ไพรเมอร์ WFB1 และ WFB2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. avenae* สามารถจำแนกชนิดเชื้อได้อย่างแม่นยำและมีความไวสูง

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) แสดงถึงระดับความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในประชากรของแบคทีเรียนั้น ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมจำเป็นต้องมีการศึกษาที่แม่นยำและเหมาะสม โดยเกณฑ์ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในปัจจุบันแบ่งได้กว้าง ๆ 2 แนวทางคือ (1) อาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) (2) อาศัยคุณสมบัติทางพันธุกรรม (อัญญา, 2550)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) และเทคนิคที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการศึกษาความหลากหลายของ

ประชากรเชื้อแบคทีเรีย คือเทคนิค repetitive element PCR (rep-PCR) ซึ่งเทคนิคทั้ง 4 ชนิดนี้ ได้มีการนำมาใช้เพื่อการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน ความผันแปรทางพันธุกรรม และพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (กุลชนา, 2546)

เทคนิค rep PCR เป็นเทคโนโลยีการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ความรู้ทางดีเอ็นเอเป็นพื้นฐาน (DNA base technology) เป็นเทคโนโลยีที่ถูกค้นพบและได้มีการพัฒนาได้ไม่นาน ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ โดยการศึกษาเกี่ยวกับ repetitive DNA sequence คือ ช่วงลำดับเบสที่ปรากฏซ้ำเหมือนกัน ซึ่งพบว่าการกระจายอยู่ตลอดจีโนมตรงตำแหน่งต่าง ๆ ที่ไม่ใช่รหัสพันธุกรรม (non-coding region) ของเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่ตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถใช้เป็น primer site สำหรับ DNA amplification ได้ (อัญชนา, 2550; กุลชนา, 2546) ชุดของลำดับเบสดังกล่าวที่ได้มีการศึกษามีอยู่ 3 ชุด ประกอบด้วย REP (Repetitive Extragenic Palindromic) ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) และ BOX (Interspersed Repetitive BOX Sequence)

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

2. ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) หรืออาจเรียกว่า intergenic repeat units (IRUs) พบใน *E. coli* และ *S. typhimurium* เช่นเดียวกับ REP แต่มีขนาดใหญ่กว่า พบว่า 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 ที่มีลักษณะอนุรักษสูง พบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* ประกอบด้วย 3 หน่วยคือ BOX A B และ C มีขนาด 59 45 และ 50 คู่เบส ตามลำดับ จากการศึกษาลำดับเบส พบว่าเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างโปรโมเตอร์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *S. pneumoniae* ถึงแม้ลำดับเบสในแต่ละหน่วยย่อยของ BOX จะแตกต่างกันบ้างแต่โดยทั่วไปแล้วมีลำดับเบสคล้ายกับ ERIC และ REP ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteria (Martin *et al.*, 1992)

จากข้อมูลลำดับเบสของ repetitive element ทั้ง 3 ชนิด จึงมีการนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์ BOX A1R (Louws *et al.*, 1994) คู่ไพรเมอร์ ERIC 1R กับ ERIC 2 และ REP 1R กับ REP 2 (Versalovic *et al.*, 1991) เพื่อใช้ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เนื่องจากสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงระดับสายพันธุ์ และ pathovar

หลักการของ rep PCR คือ การสังเคราะห์ oligonucleotide primer ที่เข้าคู่กันกับ repetitive element (rep-element) ในแบคทีเรีย เมื่อนำ primer ดังกล่าวรวมกับการใช้ปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP ERIC และ BOX เท่านั้น (ตำแหน่งต่าง ๆ ของ repetitive elements ซึ่งกระจายรอบจีโนมของแบคทีเรียจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์) ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า REP-PCR ERIC-PCR และ BOX-PCR ตามลำดับ โดยเรียกรวมกันว่า rep-PCR และผลที่ได้จากปฏิกิริยานี้ คือ ผลผลิตผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR products หรือ amplification products) ที่มีขนาดของชิ้นส่วนโมเลกุลดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนจีโนมที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ เมื่อนำผลผลิตผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ มาแยกขนาดของโมเลกุลผ่านอะกาโรสเจลโดยใช้ปฏิกิริยา electrophoresis ก็จะได้ rep-PCR genomic fingerprinting patterns ซึ่งคล้ายกับบาร์โค้ด (bar code) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์เฉพาะตัวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช Selenska-Pobell *et al.*, (1995) สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์เชื้อ *Rhizobium galegae* จำนวน 7 สายพันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP พบว่าไพรเมอร์ ERIC และ REP เหมาะสมที่จะ

นำมาใช้จัดกลุ่ม และจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อนี้เนื่องจากสามารถผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดในทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

Burdman and Kots (2005) ใช้เทคนิค rep-PCR ในการแยกลักษณะแตกต่างกันของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่เข้าทำลายเมล็ด ต้นกล้าและผลจากพืชอาศัยที่ต่างกัน แยกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่1 เข้าทำลายพืชตระกูลแตงแต่ไม่ทำลายแตงโม และกลุ่มที่2 เข้าทำลายเฉพาะแตงโม

ศุทธนา (2543) ศึกษาการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุของโรคเหี่ยวที่ทำความเสียหายกับพริก มะเขือเทศ และปทุมมา ด้วยเทคนิค rep-PCR จากผลการศึกษา พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *R. solanacearum* ไบโอราร์ 3 และ4 ที่พบในประเทศไทยออกจากกันได้ แต่สามารถแยกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคน้ำเน่าและปทุมมาออกมาเป็นแต่ละกลุ่มออกจากพืชอาศัยอื่น ๆ และสายพันธุ์จากปทุมมาจัดกลุ่มร่วมกันกับเชื้อบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากจิง และไม่พบว่ามีสหสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับสายพันธุ์เชื้อและแหล่งปลูกของพืชอาศัยที่แยกเชื้อมาได้ ในปีเดียวกัน ศุทธนา (2543) ได้ประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *R. solanacearum* จากพริกที่เป็นโรคเหี่ยว ที่แยกได้มาจากหลายแหล่งปลูกและจากพริก 4 ชนิด คือ พริกหวาน พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู และพริกหยวก ที่จัดจำแนกอยู่ในไบโอราร์ 3 จำนวน 24 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค rep PCR ผลจากการวิเคราะห์สามารถจัดแบ่งเชื้อได้ 3 กลุ่ม โดยพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์กับเชื้อกับแหล่งปลูก และชนิดของพริก

กุลชนา (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดสามารถจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *X. campestris* pv. *glycines* ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม 1 มีลักษณะ phenotype ในการก่อให้เกิดโรคอ่อนแอ และค่อนข้างอ่อนแอมีลักษณะพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงไม่หลากหลาย (homogeneous) กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มใหญ่ มีลักษณะ phenotype ในการก่อให้เกิดโรครุนแรงและค่อนข้างรุนแรง มีความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงกว่ากลุ่มแรก (heterogeneous) เมื่อประเมินลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละกลุ่ม คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 bp จะพบเฉพาะในเชื้อกลุ่มสายพันธุ์อ่อนแอ และขนาด 1300 bp จะผลิตได้จากเชื้อในกลุ่มสายพันธุ์รุนแรงเท่านั้น

ปิยรัตน์ และคณะ (2546) ศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ด้วยเทคนิค rep-PCR เปรียบเทียบกับเชื้อ *X. campestris* pathovars อื่นๆ ด้วย ERIC และ BOX-PCR พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่มีแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 200-3,000 base pairs (bp) จำนวน 4-16 แถบ จากการวิเคราะห์ข้อมูลรวมของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้งสองชนิด โดยแบ่งเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม โดยจัดกลุ่ม เชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคน้ำคายนองในพืช 60-70% อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ที่ค่า similarity 50 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ แต่การจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการเกิดโรค หรือลักษณะทางชีวเคมีอื่น

6. การคัดพันธุ์ข้าวโพดต้านทานเชื้อสาเหตุโรค

โดยธรรมชาติข้าวโพดหวานจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคมมากกว่าข้าวโพดไร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงแรกของการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลทำให้โรคต่าง ๆ เช่น โรคเน่าค้ำง โรคใบไหม้แผลเล็ก และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายได้ง่าย (กทาร์ตัน, 2546) โรคบางโรคนั้นแก้ไขได้โดยการปรับปรุงพันธุ์หรือคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ต้านทานโรค ซึ่งการที่จะได้พันธุ์พืชต้านทานโรคใดโรคนั้นๆ หรือหลายโรคในต้นเดียวกัน อาจใช้หลายวิธีร่วมกันในการคัดเลือกต้นพืชที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่อพืชนั้นอยู่ในสภาพที่ถูกเชื้อเข้าทำลายตามธรรมชาติหรือการปลูกเชื้อ วัตถุประสงค์หลักในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานพืช เพื่อให้ได้พ่อแม่ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคและใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม สำหรับการพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานโรค นักโรคพืชสามารถปฏิบัติได้ โดยการคัดเลือกต้นพืชที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ เมื่อพืชนั้นถูกเชื้อโรคซึ่งมีปริมาณมากเข้าทำลายและหลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบซ้ำอีก

Abedon and Tracy (1998) ได้ทดลองโดยใช้การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานให้ต้านทานต่อโรคราสนิม โดยใช้ข้าวโพดหวาน 3 ประชากร คือ Minn11, Minn14 และ NECDR ในรอบการคัดเลือกที่ 0 ถึง 3 ของแต่ละประชากรจะถูกประเมินภายใต้สภาพที่ปลูกเชื้อโรคราสนิมโดยวิธีการพ่นเชื้อ เมื่อข้าวโพดอายุ 6 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 5 ปี ได้แก่ ปี 1989, 1990, 1993, 1994 และ 1995 และภายใต้สภาพที่ไม่ได้ปลูกเชื้อโรคราสนิมในปี 1994 และ 1995 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่ถูกเข้าทำลายลดลงจาก 37.0 เหลือเพียง 8.2% ในประชากร Minn11 ($R^2 = 0.98$) และ 57.0 เหลือเพียง 9.9% ในประชากร NECDR ($R^2 = 0.98$) เมื่อประเมินที่ 40 วันหลังผสมเกสร และลดลงจาก 22.5 เหลือเพียง 7.8% ใน 17 ประชากร

Minn11 ($R^2 = 0.89$) และจาก 22.8 เหลือเพียง 10.0% ในประชากร NECDR ($R^2 = 0.91$) เมื่อประเมินที่ 21 วันหลังผสมเกสร เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่ถูกเข้าทำลายของประชากร Minn14 มีแนวโน้มลดลง แต่ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลักษณะโดยทั่วไปของทั้ง 3 ประชากรมีแนวโน้มดีขึ้น วันออกดอกเร็วขึ้น ลักษณะรูปทรงต้นดี น้ำหนักฝัก ผลผลิตและระดับความต้านทานโรคราสนิมสูงขึ้น แสดงว่าวิธีการพันเชื่อดังกล่าวสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อให้ข้าวโพดมีความต้านทานต่อโรคราสนิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

พรมิล (2551) ได้ทำการคัดเลือกระดับความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าในข้าวโพด พบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุด และโรคมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วโดยเกิดจุดช้ำน้ำเน่า เซลล์ยุบตัว และแผลเน่าเยิ้ม ภายใน 2-3 วันหลังปลูกเชื้อ คือวิธีการใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคลนเชื้อสาเหตุและแทงเข้าลำต้นข้าวโพดอายุ 14 วัน ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะห่างสูงจากพื้นดินประมาณ 3 เซนติเมตร ปิดปากแผลด้วยวาสลีน พร้อมให้ความชื้นสูงติดต่อกันนาน 24-48 ชั่วโมง เป็นกรรมวิธีที่สะดวกและเห็นผลรวดเร็ว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดพันธุ์ต้านทานโรคในระดับเรือนทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แทนวิธีการดั้งเดิมที่จะต้องปลูกเชื้อและคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในสภาพไร่ และเมื่อนำวิธีปลูกเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงนี้ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมรวม 10 พันธุ์ สามารถจำแนกระดับความต้านทานโรคได้ 3 กลุ่ม คือ (I) ข้าวโพดที่แสดงลักษณะความต้านทานโรคระดับสูง ได้แก่ ไพโอเนีย30A33, ไพโอเนีย30Y87, KSC503, และบ้านสวน ซึ่งเกิดอาการน้ำเน่าบริเวณยอดและลำต้นที่ 6 วันหลังปลูกเชื้อ (II) ต้านทานโรคระดับปานกลาง ได้แก่ ชูการ์74, ชูการ์75, ไฮบริกซ์3, และไฮบริกซ์10 และ (III) ข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ ไพโอเนีย3012 และ อินทรี2 ซึ่งเกิดอาการเน่าที่ข้อและใบยุบเน่าและ ภายใน 2-3 วันหลังปลูกเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง การแยกและรวบรวมสายพันธุ์เชื้อ

1.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด ที่เกิดจากเชื้อ *A.*

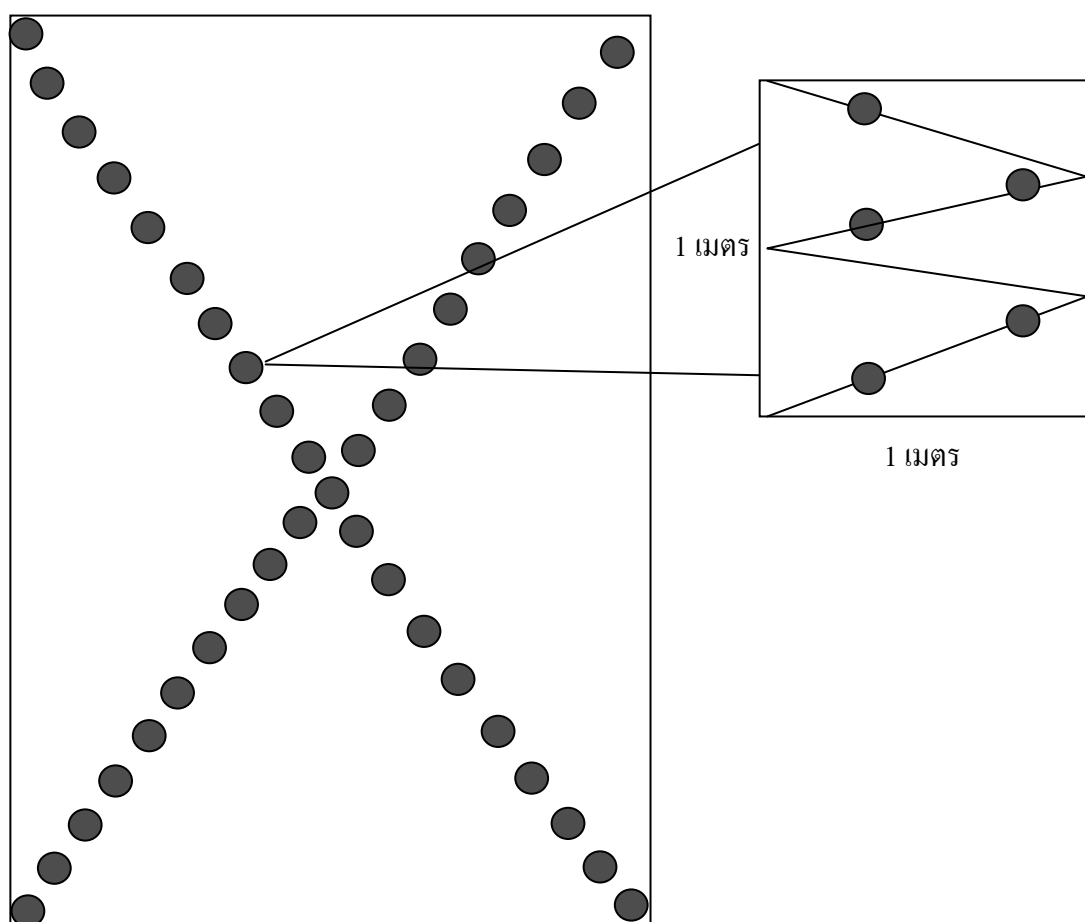
avenae subsp. *avenae*

สำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด ซึ่งมีลักษณะอาการแผลขีดยาวขนานกับเส้นใบ ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ และแปลงเกษตรกร จำนวน 4 จังหวัด ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จ. นครราชสีมา สระบุรี ลพบุรี และเพชรบูรณ์ เปรียบเทียบลักษณะอาการโรคกับคู่มืออ้างอิง (White, 1999) ซึ่งมีลักษณะอาการแผลขีดสีน้ำตาล ขนานไปตามความยาวของเส้นใบข้าวโพด โดยกำหนดพื้นที่สำรวจกระจายทั่ว วางแผนการทดลองและเก็บตัวอย่างแบบ complet randomize design (CRD) ด้วยวิธีการประยุกต์มาจาก Delp *et al* (1986) ภายในพื้นที่ 1 ไร่ ทำการตรวจสอบแบบสุ่มกากบาท จำนวน 39 จุด โดยแต่ละจุดมีพื้นที่สำรวจเท่ากับ 1 ตารางเมตร จากนั้นสุ่มตัวอย่างภายในพื้นที่ 1 ตารางเมตร แบบ W วนซ้าย จำนวน 5 จุด (ภาพที่ 1) เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการดังกล่าว ใส่ถุงพลาสติก เก็บข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ และสถานที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐานเก็บในภาชนะที่มีความเย็นเพื่อรักษาสภาพของพืชก่อนนำไปแยกเชื้อ เพื่อทำการวินิจฉัยโรค

