การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

Study on Bacterial Diseases of Orchids

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สุรีย์พร บัวอาจ รุ่งนภา คงสุวรรณ์
ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน

บทคัดย่อ

สำรวจโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรียในกล้วยไม้สกุลการค้า ในแหล่งปลูกกล้วยไม้ 18 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี อยุธยา สระบุรี นครปฐม สมุทรสาคร นครราชสีมา นครสวรรค์ กำแพงเพชร เชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี ชลบุรี ปราจีนบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือน กันยายน 2553 ศึกษาลักษณะอาการ แยกเชื้อพิสูจน์โรค เก็บเชื้อสาเหตุโรค จำนวน 200 ไอโซเลท จำแนกเชื้อสาเหตุ ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ ปลูกเชื้อทดสอบการเกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลการค้า ทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีและการใช้คาร์บอน (Biolog® test) จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยคุณสมบัติสัณฐานวิทยา ชีวเคมี การก่อให้เกิดโรค และการวิเคราะห์ลำดับเบส ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Burkholderia gladioli* (Bg.) สาเหตุโรคเน่า อาการใบเน่าสีน้ำตาลเข้มถึงดำลามจากปลายใบและปลายยอด พบเป็นปัญหาบนกล้วยไม้สกุลแวนดา สกุลช้าง (เขาแกะ) และบนม็อคคาร่า ใบเน่าช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำลามจากบริเวณปลายใบหรือปลายยอด และพบอาการแผลจุดค่อนข้างกลมสีน้ำตาล ขอบแผลช้ำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แบคทีเรียก่อให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสและหวาย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc.) สาเหตุโรคเน่าเละ พบบนกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม และหวาย อาการใบและลำต้นเน่าเละ เนื้อใบเปื่อยยุ่ย มีกลิ่นเหม็นฉุน *E. chrysanthemi* (Ech.) สาเหตุโรคเน่าเละ แพร่ระบาดทำความเสียหายมากในกล้วยไม้สกุลหวาย ฟาแลนอปซิส แวนดาสกุลช้าง ม้าวิ่ง และแคทลียา เข้าทำลายทำให้ใบเน่าช้ำเนื้อเยื่อใบเน่าเละสีเขียวหรือสีน้ำตาลอ่อน ผิวใบโป่งพอง เนื้อใบเน่าเละแยกจากผิวใบ ลำต้นเน่าช้ำ หักพับ ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุนเหมือน Ecc. แพร่ระบาดรวดเร็ว และ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรีย อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีเขียวถึงเหลืองอ่อน ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นสีน้ำตาลถึงดำ กลางแผลเนื้อเยื่อยุบตัวเป็นแอ่ง มีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ พบเกิดโรคมากบนกล้วยไม้สกุลแวนดา ช้าง แอสโคเซนดา อะแรนเธอร่า บนกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส แผลจุดค่อนข้างดำไม่กลม ส่วนใหญ่แผลยุบตัวรูปหลายลักษณะ บางแผลพบเส้นสีขาวบริเวณกลางแผลที่เป็นสีดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ นอกจากนี้พบโรคดอกเน่า อาการดอกตูมเน่าช้ำ กลีบดอกเป็นแผลไหม้ขอบแผลช้ำ

รหัสการทดลอง 01-15-49-01-01-03-03-51

ระบาดทำความเสียหายมากกับกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า ในพื้นที่ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม ทำให้เกิดอาการที่ดอก ก้านช่อดอกเป็นแผลจุดช้ำรูปกระสวย ต่อมาเป็นสีน้ำตาลยุบตัวทำให้ก้านช่อดอกหักพับ แยกเชื้อได้แบคทีเรียโคโลนี กลมสีเหลืองใส ยังไม่สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ ทั้งนี้จากการปลูกเชื้อทดสอบพบว่า *B. gladioli* ทำให้เกิดโรคดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ได้เช่นกัน แบคทีเรียนับเป็นปัญหาที่สำคัญมากขึ้นในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ สามารถแพร่ระบาดทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้สกุลการค้าตลอดทั้งปี โดยเฉพาะช่วงที่สภาพอากาศร้อนฝนตกชุก ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้ามีหลากหลายสกุล ได้แก่ สกุลหวาย แวนดา แคทลียา ม็อคคาร่า สกุลช้าง สกุลรองเท้านารี สกุลม้าวิ่ง สกุลกุหลาบ สกุลเรแนนเธอรา สกุลแอสโคเซนดา สกุลอะแรนดา และสกุลเข็ม (ดวงพร, 2547) แหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร สมุทรสงคราม นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี อยุธยา นนทบุรี ปทุมธานี ชลบุรี นครราชสีมา นครสวรรค์ เชียงใหม่ โดยมีการผลิตจำหน่ายในรูปไม้ตัดดอกและไม้กระถางทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ในแต่ละปีมีมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้มากกว่าสามพันล้านบาท

โรคพืชนับเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ สาเหตุโรคที่นับเป็นปัญหามากขึ้นในปัจจุบันคือแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดการแพร่ระบาดได้รวดเร็วและรุนแรง ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค จากการตรวจเอกสารรายงานการเกิดโรคกล้วยไม้ในประเทศไทยจากเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย โรคเน่าเละ เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp.*carotovora* อาการเริ่มแรกเป็นจุดฉ่ำน้ำ ต่อมาลุกลามเป็นแผลช้ำขนาดใหญ่ เนื้อเยื่อจะเน่ายุบตัว ใบเน่าเละ มีกลิ่นเหม็น และโรคเน่า เกิดจากแบคทีเรีย *Burkholdrira gladioli* และ *Pseudomonas cattleyae* (นิยมรัฐ, 2547) แบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* เป็นสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่า ร่วง แผลช้ำน้ำสีเขียวแก่หรือเหลือง แผลเน่าแฉะ ถ้าเป็นโรครุนแรงยอดอ่อนจะเป็นสีเขียวคล้ำ ต้นอ่อนแห้งตาย โดยรายงานเกิดโรคมากในกล้วยไม้สกุลหวายและไม่ค่อยพบในกล้วยไม้สกุลอื่น (สุเนตรา และคณะ, 2532 และ Chuenchit et al., 1983) จากปัญหาการแพร่ระบาดของโรคกล้วยไม้หลายสกุล ที่สันนิษฐานว่าเกิดจากแบคทีเรีย โดยในเดือนกรกฎาคม 2550 ได้รับตัวอย่างโรคกล้วยไม้ลูกผสมแวนดา อาการที่ใบเป็นแผลจุดกลมมีขอบสีเหลืองรอบแผลมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ บางแผลขยายลุกลามติดกัน ทำให้เกิดอาการไหม้เป็นปื้น พบเข้าทำลายทำความเสียหายมากในระยะกล้าและทุกระยะการเจริญของกล้วยไม้แวนดา ลูกผสมแวนดา และแอสโคเซนดา จากลักษณะอาการโรคสันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากขอบแผลมีลักษณะอาการขอบแผลช้ำฉ่ำ และสำรวจพบโรคเน่า ลักษณะอาการใบเน่าเป็นสีน้ำตาล ในกล้วยไม้สกุลการค้าหลาย

ชนิด ได้แก่ สกุลหวาย ฟาแลนอปซิส แวนดา ม็อคคาร่า และสกุลช้าง (เขาแกะ) ต่อมาปลายปี 2552 พบการระบาดของโรคเน่ารุนแรง ในกล้วยไม้ม็อคคาร่าลูกผสมใหม่ ปลูกที่ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม ลักษณะอาการใบเน่าช้ำเป็นสีน้ำตาลลามจากปลายใบ ปลายยอด และพบอาการแผลจุดช้ำสีน้ำตาล มีวงสีเหลืองล้อมรอบ เป็นกล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังไม่ออกดอก อายุประมาณ 3 ปี ความเสียหายจำนวนมากกว่า 5,000 ต้น

ทั้งนี้รายงานการเกิดโรคจากเอกสารต่างประเทศ Miller (1990) กล่าวถึงการเกิดโรค bacterial brown spot จากแบคทีเรีย *Pseudomonas cattleyae* ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส แคทลียา Cypripedium สกุลหวาย ออนซิเดียม และแวนดา โดยมีอาการเนื้อเยื่อนุ่ม ช้ำฉ่ำน้ำ ต่อมาเนื้อเยื่อยุบตัวเป็นแผลสีน้ำตาลถึงดำ อาการโรคดังกล่าวสามารถทำให้ต้นกล้าฟาแลนอปซิสตายได้ โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วนบนใบ และสามารถติดไปกับการกระเด็นของน้ำ และ Stovold et al. (2001) รายงานการเกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส จากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (syn. *Pseudomonas cattleyae*) Abdullah and Kadzimin (1993) จำแนกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนอปซิส ที่พบในรัฐสลันงอ ประเทศมาเลเซีย เป็น *Erwinia chrysanthemi* เช่นเดียวกับ Uchida (2006) ที่รายงานสาเหตุโรคแบคทีเรียในกล้วยไม้สกุลหวาย เกิดจาก *E. chrysanthemi* และ *P.* gladioli pv. *gladioli* และ Cating and Hong (2008) รายงานการเกิดโรคเน่าเละของกล้วยไม้สกุลแวนดาจากแบคทีเรีย *Dickeya chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) ในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา

ปัจจุบันภาวะโลกร้อนมีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Schaad, 2007) อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้แบคทีเรียเจริญรวดเร็ว เข้าทำลายพืชสร้างความเสียหายได้รวดเร็วและรุนแรง แบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้จัดอยู่ในกลุ่มทนร้อน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกล้วยไม้สกุลการ้า และสกุลอื่น ๆ ศึกษาลักษณะอาการ จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรค ติดตามการเกิดโรค ศึกษาการเข้าทำลายในกล้วยไม้ข้ามสกุล เป็นข้อมูลแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด และเพื่อเป็นแนวทางศึกษาการจัดการโรค รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับการกักกันพืชของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจโรค และเก็บตัวอย่าง

<u>การสำรวจโรค</u> วางแผนการสำรวจโรคในแหล่งปลูกกล้วยไม้สกุลการ้าที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ สกุลหวาย แวนดา แอสโคเซนดา ม็อคคาร่า แคทลียา ออนซิเดียม ช้าง และฟาแลนอปซิส ติดต่อสวนเกษตรกร สำรวจโรคและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล เก็บข้อมูลพันธุ์พืช ชื่อเกษตรกร สถานที่ปลูก และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ

การเก็บตัวอย่าง เลือกเก็บตัวอย่างโรคของกล้วยไม้แต่ละสกุล ได้แก่ อาการใบเน่า ใบและลำต้นเน่าเละ ใบจุดแผลจุดขอบแผลช้ำ แผลจุดมีวง สีเหลืองล้อมรอบ (halo) จากกล้วยไม้สกุลการค้าชนิดต่าง ๆ แยกเก็บตัวอย่างแต่ละชนิด เช่น ใบ ลำต้น หรือช่อดอก ห่อในกระดาษหนังสือพิมพ์ เขียนรหัสตัวอย่าง ใส่ลงในถุงพลาสติก บางตัวอย่างขอเก็บตัวอย่างทั้งต้นจากสวนเกษตรกร นำตัวอย่างแยกเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ตัวอย่างโรคกล้วยไม้จากข้อ 1 นำมาจำแนกตัวอย่าง ตามสกุลของกล้วยไม้ และลักษณะอาการโรค ส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค ได้แก่ ลำต้น ใบ หรือดอก ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค เลือกตัดชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการแผลใหม่ ตัดบริเวณชิ้นส่วนพืชที่มีแสดงอาการเชื่อมต่อกับส่วนพืชปกติ ขนาดชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5x 0.5 มิลลิเมตร ล้างตัวอย่างชิ้นพืชโดยแช่ล้างเนื้อเยื่อพืชในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1-2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืช วางในหยดน้ำ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ใช้ใบมีดฆ่าเชื้อหั่นชิ้นส่วนพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อ จุ่มในหยดน้ำตัวอย่าง นำมาลาก (streak) บนอาหารสังเคราะห์ Nutrient glucose agar (NGA), Wakimoto agar (PSA) หรือ Yeast-extract dextrose $CaCo_3$ agar (YDC) แยกเชื้อตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เก็บจานเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงพลาสติก บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจดูโคโลนีของเชื้อที่เจริญ เลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหารจนได้เชื้อบริสุทธิ์

เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลท 2-3 วิธี ดังนี้ เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง 1.การเก็บเชื้อลงน้ำ เขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็มละลายในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง 2. เก็บเชื้อบนอาหารเอียง NGA บ่มเชื้อ 12-24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลว เก็บในตู้ 10 องศาเซลเซียส 3. เก็บเชื้อผสมในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และจัดส่งเชื้อเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. พิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างโรคกล้วยไม้ บนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นประมาณ 0.2 O.D. ที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 2×10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

การปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้ กล้วยไม้พืชทดสอบ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา ม็อคคาร่า แคทลียา และฟาแลนอปซิส ปลูกเชื้อโดยใช้กระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน นิโปร ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาขนาด 26 Gx 1/2” ทำแผลบนใบกล้วยไม้ด้วยปลายเข็มแล้วหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการปลูกเชื้อ 4 ซ้ำ ต่อใบ หรือดอก ใช้น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดลองควบคุม เก็บต้นกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อในถุงพลาสติกที่พ่นน้ำฝอยให้ความชื้นสูง เก็บไว้ในโรงเรือนกล้วยไม้

พรางแสง บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาการเกิดโรค จากนั้นนำตัวอย่างที่แสดงอาการโรค นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธี Koch's postulation

4. จำแนกเชื้อโดยลักษณะสัณฐานวิทยา คุณสมบัติชีวเคมี และการใช้แหล่งคาร์บอน

ศึกษาลักษณะโคโลนี เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ ที่แยกได้จากอาการ โรคเน่าโรคเน่าเละ และโรคใบจุดแบคทีเรีย บนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง ใช้ลูปฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวใส่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ 9 ชนิด ได้แก่ Potato Synthetic Agar (PSA), Nutrient glucose Agar (NGA), Nutrient Agar (NA), Tween Agar (TW), PG medium, CPS medium, Sorbital Neutral Red, Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ agar และ King's medium B บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-168 ชั่วโมง (1-7 วัน) บันทึกลักษณะโคโลนี และการเจริญของเชื้อบนอาหารแต่ละชนิด

ศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีบางประการ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีปฏิกิริยา Catalase test, Oxidase test, Fermentation of glucose, tissue maceration (การสร้าง pectolytic enzyme) (De Boer and Kelman, 2001)

ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (Biolog test) เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคกล้วยไม้ โดยทดสอบแบคทีเรียที่เป็นไอโซเลทตัวแทนของเชื้อสาเหตุโรคแต่ละชนิด ใช้ลูปฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร 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 GN2 ที่ทดสอบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micrologᵀᴹ System ที่ค่าดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร วิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจำแนกชนิดของเชื้อ จากการนำค่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลเป็นบวกหรือลบมาวิเคราะห์ด้วย Simple matching หาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ด้วยวิธีทางสถิติแบบ Principal Component Analysis

5. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16s rDNA

เลี้ยงแบคทีเรีย 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) และส่งวิเคราะห์ลำดับเบส เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GeneBank และจำแนกชนิดแบคทีเรีย

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2550 สิ้นสุด กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง ศึกษาลักษณะอาการของโรค

จากการสำรวจโรคในแหล่งปลูกกล้วยไม้ 18 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี อยุธยา สระบุรี นครปฐม สมุทรสาคร นครราชสีมา นครสวรรค์ กำแพงเพชร เชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี ชลบุรี ปราจีนบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี พบการเกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลการค้า 10 ชนิด (ตารางที่ 1) การแพร่ระบาดและความรุนแรงแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดพันธุ์ สภาพแวดล้อม และการจัดการแปลงของเกษตรกร เก็บตัวอย่างลักษณะอาการโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา แอสโคเซนดา แคทลียา ฟาแลนอปซิส ช้าง ม้าวิ่ง และออนซิเดียม เก็บตัวอย่างโรคกล้วยไม้ มากกว่า 500 ตัวอย่าง นำมาจำแนกตัวอย่างตามแหล่งปลูก สกุลกล้วยไม้ ลักษณะอาการ ส่วนของพืชที่เกิดโรค นำมาแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์

