สำรวจรวบรวม และจำแนกแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาด

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
เพลินพิศ สงสังข์ วงศ์ บุญสืบสกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจการเกิดโรคใบเน่าดำในพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาด ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2553 พบการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย 2 แบบ คือ อาการแผลไหม้รูปตัววีจากขอบใบและแผลไหม้เป็นสีน้ำตาลจากกลางใบลามมาที่ขอบใบเป็นอาการขอบโรคเน่าดำหรือขอบใบทอง และพบการเกิดโรคอาการใหม่คือแผลจุดดำขนาด 1-3 มิลลิเมตร สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลแห้งลุกลามติดกันพบลักษณะแผลจุดเป็นสะเก็ดนูนดำ ทั้งสองอาการพบระบาดและรุนแรงในช่วงฤดูฝน พืชอาศัยที่พบอาการโรคเน่าดำหรือขอบใบทอง ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ คะน้า และผักกาดขาว พืชอาศัยที่พบอาการใบจุด คือ คะน้า และกะหล่ำดอก จากการแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ ได้แบคทีเรียลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม รูปร่างกลมนูนเยิ้ม ผิวมันขอบเรียบบนอาหาร NGA และ YDC ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* ทำให้เกิดปฏิกิริยาการตายเฉียบพลันบนใบยาสูบ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สร้างเมือกเยิ้ม ย่อยเจลาติน ย่อยแป้ง ไอโซเลท P233 (แผลไหม้)ให้ผลออกซิเดสลบ แคตตาเลสบวก (weak positive) และ P254 (แผลจุด) ออกซิเดสและแคตตาเลสบวก ทั้งสองไอโซเลทไม่สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแลคโตส ไม่สร้างก๊าซไดไฮโดรเจนซัลไฟล์จากเฟอรัสซัลเฟต ผลทดสอบแหล่งคาร์บอน (Biolog test) จำแนกเชื้อได้เพียงระดับสปีชีส์ คือ *X. campestris* ทดสอบการเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของแบคทีเรีย จำนวน 22 ไอโซเลท บนพืชอาศัย 5 ชนิด ได้แก่ คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ และ ผักกาดขาว พบการเกิดโรคอาการใบจุดและใบไหม้บนพืชอาศัย แสดงอาการและความรุนแรงแตกต่างกันไปแต่ละไอโซเลท ยกเว้นผักกาดขาวที่ไม่พบอาการใบจุด

วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท 380 และ 381 ที่แยกจากอาการใบจุดและใบไหม้ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank พบว่ามีความคล้ายกับแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* 99 เปอร์เซ็นต์ ความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยไพรเมอร์ Box และ Eric พบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัย แหล่งปลูกพืช หรือลักษณะอาการ แบคทีเรียสาเหตุโรค *X. campestris* pv. *campestris* สามารถเข้าทำลายพืชทำให้เกิดอาการใบไหม้และใบจุด

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-31-51

คำนำ

แบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* เป็นกลุ่มที่มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 66 สกุล ในตระกูลของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และมากกว่า 160 สกุล ใน 49 ตระกูลของพืชใบเลี้ยงคู่ (Lyons et al. 1984) โดย*X. campestris* เดิมแบ่งออกเป็น 123 pathovars ตามความจำเพาะในการก่อให้เกิดโรคของพืช (Dye et al. 1980) แต่ต่อมามีการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการจับคู่กันของดีเอ็นเอ DNA-DNA hybridization โดยจัดให้ *X. campestirs* คือ *X. campestris* pv.*campestris* และประกอบด้วย 5 pathovars ที่เป็นสาเหตุโรคพืชของ cruciferous ได้แก่ pvs. *aberrans, armoraciae, barbareae, incanae* และ *raphani* (Vauterin et al. 1995) ในปี 2001 Vicente et al. ได้ศึกษาการเข้าทำลายพืชในกลุ่ม cruciferous โดยพบว่านอกจาก *X. campestris* pv. *campestris* ยังมีอีก 4 pathovars ได้แก่ *X. campestris* pvs. *aberrans, raphani, armoraciae* และ *pv. incanae*) โดยในการจัดจำแนกกลุ่มของ *X. campestris* pv. *campestris* แบ่งตามเข้าทำลายพืช differential hosts ได้เป็น 5 (Kamoun et al.1992) และ 6 race (Vicente et al. 2001) การศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของพืชตระกูลกะหล่ำ (crucifers) ที่รัฐโอกาโฮมา ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการเปรียบเทียบการเกิดโรคและลักษณะอื่น กับ pv. *campestris* จากการศึกษาการเข้าทำลาย ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (Biolog test) และศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มของเชื้อโดยลักษณะพันธุกรรมด้วย BOXA1R primers สรุปว่าอาการโรคใบจุดแบคทีเรียเกิดจาก *X. campestris* pv. *armoraciae* (Zhao et al. 2000) การศึกษาโรคแบคทีเรียชนิดใหม่ของพืชตระกูลกะหล่ำที่ประเทศญี่ปุ่น พืชแสดงอาการใบจุดช้ำ แบคทีเรียสามารถทำให้เกิดอาการโรคบนใบมะเขือเทศ physalis แตงกวาและฟักทอง จากการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ จำแนกชนิดเป็น *X. campestris* pv. *raphani* (Tanura et al. 1994)

ในประเทศไทยแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชผัก โดยเฉพาะ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่เป็นสาเหตุโรคเน่าดำ หรือโรคขอบใบทอง (Black rot) ในกะหล่ำและผักกาดต่างๆ มีรายงานการเกิดโรคในพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กะหล่ำ กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ กะหล่ำปม กะหล่ำปลี คะน้า ผักกาดขาวปลี ผักกาดหางหงส์ ผักกาดฮ่องเต้ ผักกาดขาวกวางตุ้ง ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักกาดเขียวปลี และผักกาดหัว (พัฒนา สนธิรัตน และคณะ, 2537) ซึ่งมีรายงานพบการระบาดทั่วไป และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ทำให้มีการระบาดไปสู่พื้นที่ใหม่ (ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2545) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ในพืชผักตระกูลกะหล่ำและผักกาด สำรวจการเกิดโรคอาการใหม่ ๆ การแพร่ระบาด และจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อเป็นข้อมูลในการกักกันพืชและการจัดการพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ รวมรวม จำแนกอาการโรคใบไหม้และใบจุด และการแยกเชื้อเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