1.2. การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด และการเก็บรักษา

แยกเชื้อจากใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรค โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อติดกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดที่ทนไฟฆ่าเชื้อ และนำชิ้นส่วนเหล่านั้นมาฆ่าเชื้อภายนอก (surface disinfections) ด้วย 10% clorox เป็นเวลา 3-5 นาที บดชิ้นส่วนพืชให้ละเอียดแล้วใช้ loop และชิ้นพืชที่บดละเอียด มา cross streak บนอาหารกึ่งจำเพาะ SNR (sorbitol neutral red) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่เจริญบนอาหาร SNR โดยมีลักษณะโคโลนีสีขาวใส กลม นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เล็กเก็บโคโลนีเดี่ยว และทำการ cross-streak บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในหลอดอาหารเลี้ยง yeast extract

dextrose CaCO_3 (YDC) (ภาคผนวก ก) ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคได้นานหลายเดือน (Schaad, 2001) ทำการย้ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานประจำและเก็บรักษาใน storage medium อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาระยะยาว



ภาพที่ 1 แผนผังการสุ่มเลือกเก็บตัวอย่างโรคใบขีดข้าวโพด โดยสุ่มเก็บจำนวน 39 จุด ภายในพื้นที่ 1 ไร่ โดยแต่ละจุดมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างโรคจำนวน 5 จุด แบบ W วนซ้าย ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีของ Delp *et al.*, 1986

2. การจำแนกและศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด

2.1 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 การทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมาทดสอบแกรมด้วยสารละลายต่างไปแต่ละเข็ม ไฮดรอกไซด์ 3 เปอร์เซนต์ (3% KOH) โดยการหยด 3% KOH ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหารแข็ง NGA ที่อายุ 24-48 ชั่วโมง กวนให้เข้ากันและสังเกตความหนืดของเซลล์แบคทีเรีย ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหนืดแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่มีความหนืดแสดงว่าเป็นแกรมบวก จากนั้นยืนยันผลโดยการย้อมสีเซลล์ (Gram's stain reaction) ตามวิธีการของ Schaad (2001) ด้วยการตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม โดยล้างกระจกสไลด์ให้สะอาดนำไปจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ และผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อและทำลายคราบไขมัน จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมากระจาย (smear) ลงแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยการลนเปลวไฟห่าง ๆ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยด crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย smear เชื้อปล่อยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีน ปล่อยทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งแล้วล้างออกด้วย 95% แอลกอฮอล์ นาน 10 วินาที ตามด้วยน้ำเปล่า ซับให้แห้ง หยดสาร safranin-o นาน 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า ซับให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า บันทึกผลการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ โดยหากเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีแดงของ safranin-o แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีม่วงน้ำเงินของ crystal violet

2.1.2 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Aaa9 (เป็นตัวแทนในการศึกษารูปร่างของเซลล์ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง) บนอาหารผิวหน้าแข็ง NGA จนได้อายุ 8 ชั่วโมง ค่อย ๆ

เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้หนึ่ง ๆ ประมาณ 5 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าอาหารมาอยู่ในน้ำ ทำการ fixed เซลล์เชื้อแบคทีเรียโดยแบ่งน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ลงในหลอดทดสอบที่ฆ่าเชื้อ เดิม 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ซึ่งเป็นสาร fixative ลงในปริมาณที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที หยด suspension เชื้อลงบนแผ่น paraffin ใช้ forceps กีบแผ่น grid โดยคว่ำด้านที่มีแผ่นฟิล์ม (membrane) เคลือบอยู่ลงบนหยดของตัวอย่างทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ล้างสารส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30 หยด ชับน้ำออกเบา ๆ ทางด้านใต้ grid พอหมาด ย้อมด้วยสี uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3 หยด โดยหยดสีผ่านลงบนแผ่น grid ประมาณ 6 หยด รีบซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูรูปร่างโครงสร้างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน JEOL (รุ่น J220) ด้วยกำลังขยายประมาณ 8,000 - 10,000 เท่า

2.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

สุ่มเลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จาก 3 ลักษณะอาการโรค นำมาเลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบลักษณะทางชีวเคมีในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. ได้แก่ การสร้างเม็ดสี (pigment produced), ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility), การเกิดปฏิกิริยา citrate utilization, starch hydrolysis, nitrate reduction และ arginine dihydrolysis, รวมทั้งคุณสมบัติการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ arabinose fructose sucrose sorbitol mannitol และ ethanol มีวิธีการ ดังต่อไปนี้

2.2.1 การเคลื่อนที่ (Motility)

นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำ stab ในอาหาร NGA เชื้อละ 1 หลอด โดยใช้เข็มตรงเจ็ยเชื้อแล้วแทงลงไปลึกประมาณ $\frac{1}{2}$ ส่วนของอาหาร (ผนวก ข) ทำหลอดเปรียบเทียบกับ control 1 หลอด โดยใช้เข็มเจ็ยไม่มีเชื้อ แทงลงในอาหาร แล้วนำหลอดทั้งหมดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเป็นเวลา 7 วัน โดยถ้าแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะสังเกตเห็นการเจริญเคลื่อนที่ของแบคทีเรียแผ่ออกจากรอยเข็มที่แทงลงไป

2.2.2 การใช้สารซิเตรต (Citrate utilization)

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak ลงบนอาหารแข็ง citrate agar (ผนวก ข) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-7 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนจะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำเงิน

2.2.3 การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

ปลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบน starch agar (ผนวก ข) โดย streak เป็นเส้นตรงบนอาหาร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารทดสอบ Gram' Iodine เทให้ท่วมอาหารในจาน สังเกตการเกิดสี ถ้าเกิดบริเวณใสรอบรอยที่มีเชื้อเจริญอยู่แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ ถ้าไม่สามารถย่อยแป้งในอาหารจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็นสีน้ำเงินปนม่วงเกิดขึ้น

2.2.4 การใช้ไนเตรต (Nitrate reduction)

ย้ายเชื้อ 1 loop ลงในอาหาร nitrate ที่หลอมที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วใช้ฝามือหมุนหลอดผสมเชื้อกับอาหารให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ แล้วนำมาเติมสารทดสอบ (sulfanilic acid และ dimethylalpha naphthylamine) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้สารเข้ากับอาหารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วสังเกตดูการเกิดสีในอาหาร ถ้าเกิดสีแดงอิฐ แสดงว่ามีการเปลี่ยน NO_3 เป็น NO_2 ถ้าไม่เกิดสีให้เติม zinc powder ลงไปในหลอดเล็กน้อย ถ้ามีสีแดงอิฐเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดการเปลี่ยน NO_3 เป็น NO_2

2.2.5 การย่อยสารอาร์จินีน (Arginine hydrolysis)

นำเชื้อมา stab ลงในหลอดอาหาร Arginine นำหลอดมาเททับผิวหน้าด้วย 3% วน หลอมเหลว หรือ paraffin oil ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-7 วัน คอยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีชมพูไปเป็นสีแดงเข้ม แสดงว่ามีปฏิกิริยาเป็นบวก คือ มีการสร้าง ammonia จาก arginine ในสภาพ anaerobe และเปลี่ยนเป็นต่าง

2.2.6 การทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 41 องศาเซลเซียส (High temperature tolerance)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA ด้วยวิธีการ cross streak method จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิสูง 41 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง สังเกตดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับผลการเจริญของเชื้อดังกล่าวในอุณหภูมิห้องปกติ

2.2.7 การใช้แหล่งคาร์บอน (Carbon utilization)

นำเชื้อแบคทีเรียใส่ลงอาหาร medium C of dye (ผนวก ข) ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยการ stab บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้น ๆ ได้ อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากเกิดปฏิกิริยากรดเกิดขึ้น หลังจากบ่มเชื้อ 2, 4, 7, 21 และ 28 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอน

2.3 การพิสูจน์ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

2.3.1 การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ

เตรียมเซลล์ suspension ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient glucose broth (NGB) ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง และบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบเท่ากับ 120 รอบ/นาที ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ suspension ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น CE1011 (ประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยการทำ plate count นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ปรับความขุ่นของเซลล์ suspension ที่ O.D. 0.1 มาทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนับโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (1 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยไม่ใส่เข็มฉีดยา คูด suspension ของเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศออกแล้วฉีดเข้าเนื้อใบของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) อายุ 45 วัน อย่างช้า ๆ บริเวณใต้ใบยาสูบจะมีลักษณะชุ่มน้ำ (water soak) หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ เก็บที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลัน โดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคจะเกิดอาการตายของ

เซลล์ (necrosis) บนใบยาสูบ ทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลล้อมรอบบริเวณที่ฉีด suspension ของเชื้อภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง (Schaad, 2001)

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนต้นข้าวโพด

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแต่ละสายพันธุ์ จากข้อที่ 2.3.1 มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค ที่อายุ 7 วัน ด้วยการหยด suspension ที่ความเข้มข้นเท่ากับ O.D. 0.1 (10^8 cfu/มิลลิลิตร) ของเชื้อลงบนกรวยของใบธง (ใบยอด) ข้าวโพด เก็บรักษาดันข้าวโพดหวานไว้ที่สภาพอุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส และให้ความชื้นสูงติดต่อกัน 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบลักษณะอาการของโรค และประเมินความรุนแรงที่ปรากฏ 1, 3, 5 และ 7 วันหลังปลูกเชื้อ โดยวัดระดับความรุนแรงของโรคบนใบข้าวโพดที่แสดงอาการ ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนพื้นที่ใบข้าวโพด ดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบ 25% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบ 50% ของพื้นที่ใบ (ภาพที่ 2) และเมื่อพบข้าวโพดหวานแสดงอาการโรคใบขีดจึงแยกเชื้อสาเหตุโรคจากต้นดังกล่าวอีกครั้ง (reisolation) บนอาหาร NGA คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวและนำมาปลูกเชื้อบนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ชุดใหม่ (reinoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) นำเชื้อที่แยกได้มา streak บนอาหาร NGA จนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยการเก็บเชื้อสาเหตุโรคบนอาหารเยิง YDC ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคได้นานหลายเดือน และเพื่อคงความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลอง จึงต้องทำการปลูกเชื้อบนต้นข้าวโพดเป็นระยะอย่างสม่ำเสมอ นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการจำแนกลักษณะอาการและความหลากหลายของอาการโรค ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพดสายพันธุ์ต่าง ๆ



ภาพที่ 2 แสดงการประเมินระดับความรุนแรงของโรคใบขีดแบคทีเรีย ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรค ดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ

2.4 การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสจำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS region โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

2.4.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae*

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* บริเวณ 16S-23S ITS region จากเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ทำการจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequence alignment) เพื่อหาส่วนที่มีความหลากหลาย หรือต่างกัน น้อยที่สุดของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ จากฐานข้อมูลดังกล่าว โดยใช้โปรแกรม BioEdit หา consensus sequence เพื่อนำมาใช้เป็นตัวแทนในการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทป์ขนาด 18-20 bp ของไพรเมอร์แล้ว นำมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยการนำลำดับเลขของไพรเมอร์ที่ออกแบบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทป์ทั้งหมดใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST คัดเลือกไพรเมอร์ชนิด forward และ reward ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคมัสติดีเอ็นเอตามวิธี Chen and Kuo (1993) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA ที่สภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งไป 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 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บน้ำใสใส้หลอดใหม่ จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วย chloroform ในอัตราปริมาตรเท่ากับน้ำใส (equal volume with supernatant) ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกคว่ำหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ของเหลวแยกชั้น จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนใส้หลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วย chloroform: isoamyl alcohol

(อัตราส่วน 24:1) ในอัตราปริมาณเท่ากับน้ำไอผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที คัดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ที่แช่เย็นปริมาณเท่ากับน้ำไอผสมให้เข้ากันจะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาณ 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ข้อมเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) เป็นเวลานาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นไหลผ่าน 10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพผลการทดลอง

2.4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากข้อ 2.4.2 นำมาตรวจสอบความจำเพาะเฉพาะเจาะจงของยีนเป้าหมายโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อ 2.4.1 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S ITS region ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอเชื้อเป้าหมายจำนวน 25 นาโนกรัม, dATP, dGTP, dCTP, และ dTTP ชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์, MgCl₂ จำนวน 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase จำนวน 0.15 ยูนิต ใน 1X PCR buffer จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermocycle (Thermo Hybaid PX2) กำหนดโปรแกรมขั้นตอน PCR ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94°C	4 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94°C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	58°C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72°C	1 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72°C	7 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาถูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้ จำนวน 5 ไมโครลิตร มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8% agarose gel ด้วย horizontal slab gel electrophoresis (GelMate 2000, Toyobo) ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบบนแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้ UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ (DNA sequencing analysis)

แยกสกัดแถบดีเอ็นเอขนาด 615 bp ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส จากข้อ 2.4.3 นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยวิธี sequence analysis (หน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) นิวคลีโอไทป์ของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดขาวโพดที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทป์ที่มีในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI)

2.6 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S ITS region ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae*

ศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.4.1 ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลต Aaa9 ที่แยกมาจากข้าวโพดที่แสดงอาการใบขีดและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชใน genus *Acidovorax* ได้แก่ *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง, *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้ (ที่ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อจากอาจารย์ปิยรัตน์ ธรรมกิจกิจวัฒน์ กรมวิชาการเกษตร), รวมทั้งเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *sesami* สาเหตุโรคใบจุดของงา และเชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวโพด ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการ 2.4.2 นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากข้อ 2.4.1 ตามวิธีการข้อ 2.4.3 ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยนำผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่ได้ จำนวน 5 ไมโครลิตร มาตรวจดูขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb

3. การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพด

3.1 การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ โดยเทคนิค rep-PCR

นำตัวแทนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพดที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกข้าวโพดที่แตกต่างกัน และผ่านขั้นตอนการจำแนกชนิดเชื้อและการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคมาร่วมทำการเปรียบเทียบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 3 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ REP ที่มีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ repetitive extragenic palindromic, ไพรเมอร์ ERIC ที่เป็นส่วนจำเพาะของ enterobacteria repetitive intergenic consensus และ ไพรเมอร์ BOX ที่จำเพาะต่อบริเวณ interspersed repetitive BOX sequence (Louws *et al.*, 1994) ซึ่งมีลำดับเบสในไพรเมอร์ดังนี้

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

I = Inosine

โดยสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 2.4.2 ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอเรส 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย 100 นาโนกรัม ผสมกับ 1X PCR buffer (67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 83 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 30 mM 2-mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin) dNTP ชนิดละ 125 μM , เอนไซม์ *Taq* polymerase 1.0 unit และ ไพรเมอร์ ERIC หรือ REP ชนิดละ 50 pmol และ BOX จำนวน 100 pmol แล้วเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermocycle (Thermo Hybaid PX2) กำหนดโปรแกรมขั้นตอน PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (McManus, 1995) ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 $^{\circ}\text{C}$	1 นาที

2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94°C	20	วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	53°C (BOX)	45	วินาที
	53°C (ERIC)	45	วินาที
	44°C (REP)	45	วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72°C	1	นาที่
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72°C	4	นาที่

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลลายพิมพ์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและชัดเจนโดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเท่ากับ 1 ถ้าไม่ปรากฏให้คะแนนเท่ากับ 0 นำผลมาวิเคราะห์ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Treeconw วิเคราะห์ dendrogram ที่ได้ นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค rep-PCR มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการแสดงออกของพันธุกรรม (จีโนไทป์) กับลักษณะอาการของโรคที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกรและการประเมินลักษณะอาการและความรุนแรงของโรคในห้องปฏิบัติการ (ฟีโนไทป์) เพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายของลักษณะอาการ ระดับความรุนแรง และความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใบขีด

4. การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรค

4.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม

นำตัวแทนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ Aaa9 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดโรครุนแรงเลี้ยงในอาหารเหลว NGB ในสภาพอุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเตรียมเป็น suspension ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ โดยปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ผสมสารลดแรงตึงผิว (Tention-T7) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการปลูกเชื้อบนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 อายุ 14 วัน ที่ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ให้ความชื้นโดยคลุมด้วยถุงพลาสติกใส 0, 24, และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่น suspension เชื้อสาเหตุโรคบนต้นข้าวโพดหวาน

กรรมวิธีที่ 2 ฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคบนต้นข้าวโพด โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1.0 มิลลิลิตร ดูด suspension เชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าลำต้น โดยมีระยะสูงจากโคนต้นประมาณ 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 หยด suspension เชื้อสาเหตุโรคลงในกรวยยอด (ใบธง) ของข้าวโพด โดยใช้เข็มฉีดยาที่ไม่มีเข็ม ขนาด 1.0 มิลลิลิตร ดูด suspension เชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดลงในกรวยของข้าวโพด

กรรมวิธีควบคุม ไม่ทำการปลูกเชื้อ แต่ใช้น้ำกลั่นพ่น ฉีด และหยด ให้พืชข้าวโพดแทน ทุกกรรมวิธีให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดนาน 0 24 และ 48 ชั่วโมง

ประเมินการเกิดโรค (disease incidence) ความรุนแรงของโรค (disease severity) ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการ

เกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ (ภาพที่ 2) จากข้าวโพดหวานที่เกิดโรคทั้งหมด และระยะเวลาที่ข้าวโพดแสดงอาการหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค

4.2 การทดสอบระดับความต้านทานของข้าวโพดต่างสายพันธุ์ต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย

เปรียบเทียบระดับความต้านทานโรคใบขีดแบคทีเรียในข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ต่างสายพันธุ์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จำนวน 33 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน 11 พันธุ์ และข้าวโพดไร่จำนวน 22 พันธุ์ (ตารางที่ 1) ปลูกข้าวโพดในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว พันธุ์ละ 10 ต้น โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1 โดยการพ่น suspension ของเชื้อสาเหตุโรคไอโซเลต Aaa9 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรง ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cfu/มิลลิลิตร (O.D. เท่ากับ 0.1) บนข้าวโพดอายุ 14 วัน และคลุมด้วยถุงพลาสติกติดต่อ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ความชื้น สังเกตลักษณะอาการหลังปลูกเชื้อทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ประเมินการเกิดโรคโดยพิจารณาความรุนแรงของโรค ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) และจำนวนวันแรกที่พืชแสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อ โดยแบ่งกลุ่มระดับความต้านทานเป็น 3 กลุ่ม คือ ต้านทานระดับสูง (I) ต้านทานระดับปานกลาง (II) และอ่อนแอ (III) (ตารางที่ 2) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดพันธุ์ข้าวโพดต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรียต่อไป