จำแนกตัวอย่างลักษณะอาการที่แตกต่างกัน ได้ดังนี้

1. ใบเน่า ลักษณะอาการใบเน่าช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำ เน่าลามจากปลายใบหรือปลายยอด เนื้อใบไม่นิ่มเละหรือเปื่อยยุ่ย ขอบแผลเป็นวงหรือแถบสีเหลือง ใบที่เน่าลักษณะเนื้อใบไม่นิ่มเละหรือเปื่อยยุ่ย อาการเน่าจากยอด ไม่ทำให้เกิดอาการเน่าเข้าไส้หรือถอดยอด เหมือนโรคเน่าเข้าใส้จากราไฟทอปธอร่า เก็บตัวอย่างโรคจากกล้วยไม้สกุลแวนดา สกุลช้าง (เขาแกะ) และสกุลม็อคคาร่า บนกล้วยไม้สกุลหวายและฟาแลนอปซิส พบอาการใบเน่าช้ำสีน้ำตาล (ภาพที่ 1)

อาการโรคเน่าบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า ยังพบอาการแผลจุดเป็นวงช้ำสีเขียวอมน้ำตาลและสีน้ำตาล มีวงสีเหลืองล้อมรอบ กลางแผลยุบตัวเป็นแอ่ง แผลอาจขยายลุกลามติดกันเป็นปื้น

2. ใบและลำต้นเน่าเละ อาการใบเน่าเละเป็นสีเขียวอมเหลือง หรือเขียวช้ำอมน้ำตาล เนื้อเยื่อใบเปื่อยยุ่ย ผิวใบโป่งพองเกิดก๊าซด้านใน ใบเน่าหลุดร่วงจากต้น อาการเน่าที่ลำต้นเป็นสีเหลืองช้ำทำให้เนื้อเยื่อผิวโป่งพอง ลำต้นหักพับ พบตัวอย่างที่มีกลิ่นเหม็นฉุนและไม่เหม็นฉุน เก็บตัวอย่างจากกล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา (และแวนดาลูกผสม) ฟาแลนอปซิส ช้าง (ช้างเผือก ช้างกระ และช้างแดง) ม็อคคาร่า ออนซิเดียม และแคทลียา ลักษณะอาการบนกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ดังนี้ สกุลหวายและม็อคคาร่า อาการใบยอดเน่าช้ำสีน้ำตาลอมเหลือง เนื้อใบเปื่อยยุ่ยเละ ผิวใบโป่งพองจากก๊าซที่แบคทีเรียสร้างขึ้น อาการลามสู่ลำต้นและใบด้านล่าง ลำต้นเน่าช้ำ ใบเหลืองช้ำหลุดร่วง บางตัวอย่างมีกลิ่นเหม็นฉุน โดยตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการเน่าเละใหม่ ๆ ส่วนใหญ่ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่

2A) สกุลแวนดาและช้าง อาการบนกล้วยไม้สองสกุลคล้ายกัน คือพบมากในระยะกล้า และบนต้นกล้วยไม้อายุ 2-4 ปี ใบเน่าช้ำเป็นสีเขียวอมน้ำตาล เนื้อใบเปื่อยยุ่ยเละ บางตัวอย่างพบอาการใบพองโดยเฉพาะกล้วยไม้ช้างซึ่งใบอวบน้ำกว่าแวนดา ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 2B, 2C) สกุลฟาแลนอปซิส อาการใบเน่าช้ำเป็นสีเขียวอมน้ำตาลหรือสีเหลืองอมน้ำตาล เนื้อใบเปื่อยยุ่ย หากเป็นในต้นเล็ก ที่มีใบ 2 ใบ มักลามถึงโคนต้น ทำให้ต้นเน่าตาย ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 2D) แคทลียา พบโรคเน่าเละในกล้วยไม้ระยะกล้า ใบเน่าช้ำเป็นสีเขียวเข้มอมน้ำตาล เนื้อใบยุ่ย ใบโป่งพองเล็กน้อย อาการลุกลามจากยอดถึงโคน และทำให้ต้นตาย ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 2E) ออนซิเดียม อาการที่ลำลูกกล้วยเน่าช้ำเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง ลามไปสู่ใบทำให้ใบเน่าช้ำ หักพับ ส่วนใหญ่มีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 2F)

3. ใบจุด อาการแผลจุดกลมถึงกลมรี สีเขียวอมเหลือง หรือเหลืองอมน้ำตาล บริเวณกลางแผลยุบตัวเป็นแอ่ง ขอบแผลเป็นวงสีเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม อาการที่พบบนกล้วยไม้บางสายพันธุ์เกิดแผลค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลสีน้ำตาล ในสภาพแวดล้อมที่อากาศร้อนฝนชุก พบขอบแผลช้ำฉ่ำน้ำ โรคใบจุดแบคทีเรียพบการเข้าทำลายมากบริเวณใบอ่อน ตั้งแต่ระยะกล้า จนถึงต้นโตกำลังให้ดอก อาการแผลจุดส่วนมากเกิดกระจัดกระจายบนใบ หรืออาจเกิดบริเวณเส้นกลางใบ เนื่องจากแบคทีเรียไหลหรือกระเด็นติดไปกับน้ำ อาการแผลจุดอาจมีลักษณะแผลที่แตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 3)

