การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *Pantoea stewartii*

Surveillance and Dissemination of *Pantoea stewartii*

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล พีระวรรณ พัฒนวิภาส ณัฏฐพร อุทัยมงคล ชลธิชา รักใคร่

1/ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2/ กลุ่มวิชากักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพด (stewart's bacterial wilt disease of corn) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นส้นทาง(pathway) ของเชื้อนี้ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ ติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดเชื้อนี้อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2553 จำนวน 95 แปลง เชียงราย จำนวน 10 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 5 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 5 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 10 แปลง น่าน จำนวน 10 แปลง หนองคาย จำนวน 10 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวบนต้นกล้าของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการโรคเหี่ยวในต้นข้าวโพด จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA และและ วิธี PCR ตามวิธีของ Coplin and Majerczak ผลการตรวจสอบพบว่าตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่าง ไม่เกิดปฏิกิริยาบวกทั้งวิธี ELISA และ PCR แสดงให้เห็นว่า จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2553 จำนวน 95 แปลง ไม่พบโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii*

รหัสโครงการ..... 07-01-51-01-01-01-04-51

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นทีปลูกประมาณ 7ล้านไร่ ในปี 2547 มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 871,791 ตันต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,651 ล้านบาท(ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการสั่งนำเข้าเมล็ดข้าวโพดมีมูลค่านำเข้า เพื่อการบริโภคและเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออก โดย ในปี 2547 มีปริมาณนำเข้า 75,753 ตัน มีมูลค่าการนำเข้า 212 ล้านบาท จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นส้นทาง(pathway) ของศัตรูพืชที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่นโรคเหี่ยวของข้าวโพด (stewart's bacterial wilt of corn)ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) ในข้าวโพดทุกพันธุ์ เชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีรายงานว่ามีแมลง corn flea bettle (*Chaetocnema pulicaria*) เป็นแมลงพาหะ มีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวของข้าวโพดในประเทศอิตาลี ในปี 1950 สาเหตุจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากประเทศอเมริกา (FAO, 1983) ประเทศไทยมีรายงานการพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดตั้งแต่ปี 1967 (Bradbury, 1967) หลังจากนั้นมาไม่มีรายงานการพบโรคนี้อีก (CMI.1987)ต่อมาในปี 2547 สุดฤดีและคณะ ได้รายงานการพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา จากรายงานการตรวจพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดนี้จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ ติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดและเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ในการจัดทำวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช และใช้ในการจัดเตรียมบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

3.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA

วิธีการ

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากแหล่งผลิตที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ระหว่างปี 2550 – ปี 2551

2. ศึกษาและสำรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพดจากแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทยเพื่อการส่งออกปี 2551-2553

การสำรวจ ทำการสำรวจแปลงข้าวโพดสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์ทั้ง ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดไร่ ข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดฝักอ่อน ในช่วงข้าวโพดอายุ 30 วันจนถึง 90 วัน ตั้งแต่ช่วงเดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2553 โดยดำเนินการสำรวจโรคเหี่ยวของข้าวโพดแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลโรคเหี่ยวของข้าวโพดและเชื้อสาเหตุโรค*P. stewartii* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของประเทศ จำนวน 12 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก นครสวรรค์ ลำปาง แพร่ น่าน หนองคาย นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละส่วนทำการสุ่มสำรวจโดยวิธี completely randomized design (CRD) . จำนวน 10 จุดขนาดพื้นที่จุดละ 2x2 เมตร สุ่มตรวจ จุดละ 20 ตัวอย่าง ตรวจแบบตัวอักษร W ซ้าย ตามวิธีของ Delp *et.al*. (1986)

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแปลงปลูก จัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือ และบันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างโรคที่พบใส่ถุงหรือภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างพร้อมเขียนรายละเอียดกำกับ รีบนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผล

การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยตัดใบข้าวโพดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บด นำมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเฉพาะ Nigrosine medium หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีสีใสตรงกลางมีสีดำคล้ายตากบ ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อที่แยกได้มาตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA ตามวิธีการของบริษัท และ วิธี PCR ตามวิธีของ Coplin and Majerczak (2002) ดังนี้

การตรวจสอบโดยเทคนิค ELISA ด้วย PathoScreen® สำหรับ *Erwinia stewartii* (Agdia®, Inc., USA)

