การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์พืชสกุลแตงบางชนิดเพื่อการส่งออก

Efficiency of Chemical to Control *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* some cucubits seeds for Export

วันเพ็ญ ศรีชาติ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์
ชลธิชา รักใคร่ วานิช คำพานิช ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าแบคทีเรีย (Bacterial fruit blotch) ของพืชตระกูลแตง สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) จากการเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชสุกลแตงเพื่อการส่งออกของเกษตรกรจากภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 47 แปลง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ แตงโม เมลอน แตงกวาและ ฟักทอง พบว่า ทุกเชื้อสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและในบางพืชทดสอบต้นกล้าเกิดอาการใบเน่าเละและต้นเหี่ยวทั้งต้น และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและตรวจด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทให้ผลเป็นลบ และจากความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 2 ไอโซเลท ทำการทดสอบการเกิดโรคกับพืช 5 ชนิด คือ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอนและ ฟักทอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวโดยที่ต้นไม่เน่าเละในทุกพืชทดสอบ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโม พบว่า สามารถปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมนาน 48 ชั่วโมง สามารถทำให้เกิดโรคกับแตงโมได้ดี และสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จากเมล็ดพันธุ์แตงโมได้ดี คือ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิคเข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ),สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-01-02-06-51

คำนำ

ประเทศไทยมีการผลิตแตงโมและแตงต่างๆ เพื่อการบริโภคผลสดเป็นจำนวนมาก และยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกที่สำคัญ อีกทั้งเกษตรกรมีทักษะในการเพาะปลูก ค่าแรงงานต่ำเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ และเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของประเทศต่างๆ ทั่วโลก เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ในประเทศไทยแม้จะมีคุณภาพดีคือ ความงอกสูง ความตรงต่อสายพันธุ์สูง แต่ผู้ซื้อหลายประเทศยังต้องการให้รับรองการปลอดโรคพืชโดยระบุข้อความลงในใบรับรองปลอดศัตรูพืชว่าเมล็ดพันธุ์พืชดังกล่าวได้จากพืชปราศจากเชื้อโรคพืชที่สำคัญบางชนิดในช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก และเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวปราศจากเชื้อโรคพืชสำคัญบางชนิด แต่พบว่า ในปี พ.ศ. 2534 มีรายงานพบโรคผลเน่าของแตงโมในพื้นที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของประเทศ และในปีต่อมาพบว่าโรคนี้ระบาดทำความเสียหายต่อผลผลิตแตงโมผลสด และแตงโมสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์ซึ่งได้รับความเสียหายมากกว่า 50% (Pinyapong, 1994) และจากการนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากผลที่เกิดโรคพบว่าอัตราการเข้าทำลายมากกว่า 80% (Kucharek et al., 1993) และมีรายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าสามารถติดกับเมล็ดพันธุ์ เมื่อนำไปปลูกในฤดูต่อไปได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการส่งเสริมการผลิตแตงสำหรับบริโภคผลสดและผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรคและการจัดการโรคผลเน่าแบคทีเรียได้อย่างถูกต้อง จึงได้ศึกษาหาวิธีการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคที่ผ่านทางเมล็ดและสามารถส่งเมล็ดพันธุ์ไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกพืชตระกูลแตงของเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Nutrient Agar (NA) Starch Agar King's medium B เป็นต้น
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองกำจัดเชื้อ
4. ชุดตรวจสอบ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA Kit) ของ Agdia สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. โรงเรือนปลูกพืชที่มีตาข่ายกันแมลง
7. วัสดุและอุปกรณ์ในการปลูกพืช
8. วัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบและผลของพืชสกุลแตง ได้แก่ แตงโม แตงกวา เมลอน ฟักทองและสควัอช ที่แสดงลักษณะอาการโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อุบลราชธานี สกลนคร ลำปาง น่านและกาญจนบุรี โดยเก็บตัวอย่างอาการที่สงสัยนำตัวอย่างมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

นำตัวอย่างใบที่มีอาการของโรคผลเน่ามาล้างด้วยน้ำสะอาด และทำความสะอาดที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคมาบดให้ละเอียด ใส่เนื้อเยื่อพืชที่บดแล้วลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อที่บรรจุในหลอดทดสอบคนให้เข้ากัน แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีสีขาวใส รูปร่างกลมนูน ขอบเรียบขนาดเล็ก นำมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร NA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างอาการผลเน่า ให้ทำการแยกเชื้อโดยทำความสะอาดผิวเปลือกบริเวณแผลด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้มีดฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ รอให้มีดเย็น ตัดบริเวณผิวเปลือกของผลออก แล้วจึงใช้มีดฆ่าเชื้อเจาะเอาเนื้อผลบริเวณแผล วางลงบนสไลด์กระจกฆ่าเชื้อ หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อบดตัวอย่างให้ผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อดำเนินการเช่นเดียวกับที่แยกเชื้อจากใบที่เกิดอาการโรค จนได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่สงสัยในพืชสกุลแตง

นำเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้นำมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบคือ ต้นกล้าแตงโม เมลอน แตงกวาและฟักทอง โดยการเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียทดสอบ โดยนำเชื้อที่คัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารและใช้เข็มเขี่ยรูปทรงกลมกวาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหาร ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^8 cfu/มิลลิลิตร สำหรับนำไปปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

การปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าลงบนพืชทดสอบ โดยเตรียมพืชทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ ต้นกล้าบวบเหลี่ยม เมลอน แตงโม แตงกวา และฟักทอง อายุ 15 วัน ต้นกล้ามีใบจริง

จำนวน 2 ใบ ใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการที่ผลและใบของโรคผลเน่าที่เก็บตัวอย่างจากแปลง, สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้เชื้อจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) แล้วจึงทำการฉีดสารแขวนลอยแบคทีเรีย เข้าใต้ใบเลี้ยงของพืชทดสอบปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้วจึงคลุมต้นพืชทดสอบด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิดถุงพลาสติกออก ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั้งตรวจผล ต้องราดน้ำลงบนพื้นโรงเรือนเช้าและเย็น เพื่อควบคุมเปอร์เซ็นต์ความชื้นให้อยู่ที่ 60-70 เปอร์เซ็นต์และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 28-35 องศาเซลเซียส สังเกตอาการของโรคบนใบเลี้ยงของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นพืชชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค direct ELISA มีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 เขียนแผนผังของการตรวจตัวอย่าง บัฟเฟอร์ (buffer), ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control), ชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ตรวจ และ antiserum ที่ใช้ ลงบน แผนผังการทดลอง (loading diagram) ให้ครบสมบูรณ์

4.1.2 เจือจาง capture antibody ที่จำเพาะกับเชื้อ Aac. ด้วยสารละลาย Coating buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 200 จากนั้นเติมสารละลาย capture antibody ดังกล่าวลงในหลุมอีไลซ่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงหรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.3 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.4 ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตรหรือเตรียมตัวอย่าง 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย General extraction buffer

4.1.5 เติมสารละลาย General extract buffer, บัฟเฟอร์ (buffer), ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control), ชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และ ตัวอย่างสารแขวนลอยแบคทีเรีย ลงใน ELISA Plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตามตำแหน่งบนแผนผังที่เขียนไว้ จากนั้นนำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงหรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.6 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.7 เติม 1 เท่าของEnzyme conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุมอีไลซ่า นำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4.1.8 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.9 เติมสารละลาย PNP substrate ลงใน หลุมอีไลซ่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในกล่องชื้น นาน 30-60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3 โมล โซเดียมคลอไรด์ (3 M NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยตาเปล่าหรือนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านผลอีไลซ่า (ELISA reader) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะให้สีเหลืองและตัวอย่างที่ปกติจะใส

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

ดำเนินการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการผลเน่า และตรวจสอบด้วย เทคนิค indirect ELISA เพื่อเป็นการตรวจสอบยืนยันการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย 7 วิธี ดังนี้

4.2.1. ความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

4.2.2. ปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase reaction)

4.2.3. การสร้างสารเรืองแสง (Fluorescent pigment production)

4.2.4. การไฮโครไลด์ arginine (Arginine hydrolase activity)

4.2.5 การสร้าง Levan (Levan production)

4.2.6 ปฏิกิริยาไลโปโลติต (Lypolytic activity)

4.2.7 การรีดิวซ์ในเตรท (Nitrate reduction)

5. การทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในพืชสกุลแตงบางชนิด

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)ให้มีความขุ่นเมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.25 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^8 cfu/มิลลิลิตรนำสารละลายเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อ 1 จานอาหาร แล้วนำกระดาษกรองที่แช่ในสารทดสอบชนิดต่างๆ วางตรงกลางจานอาหาร ซึ่งสารเคมีที่นำมาทดสอบ จำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 3 ความเข้มข้นและชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) รวมทั้งสิ้น16 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 55 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ)

กรรมวิธีที่ 6 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 8 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 9 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 10.0เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 10 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 11 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 12 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 13 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 14 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 15 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 16 ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

นำจานอาหารทดสอบบ่มอุณหภูมิ 24-35 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

5.2.1 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม

นำเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร (WMPD1228)) เลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความขุ่น 0.25 (เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 300 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร Nutrient blotch ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่หยดสาร tween 80 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์แตงโมที่สมบูรณ์ที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 3 นาที แล้วนำเมล็ดฆ่าเชื้อต่อด้วยแอลกอฮอล์

เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วฆ่าเชื้อด้วยคลอร๊อกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อจนแห้ง นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ทดสอบการปลูกเชื้อโดยใช้เมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ด แช่กับสารแขวนลอยแบคทีเรีย นำตั้งบนเครื่องเขย่าบ่มในอุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปปลูกในดินฆ่าเชื้อในโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก อาการที่เกิดบนใบเลี้ยงของต้นแตงโม นำใบเลี้ยงที่มีอาการของโรคนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าเป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด}} \times 100$$