ตารางที่ 1 พันธุ์ข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ที่ทดสอบระดับความต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย

ลำดับที่	พันธุ์ข้าวโพด	ลำดับที่	พันธุ์ข้าวโพด
ข้าวโพดหวาน		ข้าวโพดไร่	
1	Hybrid 3	1	Ki 31
2	Hybrid 10	2	Ki 32
3	14004	3	Ki 33
4	Sugar 75	4	Ki 34
5	KSSC604	5	Ki 35
6	KSSC901	6	Ki 36
7	KSSC903	7	Ki 37
8	KSSC904	8	Ki 38
9	KSSC915	9	Ki 39
10	อินทรี2	10	Ki 40
11	บ้านสวน	11	Ki 41
		12	Ki 42
		14	Ki 44
		15	Ki 45
		16	Ki 46
		17	Ki 47
		18	Ki 48
		19	Ki 49
		20	Ki 50
		21	Ki 51
		22	Ki 52

ตารางที่ 2 การประเมินลักษณะความต้านทานที่ประเมินจากลักษณะอาการโรค ความรุนแรงโรค และระยะเวลาการแสดงอาการโรค

ระดับความต้านทาน	การประเมินระดับความต้านทาน		
	ลักษณะอาการ	ระดับความรุนแรงโรค ^{1/}	ระยะปมเชื้อ (วัน)
สูง (I)	แผลขีดสั้น สีน้ำตาล หรือสีเขียวซีด (chlorosis)	<10%	>6
ปานกลาง (II)	แผลขีด น้ำน้ำตาล	10-25%	4-6
อ่อนแอ(III)	แผลขีดยาว น้ำน้ำตาล มี halo	>25%	2-3

^{1/} ระดับ ความรุนแรงของโรค ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ (ภาพที่ 2)

ผลและวิจารณ์

ผล

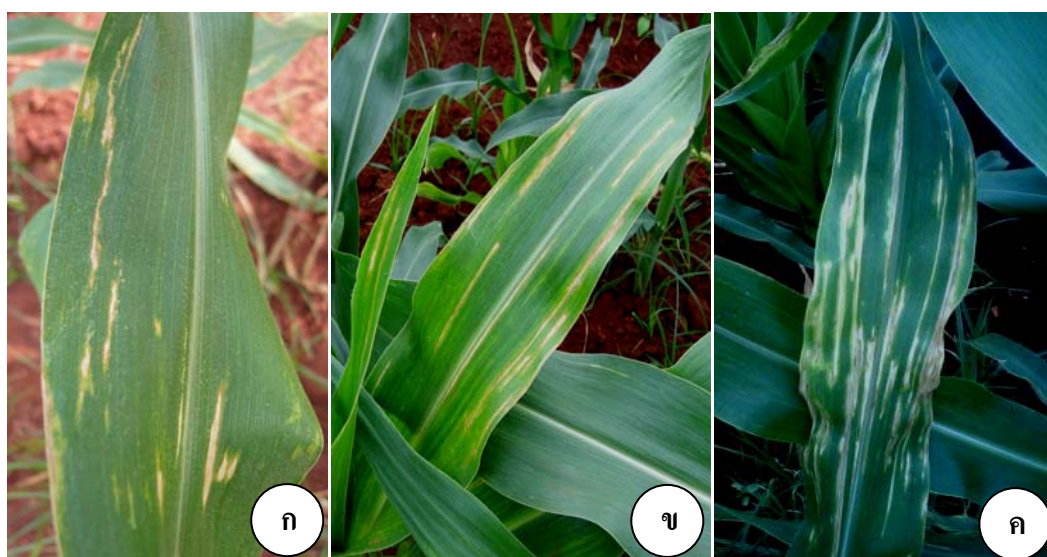
1. การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง การแยกและรวบรวมสายพันธุ์เชื้อ

1.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ

A. avenae subsp. *avenae*

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่แสดงอาการแผลขีด น้ำน้ำ มีและไม่มี halo ล้อมรอบ ขนานไปกับเส้นใบข้าวโพด ในแหล่งปลูกข้าวโพดจำนวน 4 จังหวัด สามารถเก็บรวบรวมข้าวโพดที่แสดงอาการโรคดังกล่าว ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มอ้างอิง (White, 1999) จำนวน 1365 ตัวอย่าง เมื่อทำการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นพบว่ามีเพียง 109 ตัวอย่าง เท่านั้นที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* พบว่าจังหวัดนครราชสีมาพบข้าวโพดแสดงอาการโรคมากที่สุด คือ 84 ตัวอย่าง จาก 585 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บ คิดเป็น 14.35% ของการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา รองลงมาคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี จำนวน 21, 3, และ 1 ตัวอย่าง จาก 390 195 และ 195 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บ คิดเป็น 5.38 1.5 และ 0.51% ของการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี (ตารางที่ 3) และพบว่าในปี 2549 พบการระบาดของโรค 9 % ของตัวอย่างโรคทั้งหมดจาก 109 ตัวอย่าง และพบว่าการระบาดของโรคเพิ่มขึ้นคือ 49 และ 42% ของตัวอย่างโรคทั้งหมดจาก 109 ตัวอย่าง ในปี 2550 และ ปี 2551 นอกจากนี้สามารถแบ่งกลุ่มลักษณะอาการที่พบออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ A ประชากรกลุ่มนี้ ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดสั้น สีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่เรียบ ขนาดแผลยาวประมาณ 5-10 ซม. และกว้างประมาณ 2-3 ซม. กระจายทั่วใบข้าวโพด จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นเท่ากับ 13% ของกลุ่มอาการโรค กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ B ประชากรกลุ่มนี้ ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดน้ำน้ำ มี halo ล้อมรอบ ขยายยาวตามเส้นใบ จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็นเท่ากับ 68% ของกลุ่มอาการโรค และกลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ C ประชากรกลุ่มนี้ ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดยาวสีน้ำตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำให้แผลเชื่อมติดกันจนเกิดอาการใบไหม้ จำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 19% ของกลุ่มอาการโรค (ภาพที่3) และพบโรคนี้ระบาดในข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี2 ที่อายุตั้งแต่ระยะต้นกล้าจะถึงอายุพืช 30 วัน มากที่สุด คือ 69 ตัวอย่างโดย ข้าวโพดจะแสดงลักษณะอาการโรคในกลุ่มฟิโนไทป์ B และ C รองลงมา คือข้าวโพดพันธุ์แปซิฟิก

และ Big979 คือ 22 และ 10 ตัวอย่าง ซึ่งข้าวโพดที่เป็นโรคจะแสดงอาการโรคในกลุ่มฟิโนไทป์ B และพบว่าลักษณะอาการที่พบจะขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของโรค และอายุของพืชที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย ซึ่งอาการกลุ่มแรกมักจะพบในต้นข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 30 วันขึ้นไป และพบในข้าวโพดไร่ ส่วนลักษณะอาการในกลุ่มที่ 2 และ 3 จะพบอาการโรคในระยะต้นกล้าจนถึงข้าวโพดอายุ 30 วัน และพบว่าลักษณะอาการของโรคดังกล่าวที่พบในแต่ละกลุ่มอาการที่พบในข้าวโพดในระยะต้นกล้าจนถึงอายุประมาณ 30 วัน และพบว่าเมื่อปล่อยให้ต้นที่แสดงลักษณะอาการโรคดังกล่าวไว้จนถึงระยะเก็บเกี่ยวลักษณะอาการของโรคที่พบในระยะต้นกล้าไม่มีการพัฒนาอาการของโรคแต่จะพบอาการของแผลดังกล่าวเป็นแผลแห้งสีน้ำตาลหรือเทาและมีเชื้อโรคชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำเติม



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะอาการใบขีดข้าวโพด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ชนิด A ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดสั้น สีน้ำตาลอ่อน ขนาดแผลยาวประมาณ 5-10 ซม. และกว้างประมาณ 2-3 ซม. กระจายทั่วใบข้าวโพด (ก) กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ชนิด B ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดน้ำน้ำ ขยายยาวตามเส้นใบ (ข) กลุ่มลักษณะอาการฟิโนไทป์ชนิด C ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดยาวสีน้ำตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำให้แผลเชื่อมติดกันจนเกิดอาการใบไหม้ (ค)

ตารางที่ 3 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าว โปด ที่เก็บรวบรวมและแยกจากตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบขีด และลักษณะอาการของโรคที่ ทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ

ปีที่ จัดเก็บ	แหล่งเก็บ รวบรวม ^{1/}	สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย	พันธุ์ข้าวโพด	ลักษณะอาการ ทางฟิโนไทป์ ^{2/}	ความรุนแรงโรค (%) ในห้องปฏิบัติการ ^{3/}
2549	01	Aaa1	แปซิฟิก 888	A	5
2549	02	Aaa 2	ไฮบริด 3	A	5
2549	02	Aaa 3	ไฮบริด 3	A	5
2549	02	Aaa4	ไฮบริด 3	A	5
2549	03	Aaa5	อินทรี 2	B	25
2549	03	Aaa6	อินทรี 2	B	25
2549	03	Aaa7	อินทรี 2	B	25
2549	03	Aaa8	อินทรี 2	B	25
2549	03	Aaa9	อินทรี 2	B	50
2549	03	Aaa10	อินทรี 2	B	50
2550	03	Aaa11	อินทรี 2	B	50
2550	03	Aaa12	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa13	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa14	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa15	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa16	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa17	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa18	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa19	อินทรี 2	B	10
2550	03	Aaa20	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa21	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa22	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa23	อินทรี 2	B	50
2550	03	Aaa24	อินทรี 2	B	25

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ปีที่ จัดเก็บ	แหล่งเก็บ รวบรวม ^{1/}	สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย	พันธุ์ ข้าวโพด	ลักษณะอาการ ทางฟิโนไทป์ ^{2/}	ความรุนแรงโรค (%) ในห้องปฏิบัติการ ^{3/}
2550	03	Aaa25	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa26	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa27	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa28	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa29	อินทรี 2	B	10
2550	03	Aaa30	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa31	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa32	อินทรี 2	B	10
2550	03	Aaa33	อินทรี 2	B	50
2550	03	Aaa34	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa35	อินทรี 2	B	25
2550	03	Aaa36	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa37	อินทรี 2	A	10
2550	03	Aaa38	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa39	อินทรี 2	C	50
2550	03	Aaa40	อินทรี 2	A	10
2550	03	Aaa41	อินทรี 2	C	25
2550	03	Aaa42	อินทรี 2	C	25
2550	04	Aaa43	แปซิฟิก 888	B	10
2550	04	Aaa44	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa45	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa46	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa47	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa48	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa49	แปซิฟิก 888	B	25
2550	04	Aaa50	แปซิฟิก 888	B	25

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ปีที่ จัดเก็บ	แหล่งเก็บ รวบรวม ^{1/}	สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย	พันธุ์ ข้าวโพด	ลักษณะอาการ ทางฟิโนไทป์ ^{2/}	ความรุนแรงโรค (%) ในห้องปฏิบัติการ ^{3/}
2550	04	Aaa52	แปซิฟิก 888	B	10
2550	05	Aaa53	แปซิฟิก 888	A	25
2550	05	Aaa54	แปซิฟิก 888	B	10
2550	05	Aaa55	แปซิฟิก 888	B	10
2550	05	Aaa56	แปซิฟิก 888	A	10
2550	05	Aaa57	แปซิฟิก 888	B	25
2550	05	Aaa58	แปซิฟิก 888	B	50
2550	05	Aaa59	แปซิฟิก 888	B	25
2550	05	Aaa60	แปซิฟิก 888	B	25
2550	05	Aaa61	แปซิฟิก 888	B	50
2550	05	Aaa62	แปซิฟิก 888	B	25
2550	05	Aaa63	แปซิฟิก 888	B	25
2551	06	Aaa64	Big 979	B	25
2551	06	Aaa65	Big 979	B	25
2551	06	Aaa66	Big 979	B	25
2551	06	Aaa67	Big 979	B	25
2551	06	Aaa68	Big 979	B	10
2551	07	Aaa69	Big 979	B	25
2551	07	Aaa70	Big 979	B	10
2551	07	Aaa71	Big 979	B	25
2551	07	Aaa72	Big 979	B	50
2551	07	Aaa73	Big 979	B	10
2551	03	Aaa74	อินทรี 2	B	10
2551	03	Aaa75	อินทรี 2	C	50
2551	03	Aaa76	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa77	อินทรี 2	B	50

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ปีที่ จัดเก็บ	แหล่งเก็บ รวบรวม ^{1/}	สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย	พันธุ์ ข้าวโพด	ลักษณะอาการ ทางฟิโนไทป์ ^{2/}	ความรุนแรงโรค (%) ในห้องปฏิบัติการ ^{3/}
2551	03	Aaa78	อินทรี 2	A	10
2551	03	Aaa79	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa80	อินทรี 2	C	25
2551	03	Aaa81	อินทรี 2	A	10
2551	03	Aaa82	อินทรี 2	C	10
2551	03	Aaa83	อินทรี 2	A	25
2551	03	Aaa84	อินทรี 2	C	50
2551	03	Aaa85	อินทรี 2	A	25
2551	03	Aaa86	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa87	อินทรี 2	C	10
2551	03	Aaa88	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa89	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa90	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa91	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa92	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa93	อินทรี 2	C	25
2551	03	Aaa94	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa95	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa96	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa97	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa98	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa99	อินทรี 2	B	50
2551	03	Aaa100	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa101	อินทรี 2	A	25
2551	03	Aaa102	อินทรี 2	B	25
2551	03	Aaa103	อินทรี 2	C	50

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ปีที่ จัดเก็บ	แหล่งเก็บ รวบรวม	สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย ^{1/}	พันธุ์ ข้าวโพด	ลักษณะอาการ ทางฟิโนไทป์ ^{2/}	ความรุนแรงโรค (%) ในห้องปฏิบัติการ ^{3/}
2551	03	Aaa104	อินทรี 2	A	25
2551	03	Aaa105	ATS 5	B	50
2551	03	Aaa106	ATS 5	B	50
2551	03	Aaa107	ATS 5	B	50
2551	03	Aaa108	ATS 5	B	50
2551	03	Aaa109	ATS 5	B	50

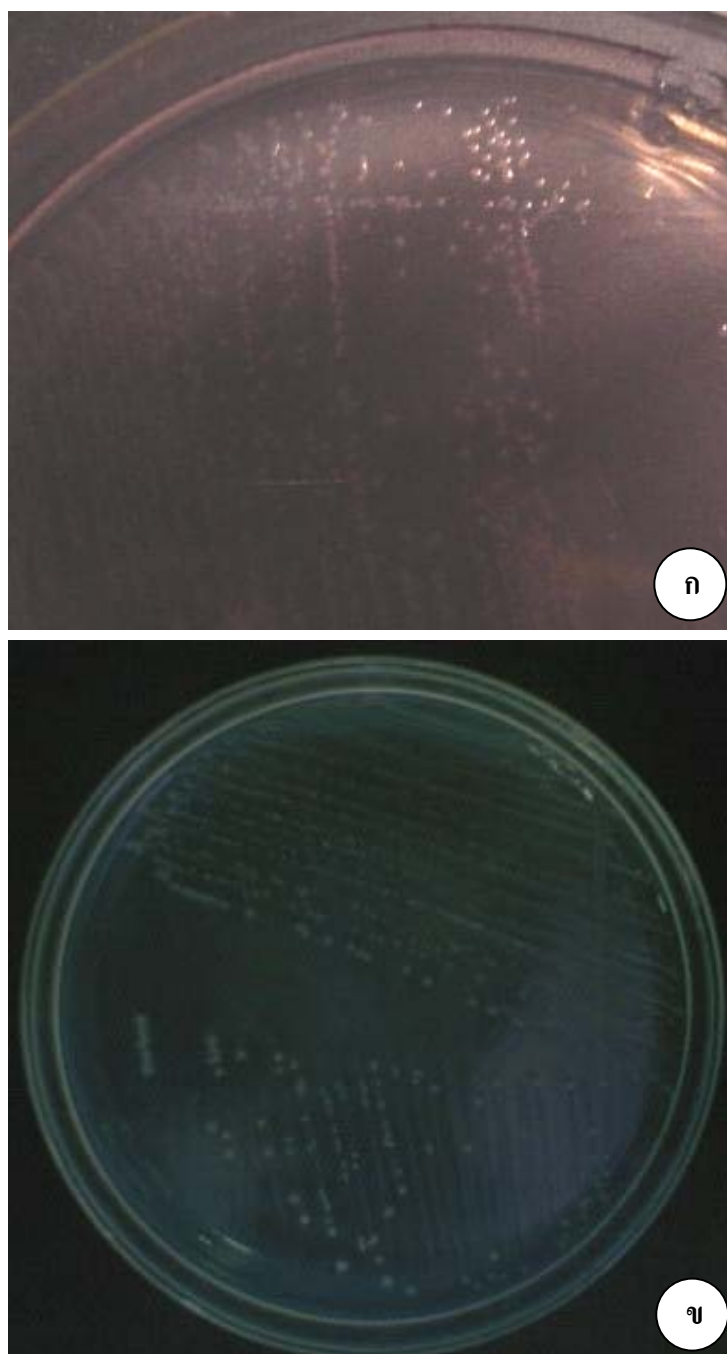
^{1/} แหล่งเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด : 01 = อ. พัฒนานิคม จ. ลพบุรี, 02 = อ. พุทธบาท จ. สระบุรี 03 = ไร่สุวรรณ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา, 04 = อ. หนองไผ่ จ. เพชรบูรณ์ 05 = อ. วิเชียรบุรี จ. เพชรบูรณ์ 06 = ต. โป่งตาลอง อ. วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา 07 = ต. หนองทราย อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