สำรวจโรค เก็บตัวอย่างอาการใบไหม้ ใบจุด ของพืชตระกูลกะหล่ำ และผักกาด จากแหล่งปลูกของเกษตรกร บันทึกข้อมูลชื่อที่อยู่ของเกษตรกร พื้นที่ปลูก ปัญหาและการดูแลจัดการโรคในสวน บันทึกภาพอาการผิดปกติ บันทึกแหล่งสำรวจ จำแนกลักษณะอาการผิดปกติของพืช เก็บตัวอย่างอาการโรค ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ และเก็บใส่ในถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง นำตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อการแยกเชื้อต่อไป

<u>การแยกเชื้อแบคทีเรีย</u> เลือกตัดชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการ โดยตัดบริเวณที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ขนาดชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5x 0.5 มิลลิเมตร 1-2 ชิ้น จุ่มแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1-2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชดังกล่าว วางบนหยดน้ำ 10-20 ไมโครลิตร ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อ จุ่มในหยดน้ำ นำมาลาก (streak) บน Nutrient glucose agar (NGA) และ Yeast-extract dextrose $CaCo_3$ agar (YDC) วางจานเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงพลาสติก คว่ำจานลง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 1-2 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญ มีลักษณะนูนเยิ้มสีเหลือง เลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหารจนได้เชื้อบริสุทธิ์

เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็มละลายในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อบนอาหารเอียงเททับด้วยพาราฟินเหลว และส่งเชื้อเข้า culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris*

ศึกษาลักษณะโคโลนี และการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA, YDC และ SX agar (Shaad และ White, 1974) SA agar, Tween agar ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง ปฏิกิริยาคะตาเลส การรีดิวซ์ไนเตรท การสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส แมนโนส และแมนนิทอล (Krieg และ Holt, 1984; Schaad และคณะ, 2001)

3. จำแนกเชื้อโดยคุณสมบัติการใช้คาร์บอนของแบคทีเรีย

<u>ทดสอบการใช้คาร์บอน</u> เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแผลไหม้ (ไอโซเลท P233) และแบคทีเรียสาเหตุโรคแผลจุด (P254) ใช้ลูปฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร BUG™ Agar (Biolog, Inc.) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อในสารละลาย Inculation fluid (0.4% NaCl, 0.03% Pluronic F-68 และ 0.02% gellan gum) ที่มี 5 mM Sodium thioglycolate วัดค่าแสงส่องผ่าน (transmittance, T) 63% ด้วยเครื่อง

Biolog® turbidimetor นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเติมลงใน Biolog® Microplate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่ม plate ที่ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micolog™ System ที่ค่าดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร วิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยนำค่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลเป็นบวกหรือลบมาวิเคราะห์ด้วย Simple matching หาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธีทางสถิติแบบ Principal Component Analysis

4. พิสูจน์การก่อให้เกิดโรค และประเมินความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค บนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ ปรับให้มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 2 x 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อบนต้นผักคะน้า กะหล่ำปลี ผักกาดขาว บร็อคโคลี่ ที่เพาะและย้ายกล้าลงกระถาง มีใบประมาณ 3-4 ใบ ปลูกเชื้อด้วยการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อผสมผงคาร์บอแรนดัม 5 กระถางต่อซ้ำ และใช้น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดลองควบคุม จากนั้นเก็บต้นพืชทดลองที่ปลูกเชื้อในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกจากถุงพลาสติก วางไว้ในบนชั้นในโรงเรือน บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาการเกิดโรค การพัฒนาอาการโรค จากนั้นนำตัวอย่างที่แสดงอาการโรค นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธี Koch's postulation

ทดสอบประเมินความรุนแรงการเกิดโรค แบคทีเรีย *X. campestris* จำนวน 22 ไอโซเลท แยกเชื้อจากการสำรวจโรคในแหล่งปลูกต่าง ๆ ปลูกเชื้อบนพืชอาศัย 5 ชนิด ได้แก่ คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาว และ บร็อคโคลี่ ประเมินความรุนแรง โดยบันทึกการเกิดโรคแยกเป็นอาการใบจุด หรือใบไหม้ ให้คะแนนความรุนแรงในการเกิดโรค แต่ละต้น รวม 5 ต้น ดังนี้ 0 ไม่เกิดโรค, 1 เกิดโรค 1-10%, 2 เกิดโรค 11-20%, 3 เกิดโรค 21-30%, 4 เกิดโรค 31-40% และ 5 เกิดโรค 41-50% จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ยความรุนแรงในการเกิดโรค

5. จำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA

เลี้ยงแบคทีเรีย ไอโซเลท 380 และ 381 เป็นตัวแทนสาเหตุโรคที่แสดงอาการใบจุด และใบไหม้ คะน้า บนอาหาร NGA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดแบคทีเรีย 2 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเก็บเซลล์แบคทีเรีย นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneAid DNA extraction ละลายตะกอนดีเอ็นเอ และเจือจาง 50 นาโนกรัม ใช้เป็นต้นแบบสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16 srDNA ด้วยไพรเมอร์ 27f และ 1488r จากนั้น purified PCR product ด้วย GeneJet™ PCR Purification Kit (Fermentus) และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GeneBank และจำแนกชนิดแบคทีเรีย

6. ศึกษาลักษณะความผันแปรทางพันธุกรรมด้วย Box และ Eric PCR

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 23 ไอโซเลท ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ Box ที่ออกแบบจากส่วน interspersed repetitive Box sequence และไพรเมอร์ ERIC ที่ออกแบบจากส่วน enterobacteria repetitive intergenic consensus (Louws และคณะ, 1994) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

BOX	(BOXA1R)	5’-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’
ERIC	(ERIC1R)	5’-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3’
	(ERIC2)	5’-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3’

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PE9700 ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอนเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร แยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ บนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 1.5% อะกาโรส ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 70 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี และถ่ายภาพ ด้วย ultraviolet transiluminator

บันทึกข้อมูลโดย การตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่มีขนาดอยู่ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System (NYSYS, version 2.01d) (Rohlf, 1994) วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ และสปีชีส์ แหล่งที่มาของเชื้อ ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ รวมรวม และจำแนกอาการโรค