อาการแผลจุดเล็กสีครีมอมเหลืองหรือแผลจุดสีเขียวอ่อน กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ขอบแผลสีเข้ม และวงนอกสุดล้อมรอบด้วยวงสีเหลืองอ่อนหรือเขียวอ่อน ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยมากพบบริเวณใบยอด หรือใบอ่อน จัดเป็นอาการในระยะเริ่มแรก อาการแผลค่อนข้างกลม กลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลเข้ม กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ล้อมรอบด้วยวงสีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตร -อาการแผลค่อนข้างกลม กลางแผลสีน้ำตาลเข้ม กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ล้อมรอบด้วยวงสีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตร โรคใบจุดแบคทีเรีย พบแพร่รบาดบนกล้วยไม้หลายสกุล ได้แก่ แวนดา แอสโคเซนดา ช้าง (ช้างเผือก ช้างแดง ช้างกระ) ฟาแลนอปซิส และกล้าอะแรนเธอร่า (พันธุ์ลูกผสมใหม่ระหว่างรีแนนเธอรากับอะแรคนิส) และแคทลียาดอกเล็ก (ภาพที่ 3) พื้นที่สำรวจโรคที่พบโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้ ได้แก่ อ.ท่าม่วง อ.ท่ามะกา อ. พนมทวน จ.กาญจนบุรี อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี อ.เมือง อ.บ้านโป่ง อ.สวนผึ้ง จ. ราชบุรี อ.หัวหิน อ.ท่ายาง จ. เพชรบุรี อ.หนองแค จ. สระบุรี อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม อ.วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา อ.เมือง จ.เชียงราย และ อ.นายายอาม จ. จันทบุรี

4. ดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ พบแพร่ระบาดบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าลูกผสมต่าง ๆ ในพื้นที่ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม อาการดอกตูมเป็นจุดช้ำ แผลฉ่ำน้ำ ต่อมาเน่าและหลุดร่วง ดอกเริ่มบานและดอกบาน มีอาการกลีบดอกเป็นแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ต่อมาทำให้กลีบดอกไหม้ และพบอาการที่ก้านช่อดอก ลักษณะเป็นแผลวงรูปกระสวยตามความยาวของก้าน ช้ำ ต่อมายุบตัวเป็นสีน้ำตาล ทำให้ก้านช่อดอกหักพับ (ภาพที่ 4 a, b)และเสียคุณภาพ ไม่สามารถจำหน่ายได้

ต้องคัดทิ้งปริมาณมาก พบมากโดยเฉพาะในฤดูร้อนและฝน ซึ่งอากาศร้อนอบอ้าว ความชื้นสูง และในแปลงที่ใช้น้ำแบบสปริงเกอร์

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

อาการใบเน่า แยกเชื้อสาเหตุโรค ได้แบคทีเรียลักษณะโคโลนีขาวขุ่น กลมนูน สร้างสารสีเขียวอมเหลืองละลายน้ำในอาหาร บนอาหาร NGA และ โคโลนีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเขียวเข้ม บนอาหาร YDC โดยลักษณะโคโลนีบนอาหาร KB โคโลนีกลมนูนใส คล้ายบนอาหาร NGA ไม่เรืองแสง

อาการใบเน่าเละ จากการเก็บตัวอย่างโรคเน่าเละกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ มากกว่า 100 ตัวอย่าง แยกเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร NGA พบการเจริญของแบคทีเรียหลังการบ่มเชื้อ 24- 36 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย จำแนกได้ 2 ลักษณะ คือโคโลนีเล็กสีขาวขุ่นค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ และโคโลนีรูปกระสวยหัวท้ายแหลม สีเขียวอ่อน ถึงเขียวเข้ม และบางไอโซเลทสีขาวอมชมพู แยกเก็บแบคทีเรียสาเหตุโรค จำนวน 48 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการเกิดโรค และจำแนกชนิดแบคทีเรีย

อาการใบจุด จากการแยกเชื้อบนอาหาร PSA แบคทีเรียเจริญหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 36-48 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เมื่อเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้เป็นเวลานานกว่า 5-7 วัน จะพบบริเวณขอบของโคโลนีมีคราบสีขาวใสขอบไม่เรียบบาง ๆ รอบโคโลนี

อาการดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ แยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NGA ได้แบคทีเรียลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน กลมนูนใส (ภาพที่ 6) บนอาหาร YDC โคโลนีกลมสีเหลือง

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง แยกเก็บเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากตัวอย่างที่มีอาการต่างกันอาการเดียวกันบนกล้วยไม้ต่างสกุล เก็บเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ทั้งสิ้น 220 ไอโซเลท

3. พิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

พิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการ Koch’s postulation

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่า ไอโซเลท 506 และ 511 ปลูกเชื้อทดสอบบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า และแวนดา หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง ใบกล้วยไม้ทั้งสองสกุล จะเริ่มมีอาการแผลจุดช้ำฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลขยายขนาดเป็นสีน้ำตาลรูปวงรีตามแนวยาวของใบ ขนาดแผลเฉลี่ย5 x 8 มิลลิเมตร ขอบแผลจะมีวงสีเหลืองล้อมรอบ ในสภาพที่ร้อนและชื้น แผลจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นและลามติดกันและทำให้ใบหลุดร่วงจากต้น แบคทีเรียไอโซเลท P 198 ปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา หลังการปลูกเชื้อ 3-5 วัน ใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการแผลช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ต่อมาแผลขยายลุกลาม (ภาพที่ 3) ทั้งนี้จากการปลูกเชื้อทดสอบบนดอกตูม กลีบดอก และก้านช่อดอกม็อคคาร่า พบอาการดอกเน่าและแผลจุดบนก้านช่อดอกได้

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ปลูกเชื้อทดสอบการก่อให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลแวนดา หวาย และฟาแลนอปซิส พบว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ จำนวน 48 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลแวนดา หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง ใบแสดงอาการเน่าช้ำเป็นวงสีเขียวเข้ม ต่อมา