^{2/} อาการโรคที่สำรวจและเก็บตัวอย่างพิจารณาจากลักษณะอาการที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ ลักษณะอาการฟิโนไทป์ A ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดสั้น สีนํ้าตาลอ่อน ขนาดแผลยาวประมาณ 5-10 ซม. และกว้างประมาณ 2-3 ซม. กระจายทั่วไปข้าวโพด ลักษณะอาการฟิโนไทป์ B ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดนํ้า ขยายยาวตามเส้นใบ ลักษณะอาการฟิโนไทป์ C ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดยาวสีนํ้าตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำให้แผลเชื่อมติดกันจนเกิดอาการใบไหม้

^{3/} การประเมินระดับความรุนแรงของโรค บนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 โดยประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) แบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ

1.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการฟิวโรเซียมทั้ง 3 กลุ่มจากข้อ 1.1 ทำการแยกเชื้อบนอาหารกึ่งจำเพาะ SNR และอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป NGA คัดเลือกเฉพาะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็เชื้อสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด โดยมีลักษณะโคโลนี สีขาวใส กลม นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บนอาหารกึ่งจำเพาะ SNR และลักษณะโคโลนีสีขาวนูน กลม นูน ขอบเรียบ บนอาหาร NGA จำนวน 109 ไอโซเลท (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) เก็บรวบรวมเชื้อดังกล่าวไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ โดยทำการ cross streak บนอาหาร NGA ประมาณ 2-3 ครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในหลอดอาหารเลี้ยง yeast extract dextrose CaCO_3 (YDC) ทำการย้ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์ เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานประจำ และเก็บรักษาใน storage medium อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาระยะยาว



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่เจริญบนอาหารกึ่งจำเพาะ sorbitol neutral red (SNR) ที่มีลักษณะโคโลนี สีขาวใส กลม นูน ขอบเรียบเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ก) และลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ บนอาหาร NGA (ข)

2. การจำแนกและศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด

การศึกษาคูณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกรวมจากแต่ละกลุ่มลักษณะอาการโรค 3 ไอโซเลท คือ Aaa1 ที่แสดงลักษณะอาการฟิโนไทป์ A, Aaa9 ที่แสดงลักษณะอาการฟิโนไทป์ B และ Aaa84 ที่แสดงลักษณะอาการฟิโนไทป์ C พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลมมน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บนอาหาร NGA และลักษณะโคโลนีสีขาวใส กลมมน เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บนอาหารกึ่งจำเพาะ SNR (ภาพที่ 4) สำหรับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียติดสีแดงของ safranin-o เมื่อทดสอบปฏิกิริยาแกรมด้วยการย้อมสี (Gram's stain) เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM; JEOL รุ่น 1220) กำลังขยายประมาณ 10,000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดความกว้างและยาวประมาณ $0.2 - 0.8 \times 1.0 - 5.0$ ไมโครเมตร มี flagella 1 เส้น อยู่ที่ขั้วด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (monotrichous flagella) (ภาพที่ 5) และเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงเท่ากับ 41 องศาเซลเซียส สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจาก glucose arabinose fructose manitol และ ethanol แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจาก sucrose arginine และ sorbitol สามารถรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และสามารถย่อยสลายแป้งได้ เมื่อนำข้อมูลข้างต้นมาประเมินเปรียบเทียบกับข้อมูลในตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (Holt *et al.*, 1994) พบว่าคุณสมบัติของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี สอดคล้องกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ตามข้อมูลอ้างอิง (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 5 ลักษณะและรูปร่างเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคใบขีดไหม้เลขที่ Aa9 การทดสอบแกรมด้วยวิธี Gram's strain พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (shot rod) เป็น แกรมลบ ติดสีแดงของ safranin-o (ก) และรูปร่างเซลล์และตำแหน่งของแฟลกเจลลาแบบ monotrichous flagella ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope : TEM)

ตารางที่ 4 ลักษณะวิทยา สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Aaa1
Aaa9 และ Aaa84 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง

Characteristics	Representative isolate ^{1/} of Morphotype group			
	Aaa1	Aaa9	Aaa84	<i>A. avenae</i> ^{2/} reference strain
Flagella	1	1	1	1-2
Shape	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Growth at 41 ⁰ C	+	+	+	+
Gram reaction ^{3/}	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+	+
Hypersensitive response ^{4/}	+	+	+	+
Carbon sources utilized for growth				
Glucose	+	+	+	+
Arginine	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-
Fucose	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
	<i>A. avenae</i>	<i>A. avenae</i>	<i>A. avenae</i>	<i>A. avenae</i> subsp.
	subsp.	subsp.	subsp.	<i>avenae</i>
	<i>avenae</i>	<i>avenae</i>	<i>avenae</i>	

^{1/} + = 90% คือ เกิดปฏิกิริยา, - = 90% คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

^{2/} อ้างอิงข้อมูลเปรียบเทียบของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ในตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition

^{3/} การทดสอบแกรมของแบคทีเรีย + = แบคทีเรียแกรมบวก - = แบคทีเรีย

^{4/} ปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันบนยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) + = เกิดปฏิกิริยา - = ไม่เกิดปฏิกิริยา

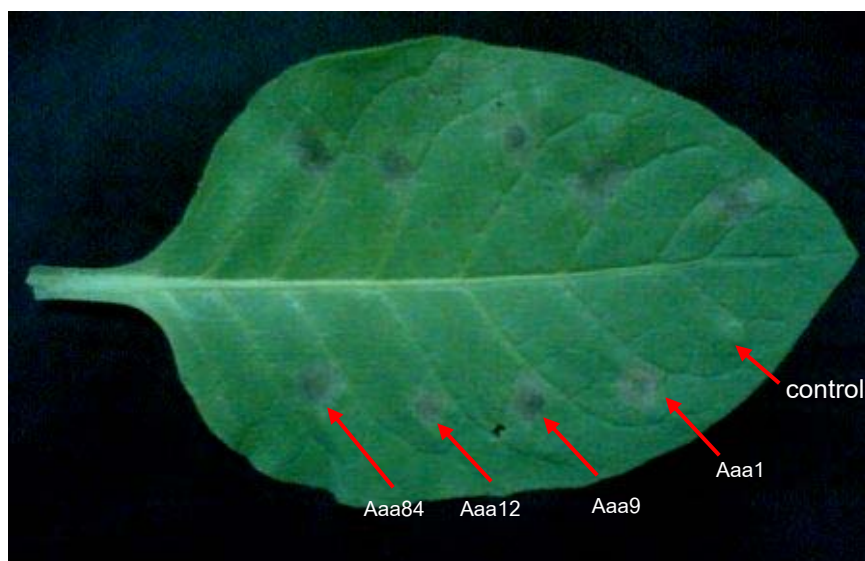
2.1. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด

2.1.1 การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ

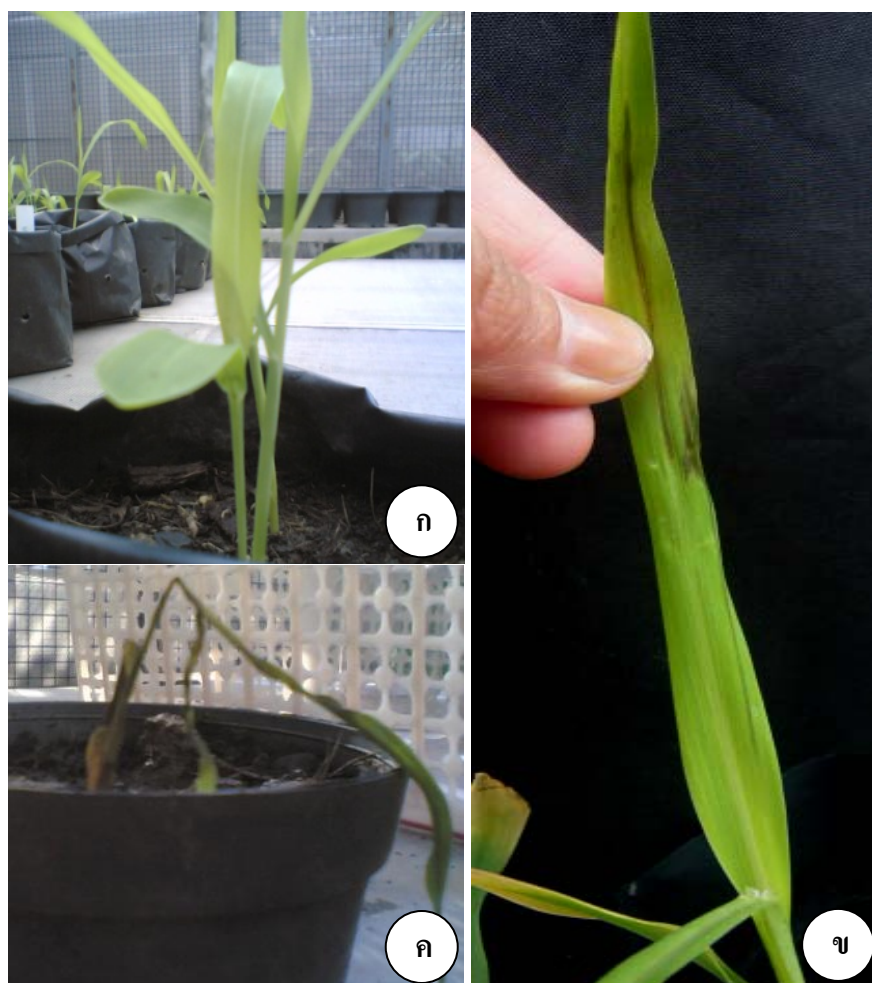
ผลการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรคใบขีดทั้ง 109 ไอโซเลท บนใบยาสูบซึ่งเป็นวิธีการขั้นต้นสำหรับตรวจสอบว่าแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหรือไม่ พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทสามารถกระตุ้นให้ใบยาสูบเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันหลังการฉีด suspension เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวหลัง 24 ชั่วโมง โดยแสดงอาการไหม้ (necrotic) ตรงบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ทดสอบเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (ภาพที่ 6)

2.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนต้นข้าวโพด

ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าวโพดที่แสดงอาการแผลขีด โดยการหยด suspension ของเชื้อลงบนกรวยของใบธงข้าวโพดอ่อนแอ (Schaad, 2001) พันธุ์อินทรี 2 และเก็บรักษาต้นข้าวโพดหวานไว้ที่สภาพอุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส และให้ความชื้นสูงติดต่อกัน 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดอาการแผลขีด โดยแสดงอาการแผล ขีดซ้ำ น้ำน้ำ สีน้ำตาล ขนานไปกับเส้น เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคที่แสดงอาการปรากฏบนต้นข้าวโพด หลังทำการปลูกเชื้อ 1 3 5 และ 7 วัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทก่อให้เกิดอาการรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ซึ่งไอโซเลท Aaa9 เกิดอาการโรครุนแรงและมีระยะเวลาการเกิดโรคสั้น คือแสดงอาการแผลขีดสีน้ำตาล ในวันที่ 1 หลังปลูกเชื้อ หลังจากนั้นแผลจะขยายยาว น้ำน้ำ ซึ่งจะแสดงอาการทั้งใบในวันที่ 3 หลังปลูกเชื้อ จากนั้นต้นข้าวโพดเหี่ยวตาย (ภาพที่ 7) รองลงมา คือ ไอโซเลท Aaa12 Aaa13 Aaa84 Aaa98 และ Aaa105 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลท Aaa9 เป็นใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 6 แสดงอาการแผลไหม้ ที่เกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบ หลังทดสอบ 24 ชั่วโมง ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Aaa1 Aaa9 Aaa12 และ Aaa84 เปรียบเทียบกับ control ที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 7 แสดงอาการโรคใบขีดขาวโพดไอโซเลต Aa9 เกิดโรคที่ 4 วันหลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการหยด suspension ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนข้าวโพดหวานพันธุ์อ่อนแออินทรี 2 โดย: ข้าวโพดปกติ (ก) ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดขาว น้ำน้ำ ขนานตามเส้นใบ ซึ่งแสดงลักษณะอาการฟิโนไทป์ B (ข) และแสดงอาการทั้งต้น (ค)

2.2 การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสจำเพาะบริเวณ 16S-23S ITS region โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบจากบริเวณ 16S-23S ITS region ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank โดยออกแบบด้วยโปรแกรม มีขนาดเท่ากับ 615 bp คือ ไพรเมอร์ AcAVF และ AcAVR มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-GGC TGG ATC ACC TCC TTT C-3' และ 5'-ACT TGC GAG GTC TTT CAC C-3' ตามลำดับ ซึ่งได้นำไพรเมอร์ทั้ง 2 มาใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดขาวโพดตลอดการศึกษา

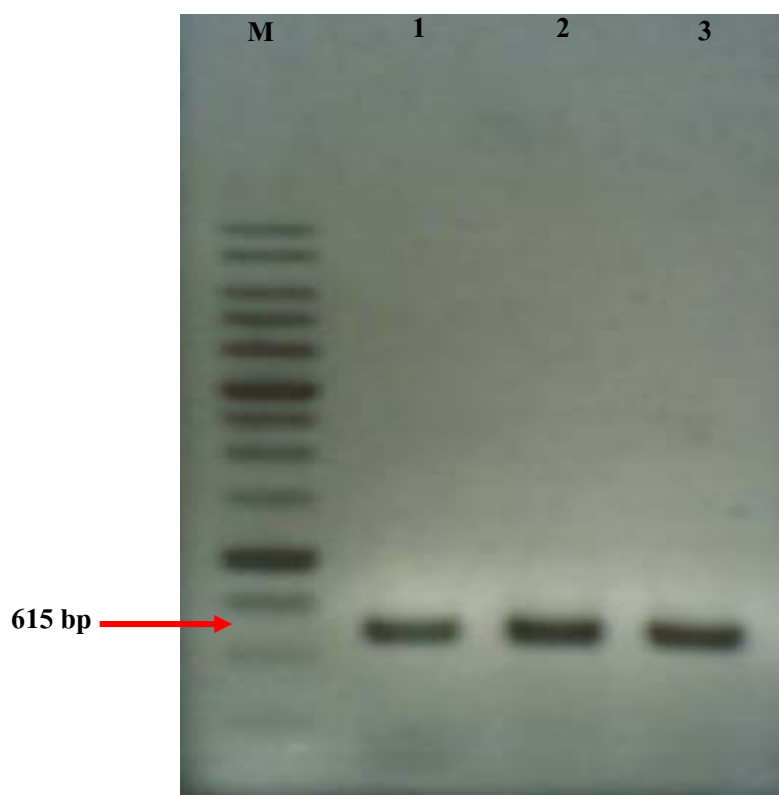
2.2.2 การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ ที่ได้จากการออกแบบ ดังแสดงลำดับนิวคลีโอไทป์ ในข้อ 2.2.1 ซึ่งออกแบบจากบริเวณ 16S -23S ITS region ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* พบว่าสามารถสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 615 bp ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะในระดับสปีชีส์ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาดเท่ากับ 615 bp จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 109 ไอโซเลท (ภาพที่ 8) จากการทดลองนี้สามารถยืนยันว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 109 ไอโซเลท มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูงกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* เนื่องจากการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองร่วมกัน ประกอบด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และลักษณะการก่อให้เกิดโรคบนข้าวโพดแสดงอาการของโรคใบขีดเช่นเดียวกับ เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* (ภาพที่ 7) เมื่อนำผลผลิตกันท์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี DNA sequence analysis (หน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลของ NCBI โดยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) สามารถยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคไอโซเลท Aaa1 Aaa9 Aaa84 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99, 100 และ 99% (% identity) กับ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ FC320 (ตารางที่ 5 และภาพที่ 9) เมื่อ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทุกกรรมวิธีประเมินร่วมกัน (การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี) สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพดที่ให้ผลการจำแนกตรงกัน คือเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* โดยปฏิบัติตามเกณฑ์ดังนี้ (1) เปรียบเทียบลำดับกับลำดับเบสที่มีรายงานอยู่แล้วพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน $\geq 99\%$ สามารถจำแนกได้ในระดับ species; (2) ถ้ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 99 และ 95% สามารถจำแนกได้ในระดับ genus (3) ถ้ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน $<95\%$ สามารถจำแนกได้ในระดับ family ของประชากรเชื้อ

2.3 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบบริเวณ 16S-23S ITS region ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae*

จากการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ AcAVF และ AcAVR กับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่ม Acidovorax สายพันธุ์อื่น ประกอบด้วย *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง, *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้ และเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesami*, และเชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกได้จากใบข้าวโพด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 615 bp สำหรับเชื้อในجنัส Acidovorax ประกอบด้วย *A. avenae* subsp. *citrulli*, *A. avenae* subsp. *cattleyae* จะสามารถผลิตแถบดีเอ็นเอได้มากกว่า 2 แถบ โดยมีแถบที่ชัดเจนที่สุดมีขนาด 615 bp นอกจากนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesami*, และเชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกได้จากใบข้าวโพด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S-23S ITS มีความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้ต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* โดยสามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอซึ่งพบเพียงแถบเดียวและมีขนาด 615 bp ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S ITS region บน 0.8% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder: ช่องที่ 1- 3 = เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจืดไอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 615 bp จำนวน 1 แถบ

ตารางที่ 5 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลท Aaa 1 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST
GenBank (accession number of comparative strain)