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

ทำการปลูกเชื้อบนเมล็ดพันธุ์แตงโมตามระยะเวลาที่เกิดโรคได้ดีจากข้อ 5.2.1 หลังจากนั้นนำเมล็ดแตงโมที่ได้ มาทำการกำจัดเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า โดยแช่เมล็ดแตงโมในสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ผลดีจากข้อ 5.1 เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลดี ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์, สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร, สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์, เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว ชุดควบคุมมี 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่เขย่าในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ซึ่งเมล็ดแตงโมทดสอบจากทุกกรรมวิธีหลังจากล้างด้วยน้ำประปาแล้วนำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน ในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำการเพาะเมล็ดแตงโมในตะกร้าพลาสติก 100 เมล็ดต่อกรรมวิธี วางตะกร้าเพาะเมล็ดพันธุ์ในโรงเรือนที่มีตาข่ายกันแมลง ที่มีอุณหภูมิ 24-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วคลุมตะกร้าพืชทดสอบด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเปิดถุงพลาสติกสังเกตอาการกับต้นกล้าของแตงโมหลังการเพาะเมล็ด 14 วัน และนำอาการของต้นแตงโมที่สงสัยตรวจด้วยวิธีอีไลซ่า ทำการ

บันทึกจำนวนต้นที่งอก และจำนวนต้นที่เป็นโรคนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าเป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด}} \times 100$$

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการ

1. แปลงปลูกแตงโมและเมลอนของเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

เก็บตัวอย่างใบและผลของแตงโมและเมลอนที่แสดงอาการโรคผลเน่า จากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัด ขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อุบลราชธานี สกลนคร ภาคเหนือ คือ ลำปางและน่าน ภาคกลาง คือ กาญจนบุรี จำนวน 47 แปลง โดยเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นมีอาการที่สงสัยว่าเป็นโรคผลเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ลักษณะของผลแตงโมที่มีอาการโรคผลเน่า คือ ผิวของผลเป็นแผลแตกสีน้ำตาล และแสดงอาการฉ่ำน้ำบริเวณรอบแผล เมื่อตัดดูภายในเนื้อผลมีอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาล แต่เนื้อผลไม่เน่าเละ และไม่มีกลิ่นเหม็นเน่า และอาการที่เกิดบนใบแตงโมที่เก็บตัวอย่างมาทดสอบ คือ บริเวณเส้นกลางใบ และเส้นแขนงของใบมีอาการฉ่ำน้ำ หรือเป็นรอยสีน้ำตาลขอบแผลหยักตามเส้นใบ (ภาพที่ 1)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างผลของแตงโมที่แสดงอาการโรคผลเน่ามาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 5 ไอโซเลท เป็นเชื้อจากจังหวัดขอนแก่น จำนวน 4 ไอโซเลท คือ 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 และแยกเชื้อจากผลเน่าของจังหวัดกาญจนบุรี ได้เชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท คือ 51KJ1 และจากการอนุเคราะห์เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยก

ได้จากแตงโม (WMKK) ซึ่งทุกไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีขาวใส กลม ขอบเรียบ นูนเนื้อผิวหน้าอาหาร ขนาดเล็ก และเจริญได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่สงสัยในพืชสกุลแตง

การทดสอบการเกิดโรคบนพืชทั้ง 4 ชนิดได้แก่ แตงโม แตงกวา เมลอน และฟักทอง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 51KJ1 ไม่สามารถทำให้เกิดอาการใดๆ บนใบเลี้ยงของพืชทดสอบทั้ง 4 ชนิด แต่แบคทีเรียไอโซเลท 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 ทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำทั้งบนใบและใต้ใบเลี้ยงของพืชทดสอบ ทั้ง 4 ชนิด แต่ต้นแตงโมและแตงกวาเนื้อใบยุบตัว และต้นฟักทองเนื้อใบเน่าฉีกขาด ส่วนอาการฉ่ำน้ำของใบเมลอนลามไปถึงใบจริงและยอดหักพับ ส่วนชุดควบคุมไม่เกิดอาการผิดปกติกับใบเลี้ยงที่ฉีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 2)

ส่วนการทดสอบการเกิดโรคบนพืช 5 ชนิด ได้แก่ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอน และฟักทอง กับเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถทำให้พืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด เกิดอาการรอยฉ่ำน้ำบริเวณที่ปลูกเชื้อบนใบเลี้ยงหลังจากปลูกเชื้อและคลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนต้นพืชทดสอบที่ฉีดด้วยชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ใบเลี้ยงเป็นปกติ (ภาพที่ 3)

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค direct ELISA

จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่มีอาการคล้ายโรคผลเน่าจากแปลงปลูกจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดขอนแก่น ด้วยเทคนิค indirect ELISA ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ 51KJ1, 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 ให้ปฏิกิริยาไม่เกิดสีเหลือง ซึ่งให้ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ปฏิกิริยาเกิดสีเหลือง ซึ่งให้ผลเป็นบวก แสดงว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบคุณสมบัติของชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า เชื้อไอโซเลท 51KK1, 51KK2, 51KK3 51KK4 และ 51KJ1 ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ

4.2.1. ความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) พบว่า ให้ผลเป็นลบ เพราะไม่สามารถย่อยแป้งได้บนอาหาร yeast extract nutrient agar (YNA)

4.2.2. ปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase reaction) พบว่าให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส บนแผ่นกระดาษ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.2.3. การสร้างสารเรืองแสง (Fluorescent pigment production) พบว่าให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเกิดการสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B