นำสารแขวนลอยเชื้อแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค ELISA ตามคำแนะนำของบริษัท โดยนำสารแขวนลอยเซลล์เคลือบลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37oC ในกล่องชื้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST (PBS ที่เติม Tween 20 0.05%) ปริมาตรเต็มหลุมจำนวน 5 ครั้ง เติม Alkaline

phosphatase enzyme conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37oC ในกล่องชื้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง เติม PNP substrate ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *E. stewartii* ด้วยวิธีการ PCR

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าวโพดมาทำปฏิกิริยาทดสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน hrpS (Coplin and Majerczak, 2002) เริ่มจากนำสารละลายตะกอน ปริมาตร 2 ul ทำปฏิกิริยาใน reaction mixture ที่ประกอบด้วยสารละลายความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้

1X PCR buffer

0.20 um dNTPs

0.25 mM MgClB2B

*0.20 uM primer HRP1d (5’ GCACTCATTCCGACCAC 3’)

*0.20 uM primer HRP3c (5’ GCGGCATACCTAACTCC 3’),

**0.20 uM primer fd2 (5’ CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG 3’)

**0.20 uM primer rp1 (5’ CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT 3’)

Taq DNA polymerase 0.3 unit

สารละลายตัวอย่าง 2 ul ในปฏิกิริยาทั้งหมด 15 ul

(* คู่ไพร์เมอร์ต่อยีน hrpS , ** คู่ไพร์เมอร์ต่อยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enteric)

การทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ตามรอบการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 120 วินาที

ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที

ขั้นที่ 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 54 °C เป็นเวลา 15 วินาที

ขั้นที่ 4 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นที่ 2 ถึง 4 อีก 24 รอบ

ขั้นที่ 5 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการทำ agarose gel electrophoresis โดยการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 0.5X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 100 Volt เป็นเวลา 40 นาที โดยต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจสอบด้วย ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยการนำเจลไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ug/ml เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำหรือ 0.5X TBE เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี

เวลาและสถานที่

ต.ค.50 – ก.ย.53 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกข้าวโพด ในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ของประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากแหล่งผลิตที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ระหว่างปี 2550 – ปี 2552

จากรายงานของ EPPO List of A2 pests regulated as quarantine pests in the EPPO region (version 2005-09) No. 54 และ Crop Protection Compendium, 2005 Edition. (CAB International, 2005.) พบว่าประเทศหรือกลุ่มประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* แบ่งตามเขตทวีปได้ดังนี้

- เขตประเทศที่อยู่ในทวีปยุโรปและเมดิเตอเรเนียน

  พบเชื้อนี้ในประเทศ ออสเตรีย (localized)

  ประเทศ กรีซ อิตาลี โปแลนด์ โรมาเนีย สาธารณรัฐรัฐเซีย พบว่าเคยมีรายงานแต่ปัจจุบันไม่พบเชื้อนี้ (absent, formerly present)

  ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ไม่พบเชื้อนี้ แต่เคยมีรายงานการพบเชื้อที่ผิดพลาด (absent, invalid record)

- เขตทวีปเอเชีย

  พบเชื้อนี้ในประเทศ อินเดีย

  ประเทศจีน มาเลเซีย ไทย และเวียดนาม พบว่าเคยมีรายงานแต่ปัจจุบันไม่พบเชื้อนี้ (absent, formerly present)

- เขตทวีปอเมริกาเหนือ

  พบเชื้อแบคทีเรียนี้ในแคนาดาในมลรัฐ Alberta และเม็กซิโก (localized) ออนตาริโอ (present) และสหรัฐอเมริกา (widespread; Alabama, Arkansas, California, Connecticut, Delaware, Florida, Georgia, Idaho, Illinois, Indiana, Iowa, Kansas, Kentucky, Louisiana, Maine, Maryland, Massachusetts, Michigan, Mississippi, Missouri, Nebraska, New Hampshire, New Jersey, New Mexico, New York, North Dakota, Ohio, Oklahoma, Pennsylvania, Rhode Island, South Carolina, South Dakota, Tennessee, Texas, Vermont, Virginia, Washington, West Virginia and Wisconsin)

  ประเทศแคนาดา Alverta และ British Columbia เคยมีรายงานการพบเชื้อแบคทีเรียนี้ แต่ปัจจุบันไม่พบเชื้อดังกล่าว (absent, formerly present)