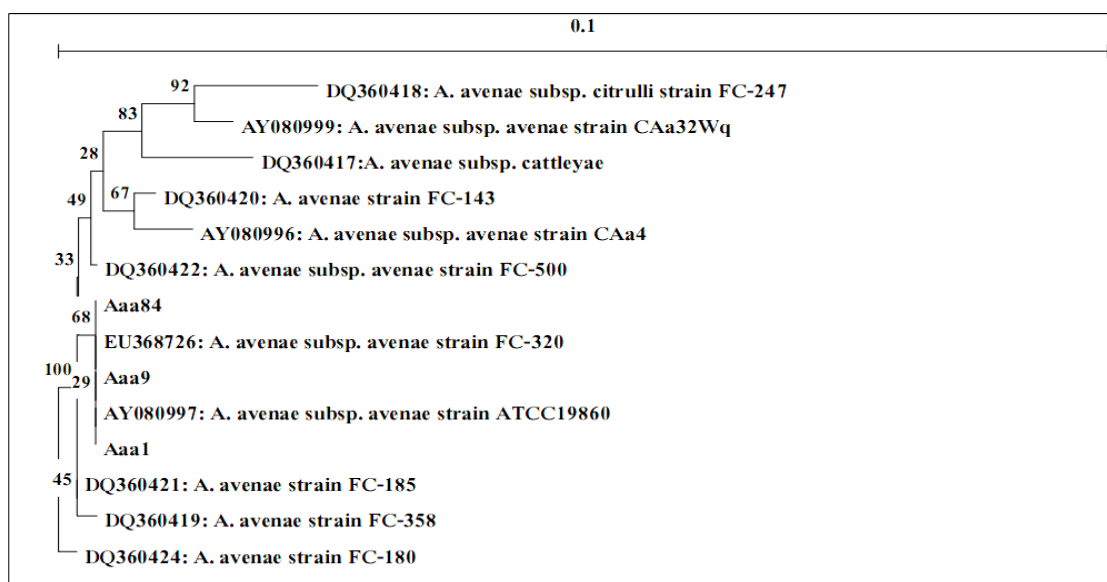
GenBank (accession number of comparative strain)	Sequence alignment		Nearest phylogenetic neighbor (genus and species)
	Similarity nucleotide	% Identity	
EU368726.1	584/587	99%	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
DQ360424.1	512/525	99%	<i>A. avenae</i>
DQ360422.1	584/587	99%	<i>A. avenae</i>
DQ360418.1	515/525	98%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
DQ360417.1	576/587	97%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>

ตารางที่ 6 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลท Aaa 9 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST
GenBank (accession number of comparative strain)

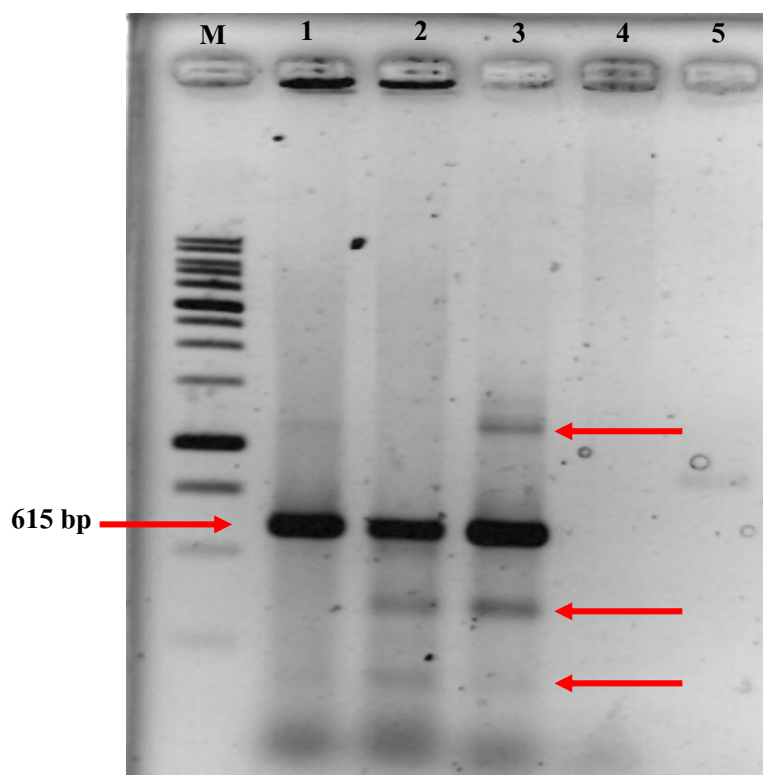
GenBank (accession number of comparative strain)	Sequence alignment		Nearest phylogenetic neighbor (genus and species)
	Similarity nucleotide	% Identity	
EU368726.1	587/587	100%	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
DQ360421.1	586/587	99%	<i>A. avenae</i>
DQ360422.1	585/587	99%	<i>A. avenae</i>
DQ360418.1	515/525	98%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
AY572032.1	579/588	98%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>

ตารางที่ 7 วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลท Aaa 84 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST GenBank (accession number of comparative strain)

GenBank (accession number of comparative strain)	Sequence alignment		Nearest phylogenetic neighbor (genus and species)
	Similarity nucleotide	% Identity	
EU368726.1	583/587	99%	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
DQ360419.1	585/587	99%	<i>A. avenae</i>
DQ360421.1	584/587	99%	<i>A. avenae</i>
AY572032.1	575/588	97%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>
DQ360418.1	573/589	97%	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ Phylogeny ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S-23S ITS region ขนาด 615 bp ของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank แบคทีเรียไอโซเลท Aaa1 Aaa9 และ Aaa84 มีความเหมือน 99 100 และ 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ FC-320



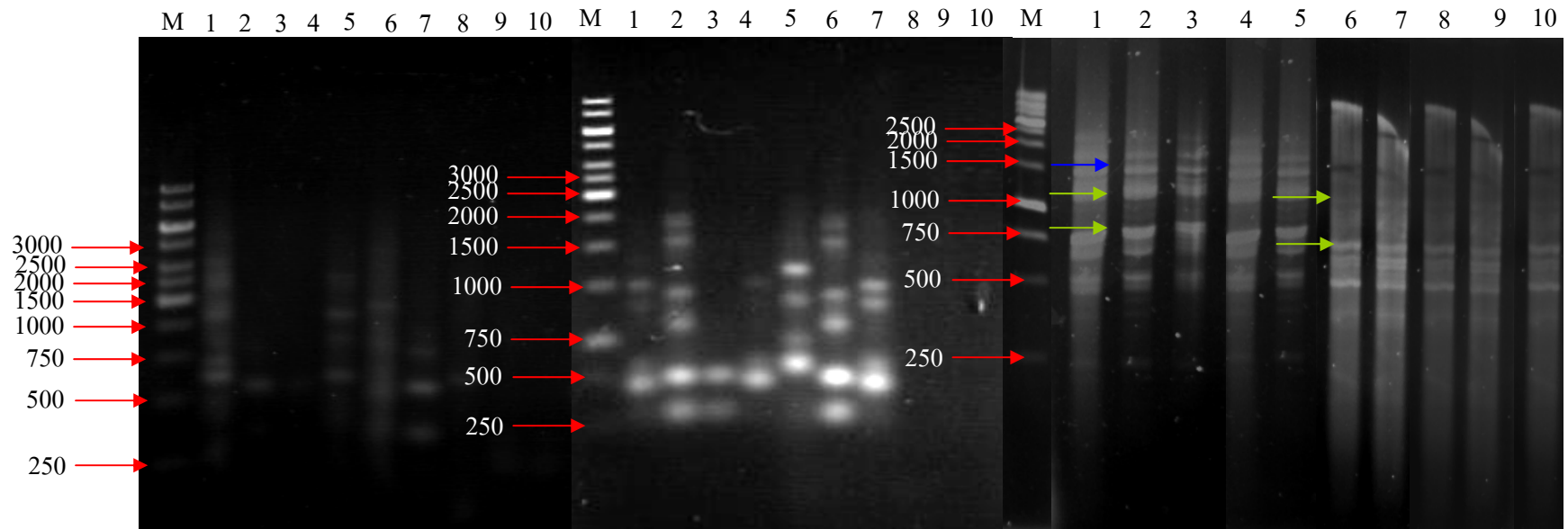
ภาพที่ 10 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ AcAVF และ AcAVR ของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S ITS บน 0.8% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder; lane 1= เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ไอโซเลท Aaa9 ; lane 2 = เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ; lane 3 = เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*; lane 4 = เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*; lane 5 = เชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกจากใบข้าวโพด

3. การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae*

ทำการเปรียบเทียบตัวแทนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีด ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยการทดลองครั้งแรกเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของไพรเมอร์ REP ERIC และ BOX โดยการสุ่มตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่แสดงลักษณะอาการของโรคทั้ง 3 กลุ่มฟิโนไทป์ พบว่าไพรเมอร์ BOX สามารถแยกความชัดเจนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์เชื้อทดสอบได้ชัดเจนกว่าไพรเมอร์ REP และ ERIC ดังนั้นจึงได้ใช้ไพรเมอร์ BOX มาใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 109 ไอโซเลท ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อโดยแสดงลักษณะของแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันแต่ละไอโซเลท มีจำนวนตั้งแต่ 8-13 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดตั้งแต่ 250-4000 bp นำข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Treeconw เพื่อสร้าง dendrogram จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* จำนวน 109 ไอโซเลท (ภาพที่ 11) ได้ 2 กลุ่ม มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.1 คือ กลุ่มพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรง (aggressive strains) และไม่รุนแรง (non-aggressive strains) โดยกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรง ประกอบด้วยประชากรเชื้อเท่ากับ 79 ไอโซเลท คิดเป็น 72.4 % ของประชากรเชื้อทั้งหมด เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มรุนแรงนี้ร่วมกับผลการทดลองกลุ่มลักษณะอาการโรคจากแปลงปลูกเกษตรกร (ผลการทดลองที่ 1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการแผลขีดขาว ฉ่ำน้ำ และมี halo ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟิโนไทป์ B (จากผลการทดลองที่ 1) โดยคิดเป็น 70.9 % ของประชากรในกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรง และประชากรบางส่วนจัดอยู่ในกลุ่มฟิโนไทป์ C ที่แสดงอาการแผลขีด และมีอาการใบไหม้ร่วมด้วย (จากผลการทดลองที่ 1) คิดเป็น 22.8% ของประชากรในกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรง สำหรับกลุ่มพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการโรคไม่รุนแรง ประกอบด้วยประชากรเชื้อจำนวน 29 ไอโซเลท คิดเป็น 26.6 % ของประชากรเชื้อทั้งหมด เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการโรคไม่รุนแรงนี้ร่วมกับผลการทดลองกลุ่มลักษณะอาการโรค (ผลการทดลองที่ 1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการแผลขีดสั้นในกลุ่มฟิโนไทป์ A และกลุ่มฟิโนไทป์ B (จากผลการทดลองที่ 1) คิดเป็น 27 และ 70 % ประชากรในกลุ่มที่ไม่รุนแรงตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มที่มีความรุนแรงของอาการโรคที่แตกต่างกัน พบว่าในกลุ่มพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะขนาด 1500 bp ทุกไอโซเลท ทั้ง 72.4%

และพบว่าเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ทุกสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 750 และ 1000 bp จากไพรเมอร์ BOX

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ข้างต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* ที่แยกจากใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรคทั้ง 3 กลุ่มอาการ ที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกรและลักษณะอาการของโรคที่ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการสอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และกลุ่มอาการ โรค แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับพันธุ์ข้าวโพดและแหล่งที่มาของเชื้อสาเหตุโรค

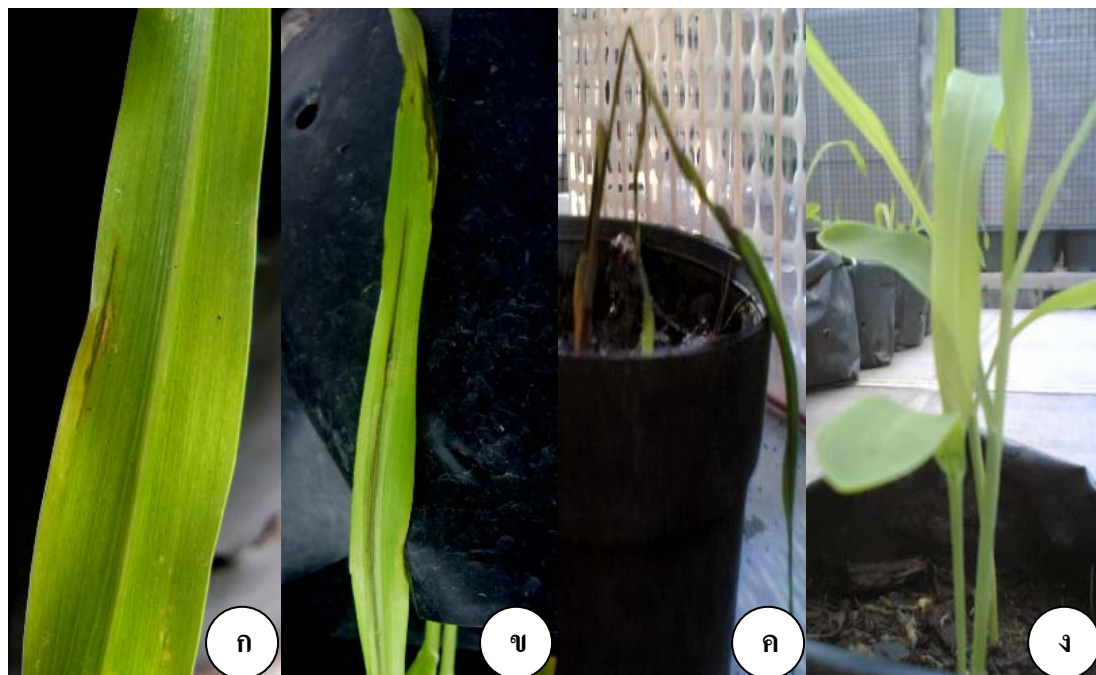


ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวแทนกลุ่มเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ที่แสดงลักษณะความรุนแรงโรค 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่แสดงอาการโรครุนแรง (Aaa14, Aaa15, Aaa35, Aaa51 และ Aaa80) และกลุ่มที่แสดงอาการโรคไม่รุนแรง (Aaa37, Aaa40, Aaa11, Aaa86 และ Aaa 101) จากไพรเมอร์ REP ERIC และ BOX บน 1.5% agarose gel โดยช่องที่ M: 1 kb ladder ; lane 1-10= Aaa14, Aaa15, Aaa35, Aaa51, Aaa80, Aaa37, Aaa40, Aaa11, Aaa86 และ Aaa 101

4. การศึกษาเทคนิควิธีการที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรค

4.1 เทคนิคและวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม

จากการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิควิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรีย เพื่อคัดเลือกวิธีที่เหมาะสม สะดวก และรวดเร็ว ต่อการศึกษาชีววิทยาของโรคใบขีดและสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปปรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดในระบบการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีด Aaa9 ซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความรุนแรงที่สุดในการก่อโรคกับข้าวโพดหวาน เป็นตัวแทนในการทดลองนี้ โดยทำการปลูกเชื้อบนข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ที่อายุ คือ 14 วัน ด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 3 กรรมวิธี และคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่าต้นข้าวโพดที่ปลูกเชื้อวิธีที่ 1 ที่ให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการของโรคได้เร็วและรุนแรงที่สุด คือ แสดงอาการโรคที่ 2 วันหลังปลูกเชื้อ โดยแสดงอาการโรคบนใบที่ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 45% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และแสดงอาการทั่วทั้งต้น (systemic) ในวันที่ 3 รองลงมาการปลูกเชื้อด้วยวิธีที่ 1 ที่มีการให้ความชื้น 24 ชั่วโมง แสดงอาการโรค 3-4 วันหลังปลูกเชื้อ และแผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาล โดยจะแสดงลักษณะอาการบนใบที่ความรุนแรงเท่ากับ 20% ของพื้นที่ใบทั้งหมด (ภาพที่ 12) และกรรมวิธีที่ 3 โดยการหยด suspension ของเชื้อในกรวยยอดข้าวโพดและให้ความชื้นที่ 48 และ 24 ชั่วโมง จะแสดงอาการแผลขีดสีน้ำตาล น้ำตาล มีความรุนแรงโรคเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบทั้งหมด มีระยะเวลาเกิดโรค 4-6 วัน และ 7-8 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดเซลล์ suspension ของเชื้อสาเหตุโรคเข้าลำต้นข้าวโพดและให้ความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไม่สามารถสังเกตเห็นลักษณะอาการ โรคและการพัฒนาการเกิดโรคได้ชัดเจน แต่จะแสดงอาการต้นเน่าตายทั้งต้น จึงไม่สามารถประเมินได้ สำหรับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 กรรมวิธี แต่ให้ความชื้นที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงกรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์ suspension ของเชื้อสาเหตุเท่านั้นที่แสดงอาการโรค โดยพบอาการแผลขีดสีน้ำตาล น้ำตาล ที่ 4-5 วันหลังปลูกเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกวิธีการที่ 1 ที่มีการให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 13 ลักษณะอาการโรคใบขีดบนข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 14 วัน ที่ความรุนแรงของ โรค
ระดับต่าง ๆ ด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรควิธีที่ 1 ที่ให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง : แสดง
อาการรุนแรงของโรค 10% ของพื้นที่ใบ (ก) แสดงอาการรุนแรงของโรค 25% ของพื้นที่
ใบ (ข) แสดงอาการรุนแรงของโรค 50% ของพื้นที่ใบ ขึ้นไป จนกระทั่งแสดงอาการเหี่ยว
ทั้งต้น (100%) (ค) และข้าวโพดปกติที่ใช้น้ำกลั่นแทนการปลูกเชื้อ (ง)

4.2 การทดสอบระดับความต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรียของข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่พันธุ์ต่าง ๆ