สำรวจการเกิดโรคในแปลงปลูกกะหล่ำปลี ผักกาดเขียวปลี บร็อคโคลี่ กะหล่ำดอก และกวางตุ้ง ในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี จ. ราชบุรี จ. เพชรบุรี อ.เขาค้อ และอ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ จ. เพชรบูรณ์ และ จ.เชียงใหม่ แยกเก็บเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค รวม 47 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) จากการเก็บตัวอย่างแยกเชื้อ ได้เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอาการแผลไหม้ของกะหล่ำดอก 1 ไอโซเลท สำรวจโรคในแปลงปลูกกะหล่ำดอก อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี เก็บตัวอย่างอาการแผลจุดและแผลไหม้ แยกเก็บเชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท สำรวจโรคเพิ่มเติม พื้นที่ปลูก อ.เขาค้อ พบอาการโรคเน่าดำ อาการแผลไหม้รูปตัววี จากกะหล่ำปลีและกะหล่ำดอก จำแนกลักษณะการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียได้ 2 แบบ คือ ลักษณะอาการแผลไหม้เป็นรูปตัววีจากขอบใบและแผลไหม้เป็นสีน้ำตาลจากกลางใบลามมาที่ขอบใบมีวงสีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งเป็นอาการขอบโรคเน่าดำหรือขอบใบทอง (ภาพที่ 1ก)

และพบการเกิดโรคอาการใหม่คืออาการแผลจุดเล็กขนาด 1-3 มิลลิเมตร สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลแห้งลุกลามติดกันพบลักษณะแผลจุดเป็นสะเก็ดนูนดำ (ภาพที่ 1ข) ทั้งสองอาการพบระบาดและรุนแรงในช่วงอาการร้อนฝนชุก

พืชอาศัยที่พบการเกิดโรคขอบใบทอง ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ คะน้า จากการรายงานการเกิดโรคเน่าดำในประเทศไทยพบในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กะหล่ำ กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ กะหล่ำปม กะหล่ำปลี คะน้า ผักกาดขาวปลี ผักกาดหางหงส์ ผักกาดฮ่องเต้ ผักกาดขาวกวางตุ้ง ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักกาดเขียวปลี และผักกาดหัว (พัฒนา สนธิรัตน และคณะ, 2537) แต่จากการสำรวจโรคพบว่าพืชตระกูลผักกาดมีอาการโรคเน่าดำหรือขอบใบทองค่อนข้างต่ำ พบเพียงตัวอย่างเดียวจากผักกาดขาว พืชอาศัยที่พบอาการแผลจุด คือ คะน้า กวางตุ้ง และกะหล่ำดอก ซึ่งจากการรายงานของ Zhao et al. (2000) พบว่าอาการโรคใบจุดแบคทีเรียเกิดมากในผักคะน้า ผักโขม มัสตาร์ด และเทอนิป ซึ่งมีอาการแผลจุดเหลี่ยม มีวงสีเหลืองล้อมรอบ ทั้งนี้มีรายงานการเกิดโรคบนพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาดที่เกิด จากเชื้อสกุล *Xanthomonas campestris* pathovars ต่าง ๆ หลายชนิด ไม่เคยมีรายงานการเกิดโรคในประเทศไทย คือ *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X.campestris* pv. *raphani*

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้ จากลักษณะอาการแผลไหม้และแผลจุด (ภาพที่ 2ค) ได้แบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกัน คือโคโลนีสีเหลือง กลมนูนเยิ้ม ผิวมันขอบเรียบ บนอาหาร NGA และ YDC โดยสีเหลืองของโคโลนีอาจมีความแตกต่างกันในบางไอโซเลท คือสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม (ภาพที่ 2ก) บนอาหาร SX ลักษณะโคโลนีกลมนูนผิวมันเยิ้มขอบเรียบ สีเขียวเหลืองอมฟ้าม่วง มีขอบใส (clear zone) รอบโคโลนีเนื่องจากแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งในอาหาร (ภาพที่ 2ข) บนอาหาร Starch agar โคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเข้ม กลมนูนผิวมัน ขอบเรียบ ไม่เยิ้มมาก บนอาหาร tween agar โคโลนีสีเหลืองอ่อน สร้างฝ้าสีขาวขุ่นรอบโคโลนี ลักษณะเป็นเส้นจากขอบโคโลนี โดยลักษณะโคโลนีบนอาหารชนิดเดียวกัน แบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกัน อาจมีความเข้มของสีโคโลนีที่ต่างกันเล็กน้อย

ผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมี เกิดปฏิกิริยาการตายเฉียบพลันบนใบยาสูบ จากการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเมือก ย่อยเจลาติน ย่อยแป้ง ไอโซเลท P233 (แผลไหม้)ให้ผลออกซิเดสลบ แคตตาเลสบวก (weak positive) และ P254 (แผลจุด)ออกซิเดสและแคตตาเลสบวก ทั้งสองไอโซเลทไม่สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแลคโตส ไม่สร้างก๊าซไดไฮโดรเจนซัลไฟล์จากเฟอรัสซัลเฟต แบคทีเรียสามารถย่อยเจลาตินและย่อยแป้ง ไม่รีดิวซ์ไนเตรท สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส และแมนโนส โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล

(ตารางที่ 2) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวตรงกับคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *X. campestris* (Krieg และ Holt, 1984) สำหรับคุณสมบัติการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า 11-89 % ของเชื้อ *X. campestris* ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก ความผันแปรดังกล่าวอาจเนื่องจากคุณสมบัติการเข้าทำลายพืชอาศัยที่ต่างกันซึ่งมีการจัดจำแนกเป็น parthovar ซึ่งมีมากกว่า 30 parthovars ทั่วโลก (Schaad และคณะ, 2001) โดยพบในประเทศไทยมากกว่า 10 parthovars (วิชัย, 2531) โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง parthovars ของเชื้อ *X. campestris* ได้

ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทสามารถทนร้อน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 38 และ 40 องศาเซลเซียส มีเพียงไอโซเลท P 127 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 38 -40 องศาเซลเซียส

3. จำแนกเชื้อโดยคุณสมบัติการใช้คาร์บอนของแบคทีเรีย

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำ (อาการแผลไหม้) ไอโซเลท P233 ให้ผลบวกในการใช้แหล่งคาร์บอน 22 ชนิด ได้แก่ Dextrin, Glycogen, N-acetyl-D-galactosamine, D-cellobiose, D-fructose, Gentiobiose, α-D-glucose, Maltose, D-mannose, D-melibiose, D-psicose, Sucrose, D-trehalose, Pyruvic acid methyl ester, Succinic acid mono-methyl-ester, citric acid, α-keto valeric acid, D-saccharic acid, Succinic acid, Bromosuccinic acid, L-alanyl-glycine และ L-serine จำแนกได้เพียงระดับ species คือ *Xanthomonas campestris* (ตารางที่ 3)

แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด (อาการแผลจุด แผลสะเก็ดดำ) ไอโซเลท P254 ให้ผลบวกในการใช้แหล่งคาร์บอน 38 ชนิด ได้แก่ Dextrin, Glycogen, N-acetyl-D-glucosamine, L-arabinose, D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, Gentiobiose, α-D-glucose, m-inositol, α-D-lactose, Lactulose, Maltose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, β-methyl-D-glucoside, D-psicose, D-raffinose, L-rhamnose, Sucrose, D-trehalose, Pyruvic acid methyl ester, Succinic acid mono-methyl-ester, Citric acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, α-keto glutaric acid, D-saccharic acid, Succinic acid, Bromosuccinic acid, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-serine, Glycerol, D-L-α-glycerol phosephate และ D-glucose-6-phosphate จำแนกเชื้อได้ระดับ species คือ *X. campestris* (ตารางที่ 3)

ผลการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อทั้งสองไอโซเลท มีความแตกต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างจากแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำ อาการแผลไหม้ 16 ชนิด และมีแหล่งคาร์บอนที่เหมือนกัน 20 ชนิด โดยทั้งสองไอโซเลทจัดจำแนกเป็น *X. campestris* และอาจเป็นเชื้อต่าง pathovar กัน และในการจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรค

แบคทีเรียที่แยกจากคะน้าอาการใบไหม้รูปตัววี ไอโซเลท P381 และสำหรับแบคทีแและจากการจำแนกเชื้อเพิ่มเติมพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท P029 สาเหตุโรคใบจุดคะน้า เป็น *X. campestris* pv. *raphani* ด้วยค่า probability 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท P381 สาเหตุโรคเน่าดำ (ใบไหม้รูปตัววี) จำแนกเป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ด้วยค่า probability 96 เปอร์เซ็นต์ similarity 65 เปอร์เซ็นต์ probability 83 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ผลการจำแนกดังกล่าวจะต้องตรวจสอบด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส และต้องเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น ๆ อีกเพื่อยืนยันผลต่อไป

4. พิสูจน์การก่อให้เกิดโรค และประเมินความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ

จากการปลูกเชื้อทดสอบ 16 ไอโซเลท และการทดลองเปรียบเทียบ พบว่าไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรค มีลักษณะอาการแผลไหม้ ใบไหม้แห้ง 100% (เกิดโรคทั้ง 5 ต้น) คือ ไอโซเลท P226 และ P211 โดยไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรค 80% (4 ต้น) คือ P029, P046, P127, P238 ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดอาการใบจุดคือ P046, P081, P254, P230 และ P238 โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการแผลจุดหรือแผลไหม้ ไม่ทำให้เกิดลักษณะอาการจำเพาะของแผลจุดหรือแผลไหม้ เช่น ไอโซเลท P230 แยกเชื้อจากอาการแผลไหม้ พบว่าทำให้เกิดอาการใบไหม้ 40% และใบจุด 80% (4 ต้น) เป็นต้น สำหรับบางไอโซเลท มีการพัฒนาเป็นแผลจุดในระยะแรก ต่อมาอาการแผลจุดพัฒนาเป็นแผลไหม้ ทั้งนี้พบว่าไอโซเลท 1675 พืชไม่แสดงอาการโรคใด ๆ (ตารางที่ 4) ในการพิสูจน์จำแนกชนิด *X. campestris* pv.*campestris* และ *X. campestris* pv. *armoraciae* Zhao et al. (2000) รายงานว่าไอโซเลทที่ทำให้เกิดอาการแผลไหม้ที่ลำต้นของกะหล่ำปลี เกิดอาการใบจุดแผลยุบตัวสีดำบริเวณก้านใบของผักกาด และแสดงอาการใบจุดบนมะเขือเทศ จำแนกเป็น *X. campestris* pv.*armoraciae*

-ตรวจผลการทดสอบประเมินความรุนแรงสายพันธุ์เชื้อจำนวน 18 ไอโซเลท บนต้นคะน้า พบการเกิดโรคที่มีลักษณะอาการแผลจุด และอาการแผลไหม้ อาการไหม้จากขอบใบรูปตัววี ประเมินความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลท

-ประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* ที่แยกได้จากพอาการใบไหม้ (V-shape) และอาการใบจุด จำนวน 22 ไอโซเลท บนพืชอาศัย 5 ชนิด ได้แก่ คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาว และบร็อคโคลี่ พบอาการโรคทั้งแผลไหม้รูปตัววี และอาการใบจุด โดยมีความรุนแรงในการเกิดโรคแตกต่างกันไป (ตารางที่ 5) *X. campestris* ไอโซเลทที่แยกจากอาการใบไหม้ สามารถก่อให้เกิดอาการใบจุดได้ เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่แยกจากอาการใบจุดสามารถก่อให้เกิดอาการใบไหม้ได้ โดยลักษณะอาการและความรุนแรงแตกต่างกันไป ทุกไอโซเลทที่ปลูกเชื้อสามารถก่อให้เกิดโรคบนคะน้าได้ ซึ่งจัดเป็น พืชอาศัยที่อ่อนแอต่อโรคแบคทีเรีย โดยไอโซเลท PA063, PA231 และ PA081 ไม่ทำให้เกิดอาการใบจุดบนคะน้า ไอโซเลท PA218 เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการไหม้รูปตัววีรุนแรงที่สุด บนพืชอาศัยกะหล่ำปลี กะหล่ำดอก

และบร็อคโคลี่ พบการเกิดโรคทั้งใบจุดและใบไหม้ ยกเว้นบนผักกาดขาวพบเพียงอาการใบไหม้ ไม่พบอาการใบจุด

5. จำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA

วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท 380 และ 381 ที่แยกจากอาการใบจุดและใบไหม้ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank พบว่าลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท 380 มีความคล้ายกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *X. campestris* strain TA, partial sequence (accession no. EU814440.1) และ str. ATCC33913 (accession no. AE008922.1), complete genome 99 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสแบคทีเรียไอโซเลท 381 มีความคล้ายกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *X.* campestris pv. *campestris* str. ATCC33913 (accession no. AE008922.1), complete genome และ strain B100 (accession no. AM920689.1) โดยลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท 381 ซึ่งแยกจากตัวอย่างอาการใบไหม้ (typical symptom) สามารถจำแนกได้เป็น *X. campestris* pv. *campestris* ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 380 แยกจากอาการใบจุดจำแนกได้เป็น *X. campestris* pv. *campestris* เช่นกันโดยอาจมีความผันแปรของลำดับเบสส่วนที่ต่างกันบ้างเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการปลูกเชื้อทดสอบบนพืชอาศัย แบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้จากอาการใบไหม้ สามารถก่อให้เกิดอาการใบจุดและใบไหม้เช่นเดียวกับไอโซเลทที่แยกจากใบจุด สามารถก่อให้เกิดอาการใบไหม้ได้ด้วย