- เขตทวีปอเมริกากลางและแคริเบียน

  พบเชื้อแบคทีเรียนี้ใน คอสตาริกา และเปอร์โตริโก (present)

- เขตทวีปอเมริกาใต้

  พบเชื้อแบคทีเรียนี้ในประเทศโบลิเวีย บราซิล กูยาน่า (present) ประเทศเปรู (localized)

  ประเทศปารากวัยไม่พบเชื้อนี้แต่เคยมีรายงานการพบเชื้อที่ผิดพลาด (Paraguay; absent, invalid record)

ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (Maize or Corn Seed) สำหรับทำพันธุ์ในปี 2550 -2552

มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (Maize or Corn Seed) สำหรับทำพันธุ์จากประเทศต่างๆ ดังนี้ ออสเตรเลีย โบลีเวีย บราซิล สหราชอาณาจักร ชิลี สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนิเซีย อินเดีย อิตาลี ญี่ปุ่นสาธารณรัฐประชาชนลาว พม่า เม็กซิโก ฟิลิปปินส์ ปากีสถาน เปอร์โตริโก สหรัฐอเมริกา เวียดนาม ซึ่งแยกเป็นประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และมูลค่าการนำเข้าพืชผลิตภัณฑ์ข้าวโพดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (Maize or Corn Seed) สำหรับทำพันธุ์ของประเทศไทยแยกตามประเทศผู้ส่งออกในปี 2550-2552 เฉพาะประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

ประเทศผู้ส่งออก	2550		2551		2552	
	ปริมาณ*	มูลค่า**	ปริมาณ*	มูลค่า**	ปริมาณ*	มูลค่า**
สหรัฐอเมริกา	2,470	1,033,111	21,361	422,033	418	153,178
เปอร์โตริโก	0	0	1		0	0
เม็กซิโก	0	0	10	5,455	21	14,596
บราซิล	35	15,308	130	59,605	88,854	15,694,951
โบลิเวีย	32	13,349	0	0	0	0
อินเดีย	563,466	25,664,499	587,347	29,596,305	2,602,510	154,525,224
รวม	**566,003**	**26,726,267**	**608,849**	**29,661,365**	**2,691,803**	**170,387,949**

* ปริมาณ (กิโลกรัม) ** มูลค่า (บาท)

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

2. ศึกษาและสำรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพดจากแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทยเพื่อการส่งออกปี 2551-2553

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2553 จำนวน 95 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 10 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 5 แปลง ตาก

จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 5 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 10 แปลง น่าน จำนวน 10 แปลง หนองคาย จำนวน 10 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวบนต้นกล้าของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการโรคเหี่ยวในต้นข้าวโพด จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* ห้องปฏิบัติการ

การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* บนอาหารเฉพาะ Nigrosine medium หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28° ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีสีใสตรงกลางมีสีดำคล้ายตากบ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 60 ไอโซเลท ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA และ วิธี PCR ตามวิธีของ Coplin and Majerczak (2002) ผลการตรวจสอบพบว่าทั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 60 ไอโซเลทไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาบวกทั้งวิธี ELISA และ PCR (ตารางที่ 2)

จากผลการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพดทั้ง 12 จังหวัด จำนวน 95 แปลง ไม่พบโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* และและยังไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* สามารถสรุปได้ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* ในประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 12 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2553 จำนวน 95 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 10 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง แม่ฮ่องสอน จำนวน 5 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 5 แปลง ลำปาง จำนวน 5 แปลง แพร่ จำนวน 10 แปลง น่าน จำนวน 10 แปลง หนองคาย จำนวน 10 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง สระบุรี จำนวน 5 แปลง และลพบุรี จำนวน 5 แปลง ไม่พบอาการของโรคเหี่ยวของข้าวโพด และยังไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii*

เอกสารอ้างอิง

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ประชุม จุฑาวรรธนะ กุลชนา เกศสุวรรณ์ และ สุพจน์ กาเซ็ม. 2547. การระบาดของโรคข้าวโพดจากแบคทีเรียชนิดใหม่ในประเทศไทยใ ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการข้าวโพดข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ม 19-21 พฤษภาคม 2547. จ.อยุธยา 249-262.

Block CC, Hill JH, McGee DC, 1998. Seed transmission of Pantoea stewartii in field and sweet corn. Plant Disease, 82(7):775-780.