การทดสอบระดับความต้านทานของข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย จำนวน 33 พันธุ์ คือ ข้าวโพดหวานจำนวน 11 พันธุ์ ข้าวโพดไร่จำนวน 22 พันธุ์ พบว่าข้าวโพดแต่ละพันธุ์มีระดับความต้านทานแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งกลุ่มระดับของความต้านทานดังนี้ กลุ่ม I พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคต่ำ (แนวโน้มต้านทานระดับสูง) ได้แก่ ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ คือ บ้านสวน ชูการ์ 75 และ KSSC 915 ซึ่งแสดงอาการแผลขีดสั้นสีน้ำตาล หรือแผลขีดสีเขียวซีด (chlorosis) แสดงอาการที่ 5-7 วันหลังปลูกเชื้อ และมีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และข้าวโพดไร่ 13 พันธุ์ คือ Ki 39, Ki 40, Ki 44, Ki 45 ไม่แสดงอาการของโรค และ Ki 32, Ki 35, Ki 37, Ki 38, Ki 43, Ki 46, Ki 49, Ki 50 และ Ki 52 แสดงอาการแผลขีดสั้นสีน้ำตาล แสดงอาการที่ 5-6 วันหลังปลูกเชื้อ และมีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1% ของพื้นที่ใบทั้งหมด สำหรับในกลุ่ม II คือ พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคปานกลาง (แนวโน้มต้านทานปานกลาง) ได้แก่ ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ คือ KSSC904, 14004 ไฮบริกซ์10 และ KSSC604 แสดงอาการแผลขีดสั้นสีน้ำตาล ที่ 3-6 วันหลังปลูกเชื้อ และระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบทั้งหมด ในข้าวโพดพันธุ์ KSSC 904 และ 1404 สำหรับพันธุ์ไฮบริกซ์ 10 และ KSSC604 จะแสดงอาการ โรคความรุนแรงของโรคเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และข้าวโพดไร่ จำนวน 8 พันธุ์ คือ Ki 31, Ki 33, Ki 36, Ki 41, Ki 42, Ki 47, Ki 48, และ Ki 51 แสดงอาการแผลขีดสั้นสีน้ำตาล ที่ 3-6 วันหลังปลูกเชื้อ และระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 10% และ 25% ของพื้นที่ใบ ในข้าวโพดพันธุ์ Ki 33 และ Ki 36 และในกลุ่ม III เป็นพันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคสูง (แนวโน้มอ่อนแอต่อโรคหรือแนวโน้มต้านทานระดับต่ำ) ได้แก่ ข้าวโพดหวาน 4 พันธุ์ คือ KSSC 903, อินทรี 2, KSSC 901 และไฮบริกซ์3 แสดงอาการแผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำตาล และมี halo ล้อมรอบแผลภายในระยะเวลา 2-3 วันหลังปลูกเชื้อ มีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบทั้งหมด ในพันธุ์ KSSC 903 และ 25%ของพื้นที่ใบทั้งหมด ในพันธุ์อินทรี2, KSSC 901 และไฮบริกซ์3 (ตารางที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 8 การประเมินระดับความต้านทานของข้าวโพดหวานต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย ที่เกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ในระดับห้องปฏิบัติการ

พันธุ์	ลักษณะอาการ	ระดับความรุนแรงโรค (%) ^{2/}	จำนวนวันที่แสดงโรคหลังปลูกเชื้อ (วัน)	กลุ่มระดับความต้านทาน ^{1/}
KSSC 903	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า และมี halo ล้อมรอบ	50	2-3	III
อินทรี2	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า และมี halo ล้อมรอบ	50	2	III
KSSC 901	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า และมี halo ล้อมรอบ	50	3	III
Hybrid3	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า และมี halo ล้อมรอบ	25	3	III
KSSC 904	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า	10	6	II
14004	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า	10	4	II
Hybrid10	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า	25	3-5	II
KSSC 604	แผลขีดยาวสีน้ำตาล น้ำนํ้า	25	3-4	II
Ban-Souan	แผลขีดสั้นสีเขียวซีด (chlorosis) กระจายทั่วทั้งใบ	1	7	I
Sugar75	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	5	5-6	I
KSSC 915	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	5	5-6	I

ตารางที่ 8 (ต่อ)

พันธุ์	ลักษณะอาการ	ระดับความรุนแรงโรค ^{2/}	จำนวนวันที่แสดงโรคหลังปลูกเชื้อ (วัน)	กลุ่มระดับความต้านทาน ^{1/}
KSSC 915	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	1	5-6	I

^{1/} ระดับต้านทานสูง (I) ต้านทานปานกลาง (II) อ่อนแอ (III)

^{2/} ระดับความรุนแรงของโรค ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ

ตารางที่ 9 การประเมินระดับความต้านทานของข้าวโพดไร่ต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย ที่เกิดจากเชื้อ
Acidovorax avenae subsp. *avenae* ในระดับห้องปฏิบัติการ

พันธุ์	ลักษณะอาการ	ระดับความ รุนแรงโรค ^{2/}	จำนวนวันที่ แสดงโรคหลัง ปลูกเชื้อ (วัน)	กลุ่มระดับ ความต้านทาน ^{1/}
Ki34	แผลขีดยาวสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ และมี halo ล้อมรอบ	50	3	III
Ki31	แผลขีดสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ	10	6	II
Ki33	แผลขีดยาวสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ	25	3-4	II
Ki36	แผลขีดยาวสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ	25	3-4	II
Ki 41	แผลขีดสีน้ำตาล	25	3-4	II
Ki 42	แผลขีดสีน้ำตาล	25	3	II
Ki 47	แผลขีดสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ	10	4	II
Ki 48	แผลขีดสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ	10	5	II
Ki 51	แผลขีดสีน้ำตาล	10	5-6	II
Ki 32	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	5	5	I
Ki 35	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	5	5	I
Ki 37	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	1	6	I
Ki 38	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล	1	6	I
Ki 39	ไม่แสดงอาการ	-	-	I
Ki 40	ไม่แสดงอาการ	-	-	I
Ki 43	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	1	5	I
Ki 44	ไม่แสดงอาการ	-	-	I
Ki 45	ไม่แสดงอาการ	-	-	I
Ki 46	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล กระจายทั่วทั้งใบ	1	5	I
Ki 49	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ กระจายทั่ว ทั้งใบ	1	5	I
Ki 50	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ กระจายทั่ว ทั้งใบ	1	6	I

ตารางที่ 9 (ต่อ)

พันธุ์	ลักษณะอาการ	ระดับความรุนแรงโรค ^{2/}	จำนวนวันที่แสดงโรคหลังปลูกเชื้อ (วัน)	กลุ่มระดับความต้านทาน ^{1/}
Ki 52	แผลขีดสั้นสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ กระจายทั่วทั้งใบ	1	5	I

^{1/} ระดับต้านทานสูง (I) ต้านทานปานกลาง (II) อ่อนแอ (III)

^{2/} ระดับความรุนแรงของโรค ที่ประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 1 % ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 10% ของพื้นที่ใบ, แสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบ, และแสดงการเกิดโรคบนใบเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบ

วิจารณ์

โรคใบขีดข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* นับเป็นโรคแบคทีเรียที่สำคัญโรคหนึ่งของข้าวโพด และมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมพืช ระบบการปลูก พัฒนาการและการปรับตัวของเชื้อสาเหตุ ตลอดจนปัญหาสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และส่งผลกระทบโดยตรงต่อความรุนแรงของเชื้อสาเหตุ และความอ่อนแอของพันธุ์ข้าวโพด เมื่อเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายข้าวโพดจะก่อให้เกิดความเสียหายในระดับสูง และถ้าหากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะทำให้เกิดการระบาดของโรคอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคแพร่กระจายผ่านทางระบบการให้น้ำ หรือ ฝน ดังนั้นการศึกษาถึงการแพร่ระบาด การจำแนกชนิด การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค และพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคข้าวโพด รวมทั้งศึกษาชีววิทยาของเชื้อ เช่น การเข้าทำลายของพืชอาศัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และระดับความต้านทานของพืชอาศัย ถือเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการจัดการ/ควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคใบขีดแบคทีเรีย จากพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวานแหล่งต่าง ๆ และนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค พร้อมทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรค การทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนข้าวโพดหวานทดสอบพันธุ์อินทรี 2 และการจำแนกชนิดด้วยวิธีพื้นฐานและขั้นสูง เมื่อเก็บตัวอย่างโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด โดยกำหนดพื้นที่สุ่มกระจายทั่วแปลงในพื้นที่ 1 ไร่ สุ่มเก็บตัวอย่างโรคโดยใช้อัตราส่วนในการเก็บตัวอย่าง 1: 2 ไร่ แบบกากบาท จำนวน 39 จุด แต่ละจุดมีพื้นที่ 1 ตารางเมตร และภายในพื้นที่ 1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างโรคลักษณะการเดินแบบ W วนซ้าย จำนวน 5 จุด ซึ่งวิธีการสุ่มดังกล่าวครอบคลุมได้ดี เทียบเท่ากับการสุ่มตัวอย่างทุกต้น (Delp *et al.*, 1986) การเก็บรวบรวมและการแยกเชื้อสาเหตุโรคใบขีด สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่แสดงลักษณะอาการคล้ายกับคู่มืออ้างอิง เชื้อแบคทีเรียข้าวโพด (White, 1991) จำนวน 1367 ตัวอย่าง เมื่อทำการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นพบว่ามีเพียง 109 ตัวอย่างเท่านั้นที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* และเมื่อนำมาประเมินการระบาดของโรคจากตัวอย่างโรคทั้งหมด พบว่าโรคนี้นี้มีการระบาดสูงสุดในแปลงทดลองข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติและแปลงเกษตรกรจังหวัดนครราชสีมาที่มีการระบาดของโรคมากที่สุด คิดเป็น 14.35% ของพื้นที่สำรวจในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา รองลงมาคือ พื้นที่การปลูกข้าวโพดในจังหวัด

เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี เท่ากับ 5.38, 1.5 และ 0.51% ตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มลักษณะอาการโรคจากตัวอย่างที่รวบรวมได้จากการสำรวจได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ข้าวโพดแสดงอาการใบขีดสั้น สีน้ำตาลอ่อน ขนาดแผลประมาณ 5-10 ซม. กระจายทั่วไปข้าวโพด (กลุ่มฟิโนไทป์ A) กลุ่มที่ 2 ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดฉีกฉีก ขยายยาวตามเส้นใบ (กลุ่มฟิโนไทป์ B) กลุ่มที่ 3 ข้าวโพดแสดงอาการแผลขีดยาวสีน้ำตาล ขนานตามเส้นใบ และแผลจะขยายกว้างออกด้านข้างทำให้แผลเชื่อมติดกันจนเกิดอาการใบไหม้ (กลุ่มฟิโนไทป์ C) และพบโรคนี้จะระบาดในข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ในระยะต้นกล้าจนถึงอายุ 30 วัน อาการโรคส่วนใหญ่จะพบอาการในกลุ่มฟิโนไทป์ B และ C รองลงมาคือ ข้าวโพดพันธุ์แปซิฟิก และ Big 979 โดยแสดงอาการในกลุ่มฟิโนไทป์ B ซึ่งลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค พันธุ์ข้าวโพดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และระยะเวลาในการเกิดโรค ปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลต่อการเกิดโรค โดยลักษณะอาการของโรคที่พบจะขึ้นอยู่กับปัจจัยเหล่านี้ คือ พันธุ์ของข้าวโพด อายุของข้าวโพด และสภาพภูมิอากาศ ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Gitaitis *et al.* (2002) ที่พบว่าสายพันธุ์เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ที่เกิดโรคใน Pearl millet จะแสดงอาการแผลไหม้ แต่ไม่พบอาการแผลฉีกฉีกในข้าวโพดหวาน สำหรับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวโพดหวานจะมีลักษณะอาการแผลขีด ฉีกฉีก ซึ่งจะพบอาการโรคทั้งในข้าวโพดหวานและ millet และจะพบเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ที่รุนแรงในข้าวโพดหวานมากกว่าข้าวโพดไร่ และอ้อย นอกจากนี้พบว่าข้าวโพดในระยะต้นกล้าจะอ่อนแอต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* มาก (Hu *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับ สุดฤดี และคณะ (2547) พบว่าข้าวโพดที่แสดงลักษณะอาการในกลุ่มฟิโนไทป์ A ส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดไร่ และมีอายุในช่วงก่อนออกดอก ซึ่งจะพบอาการของโรคกลุ่มฟิโนไทป์ B และ C ในข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสม อายุประมาณ 2 สัปดาห์ถึงระยะก่อนออกดอก จะพบอาการโรคในช่วงเดือนเมษายน ถึงเดือนกรกฎาคม ในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม นอกจากนี้เมื่อปล่อยให้ต้นข้าวโพดที่แสดงอาการโรคแต่ละกลุ่มอาการจนถึงระยะเก็บเกี่ยว พบว่าอาการของโรคที่พบในระยะต้นกล้าไม่มีการพัฒนาอาการของโรคแต่จะพบอาการของแผลดังกล่าวเป็นแผลแห้งสีน้ำตาลหรือเทาและมีเชื้อโรคชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำเติม

ทั้งนี้จากจำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุแล้ว ผลการสำรวจและการวิเคราะห์การระบาดในพื้นที่ปลูก พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ สภาพพื้นที่ และภูมิอากาศในพื้นที่ปลูก ตลอดจนพันธุ์ที่ใช้ปลูก จากการสำรวจ ซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยรวมข้างต้นดังกล่าว พบว่าในช่วงการสำรวจพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค คือ มีปริมาณฝนตกติดต่อกันและมีช่วงอุณหภูมิสูงติดต่อกัน ซึ่ง

ปัจจัยดังกล่าวเหมาะต่อการระบาดของโรค รวมทั้งพื้นที่ ดังกล่าวมีการปลูกข้าวโพดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจทำให้มีการสะสมของเชื้อสาเหตุโรค เมื่อเกษตรกรปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอและมีสภาพอากาศเหมาะสมจึงทำให้เกิดโรครุนแรง ในขณะที่พื้นที่ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี และ ลพบุรี มีการระบาดน้อยกว่า เนื่องจากแต่ละพื้นที่มีปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิค่าก่ายังส่งผลโดยตรงต่อการเกิดและการระบาดของโรคในพื้นที่เหล่านั้น แต่อย่างไรก็ตามในทุกพื้นที่ พบว่าพันธุ์ข้าวโพดเป็นปัจจัยส่งเสริมต่อความรุนแรงของโรค ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช สภาพแวดล้อม และระดับความรุนแรงเชื้อก่อโรค ดังนั้น หากมีการจัดการหรือควบคุมปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งก็สามารถลดการแพร่ระบาดของโรคได้ และจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเชื้อสาเหตุโรคมีลักษณะแตกต่างกันในการเข้าทำลายพืชทดสอบ ระดับที่ต่างกัน เมื่อทำการทดลองในสภาพแวดล้อมและปัจจัยเดียวกัน (พันธุ์ อายุ วิธีการปลูกเชื้อ) เชื้อบางสายพันธุ์ที่แยกจากต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการ โรครุนแรงในสภาพไร่ แต่แสดงอาการไม่รุนแรงในสภาพเรือนทดลอง ในขณะที่บางสายพันธุ์ที่แยกจากต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการ โรคไม่รุนแรงในสภาพไร่แต่กลับก่อให้เกิดความรุนแรงในสภาพควบคุม ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยทางธรรมชาติ/หรือสภาพแวดล้อมเป็นตัวแปรหนึ่งที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคและควบคุมการแสดงออกของยีนก่อโรคพืช ในสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคและลักษณะความต้านทานโรคของพืช (พรภิมล และคณะ 2550)

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพดด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อจำแนกและระบุเชื้อสาเหตุโรคใบขีดนั้น พบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดที่แสดงอาการใบขีดเป็นเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ดังสมมติฐานของการทดลอง คือ สามารถเจริญบนอาหารกึ่งจำเพาะ SNR มีโคโลนีลักษณะสีขาวใส กลม นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ขนาดความกว้างและยาวประมาณ 0.2-0.8 x 1.0-5.0 ไมโครเมตร มี flagella 1 เส้น อยู่ที่ขั้วด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงเท่ากับ 41 องศาเซลเซียส ไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (pigment) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *A. avenae* subsp. *avenae* (Schaad, 1980 : Rosen, 1926) สำหรับการพิสูจน์ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดหวานพันธุ์อ่อนแอ อินทรี 2 โดยแสดงอาการแผลขีด ฉ่ำน้ำ ขนานตามเส้นใบข้าวโพด ภายใน 3 วันหลังปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing analysis) ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อให้การจำแนกและระบุชนิดเชื้อแม่นยำยิ่งขึ้น พบว่าการเรียงตัวของลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อตัวแทนที่ใช้ในการทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (identity) กับ

เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ FC-320 ถึง 99-100% สำหรับโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด (bacterial leaf streak) พบโรคนี้ครั้งแรกในปี 1949 (Johnson *et al.*, 1949) และพบโรคนี้ระบาดในรัฐ florida ในปี 1970 โดยพบอาการของแผลขีดน้ำน้ำ ขนานกับเส้นใบข้าวโพด เมื่อทำการศึกษาจำแนกชนิดของ เชื้อสาเหตุโรค เป็นเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* (Manns 1909) (ชื่อเดิมว่า *P. avenae* Manns 1909, *P. alboprecipitans* Rosen 1926) สำหรับประเทศไทย สุกฤดี และคณะ 2547 พบการระบาดของโรคนี้ในข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสม 30% ของแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญ แต่ยังไม่มีการศึกษาในเชิงลึกสำหรับโรคนี้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงเป็นการศึกษาและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A.avenae* subsp. *avenae* บริเวณ 16S-23S ITS ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว คือ เป็นเชื้อชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว มีขนาด 615 bp ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Acidovorax* สายพันธุ์อื่น เช่น *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง และ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้ จะสามารถผลิตแถบดีเอ็นเอได้มากกว่า 2 แถบ โดยมีแถบที่ชัดเจนที่สุดมีขนาด 615 bp ที่ได้ผลการทดลองเช่นนี้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง และ *A. avenae* subsp. *cattleyae* จัดอยู่ใน genus และ species เดียวกันกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด แต่อยู่คนละ subspecies จึงทำให้สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 615 bp ได้เช่นเดียวกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ปัจจุบันยังไม่ทราบจีโนมที่ชัดเจนของเชื้อกลุ่มนี้ ดังนั้นต้องมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนมของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม จะทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้น นอกจากนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesami* และเชื้อแบคทีเรีย saprophyte ที่แยกได้จากใบข้าวโพด จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S-23S ITS มีความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้ต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* โดยสามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอซึ่งพบเพียงแถบเดียวและมีขนาด 615 bp ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gitaitis และคณะ (2002) จำแนกเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดของ pearl millet พันธุ์ลูกผสมด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อ *A. avenae* คือ ไพรเมอร์ WFB1 และ WFB2 สามารถจำแนกชนิดเชื้อได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ David และคณะ (2002) ได้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *stewartii*