4.2.4. การไฮโดรไลด์ arginine (Arginine hydrolase activity) พบว่าให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสีไฮโดรไลด์ เนื่องจากสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนีย

4.2.8 การสร้าง Levan (Levan production) พบว่าให้ผลเป็นบวก คือ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เจริญบนอาหารมีลักษณะสีขาว นูน และเป็นเมือกเยิ้มบนอาหาร nutrient sucrose agar

4.2.9 ปฏิกิริยาไลโปโลติต (Lypolytic activity) พบว่าให้ผลเป็นลบ เนื่องจากแบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างฝ้าสีขาวบนอาหาร tween 80 agar การรีดิวซ์ในเตรท (Nitrate reduction)

ส่วนเชื้อแบคทีเรียได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ผลตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทข้างต้น

5. การทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในพืชสกุลแตงบางชนิด

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ พบว่า สารที่ให้ลักษณะของวงใสมากที่สุด คือ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดวงใสเท่ากับ 1.14 เซนติเมตร รองลงมา คือ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.09 เซนติเมตร และ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และสารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.09, 0.97 และ 0.51 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นกับการทดสอบของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่

ความเข้มข้น 5.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จะสังเกตเห็นส่วนขุ่นเกิดขึ้นบริเวณรอบกระดาษกรองทดสอบ และจึงเกิดวงใสล้อมรอบ ซึ่งต้องนำสารนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในเมล็ดพันธุ์เพื่อดูผลที่เกิดขึ้นอีกครั้ง ส่วนในการทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.16, 0.22 และ 0.39 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่สารเคมีที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ คือ สารโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์, สารโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ และสารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 4)

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

5.2.1 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม

จากการทดสอบการถ่ายทอดโรคผลเน่ากับเมล็ดพันธุ์แตงโม โดยการนำเมล็ดพันธุ์แตงโมเขย่าในเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในอาหาร Nutrient Broth ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์แตงโมไปปลูกในดินเพื่อสังเกตอาการของต้นแตงโม พบว่า การปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด คือ 98 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าแตงโมเป็นปกติ รองลงมาคือการปลูกเชื้อแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าต้นกล้าของแตงโม บริเวณใบเลี้ยงเกิดอาการฉ่ำน้ำ เนื้อใบยุบตัว มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.33 เปอร์เซ็นต์ และการปลูกเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดแตงโมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด คือ 68.97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำใบที่เกิดอาการไปตรวจด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลเป็นสีเหลือง (เป็นผลบวก) ส่วนชุดควบคุมไม่พบอาการใบเลี้ยงฉ่ำน้ำ (ตารางที่ 2)

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม หลังจากปลูกเมล็ดแตงโมทดสอบในโรงเรือน พบว่าเมล็ดพันธุ์แตงโมมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดด้วยสารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ) มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นแตงโมเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลเปอร์เซ็นต์ความงอกใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่เขย่าในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบนซอลโค

เนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดด้วยสารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากันกับเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์ แต่เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์มีความเข้มข้นสูง ทำให้เป็นพิษกับเมล็ดพันธุ์แตงโมก่อให้เกิดการตายของเมล็ดพันธุ์ได้ (ตารางที่ 3)

ผลจากการสังเกตอาการของใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมที่เพาะในโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน พบว่า สารเคมีที่ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม คือ สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบอาการฉ่ำน้ำที่ใบเลี้ยงของต้นแตงโมเลย (ภาพที่ 5ก) เช่นเดียวกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ส่วนต้นแตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบน-ซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมแสดงอาการฉ่ำน้ำเนื้อใบยุบตัว 39.51 และ 46.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้แสดงว่าการทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เห็นลักษณะขุ่นบริเวณรอบของกระดาษกรอง อาจเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เมื่อนำมาทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดพันธุ์ จึงแสดงอาการของโรคเกิดขึ้นกับต้นกล้าแตงโม แสดงให้เห็นว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ และต้นกล้าแตงโมที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบว่าใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมมีอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัว 56.98 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการล้างด้วยน้ำกลั่นสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้บางส่วน แต่กำจัดไม่ได้ทั้งหมด ส่วนเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว พบว่าใบเลี้ยงมีอาการ ฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัว 93.98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5ข) และเมื่อนำใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมที่มีอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวก แสดงว่าใบเลี้ยงที่เกิดอาการมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (ตารางที่ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชสุกลแตงเพื่อการส่งออกของเกษตรกรจากภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 47 แปลง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ แตงโม เมลอน แตงกวาและ ฟักทอง พบว่า ทุกเชื้อสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและในบางพืชทดสอบต้นกล้าเกิดอาการใบเน่าเละและต้นเหี่ยวทั้งต้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและตรวจด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ผลเป็นลบ และจากความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ทำการทดสอบการเกิดโรคกับพืช 5 ชนิด คือ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอนและ ฟักทอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวโดยที่ต้นไม่เน่าเละในทุกพืชทดสอบ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโม พบว่า สามารถปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมนาน 48 ชั่วโมงได้ผลดี และสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จากเมล็ดพันธุ์แตงโมให้ได้ผลดี คือ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เพื่อใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขอขอบพระคุณ ดร. ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ ดร. ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุเคราะห์เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เพื่อใช้ในการทดสอบการกำจัดด้วยสารเคมี รวมถึงคุณจิรวัฒน์ ไกรนรา ที่ช่วยในการปลูกเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ทดสอบในโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

พยอม พินยพงศ์. 2537. รายงานครั้งแรกของโรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของแตงโมในประเทศไทย. แก่นเกษตร 22 : 55-57.

เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และ ประภาษ กาวิชา. 2543. โรคเน่าแตงโมของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย. รายงานสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2543. วันที่ 24-25 มกราคม 2543 ณ หอประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีวิเศษ เกษสังข์. 2548. ผลงานฉบับเต็ม. ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 8ว. กลุ่มงานวิชาการกักกันโรคพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-16.

Babadoost, M., and Pataky, N. 2002. First Report of Bacterial Fruit of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. Plant Dis. 86:443.

Crall, J.M. and N.C. Schenck. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. Plant Dis. Rep. 53:74-75.

Evans, T.A., and R. P. Mulrooney. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. Plant Dis. 73: 1074.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Hopkins, D.L., J.D. Cucuzza and J.C. Watterson. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. Plant Dis. 80: 529-532.

Isakeit, T., M.C. Black, L.W. Barnes and J.B. Jones. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 81: 694.

Pinyapong, P.S. 1994. Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum&Nakai) in Northeastern Thailand. M.S. Thesis. University of the Philippines at Los Banos. 99.

Rane, K.K. and R.X. Latin 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon : association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.

Schaad, N.W., Sowell, G,Jr Goth, R.E., Colwell, R.R., and Webb,R.E.1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacterial. 28:117-125.

Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson.1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Sowell, G., Jr. and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligens* subsp. *citrulli* on watermelon seed transmission and resistance of plant interactions. Plant Dis. Rep. 63: 437-441.

Wall, G.C. 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat treatment. Phytopathology. 79: 1191.

Webb, R.E., and Goth, R.W. 1965. A seed-borne bacterium isolated from watermelon. Plant Dis. Rep. 49:818-821.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L, and Thomas, C.E. 1996. Bacterial fruit blotch in Compendium of Cucurbit Disease. The America Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota . 34-35 p.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

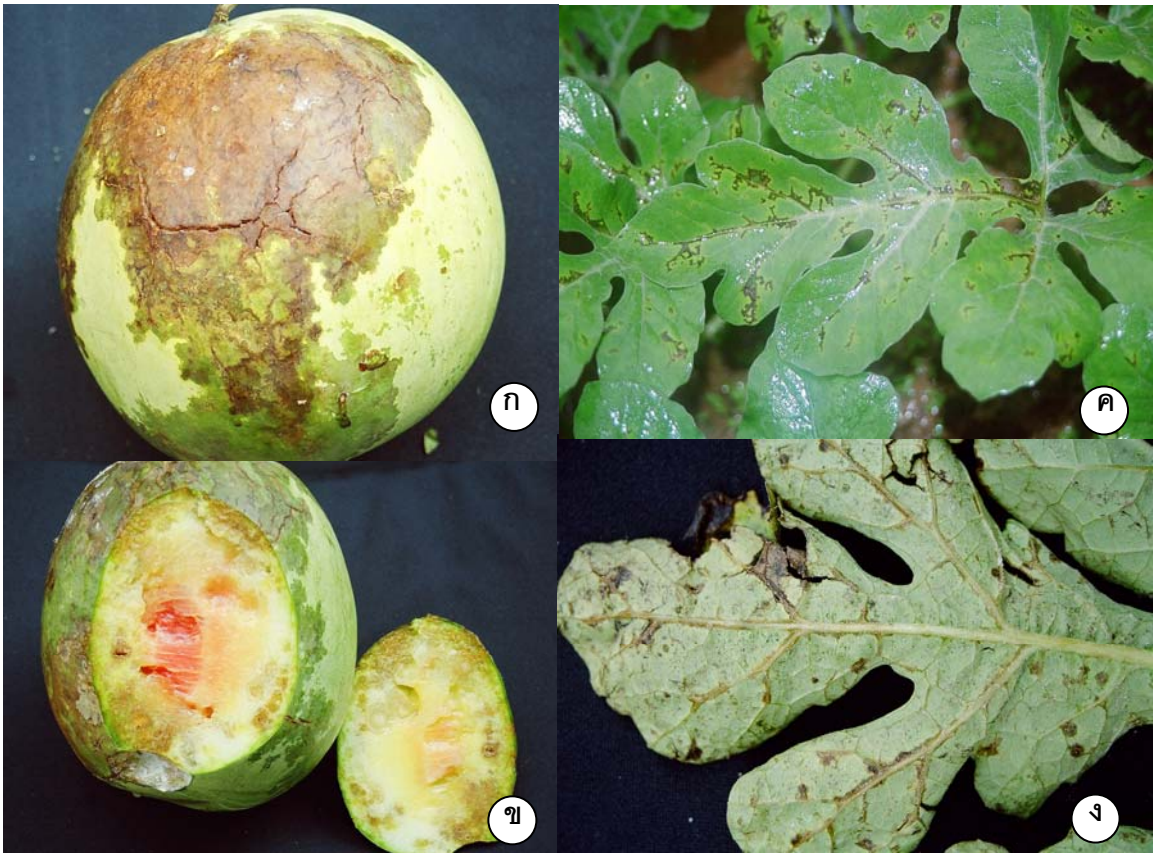
ชนิดของสารเคมี	**ความเข้มข้น**	**ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญ ของ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (เซนติเมตร)**
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 37%	0.5 เปอร์เซ็นต์	0.16
	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.22
	2.0 เปอร์เซ็นต์	0.39
สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride)	2.5 เปอร์เซ็นต์	0.78
	5.0 เปอร์เซ็นต์	1.14
	10.0 เปอร์เซ็นต์	1.09
สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate)	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.00
	5.0 เปอร์เซ็นต์	0.00
	10.0 เปอร์เซ็นต์	0.13
สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (Tsunami 100) 220 ml/H2O 2 l.	เข้มข้นน้อยกว่า ½ ของคำแนะนำ	0.33
	คำแนะนำ	0.51
	Tsu เข้มข้นมากกว่า 2 เท่าของคำแนะนำ	0.97
สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 5.25% w/w	0.5 เปอร์เซ็นต์	0.00
	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.17
	2.0 เปอร์เซ็นต์	0.31
ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	-	0.00