Bradbury JF, 1967. Erwinia stewartii. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 123. Wallingford, UK: CAB International

Claflin LE, 1999. Stewart's bacterial wilt. In: Compendium of Corn Diseases. 3rd Edition. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 4-5.

CMI, 1987. Distribution Maps of Plant Diseases, No. 41, Edition 4. Wallingford, UK: CAB International.

Coplin DL and Majerczak DR. 2002 Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. Plant Disease 86, 304–311.

Elliot C, Poos FW, 1940. Seasonal development, insect vectors, and host range of bacterial wilt of corn. Journal of Agricultural Research, 645-686

EPPO, 2005. PQR database (version 4.4). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization

FAO, 1983. Reappearance of *Erwinia stewartii* in the Po valley. FAO Plant Protection Bulletin 31,96.

Guo YF, Liang ZQ, Lu GQ, Xie BC, 1987. Survival conditions of *Erwinia stewartii* in stored corn. Acta Phytophylactica Sinica, 14(1):39-44.

OEPP/EPPO, 1987. Data sheet on quarantine organisms No. 54, *Erwinia stewartii*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8:2.

Pepper EH, 1967. Stewart's Bacterial Wilt of Corn. Monogr. 4. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.

Robert AL, 1955. Bacterial wilt and Stewart's leaf blight of corn. USDA Farmer's Bulletin, 2092.

ภาคผนวก

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวบนต้นกล้าข้าวโพด ภาพจาก APSnet

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวบนต้นข้าวโพด ภาพจาก APSnet

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าวโพด ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA และ วิธี PCR ตามวิธีของ Coplin and Majerczak (2002)

ไอโซเลท	สถานที่	ผลปฏิกิริยา ELISA® kit	ผลปฏิกิริยา PCR
1	จ. แม่จัน เชียงราย	-	-
2	อ.ร้องกวาง จ. แพร่	-	-
3	อ.ร้องกวาง จ. แพร่	-	-
4	อ.ร้องกวาง จ. แพร่	-	-
5	อ.สูงเม่น จ.แพร่	-	-
6	จ. เชียงราย	-	-
7	จ. เชียงราย	-	-
8	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	-	-
9	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	-	-
10	จ. เชียงราย	-	-
11	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	-	-
12	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	-	-
13	จ.นครราชสีมา	-	-
14	อ.ตากฟ้า จ.นครสวรค์	-	-
15	อ.ตากฟ้า จ.นครสวรค์	-	-
16	อ.ตากฟ้า จ.นครสวรค์	-	-
17	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
18	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
19	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
20	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
21	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
22	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
23	อ.พบพระ จ.ตาก	-	-
24	อ.สันทราย จ. เชียงใหม่	-	-
25	จ.เชียงใหม่	-	-
26	อ.สันทราย จ. เชียงใหม่	-	-
27	อ.วังเหนือ จ. ลำปาง	-	-
28	อ.สังคม จ. หนองคาย	-	-
29	อ.สังคม จ. หนองคาย	-	-
30	อ.สังคม จ. หนองคาย	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	สถานที่	ผลปฏิกิริยา ELISA® kit	ผลปฏิกิริยา PCR
31	จ.หนองคาย	-	-
32	อ.สังคม จ. หนองคาย	-	-
33	อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี	-	-
34	อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี	-	-
35	อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี	-	-
36	อ.เมือง จ. ลพบุรี	-	-
37	อ.เมือง จ. ลพบุรี	-	-
38	อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี	-	-
39	อ.สันทราย จ. เชียงใหม่	-	-
40	อ.สันทราย จ. เชียงใหม่	-	-
41	อ.แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่	-	-
42	อ.แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่	-	-
43	อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่	-	-
44	อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่	-	-
45	อ. เทิง จ.เชียงราย	-	-
46	อ. เทิง จ.เชียงราย	-	-
47	อ. ป่าแดด จ.เชียงราย	-	-
48	อ. ป่าแดด จ.เชียงราย	-	-
49	อ. แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย	-	-
50	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-
51	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-
52	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-
53	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-
54	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-
55	อ. สังคม จ.หนองคาย	-	-
56	อ. สังคม จ.หนองคาย	-	-
57	อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี	-	-
58	อ. หนองม่วง จ.ลพบุรี	-	-
59	อ.โคกเจริญ จ.ลพบุรี	-	-
60	อ. โคกสำโรง จ.ลพบุรี	-	-