สาเหตุโรคเหี่ยวในข้าวโพด โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ *hrpS*, *cpsDE*, 16S rRNA และ 16S-23S intergenic transcription spacer (ITS) region ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพด เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เช่น *P. agglumerans* pv. *herbicola*, *P. annanas*, *Erwinia amylovora* และ *E. carotovora* พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ คือ 900, 1100, 290 และ 920 bp ขณะที่เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวได้

การทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดหวานพันธุ์อ่อนแอ อินทรี 2 บันทึกการเกิดโรคที่ 3 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เหมาะสม เชื้อสาเหตุมีการพัฒนาเต็มที่ ผลความรุนแรงโรคที่ได้พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทจากแหล่งต่าง ๆ มีระดับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกัน นอกจากแหล่งที่มาของเชื้อแล้ว ช่วงอายุของข้าวโพดที่ต่างกันในการเก็บรวบรวมเชื้อพบว่า ระดับความรุนแรงของโรคแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Scortichini *et al.* (2002) ที่กล่าวถึงเชื้อแบคทีเรีย *X. arboricola* pv. *corylina* ที่เก็บจากพื้นที่ต่างกัน มีระดับความรุนแรงโรคไม่เท่ากัน ความเหมาะสมในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์อาจมีพัฒนาไปตามสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เมื่อนำมาทดสอบในสภาพเรือนทดลองซึ่งมีความเหมาะสมเฉพาะเชื้อแต่ละกลุ่ม ทำให้เชื้อบางส่วนมีความรุนแรงมาก บางกลุ่มมีความรุนแรงน้อย ทั้งนี้เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปและเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มเดิมจากที่เคยอ่อนแอ อาจก่อให้เกิดความรุนแรงขึ้นใหม่ได้ การที่เชื้อสามารถพัฒนาจากเชื้อที่อ่อนแอมาเป็นรุนแรงได้เอง เป็นสิ่งที่สำคัญที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องให้ความระมัดระวังการปรับปรุงพันธุ์พืชใหม่ ๆ ให้มีลักษณะแตกต่างจากเดิม (Trevor, 1988)

การศึกษาด้านความหลากหลายพันธุกรรมของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ BOX เมื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้และเมื่อนำมาจัดกลุ่มเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับลักษณะความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรค ลักษณะอาการโรค และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค การทดลองครั้งนี้จึงสามารถแบ่งเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะความรุนแรงในการก่อโรค โดยสามารถจำแนกพันธุกรรมเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ก่อให้เกิดโรครุนแรง (aggressive strains) ออกจากสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคไม่รุนแรง (non-aggressive strains) ได้ ซึ่งสามารถพบการผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ได้จากเชื้อสายพันธุ์รุนแรงทั้งหมด แต่ไม่พบในสายพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งแสดงลักษณะพันธุกรรมดังกล่าวน่าจะเป็นลักษณะเฉพาะเจาะจงชนิดหนึ่งใน

การบ่งบอกความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคโดยน่าจะเกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenicity gene) ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* ซึ่งการที่ปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เฉพาะนี้ อาจเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์บริเวณหนึ่งของลำดับสารพันธุกรรมในจีโนม (Gonzalez *et al.*, 2002) แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp อาจนำไปใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ที่แสดงกลุ่มอาการแผลขีดได้และสามารถนำ sequence ดังกล่าวมา ทำเป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่มีความแม่นยำต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรเมอร์ BOX สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อได้จากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 8-13 แถบ (DNA polymorphic band) และยังพบว่าการใช้ไพรเมอร์ BOX ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สามารถตรวจพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 750 และ 1000 bp ได้ ทุกไอโซเลทที่ทำการทดลอง (109 ไอโซเลท) ไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากแหล่งพื้นที่หรือ พันธุ์ข้าวโพดใดก็ตาม ซึ่งผลการทดลองนี้มีลักษณะผลการทดลองเช่นเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycenes* พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจากลายพิมพ์ที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ BOX เท่านั้น (กุล ชนา, 2546) ถึงแม้ว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะแตกต่างกันเช่นไร แต่ถ้าเป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycenes* จะพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 650 bp นี้เสมอ นอกจากนี้พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 และ 1500 bp จากไพรเมอร์ BOX เฉพาะในกลุ่มเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดลักษณะอาการโรคกลุ่มที่ 1 และ 2 เช่นเดียวกับงานทดลองของ Gonzalez *et al.* (2002) ที่ใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ F13/XV ร่วมกับ F18/XV ได้ polymorphic band เพียง 1 แถบซึ่งเป็นแถบที่พบเฉพาะใน *X. axonopodis* pv. *manihotis* สายพันธุ์รุนแรงเท่านั้น ดังนั้นการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า BOX-PCR ให้ผลการวิเคราะห์ที่ละเอียด และแสดงให้เห็นว่า *A. avenae* subsp. *avenae* แม้จะมาจากแหล่งและ พันธุ์พืชเดียวกันแต่ก็มีลักษณะ phenotype ที่แสดงออกแตกต่างกันชัดเจน แสดงว่าพันธุกรรมของ เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* มีความสัมพันธ์ค่อนข้างน้อยกับแหล่งที่มาของเชื้อหรือพันธุ์ข้าวโพด ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับ Tika *et al.* (1999) ที่ทำการศึกษา rep-PCR กับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในประเทศเนปาลโดยทดลองแยกเชื้อจากแหล่งปลูกข้าว และพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกัน เมื่อ ตรวจดูลักษณะทาง genotype พบความเหมือนกันจากเชื้อที่แยกมาจากแหล่งปลูกข้าวที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้จะขัดแย้งกับสมมติฐานที่กล่าวว่าพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะมีอิทธิพลของ สภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ จึงจัดเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา ความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* กับข้าวโพดที่มีระดับ ความสามารถในการก่อโรครุนแรงมาก/น้อย

การศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่เหมาะสมในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคใบขีดแบคทีเรีย ที่สะดวกและรวดเร็วให้ผลชัดเจนและแม่นยำในระดับเรือนทดลอง โดยศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนข้าวโพดหวานพันธุ์อ่อนแอ ด้วยวิธีการต่าง ๆ 4 วิธี ที่ข้าวโพดอายุ 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ข้าวโพดอ่อนแอต่อโรคนี้ และเปรียบเทียบกับ การให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดที่ระยะเวลาต่างกัน คือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าต้นข้าวโพดที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการพ่นเซลล์ suspension ของเชื้อสาเหตุโรคและให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการของโรคได้เร็วและรุนแรงที่สุด คือ แสดงอาการโรคที่ 2 วันหลังปลูกเชื้อ โดยแสดงอาการบนใบที่ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 50% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และแสดงอาการทั่วทั้งต้น (systemic) ในวันที่ 3 รองลงมาการปลูกเชื้อด้วยการพ่นเซลล์ suspension และให้ความชื้น 24 ชั่วโมง แสดงอาการโรคน้ำ 3-4 วันหลังปลูกเชื้อและจากนั้นแผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาล โดยจะแสดงลักษณะอาการบนใบที่ความรุนแรงเท่ากับ 25% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และกรรมวิธีที่หยดเซลล์ suspension ของเชื้อลงในกรวยยอดของใบธงของข้าวโพดและให้ความชื้นที่ 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่าข้าวโพดแสดงอาการแผลขีด สันประมาณ 3-5 เซนติเมตร น้ำมีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 5% ของพื้นที่ใบทั้งหมด และมีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 4-6, และ 7 วันหลังปลูกเชื้อ ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีที่ฉีด suspension ของเชื้อสาเหตุโรคเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดร่วมกับการให้ความชื้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าต้นข้าวโพดแสดงอาการเน่า ซึ่งไม่ปรากฏอาการแผลขีด ที่ 2-3 วันหลังปลูกเชื้อ จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่าต้นข้าวโพดที่แสดงอาการเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคหรือเกิดจากสาเหตุอื่น ทำให้ยากต่อการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคข้าวโพดหวานเนื่องจากต้นข้าวโพดแสดงอาการของโรคได้เร็ว และสามารถสังเกตเห็นพัฒนาการการเกิดโรคได้ชัดเจนที่สุด นอกจากนี้ในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคควรปลูกเชื้อในช่วงที่ปากพืชเปิดอยู่ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่รวมทั้งเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* จะเข้าทำลายพืชทางปากใบ และทาง stomata และโรคนี้จะเข้าทำลายที่ใบอ่อนของข้าวโพด (Pataky, 1997) นอกจากนี้ การให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดก็เป็นการส่งเสริมให้ต้นข้าวโพดอยู่ในสภาวะเครียดซึ่งเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะส่งผลให้ต้นข้าวโพดอ่อนแอลงทำให้เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายและเกิดโรคได้ง่ายขึ้น (พรพิมล, 2550) และเมื่อนำเทคนิคที่คัดเลือกดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรีย จำนวน 33 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวโพดหวานจำนวน 11 พันธุ์ ข้าวโพดไร่จำนวน 22 พันธุ์ พบว่า ข้าวโพดแต่ละพันธุ์มีระดับความต้านทานแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งกลุ่มระดับของความต้านทาน จากการพิจารณาระดับความรุนแรงของโรค (disease

severity) บนพื้นที่ใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรค ซึ่งประยุกต์วิธีการประเมินจาก Duveiller (1994) และจำนวนวันที่พืชแสดงอาการหลังปลูกเชื้อ ได้ 3 กลุ่ม คือ (I) พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคต่ำ (แนวโน้มด้านทานระดับสูง) ได้แก่ ข้าวโพดหวานจำนวน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์บ้านสวน พันธุ์ชูการ์ 75 และ KSSC 915 และ ข้าวโพดไร่พันธุ์จำนวน 13 พันธุ์ คือ พันธุ์ Ki 39, Ki 40, Ki 44, Ki 45, Ki 32, Ki 35, Ki 37, Ki 38, Ki 43, Ki 46, Ki 49, Ki 50 และ Ki (II) พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคปานกลาง (แนวโน้มด้านทานปานกลาง) ได้แก่ ข้าวโพดหวานจำนวน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ KSSC 904, 14004, ไฮบริคซ์ 10 และ KSSC 604 และ ข้าวโพดไร่พันธุ์จำนวน 8 พันธุ์ คือ พันธุ์ Ki 31, Ki 33, Ki 36, Ki 41, Ki 42, Ki 47, Ki 48, Ki 51, Ki 33 และ Ki 36 (III) พันธุ์ที่มีระดับการเป็นโรคสูง (แนวโน้มอ่อนแอต่อโรคหรือแนวโน้มด้านทานระดับต่ำ) ได้แก่ ข้าวโพดหวานจำนวน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ KSSC 903, อินทรี 2, KSSC 901 และ ไฮบริคซ์ 3 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการจัดระดับความต้านทานของโรคใบขีดแบคทีเรียในการทดลองครั้งนี้ ไม่ว่าจะจัดกลุ่มตามลักษณะความต้านทานแบบเฉพาะเจาะจง (ลักษณะอาการแผล) หรือการจัดกลุ่มตามลักษณะความต้านทานทั่วไป (ระดับความรุนแรงของโรค) หรือการจัดกลุ่มโดยอาศัยจำนวนวันที่พืชแสดงอาการโรคหลังจากปลูกเชื้อ ผลที่ได้มีความสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ พันธุ์อ่อนแอมีลักษณะอาการของโรคชัดเจนและแผลมีขนาดใหญ่มีระยะเวลาในการเกิดโรคช้า ในขณะที่พันธุ์ต้านทานมีลักษณะอาการของโรคไม่ชัดเจนและมีแผลขนาดเล็ก มีระยะเวลาในการเกิดโรค (infection period) นาน อย่างไรก็ตาม ในการก่อให้เกิดโรคจะมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค 3 ปัจจัย คือ พืชอาศัยอ่อนแอ เชื้อสาเหตุโรคเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงและสภาพแวดล้อมเหมาะสมในการก่อให้เกิดโรค โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อก่อโรคจะเป็นความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์ โดยหากสายพันธุ์เชื้อมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงหรือมีการปรับปรุงพัฒนาพืชพันธุ์ใหม่ขึ้นมา ก็จะส่งผลต่อการเกิดและการพัฒนาของโรค โดยเฉพาะโรคที่ไม่เคยระบาดอาจจะมีผลสำคัญและรุนแรงได้ (สุดฤดี และคณะ 2547) โดยมีสภาพแวดล้อมเป็นตัวแปรที่สำคัญ นอกจากนี้ ปฏิสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดโรคแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ แบบเฉพาะเจาะจง (race-cultivar specific) และไม่เฉพาะเจาะจง (non-race-cultivar specific) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคบางสายพันธุ์มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชเฉพาะพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง ในขณะที่เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 1 พันธุ์หรือ 1 ชนิด โดยผลการทดลองนี้เป็นตัวชี้วัดอีกอย่างหนึ่งว่าควรมีการคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่เหมาะสมต่อพื้นที่หรือสภาพแวดล้อม โดยหลีกเลี่ยงการปลูกข้าวโพดพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคในพื้นที่ที่มีประวัติเกิดการระบาดของโรคดังกล่าว หรือควรมีการจัดการพื้นที่ปลูก เพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคก่อนทำการปลูกพืช หรืออาจใช้หรือคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรคปลูกในพื้นที่เสี่ยงร่วมกับการจัดการโรคอย่างถูกวิธี นอกจากนี้ พบว่าข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมที่มียีน *Shrunken-2* จะอ่อนแอต่อโรคใบขีดแบคทีเรียที่

เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* (Pataky *et al*, 1997) และพบว่า ข้าวโพดหวานพันธุ์ อินทรี 2 ไฮบริด 3 และ KSSC604 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่ำ (III) และเป็นข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมที่มียีน *Shrunken-2* (โชคชัย และคณะ, 2551) ซึ่งตรงกับ Pataky และคณะรายงาน การทดลองในครั้งนี้ จึงจัดเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการประเมินพันธุ์พืชต้านทานโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดและนำไปประยุกต์ใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ในระดับแปลงทดลองต่อไป นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรคสามารถปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นควรมีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ก่อนที่จะนำไปแจกจ่ายให้แก่เกษตรกรนำไปเพาะปลูก เพราะหากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวเชื้อมีอาจสามารถดำรงชีพและก่อให้เกิดการแพร่ระบาดได้ทุกพื้นที่และทุกสภาพภูมิอากาศ

สรุป

สามารถสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดที่แสดงอาการแผลขีดข้าว สีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ และมี halo ล้อมรอบ ขนานไปตามเส้นใบ ในแหล่งปลูกข้าวโพดจำนวน 4 จังหวัด และสามารถรวบรวมข้าวโพดที่แสดงอาการโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายกับคู่มืออ้างอิง (White, 1999) จำนวน 1365 ตัวอย่าง เมื่อทำการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นพบว่า มีเพียง 109 ตัวอย่าง เท่านั้นที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* พบว่าจังหวัดนครราชสีมาพบข้าวโพดแสดงอาการโรคมากที่สุด คือ 84 ตัวอย่าง จาก 585 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บ คิดเป็น 14.35% ของการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา รองลงมาคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี จำนวน 21, 3, และ 1 ตัวอย่าง จาก 390 195 และ 195 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บ คิดเป็น 5.38 1.5 และ 0.51% ของการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี และสามารถแบ่งกลุ่มลักษณะอาการที่พบออกเป็น 3 กลุ่ม เมื่อทำการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมีบางประการ ศึกษาโครงสร้างของเชื้อสาเหตุด้วยกล้อง TEM และศึกษาลำดับเบสบริเวณจำเพาะ 16S-23S rDNA เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับการวินิจฉัยเชื้อทุกวิธีมาประเมินร่วมกันสามารถจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดข้าวโพด คือ เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae*

เทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดข้าวโพดออกเป็น 2 กลุ่ม พบว่าเมื่อจำแนกตามความรุนแรงของโรค และลักษณะอาการของโรคที่เก็บจากแปลงเกษตรกรและได้ผ่านการทดสอบความรุนแรงของโรคในห้องปฏิบัติการแล้วโดยพิจารณาจากระดับความรุนแรงของโรค ลักษณะของแผล (phenotype) และลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (genotype) ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ความหลากหลายของความรุนแรงโรค ลักษณะอาการและความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดพบว่าลักษณะอาการโรคที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกร และลักษณะอาการของโรค รวมทั้งระดับความรุนแรงของโรคที่ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการสอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่า *A. avenae* subsp. *avenae* แม้จะมาจากแหล่งและพันธุ์พืชเดียวกันแต่ก็มีลักษณะ phenotype ที่แสดงออกแตกต่างกันชัดเจน แสดงว่าพันธุกรรมของเชื้อ *A. avenae* subsp.

avenae มีความสัมพันธ์ค่อนข้างน้อยกับแหล่งที่มาของเชื้อหรือพันธุ์ข้าวโพด แต่มีระดับความสัมพันธ์สูงกับความรุนแรงโรคและลักษณะอาการโรคที่แสดงออก

เทคนิคการปลูกเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรีย คือ วิธีการปลูกเชื้อด้วยการปั่นเซลล์ suspension ของเชื้อสาเหตุโรคและให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสะดวก รวดเร็ว และสามารถสังเกตพัฒนาการการเกิดโรคได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น และเมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคใบขีดแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* จำนวน 33 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวานจำนวน 11 พันธุ์ และข้าวโพดไร่จำนวน 22 พันธุ์ โดยการปั่น suspension ของเชื้อสาเหตุโรค และให้ความชื้นติดต่อกัน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถเห็นพัฒนาการการเกิดโรคบนข้าวโพดได้ดีที่สุด พบว่าข้าวโพดหวานจำนวน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์บ้านสวน พันธุ์ชูการ์ 75 และ KSSC 915 และ ข้าวโพดไร่พันธุ์จำนวน 13 พันธุ์ คือ พันธุ์ Ki 39, Ki 40, Ki 44, Ki 45, Ki 32, Ki 35, Ki 37, Ki38, Ki 43, Ki 46, Ki 49, Ki 50 และ Ki มีระดับความต้านทานต่อโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพดระดับสูง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2550. สถิติการนำเข้า-ส่งออก.