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม	**เปอร์เซ็นต์ความงอก**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
ปลูกเชื้อนาน 12 ชั่วโมง	98	0.00
ปลูกเชื้อนาน 24 ชั่วโมง	90	33.33
ปลูกเชื้อนาน 48 ชั่วโมง	87	68.97

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

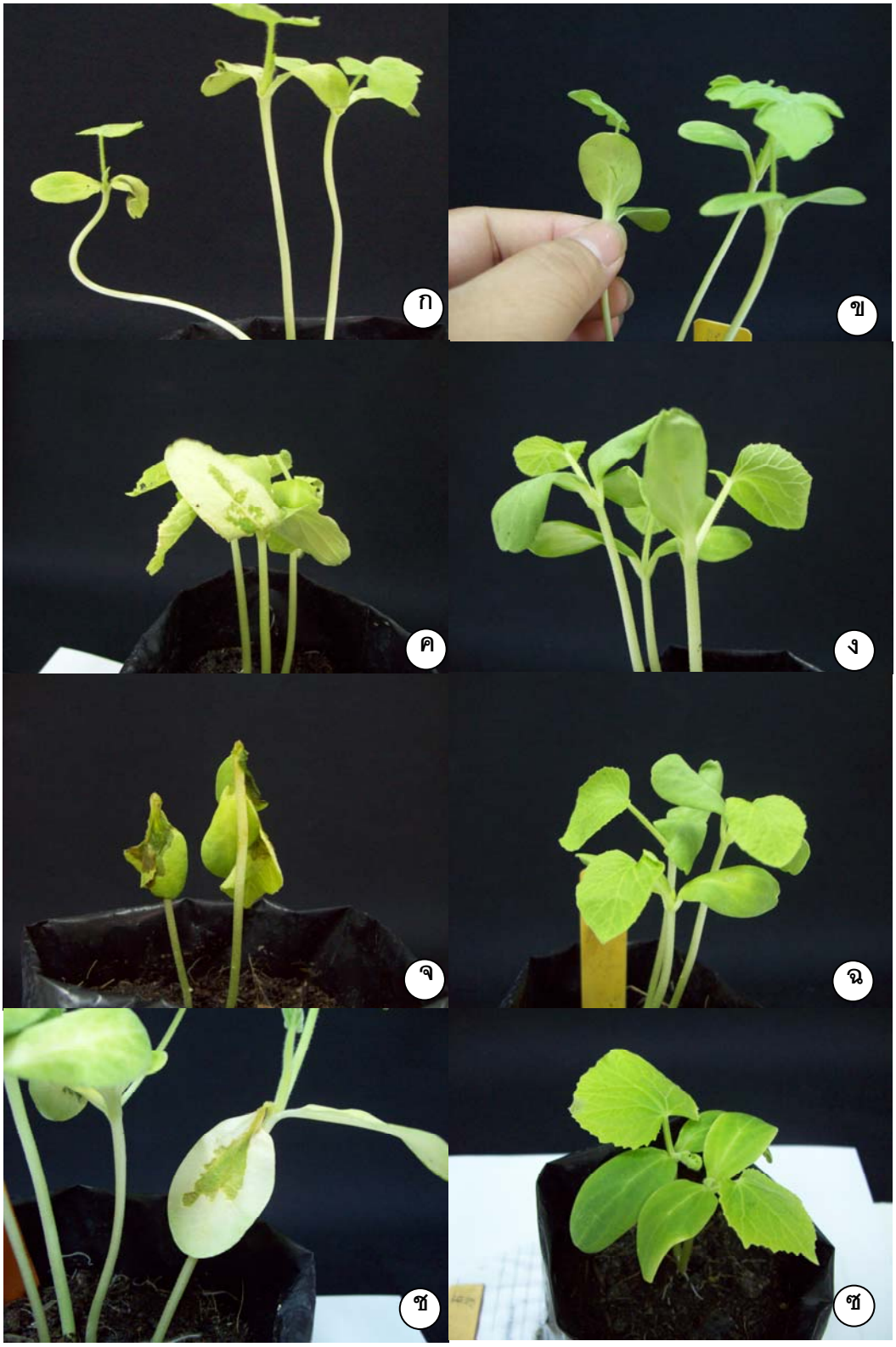
ชนิดของสารเคมี	**ความเข้มข้น**	**เปอร์เซ็นต์ความงอก**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์	2.0 เปอร์เซ็นต์	95	0
สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride)	2.5 เปอร์เซ็นต์	88	39.77
	5.0 เปอร์เซ็นต์	86	46.51
	10.0 เปอร์เซ็นต์	6	100
สารเพอร็อกซี่อะซิติกเอสิด (Tsunami 100) 220 มิลลิลิตร/น้ำ 2 ลิตร	คำแนะนำ	97	0
	เข้มข้นมากกว่า 2 เท่า ของคำแนะนำ	86	0
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว	-	83	93.98
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง	-	86	56.98
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง	-	100	0
เมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ	-	98	0