6. ศึกษาลักษณะความผันแปรทางพันธุกรรมด้วย Box และ Eric PCR

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ Box และ Eric (ภาพที่ 3) ของแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำ แยกจากพืชอาศัยที่แสดงอาการขอบใบไหม้รูปตัววี และอาการใบจุด บางไอโซเลทมีรูปแบบลายพิมพ์เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่แยกจากแผลจุดและแผลไหม้ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ยืนยันผลด้วยการปลูกเชื้อซึ่งพบว่าไอโซเลทที่แยกจากแผลขอบใบไหม้ สามารถทำให้พืชแสดงอาการใบจุด ในขณะเดียวกันไอโซเลทที่แยกจากแผลจุด เมื่อปลูกเชื้อบนพืชอาศัยสามารถก่อให้เกิดโรคอาการขอบใบไหม้ได้เช่นกัน จากรูปแบบ phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อเป็น cluster และ group แต่การวิเคราะห์ความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยไพรเมอร์ Box และ Eric รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยแหล่งปลูกพืช หรือลักษณะอาการ (ขอบใบไหม้, V; ใบจุด, S) (ภาพที่ 4-5) แบคทีเรียสาเหตุโรค *X. campestris* สามารถเข้าทำลายพืชทำให้เกิดอาการใบไหม้และใบจุด

สรุปผลการทดลอง

1.โรคของพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* จำแนกตามลักษณะอาการได้ 2 รูปแบบ คือ อาการแผลไหม้ (รูปตัววี และแผลไหม้จากกลางใบ) ซึ่งเป็นอาการของโรคเน่าดำ หรือโรคขอบใบทอง พืชอาศัยที่พบการเกิดโรคขอบใบทอง ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ ผักกาดขาว และคะน้า และ อาการแผลจุด ลักษณะแผลจุดเล็กขนาด 1-3

มิลลิเมตร สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลแห้งลุกลามติดกันพบลักษณะแผลจุดเป็นสะเก็ดนูนดำ พืชอาศัยที่พบอาการแผลจุด คือ คะน้า และกะหล่ำดอก

2. ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* พบว่าสามารถก่อให้เกิดอาการใบจุดและใบไหม้ โดยมีความผันแปรของอาการและความรุนแรง ไปตามชนิดของไอโซเลทเชื้อ และพืชอาศัย

3. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรค *X. campestris* ไอโซเลทตัวแทนเชื้อที่แยกจากใบจุด และใบไหม้ จัดเป็น non-enteric oxidase negative ผลทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (Biolog test) จำแนกได้ระดับสปีชีส์ คือ *X. campestris* pv. *campestris*

4. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำ ลักษณะอาการขอบใบไหม้รูปตัววี อาการแผลไหม้กลางใบและอาการแผลจุด เปรียบเทียบผลของชีวเคมีเชื้อ การเกิดโรค ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบส ไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร หจก. โรงพิมพ์ยูไนเต็ด โปรดักชั่น กรุงเทพฯ. 285 หน้า.

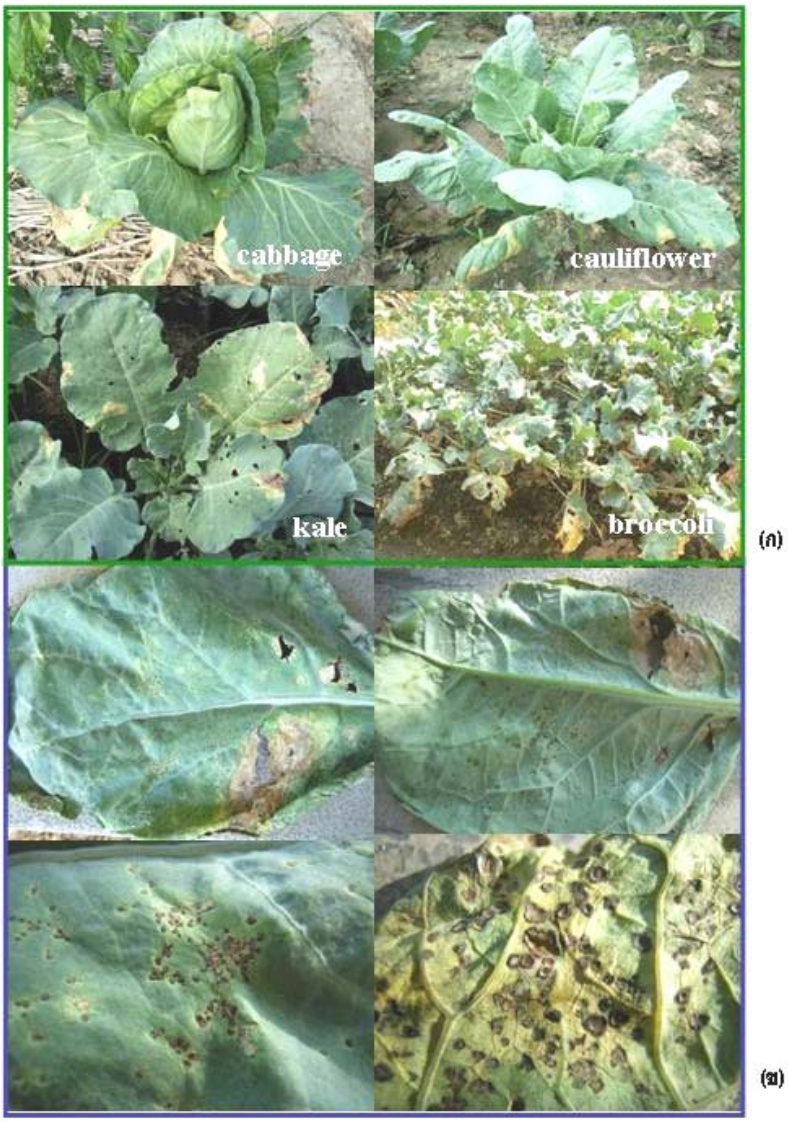
ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักรกรุงเทพฯ.173 น.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. APS Press St. Paul, Minnesota. 373 p.