<http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticIndex.jsp>. วันที่ 27 เมษายน 2550.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. <http://www.doae.go.th/indexhome.asp>.

กุลชญา เกศสุวรรณ. 2546. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542. **พืชเศรษฐกิจ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คฑารัตน์ ชูศรีเอี่ยม. 2546. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานเพื่อคุณภาพฝักสดและต้านทานโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลลิตา เล็กสมบุญ, พิสุวรรณ เจียมสมบัติ, รณภพ บรรเจิดเชิดชู, รัชนี สงประยูร, รัตติยา พงษ์พิสุธา, วรณวิไล อินทนู, ศศิธร วุฒิวิชัย, สมชาย สุชะกุล, สุภาพร กลิ่นทอง และอุดม ฟุ้งสง. 2544. **บทปฏิบัติการโรคพืชเบื้องต้น**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชคชัย เอกทัศนาวรรณ, ไมพร เอกทัศนาวรรณ, พงษ์ จุลจอหอ และ ฉัตรพงษ์ บาดลา. 2551. ข้าวโพดหวานลูกผสมเดี่ยวพันธุ์ใหม่ KSSC 604. น. 24-29. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 3, 14-16 พฤษภาคม 2551. เพชรบูรณ์.

ฐานข้อมูล GenBank. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ทวีศักดิ์ ภู่อำ. 2540. ข้าวโพดหวาน: การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกเพื่อการค้า. โอเอสพรีนติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

นันทิยา เตชะดิ ฌฐธิญา เปื่อนสันเทียะ สุพจน์ กาเซ็ม ประชุม จุฑาวรรณะ และ สุดฤดี ประเทือง วงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการควบคุมโรคใบขีดของ ข้าวโพด. น. 621-630. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45, 30 มกราคม- 2 กุมภาพันธ์ 2550, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประชุม จุฑาวรรณะ. 2544. โรคที่สำคัญของข้าวโพดหวานและการป้องกันกำจัด, น. 53-57. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การผลิตข้าวโพดหวานฝักสดเพื่อให้ได้ผลผลิตและ คุณภาพสูง วันที่ 28 กุมภาพันธ์-2 มีนาคม 2544. ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่าง แห่งชาติ ตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ รุ่งนภา คงสุวรรณ และณัฐธิดา โหมยิตเจริญกุล. 2546. ชีววิทยาและความ หลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ด้วยเทคนิค rep-PCR. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักงานพัฒนาการอารักขาพืช.

พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สุจินต์ ภัทรภูวดล วิบูลย์ จงรัตนเมธีกุล และประชุม จุฑาวรรณะ. 2549. ใน รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีที่ 1 เรื่องการจัดการโรคไวรัส ใบด่างลาย (SCMV) ไวรัสใบด่างประจุดเหลือง (MCMV) โรคเหี่ยว และโรคลำต้น แบคทีเรียข้าวโพดหวาน และแมลงพาหะที่สำคัญ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี PCR ทางเกษตร. คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรกมล จันทร์อ่อน สุพจน์ กาเซ็ม ประชุม จุฑาวรรณะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. การศึกษาลักษณะสำคัญและการพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* สาเหตุโรค ลำต้นเน่าข้าวโพดหวาน. น. 655-662. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 45, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพิมล จันทร์อ่อน. 2551. การระบาดของ *Erwinia chrysanthemi* สาเหตุโรคต้นเน่าของ
ข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมและการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย โฉมรัตน์. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

ศุภธนา คล้ายมงคล. 2543. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย
Ralstonia solanacearum ในประเทศไทยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ประชุม จุฑาวรรณะ กุลชญา เกศสุวรรณ และสุพจน์ กาเซ็ม. 2547. การ
ระบาดของโรคข้าวโพดจากแบคทีเรียชนิดใหม่ในประเทศไทย. น. 249-262. ใน รายงาน
การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
19-21 พฤษภาคม 2547. อุดรธานี.

สุดฤดี มารมย์. 2518. การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อ *Erwinia* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าและของผัก
10 ชนิด ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. สถิติการเกษตร. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร แหล่งที่มา :
[http://www. Oae.go.th/ news info/Agro Meg.htm](http://www.Oae.go.th/news info/Agro Meg.htm).

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

Abedon, B.G. and W.F. Tracy. 1998. Direct and direct effect of full-sib recurrent selection for
resistance to common rust (*Puccinia sorghi* Schw.) in three sweet corn populations.
Crop Science. 38 : 56-61.

- Burdman, S., N. Kots, G. Kritzman and J. Kopelowiz. 2005. Molecular physiological, and host characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* isolates nfrom watermelon and melon in Israel. **Plant Disease**. 89 : 1339-1347.
- 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.
- Costas, M., B. Holmes, S. L. W. On and D. E. Stead. 1992. Identification of medically important *Pseudomonas* species using computerized methods, pp. 1-19. *In* **R. G. Board, D. Jones, and F. A. Skinner (ed.), Identification methods for microbiologists, 3 ed. SAB technical series no. 29**. Academic Press, London.
- Chen, W. and T. Kuo. 1993. A simple and rapid method for preparation of gram negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acid Research**. 21 : 2260.
- Coplin, D.L., D.R. Majerczak, Y. Zhang, W.-S. Kim, S. Jock and K. Geider. 2002. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differencetation by PFGE. **Plant Disease**. 86 : 304-311.
- Dang, S.R.S., M.M. Payak, B.L. Renfro. 1978. Seed transmission of *Pseudomonas rubrilineans* the incitant of bacterial leaf stripe of maize. **Indian Phytopathology**. 31(4) : 523-524.
- Delp, B.R., L.J. Stowel, and J.J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathology**. 76 : 1299-1305.
- Duveiller, E. 1994. A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. **Plant Disease**. 78 :137-141.

- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathology*. 9 :275-296.
- Gill, S., J. Belles-Isles, G. Brown, S. Gagne, C. Lemieux, J. P. Mercierand and P. Dion. (1994). Identification of variability of ribosomal DNA spacer form *Pseudomonas* soil isolates. **Can J Microbiology**. 40 : 541-547
- Gingera, G.R., D.W. Davis and J.V. Groth. 1994. Pedigree selection for improvement partial resistance to common leaf rust sweet corn. **Crop Science**. 34 : 615-620.
- Gitaitis, R., J. Wilson, R. Walcott, H. Sanders, and W. Hanna. 2002. Occurrence of bacterial strip of pearl millet in Georgia. **Plant Disease**. 86(3) : 326.
- Gonzalez, C. S. Restrepo, J. Tohme, V. Verdier. 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR- based DNA fingerprinting techniques. **FEMS Microbiol. Lett** .
- Goodman, R.N. and A.J. Novacky. 1994. **The hypersensitive reaction in plants to pathogen**. The American Phytopathological Society. APS Press, St.Paul ,MN.
- 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 ed**. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequence: a novel family of repetitive element in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella trphimurium* and other eubacterium. **Molecular Microbiology**. 5 : 925-934.

- Jeamvijit, J., S. Prathuangwong, P. Jutawantana and S. Tsuyumu. 2005. Identification of *Erwinia chrysanthemi* Thai strains and its pathogenic enzymes on corn. In. **Proc. of the International Conference on Maize Adaptation to Marginal Environments**. Mar. 6-9, 2005. Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Johnson, A. G., Robert, A. L., and Cash, L. 1949. Bacterial leaf blight and stalk rot of corn. **J. Agricultural Research**. 78 :719-732.
- Kadota, I., A. Mizuno, K. Nishiyama. 1996. Detection of a protein specific to the strain of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 62(4) : 425-428.
- Louws, F.J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Appl. Environ. Microbiology**. 60 : 2286-2295.
- Manns. 1909. **Bulletin of the Ohio Agriculture Experiment Station**. 210 : 91-167.
- Martin, B.O., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D.A. Marrison, 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 : 3479-3483.
- McManus, P.S. and A.L. Jones. 1995. Genetic fingerprint of *Erwinia amylovora* strains isolated from three-fruit crops and *Rubus* spp. **Phytopatology**. 85 : 1547-1553.

- Miller, J. M. and D. L. Rhoden. 1991. Preliminary evaluation of biolog, carbon source utilization method for bacterial identification. **Clin. Microbiol.** 29: 6.
- Moorman, G. W. and R. J. Lease. 1992. Residual efficacy of fungicides used in the management of *Botrytis cinerea* on greenhouse grown geranium. **Plant Disease.** 76 : 374-376.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods Enzymology.** 155 : 335-350.
- Pataky, J.K., L. J. du Toit, and M. R. Kerns. 1997. Bacterial leaf blight on *Shrunken-2* sweet corn. **Plant Disease.** 81 : 1293-1298.
- Rosen, JR. 1926. Bacterai Stalk Rot of Corn . **Phytopathology.** 16 : 241-264.
- Saddler, G.S. 1994. *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. **IMI descriptions of fungi and bacteria, No. 1211.** Wallingford, UK: CAB International.
- Sadowsky, M.J., L.L. Kinkel, J.H. Bower and J.L. Schottel. 1996. Use of repetitive intergenic DNA sequence to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. **Appl. Environment Microbiology** . 62 : 3489-3493.
- Schaad, N.W., D.R. Sumner, G.O. Ware. 1980. Influence of temperature and light on severity of bacterial blight of corn, oats, and wheat. **Plant disease.** 64(5) : 481-483.
- Schaad, N.W., B. Jones. and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd edition.** Bacteriology Committee of American Phytopathological Society, St. Paul MN.

- Scortichini, M., M.P. Rossi and U. Marchesi. 2002. Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* strains question the representative nature of the type strain. **Plant Disease**. 51 : 374-381.
- Selenska-pobell, S., L. Gigova and Petrova. 1995. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primer. **J. Appl. Bacteriology**. 74 : 425-431.
- Shakya, D.D., F. Vinther, S.B. Mathur. 1985. World wide distribution of a bacterial stripe pathogen of rice identified as *Pseudomonas avenae*. **Phytopathologische Zeitschrift**. 114(3) : 256-259.
- Song W.Y., H.M.Kim, C.Y. Hwang and N.W. Schaad. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in Rice Seeds Using Bio-PCR. **Phytopathology**. 152 : 667-676
- Sontirat, P., P. Pitakpaivan, T. Khamhangridthirong, W. Choobamroong and U. Kueprakone. 1994. **Host Index of Plant Disease in Thailand**. 3rd ed. Sahamitprinting, Nonthaburi.
- 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.
- Trevor, W. 1988. Plant genetic resources and food security. **Food Policy**. 13 : 178-184.
- Ullasa, B.A., Y.R. Mehta, M.M. Pavak, B.L. Renfro. 1967. *Xanthomonas rubrilineans* on zeamays in India. **India Phytopathology**. 20 : 77-78.

White, D.G. 1999. Compendium of Corn Diseases, 3rd ed. **The American Phytopathological Society.** APS Press, St.Paul, MN.

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 Reseach.** 19 : 6823-6831.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient glucose broth (NGB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

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

Nutrient glucose agar (NGA) (วิชัย, 2537)

Nutrient glucose broth		
วุ้น	15.0	กรัม

เตรียมโดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมผงวุ้นนำไปหลอมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Sorbitol neutral red (SNR) agar

K_2HPO_4	3.0	กรัม
NaH_2PO_4	1.0	กรัม
KNO_3	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	กรัม
Neutral red (0.2% aqueous)	10.0	มล.

Solution 69% active)

Agar	15.0	กรัม
------	------	------

เตรียมในอัตราน้ำ 950 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 950 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ผสมส่วนผสมที่เหลือโดยกรองสารด้วย filtered

Cyclohexamide (100 mg/ml 75% ethanol)	2.0	มล.
---------------------------------------	-----	-----

D-sorbitol (10% aqueous)	50.0	มล.
--------------------------	------	-----

Yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC)

Yeast extract	10.0	กรัม
---------------	------	------

Dextrose (glucose)	20.0	กรัม
--------------------	------	------

Calcium carbonate, USP

Light powder	20.0	กรัม
--------------	------	------

Agar	15.0	กรัม
------	------	------

เนื่องจาก CaCO₃ มีลักษณะเป็นผง และทำให้ตกตะกอน เมื่อเตรียมอาหาร YDC สามารถโดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นวุ้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมผงวุ้นนำไปหลอมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง หรือแยกนึ่งฆ่าเชื้อเฉพาะ dextrose ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับส่วนผสมที่เหลือที่หลอที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Storeg medium

Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Glycerol	100	กรัม
ddH ₂ O	872	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

Motility Test medium

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

เตรียมอาหารดังกล่าวในปริมาตรน้ำ 1000 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหารประมาณ 6.8 –7 เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการ stab เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญออกนอกบริเวณเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

Starch Agar (Starch hydrolysis)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	13	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้งได้โดยการหยดน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ รอยขีดแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

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

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
Bromcresl purple (1.5% ethanol solutinn)	0.7	มล.
Agar	12.0	กรัม
pH 6.8		

เตรียมอาหารใส่หลอดละ 5 มล. เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 0.5 มล. สารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ให้เตรียมสารละลายความเข้มข้น 5% และทำให้สารละลายปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรียที่มีเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ยกเว้น คาร์บอนบางชนิดจะต้องผสมในอาหารและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยกัน เช่น starch inulin salisin และ Esculin

Citrate utilization

NGB+12% gelatin	
Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Gelatin	120.0 กรัม

เตรียมอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Nitrate reduction

Ntrate broth	
Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
KNO ₃	1.0 กรัม

สารทดสอบ

1. α -naphthylamine
2. sulphanilic acid
3. Zinc powder

เตรียมอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยา ชีวเคมี และอณูพันธุศาสตร์

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยา ชีวเคมี และอณูพันธุศาสตร์

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 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

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

สารเคมีสารละลายบัฟเฟอร์

0.1 M sodium phosphate buffer (100 มิลลิลิตร)

0.2 M KH_2PO_4	39	มิลลิลิตร
0.2 M K_2HPO_4	61	มิลลิลิตร

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10X Tris EDTA (TE)

100 mM Tris-Cl
10 mM EDTA

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10X Tris buffer-EDTA (TBE)

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA	40	มิลลิลิตร

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5M NaCl

NaCl	292	กรัม
------	-----	------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10 mg/ml Ethidium bromide (EtBr)

EtBr	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิกรัม

ละลาย EtBr ในน้ำกลั่น คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer แล้วเก็บในขวดสีชา

Arsenomolybdate reagent

Ammonium molybdate ($\text{NH}_4 6.\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$)	25	กรัม
Concentrated H_2SO_4	21	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร
12% (w/v) $\text{Na}_2 \text{HAsO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	25	มิลลิลิตร

เติมน้ำละลาย $\text{Na}_2\text{HAsO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ลงในสารละลาย molybdate โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

Copper reagent

0.4% (w/v) Cupric sulfate pentahydrate	100.0	มิลลิลิตร
NaSO_4	16.0	กรัม
Sodium potassium tartate	1.2	กรัม
NaHCO_3	2.4	กรัม
น้ำกลั่น	25.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Dry stock

Coomassie brilliant blue-250	100	มิลลิกรัม
95% Ethanol	50	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ละลาย coomassie brilliant blue-250 ใน 95% ethanol เติม 85% phosphoric acid แล้วปรับ
ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวนันทยา นามสกุล เทชะติ
(ภาษาอังกฤษ) Miss Nantiya Techati
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 5708 00239 18 1
3. เกิดวันที่ 20 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2525
4. สถานที่เกิด บ้านเลขที่ 31 หมู่ที่ 9 ต. ศรีดอนมูล อ. เชียงแสน จ. เชียงราย รหัสไปรษณีย์ 57010
5. ตำแหน่งงานปัจจุบัน หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ผู้ช่วยนักวิจัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถ. พหลโยธิน แขวง
ลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ : 085 970 5580
โทรสาร : 02 579 9550
E-mail : g4861082@ku.ac.th, moshi_61@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนเชียงแสนวิทยาคม พ.ศ 2540
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนแม่จันวิทยาคม พ.ศ 2543
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญา วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2547
กำลังศึกษาระดับปริญญาโท ปริญญา วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2548-ปัจจุบัน

7. ผลงานตีพิมพ์

1. สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สุพจน์ การัมย์ นันทิยา เตชะติ และ ประชุม จุฑาวรรณะ. แบคทีเรียไอเอสอาร์ที่ยับยั้งโรคสำคัญและปรับปรุงเพิ่มพูนคุณภาพของข้าวโพด. น. 53-64. ใน การประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 32, 13-15 กรกฎาคม 2548. จ. สุโขทัย.
2. สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ประชุม จุฑาวรรณะ ญัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ คุสิต อธิณวัฒน์ และ นันทิยา เตชะติ. 2549. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพดด้วยกระบวนการหลายขั้นตอน. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บท ข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 2, 9-11 มีนาคม 2549. จ. นครนายก.
3. นันทิยา เตชะติ ญัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ สุพจน์ การัมย์ ประชุม จุฑาวรรณะ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการควบคุมโรคใบขีดของข้าวโพด. น. 621-630. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
4. นันทิยา เตชะติ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. ลักษณะความต้านทานของข้าวโพดหวาน ต่อ *Acidovorax avenae* subsp *avenae* และความสัมพันธ์กับการควบคุมโรคโดยแบคทีเรียปฏิชีวนะ ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. โรงแรมอัมรินทร์ลากูล พิษณุโลก.