ภาพที่ 1 ลักษณะของอาการโรคผลเน่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

ก) ลักษณะอาการบริเวณเปลือกของผลแตงโม ข) เมื่อตัดดูภายในเนื้อผลมีอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาลบน

ค) ลักษณะอาการฉ่ำน้ำบริเวณเส้นบนใบของต้นแตงโม ง) ลักษณะอาการฉ่ำน้ำบริเวณเส้นใต้ใบของต้นแตงโม



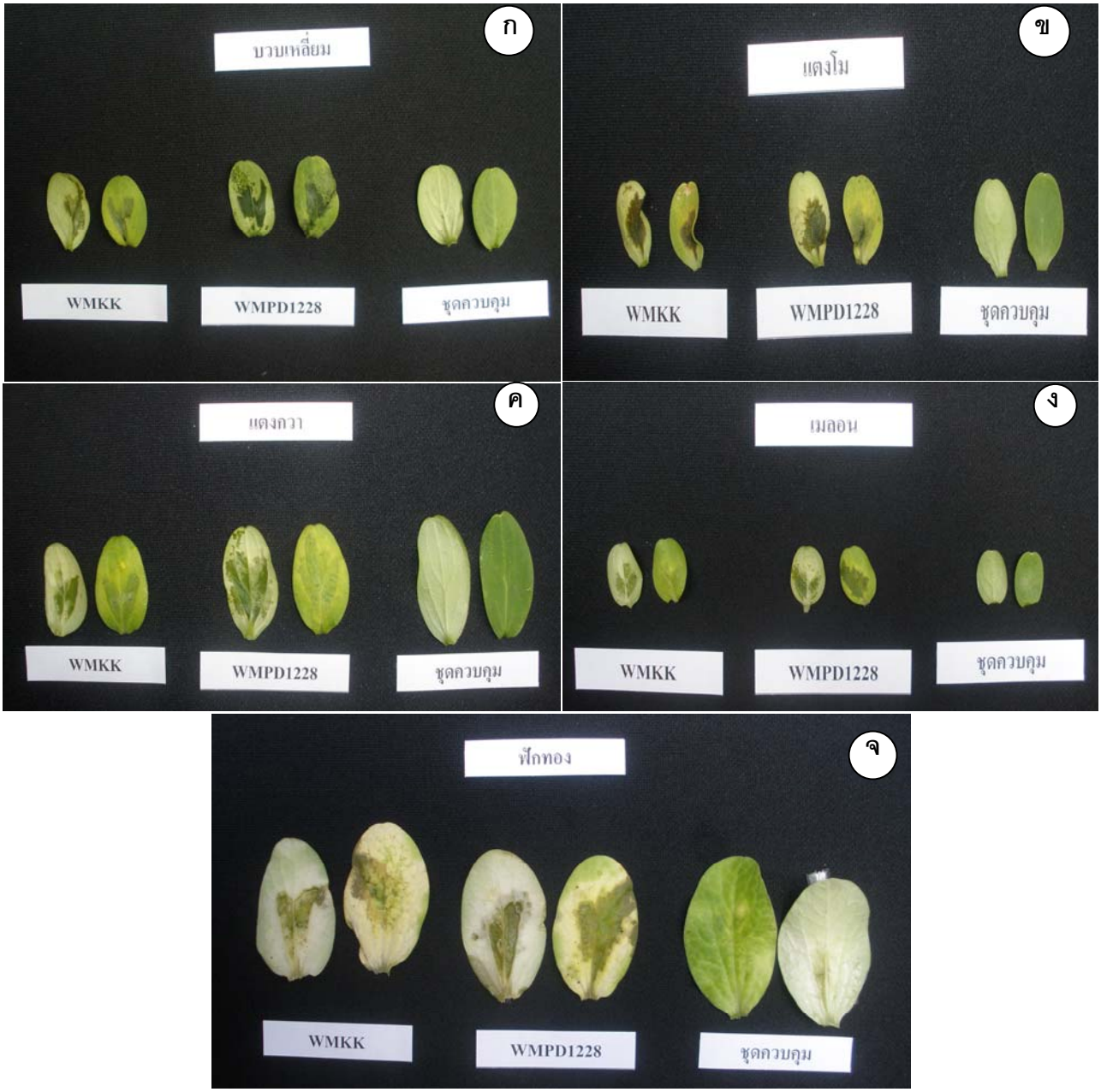
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของต้นพืชชนิดต่างๆ เมื่อทำการปลูกเชื้อทดสอบ