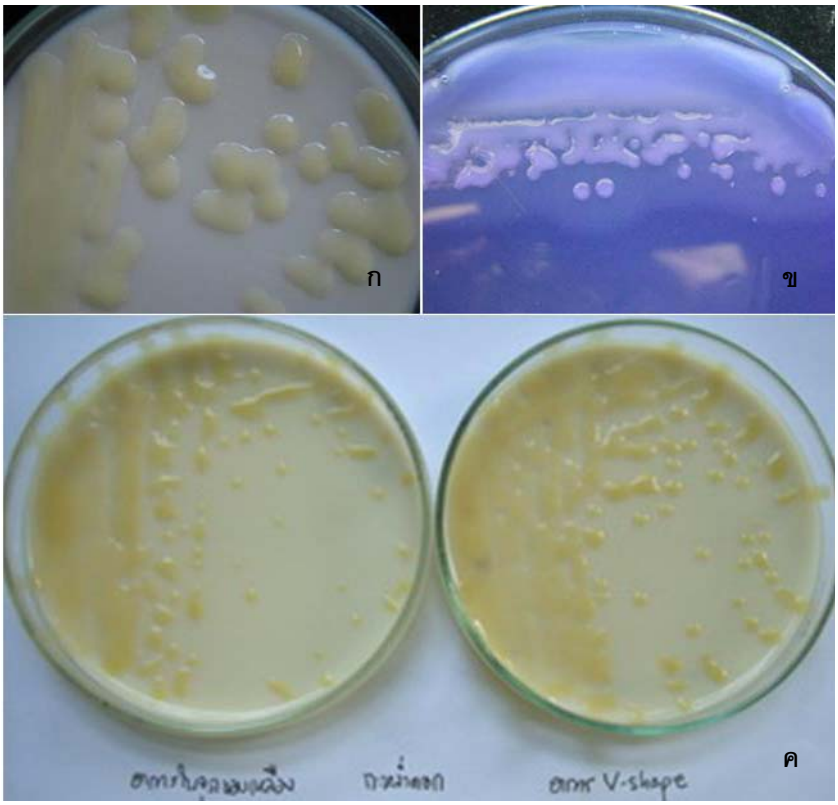
Tamura, K., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., and Goto, M. 1994. Bacterial spot of crucifers caused by *Xanthomonas campestris* pv.*raphani*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60:281-287.

Vicente, J. G., Conway, J., Roverts, S. J. and Taylor, J. D. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* races and related pathovars. Phytopathology 91:492-499.

Zhao, Y., Damicone, J. P., Demezas, D. H., and Bender, C. L. 2000. Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. Plant Dis. 84:1008-1014.



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาดจากเชื้อแบคทีเรีย
(ก) อาการโรคเน่าดำ หรือขอบใบทอง แผลไหม้จากขอบใบหรือกลางใบ ใน กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า และบร็อคโคลี่
(ข) อาการโรคใบจุด บนใบคะน้า อาการแผลจุดมีวงสีเหลืองล้อมรอบ และอาการแผลจุดนูนสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนี ของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pathovars

ก เจริญบนอาหาร Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ อายุ 36 ชั่วโมง

ข เจริญบนอาหาร SX agar เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ค ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย แยกจากอาการแผลจุดและแผลไหม้

ตารางที่ 1 ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรีย พืชอาศัย ลักษณะอาการ และแหล่งปลูก

ไอโซเลทเชื้อ	พืชอาศัย	ลักษณะอาการ	แหล่งปลูก
1675	คะน้า	แผลไหม้ตัววี	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี
P 022	กะหล่ำดอก	แผลไหม้ตัววี	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
P 023	คะน้า	แผลไหม้ตัววี	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
P 029	คะน้า	ใบจุด	อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี
P 046	กะหล่ำดอก	แผลไหม้ตัววี	อ. ท่ายาง จ. เพชรบุรี
P 063	กะหล่ำปลี	แผลไหม้	อ. นครชัย จ. เพชรบูรณ์
P 081	คะน้า	แผลไหม้ตัววี	อ. บางกรวย จ. นนทบุรี
P 100	กะหล่ำดอก	แผลไหม้	อ. วังไคร้ จ. เพชรบุรี
P 127	บร็อคโคลี่	แผลไหม้ตัววี	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
P 211	กะหล่ำดอก	แผลไหม้ตัววี	อ. จอมบึง จ. ราชบุรี
P 218	กะหล่ำดอก	แผลไหม้ตัววี	อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี
PA219	กะหล่ำดอก	ใบจุด	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี
P 225	กะหล่ำปลี	แผลไหม้ตัววี	อ. อุ้มผาง จ. ตาก
P 226	กะหล่ำปลี	แผลไหม้ตัววี	อ. อุ้มผาง จ. ตาก
P 230	ผักกาดขาว	แผลไหม้	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
PA231	กะหล่ำประดับ	ใบไหม้	ดอยมูเซอ จ.ตาก
P 233	คะน้า	แผลไหม้ตัววี	อ. เมือง จ. กาญจนบุรี
P 237	คะน้า	แผลไหม้ตัววี	อ. ท่ายาง จ. เพชรบุรี
P 238	คะน้า	ใบจุดดำ	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี
P 254	คะน้า	ใบจุดเล็กดำ	อ. ท่าม่วง จ .กาญจนบุรี
P 273	กะหล่ำดอก	แผลไหม้ตัววี	อ. ท่ายาง จ. เพชรบุรี
PA 343	กะหล่ำดอก	ใบไหม้	อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
PA350	กะหล่ำดอก	ใบไหม้	อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี
PA368	กะหล่ำปลี	ใบไหม้	อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
PA372	คะน้า	ใบจุด	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี
PA 371	คะน้า	ใบจุดขอบเหลือง	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี
PA 372	คะน้า	ใบจุดช้ำ	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี
PA 379	กวางตุ้ง	ใบไหม้ v-shape	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี
PA 380	คะน้า	ใบจุด	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี
PA 381	คะน้า	ใบไหม้ v-shape	อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris*

คุณสมบัติชีวเคมี	สายพันธุ์เชื้อ	
	XC	P233
Mucoid growth on nutrient agar 5% glucose	+	+
Xanthomonadins produced	+	Nd
Hydrolysis of: Gelatin	D	+
Esculin	+	nd
Starch	D	-
Growth on nutrient agar:	+	+
Growth rate in culture: Moderate	+	+
Slow to very slow	-	-
Catalase	+	+
Nitrate reductase	-	-
Utilization of: Acetate	+	+
Citrate	+	+
Succinate	+	+
Benzoate	-	-
Arabinose	+	+
Galactose	+	+
Trehalose	+	+
Acid production on Dye's medium C from:		
Fructose	+	nd
Maltose	d	+
Xylose	d	+
Ribose	d	+
Raffinose	d	+
Melezitose	d	+
Dextrin	d	+
Glycerol	d	+
Mannitol	-	-
Rhamnose	-	+

[a]สายพันธุ์เชื้อ XC= *Xanthomonas campestris* จาก Bergey's manual of systematic bacteriology (Krieg และ Holt, 1984), d= 11-89% ผลการทดสอบเป็นบวก, nd= ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ไอโซเลทจากคะน้าอาการเน่าดำขอบใบไหม้รูปตัววี P233, P381 และอาการใบจุด P254, P029 โดย Biolog® system

แหล่งคาร์บอน	**สายพันธุ์แบคทีเรีย**			
	P 233 (V)	**P 254 (S)**	**P381 (V)**	**P029 (S)**
Water	-	-	-	-
∞-cyclodextrin	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+
Glycogen	+	+	-	+
Tween-40	-	-	+	-
Tween-80	-	-	+	-
N-acetyl-D-galactosamine	-	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-
L-arabinose	-	+	-	-
D-arabitol	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	+	+
L-erythritol	-	-	-	-
D-fructose	+	+	+	+
L-fucose	-	+	-	+
D-galactose	-	+	-	+
Gentiobiose	+	+	-	+
∞-D-glucose	+	+	+	+
M-inositol	-	+	-	-
∞-D-lactose	-	+	-	-
Lactulose	-	+	-	+
Maltose	+	+	-	+
D-mannitol	-	+	-	-
D-mannose	+	+	+	+
D-melibiose	+	+	-	+
ß-methy-D-glucoside	-	+	-	-
D-psicose	+	+	+	+
D-raffinose	-	+	-	-
L-rhamnose	-	+	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-

Sucrose	+	+	+	+
D-trehalose	+	+	+	+
Turanose	-	-	-	b
Xylitol	-	-	-	-
Pyruvic-acid-methyl ester	+	+	+	+
Succinic acid monoethyl ester	+	+	+	+
Acetic acid	-	-	-	b
Cis-aconitic acid	-	-	-	-
Citric-acid	+	+	+	+
Formic-acid	-	-	-	-
D-galactonic-acid lactone	-	+	-	-
D-galacturonic acid	-	+	-	-
D-gluconic acid	-	-	-	-
D-glucosaminic acid	-	-	-	-
D-glucoronic acid	-	-	-	-
∞-hydroxybutyric acid	-	-	-	-
ß-hydroxybutyric acid	-	-	-	-
ɣ-hydroxybutyric acid	-	-	-	-
P-hydroxy-phynyl acetic acid	-	-	-	-
Itaconic acid	-	-	-	-
∞-Keto Butyric acid	-	-	-	b
∞-Keto glutaric acid	+	+	+	+
∞-Keto valeric acid	-	-	-	-
D,L-lactic acid	-	-	-	b
Malonic acid	-	-	-	+
Propionic acid	-	-	-	-
Quinic acid	-	-	-	-
D-saccharic acid	+	+	-	+
Sebacic acid	-	-	-	-
Succinic acid	+	+	+	+
Bromosuccinic acid	+	+	-	+
Succinamic acid	-	-	-	+
Glucuronamide	-	-	-	-
L-alanimamide	-	-	-	+
D-alanine	-	-	-	b
L-alanine	-	-	-	b

L-alanyl glycine	+	-	-	b
L-asparagine	-	+	-	-
L-aspartic acid	-	+	-	+
L-glutamic acid	-	+	-	+
Glycyl-L-aspartic acid	-	-	-	b
Glycyl-L-glutamic acid	-	-	-	+
L-histidine	-	-	-	-
Hydroxy-L-proline	-	-	-	+
L-leucine	-	-	-	-
L-ornithine	-	-	-	-
L-Phynylalanine	-	-	-	-
L-proline	-	-	-	+
L-pyroglutamic acid	-	-	-	-
D-serine	-	-	-	-
L-serine	+	+	-	+
L-threoine	-	-	-	b
D-L-carnitine	-	-	-	-
ɣ-amino-butyric acid	-	-	-	-
Urocanic acid	-	-	-	-
Inosine	-	-	-	b
Uridine	-	-	-	b
Thymidine	-	-	-	-
Phenyethyl-amine	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-
2-aminocethanol	-	-	-	-
2-3-butanediol	-	-	-	-
Glycerol	-	+	-	b
D-L-∞-glycerol-phosphate	-	+	-	b
∞-D-glucose-1-phosphate	-	-	-	+
D-glucose-6-phosphate	-	+	-	b

หมายเหตุ: +, สามารถใช้คาร์บอนได้ ; -, ไม่สามารถใช้คาร์บอนได้; b, borderline

P233 (kale-V), *X. campestris* unidentified pathovar

P254 (kale-S), *X. campestris* unidentified pathovar

P381 (kale-V), *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* Prob. 96% sim. 0.65 Dist 4.98

P029 (kale-S), *X. campestris* pv. *raphini* Prob. 100% sim. 0.83 Dist 2.4

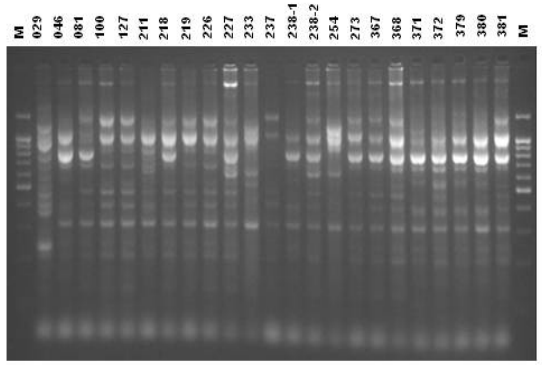
ตารางที่ 4 การประเมินการเกิดโรคของเชื้อ *Xanthomonas* sp. บนต้นคะน้า (ปี 2551)

ไอโซเลท	จำนวนต้นที่แสดงอาการใบไหม้	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	จำนวนต้นที่แสดงอาการใบจุด	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
P022	1	20	0	0
P029	4	80	0	0
P046	4	80	1	20
P127	4	80	0	0
P063	3	60	0	0
P081	0	0	2	40
P100	2	40	0	0
P211	5	100	0	0
P219	3	60	0	0
P225	3	60	0	0
P226	5	100	0	0
P230	2	40	4	80
P237	3	60	0	0
P238	4	80	1	20
P254	2	40	2	40
1675	0	0	0	0
Control	0	0	0	0

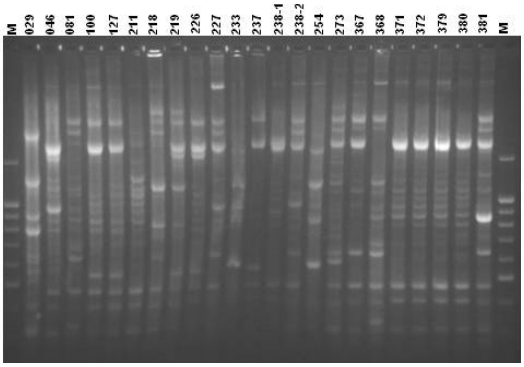
ตารางที่ 5 ผลการประเมินความรุนแรงการเกิดโรคจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* บนพืชคะน้า กะหล่ำปลี ผักกาดขาว บร็อคโคลี่ และกะหล่ำดอก (ปี 2552)