ก) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโมที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ข) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโมที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

ค) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวาที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ง) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวาที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

จ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอนที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ฉ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอนที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

ช) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทองที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ซ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทองที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

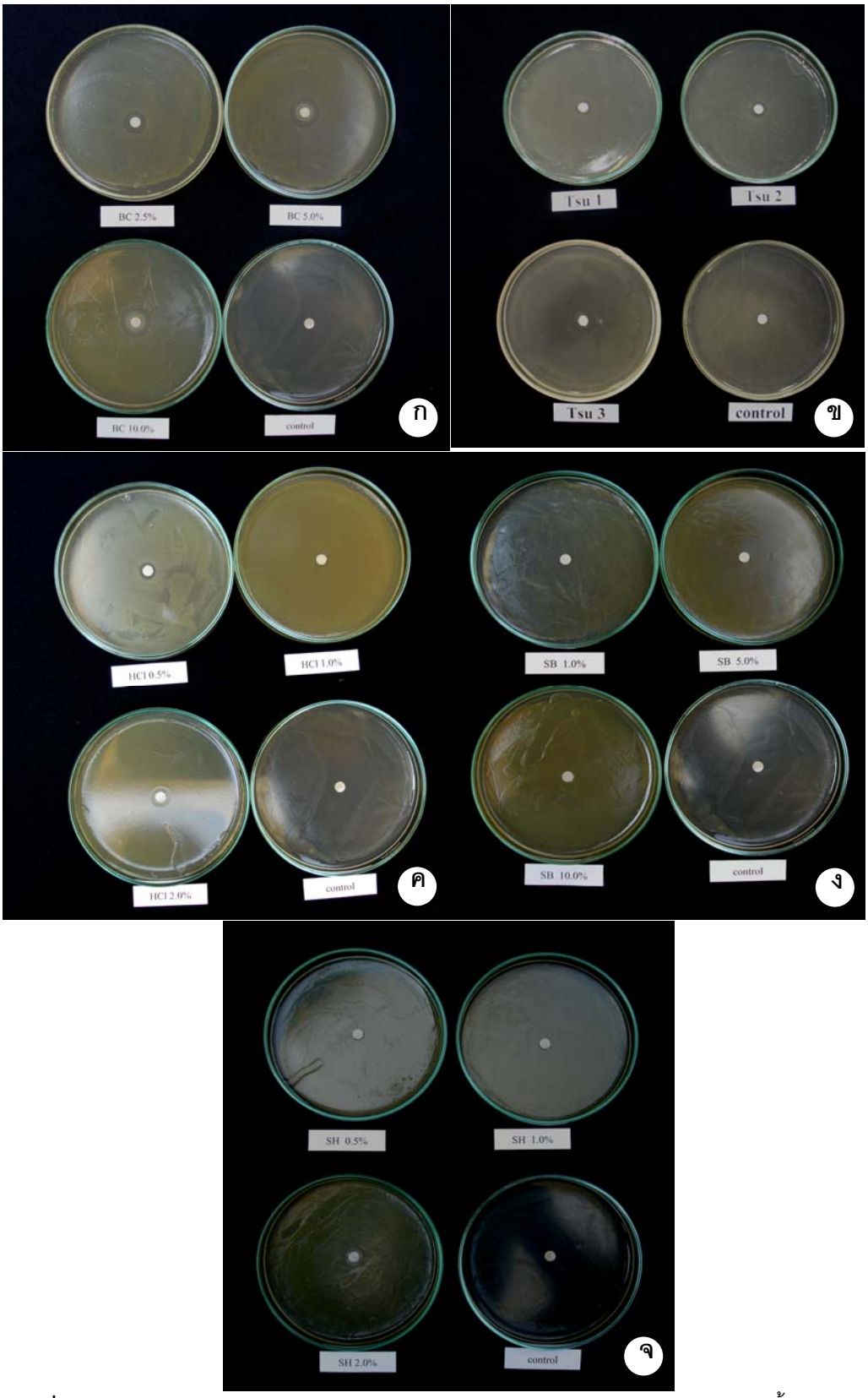


ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของใบเลี้ยงของต้นพืชทดสอบชนิดต่างๆ เมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ก) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าบวบเหลี่ยม ข) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโม

ค) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวา ง) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอน

จ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทอง



ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ก) การทดสอบสารเบนซอลโคเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ข) การทดสอบสารเพอร็อกซี่อะซิกเอสิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ค) การทดสอบกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ง) การทดสอบสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

จ) การทดสอบสารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ภาพที่ 5 ลักษณะใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโม

ก) ลักษณะใบเลี้ยงปกติ

ข) อาการเนื้อฉ่ำน้ำ เนื้อใบยุบตัวที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนต้นกล้าแตงโม