ไอโซเลท	ลักษณะอาการและความรุนแรงในการเกิดโรคบนพืชอาศัย									
	คะน้า		กะหล่ำปลี		ผักกาดขาว		บล็อกโคลี		กะหล่ำดอก	
	V-shape	Spot	V-shape	Spot	V-shape	Spot	V-shape	Spot	V-shape	Spot
PA022	0.6	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA029	0.6	0.2	1	-	2	-	3.3	-	1.67	-
PA046	0.5	0.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA063	2	-	-	-	0.67	-	1	-	0.33	-
PA081	0.2	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA100	1.6	0.2	-	0.67	1	-	0.67	0.3	1	0.33
PA127	1.2	0.5	0.67	0.33	0.33	-	5	-	0.33	-
PA211	0.8	0.2	1.67	-	2	-	4	-	2	-
PA218	2.3	0.2	1.33	-	0.67	-	2.33	-	2	-
PA219	1	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA225	1.3	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA226	0.5	0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA230	0.5	0.4	-	1	1.67	-	2.33	-	2	-
PA231	0.7	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA233	0.9	0.7	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA23	0.4	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PA254	0.6	0.6	1.67	-	5	-	2.33	-	1.33	-
PA273	0.5	0.2	0.33	0.67	0.33	-	1	-	0.67	0.33
PA 343	ND	ND	1	-	0.67	-	1	-	1.67	-
PA350	ND	ND	2	0.67	2	-	5	-	4.33	-
PA368	ND	ND	0.67	0.33	1	-	1	-	1.33	-
PA372	ND	ND	1.67	-	1.33	-	4.33	-	2	-

หมายเหตุ: ND= not determine

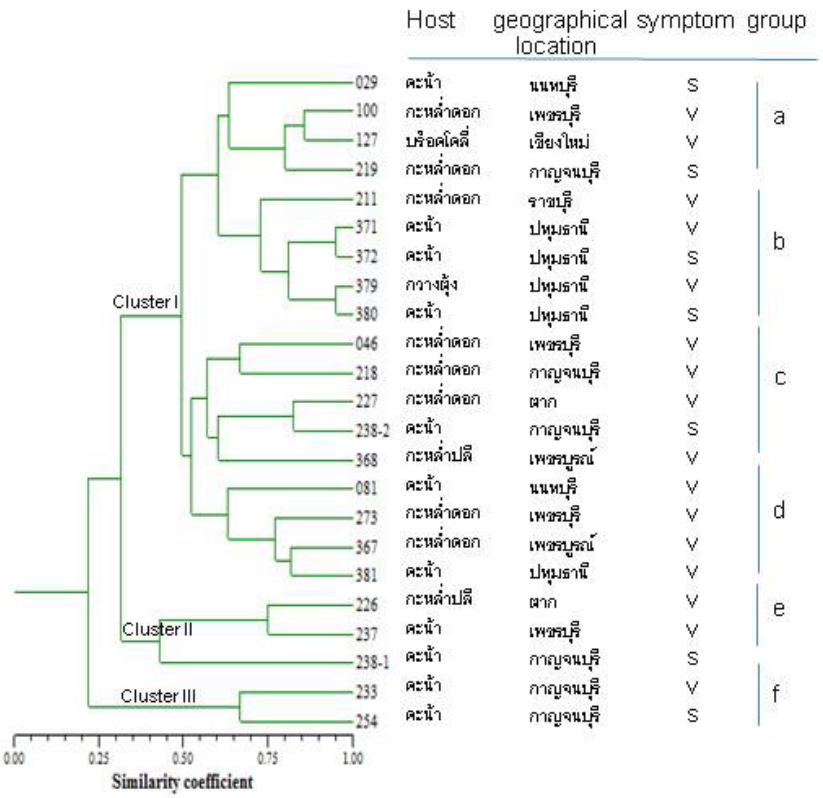


(A)

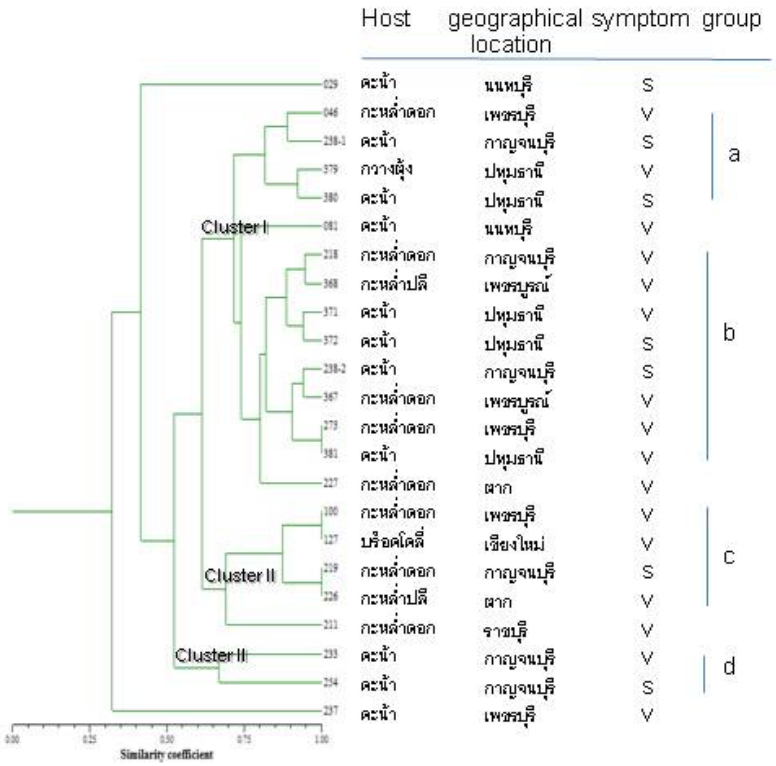


(B)

ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* จำนวน 23 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ Box (A) และไพรเมอร์ Eric (B) เลนแรกและสุดท้ายเป็นดีเอ็นเอ 100 bp ladder



ภาพที่ 4 แสดง Phylogenetic tree ด้วย Box-PCR แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* จำนวน 23 ไอโซเลท จากพืชอาศัย คะน้า กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ กวางตุ้ง กะหล่ำปลี อาการขอบใบไหม้รูปตัววี (V) และอาการใบจุด (S) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys (2.01)



ภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree ด้วย Eric-PCR แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* จำนวน 23 ไอโซเลท จากพืชอาศัย คะน้า กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ กวางตุ้ง กะหล่ำปลี อาการขอบใบไหม้รูปตัววี (V) และอาการใบจุด (S) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys (2.01)