3 วันอาการเน่าช้ำลุกลามทั้งใบ เนื้อใบเน่าเละแยกจากผิวใบซึ่งมีลักษณะโป่งพองเล็กน้อย แบคทีเรียบางไอโซเลทลุกลามถึงลำต้น บนกล้วยไม้สกุลหวาย อาการเน่าเป็นสีน้ำตาล หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง และลุกลามทั้งใบภายใน 48 ชั่วโมง ทำให้ใบเหลือง หลุดร่วงจากต้น บางไอโซเลทแบคทีเรียลุกลามถึงลำต้นทำให้ลำต้นเน่าช้ำเป็นสีเหลือง และบนกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส อาการใบเน่าช้ำเป็นสีเขียวอมน้ำตาล ตัวอย่างการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท P 169 ปลูกเชื้อบนกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม หลังการปลูกเชื้อ 1-2 วัน ลำต้นแสดงอาการเน่าช้ำเป็นสีน้ำตาล ต่อมาแผลขยายลุกลาม และเน่าช้ำทั้งลำต้น (ภาพที่ 3b) ไอโซเลท P 248 ปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา หลังการปลูกเชื้อ 1 วัน ใบแสดงอาการเน่าช้ำเป็นสีเขียวเข้ม ต่อมา 3 วันอาการเน่าช้ำลุกลามทั้งใบ เนื้อใบเน่าเละแยกจากผิวใบซึ่งมีลักษณะโป่งพองเล็กน้อย (ภาพที่ 3c)

แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด พบว่าหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน พืชเริ่มแสดงอาการแผลจุดเหลืองเล็กขนาด 1-2 มิลลิเมตร ต่อมาแผลเริ่มขยายขนาดขึ้น ตรงกลางแผลเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน ขอบแผลมี halo เหลืองล้อมรอบ หลังการปลูกเชื้อ นาน 10-15 วัน อาการแผลชัดเจน คล้ายอาการโรคที่เก็บจากแปลงของเกษตรกร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม กล่าวคือหากในโรงเรือนอากาศร้อนอบอ้าว ฝนตกชุก ทำให้มีความชื้นสูง และอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ อาการแผลจะขยายลุกลามได้รวดเร็วกว่าในสภาพอากาศที่แห้ง เมื่อนำตัวอย่างอาการแผลที่ปลูกเชื้อ มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ พบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบบเดียวกัน แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นเป็นสาเหตุโรคใบจุดจริง จากการปลูกแบคทีเรียไอโซเลท P 207 ปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา หลังการปลูกเชื้อ 3-5 วัน พืชเริ่มแสดงอาการแผลจุดเหลืองเล็กขนาด 1-2 มิลลิเมตร ต่อมาแผลเริ่มขยายขนาดขึ้น ตรงกลางแผลเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน ขอบแผลมี halo เหลืองล้อมรอบ อาการแผลชัดเจน คล้ายอาการโรคที่เก็บจากแปลงของเกษตรกร หลังการปลูกเชื้อ นาน 10-15 วัน (ภาพที่ 3d)

แบคทีเรียสาเหตุโรคดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ ปลูกเชื้อทดสอบบนดอกตูม กลีบดอก และก้านช่อดอก กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า พบอาการโรคที่ดอกตูมและกลีบดอกหลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง แผลจุดช้ำฉ่ำน้ำ อาการที่กลีบดอกปลูกเชื้อโดยการฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้ากลีบดอก กลีบดอกจะแสดงแผลช้ำฉ่ำน้ำบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไป ต่อมาเริ่มเกิดอาการแผลไหม้เป็นสีน้ำตาลถึงดำ เส้นกลีบดอกเป็นสีดำ (ภาพที่ 6) ทั้งนี้แบคทีเรียสาเหตุโรค ที่ปลูกเชื้อทดสอบสามารถก่อให้เกิดโรคบนกล้วยไม้ลักษณะอาการเหมือนหรือคล้ายกับตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกร โดยหลังจากการปลูกเชื้อ เมื่อพืชแสดงอาการโรค ได้นำตัวอย่างอาการแผลที่ปลูกเชื้อ มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตาม Koch's postulation ซึ่งพบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบบเดียวกับที่นำไปปลูกเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียเป็นสาเหตุโรคจริง ทั้งนี้ระยะเวลาในการเกิดโรคและความรุนแรงในการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความอ่อนแอของพันธุ์พืช โดยเฉพาะสภาพโรงเรือนที่อากาศร้อนอบอ้าว ฝนตกชุก ความชื้นสูง อาการแผลจะขยายลุกลามได้รวดเร็วกว่าในสภาพอากาศที่แห้ง และหากเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ จะเกิดโรคได้รวดเร็วและรุนแรง

4. จำแนกเชื้อโดยลักษณะสัณฐานวิทยา คุณสมบัติชีวเคมี และการใช้แหล่งคาร์บอน

นำไอโซเลทที่เป็นตัวแทนของลักษณะอาการ และลักษณะโคโลนีที่ต่างกัน สำหรับจำแนกชนิด (ตารางที่ 2) จากการศึกษาลักษณะโคโลนี จำแนกลักษณะเบื้องต้น ได้ดังนี้

1. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่า P198 บนอาหาร NGA เจริญหลังการบ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง แบคทีเรียลักษณะโคโลนีขาวขุ่น กลมนูน สร้างสารสีเขียวอมเหลืองละลายน้ำในอาหาร บนอาหาร YDC โคโลนีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเขียวเข้ม และบนอาหาร KB โคโลนีกลมนูนใส ไม่เรืองแสง (ภาพที่ 4ก)

2. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละแยกได้เชื้อสาเหตุโรค 2 ลักษณะ ดังนี้

2.1 ไอโซเลท P169 บนอาหาร NGA เจริญหลังการบ่มเชื้อ 24- 36 ชั่วโมง โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 2-3 มม. กลางโคโลนีนูน ขอบโคโลนีราบไม่เรียบ (ภาพที่ 4ข)

2.2 ไอโซเลท P 248 บนอาหาร NGA เจริญหลังการบ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง โคโลนีสีเขียวถึงเขียวขี้ม้า ส่วนใหญ่เป็นรูปกระสวย กลางโคโลนีกลมนูนเล็กน้อย ขอบโคโลนีราบไม่เรียบ (ภาพที่ 4ค)

3. แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด P206 บนอาหาร NGA เจริญหลังการบ่มเชื้อ 36-48 ชั่วโมง โคโลนีมีขนาดค่อนข้างเล็กสีขาวขุ่นถึงใส ลักษณะโคโลนีกลม ขอบโคโลนีเรียบ ตรงกลางนูนคล้ายโดม ขนาดประมาณ 1-2 มม. เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานาน 5-7 วัน พบบริเวณขอบของโคโลนีมีเมือกสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ รอบ ๆ โคโลนี บนอาหาร Yeast-extract Dextrose $CaCO_3$ แบคทีเรียมีโคโลนีสีส้มอมน้ำตาล มีคราบบางใส ขอบไม่เรียบล้อมรอบ และบนอาหาร Tween agar แบคทีเรียมีโคโลนีสีขาวขุ่น สร้างฝ้าขาวขุ่นรอบโคโลนี (ภาพที่ 4ง)

คุณสมบัติทางชีวเคมี ให้ผลการทดสอบ ดังนี้ (ตารางที่ 3)

1. แบคทีเรียสาเหตุโรคใบเน่า ไอโซเลท P198 แยกจากกล้วยไม้สกุลช้าง (เขาแกะ) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ออกซิเดสและแคตตาเลสเป็นบวก ย่อยเปปโตน สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ให้ผลบวกในการใช้คาร์บอน จำนวน 62 ชนิด จำแนกเชื้อเป็น *Burkholderia gladioli* ด้วยค่า probability 100% และ similarity 0.87 และจากผลการทดสอบจำแนกเชื้ออีก 7 ไอโซเลท ได้ผลการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ทุกไอโซเลทจำแนกได้เป็น *B. gladioli* ด้วยค่า probability และ similarity ดังนี้ P284 (100, 0.52) , P313 (94, 0.66), P321 (97, 0.81), P373 (100, 0.84), P388 (100,0.74), P403 (100,0.83), P584 (100, 1.00)

2. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ไอโซเลท P169 แยกจากกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ออกซเดสลบ แคตตาเลสบวก สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สร้างก๊าซ ไม่สร้างก๊าซ H_2S จาก ferrous sulfate ย่อยแลคโตส ให้ผลบวกในการใช้คาร์บอน จำนวน 20 ชนิด จำแนก

เชื้อเป็น *Pectobacterium carotovorum* ss *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) ด้วยค่า probability 94% และ similarity 0.73

3. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ไอโซเลท P248 แยกจากกล้วยไม้สกุลแวนดา เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ออกซิเดสลบ แคตตาเลสบวก สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สร้างก๊าซ ไม่สร้างก๊าซ H_2S จาก ferrous sulfate ย่อยเปสโตนไม่ย่อยแลคโตส ให้ผลบวกในการใช้คาร์บอน จำนวน 28 ชนิด จำแนกเชื้อเป็น *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) ด้วยค่า probability 100% และ similarity 0.63 ผลการทดสอบ P392 ใช้แหล่งคาร์บอน 21 ชนิด จำแนกเป็น *E. chrysanthemi* prob 100%, sim 0.67

4. แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด ไอโซเลท P207 แยกจากกล้วยไม้สกุลแวนดา เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ให้ผลออกซิเดส และแคตตาเลสเป็นบวก สามารถย่อยเปปโตน สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ทดสอบการใช้คาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 95 ชนิด บนอาหารทดสอบ Biolog® GN2 แบคทีเรียให้ผลบวกในการใช้คาร์บอน จำนวน 38 ชนิด จำแนกเชื้อเป็น *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยค่า probability 98% และ similarity 0.78 ผลการทดสอบ P370 ใช้แหล่งคาร์บอน 29 ชนิด จำแนกเป็น *A. avenae* subsp. *avenae* prob. 100%, sim 0.86

ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ ทั้ง 4ชนิด คือ Aacat. PA206, Bg. PA 198, Ecc. PA166 , Ech. PA 248 สามารถเจริญมีชีวิตรอดได้ หลังการเลี้ยงเชื้อไว้ เป็นเวลา 7 วัน

5. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16s rDNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank โดย NCBI Blast Nucleotide Sequence (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือกสังเคราะห์และวิเคราะห์ไอโซเลทที่เป็นตัวแทนของสาเหตุโรคแต่ละชนิด ดังนี้

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่า ไอโซเลท P284 มีค่า identity 98 เปอร์เซ็นต์ กับแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* หลาย accession no. ได้แก่ strain S10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Accession no. EF088208.1), ที่เป็นสาเหตุโรคยอดไหม้ข้าว (rice sheath blight) *B.* gladioli strain 233gr-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Accession no. DQ355168.1)

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ไอโซเลท P384 มีค่า identity 98 เปอร์เซ็นต์ กับแบคทีเรีย *Dickeya* sp. BC2878 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (*Pectobacterium chrysanthemi* strain 571 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Accession no. GQ461741.1) และ identity 97 เปอร์เซ็นต์กับแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* strain BC2877 (acc. no. FJ571651.2) PD2098 (acc. no. GU362079.1)

แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ไอโซเลท P392 มีค่า identity 98 เปอร์เซ็นต์ กับแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (acc. no. EU526397.1) และ identity 97 เปอร์เซ็นต์ กับ *E. chrysanthemi* 16S rRNA gene (strain DSM 4610) (acc. no. AJ233412.1)

แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดกล้วยไม้แวนดา ไอโซเลท P206 มีค่า identity 100 เปอร์เซ็นต์ กับแบคทีเรีย *Acidovorax cattleyae* strain ICMP2826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (acc. no. GU339087.1) และ *A. avenae* subsp. *cattleyae* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (acc. no. AF137504.1) และ *A. citrulli* AAC00-1, complete genome (acc. no. CP000512.1) และแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดกล้วยไม้แคทลียา ไอโซเลท P377 ให้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับไอโซเลท P206

วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* เป็นสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลแวนดา ม็อคคาร่า และพบประปรายในสกุลช้าง (เขาแกะ) ซึ่งเคยมีรายงานความเสียหายในสกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่า ร่วง แผลช้ำน้ำสีเขียวแก่หรือเหลือง แผลเน่าแฉะ ถ้าเป็นโรครุนแรงยอดอ่อนจะเป็นสีเขียวคล้ำ ต้นอ่อนแห้งตาย โดยรายงานเกิดโรคมากในกล้วยไม้สกุลหวาย และไม่ค่อยพบในกล้วยไม้สกุลอื่น (สุเนตรา และคณะ, 2532 และ Chuenchit et al., 1983)ทั้งนี้เช่นเดียวกับรายงานในมลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา พบปัญหาโรคเน่าในกล้วยไม้สกุลการ้า ได้แก่ สกุลหวาย ออนซิเดียม มิลโทเนีย และลูกผสม จำแนกเชื้อเป็นแบคทีเรีย *B. gladioli* ซึ่งพบความต้านทานของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน และสารประกอบคอปเปอร์ (Keith et al., 2005) โรคเน่านับเป็นปัญหาที่ควรต้องเฝ้าระวังชนิดหนึ่งในกลุ่มของกล้วยไม้แวนดา และม็อคคาร่าลูกผสมใหม่ ๆ ทั้งนี้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายที่ช่อดอกได้ ดังเช่นในการศึกษาสาเหตุโรคดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ ในเบื้องต้นสันนิษฐานว่าเกิดจาก *B. gladioli* เนื่องจากสวนกล้วยไม้ที่ได้รับความเสียหายที่ช่อดอก เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคเน่าในกล้วยไม้ม็อคคาร่าลูกผสมใหม่ จากการปลูกเชื้อพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้อาการคล้ายกัน แต่จากการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังจำแนกเชื้อไม่ได้เป็นสาเหตุหลัก

โรคเน่าเละในกล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา ฟาแลนอปซิส แคทลียา ช้าง และออนซิเดียม จำแนกได้แบคทีเรียสกุล *Erwinia* 2 ชนิด ซึ่งจำแนกเบื้องต้นได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ NGA โดยแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* โคโลนีขาวขุ่น ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ และ*E. chrysanthemi* โคโลนีรูปกระสวย หัวท้ายแหลม ขอบไม่เรียบ สีเขียวอ่อนถึงเขียวเข้ม และบางโคโลนีสีชมพูอ่อน บนอาหาร NGM ที่พัฒนาขึ้นโดย Lee and Yu (2006) แบคทีเรีย *E. chrysanthemi* สร้างเม็ดสีน้ำเงินอมม่วง และบนอาหาร PDA โคโลนีรูปร่างคล้ายไข่ดาว ตรงกลางนูนเล็กน้อย ขอบไม่เรียบ (OEPP/EPPO, 1982) เช่นเดียวกับรายงานของ พัฒนาอาหาร

NGM ชนิดแรกคือ *E. carotovora* subsp. *carotovora* พบบนกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานโรคเน่าเละบนกล้วยไม้ แพร่ระบาดมานานกว่า 25 ปี ในกล้วยไม้ลูกผสม แวนดา เข็ม แคทลียา หวาย ฟาแลนอปซิส ม็อคคาร่า และออนซิเดียม (นิยมรัฐ, 2544; ทัศนาพรและสุรภี, 2548) แต่จากการจำแนกสาเหตุโรค 38 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละชนิดใหม่ คือ *E. chrysanthemi* ทำให้เกิดอาการเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา ฟาแลนอปซิส แคทลียา ช้าง และออนซิเดียม โดยแบคทีเรียสกุล *Erwinia* จะสร้างเอ็นไซม์เพคโตไลติก (pectolytic enzyme) ย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชทำให้เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย (De Boer and Kelman, 2001) และผิวใบโป่งพองเกิดจากการสร้างก๊าซระหว่างที่แบคทีเรียเข้าทำลายให้พืชเน่าเละ ซึ่งพบอาการใบพองมากในว่านหางจระเข้ (Mandal and Satyabrata, 2005) เช่นเดียวกับรายงานสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ในต่างประเทศ Abdullah and Kadzimin (1993) จำแนกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนอปซิส ที่พบในรัฐสลันงอ ประเทศมาเลเซีย เป็น *E. chrysanthemi* เช่นเดียวกับ Uchida (2006) ที่รายงานสาเหตุโรคแบคทีเรียในกล้วยไม้สกุลหวาย เกิดจาก *E. chrysanthemi* และ *P.* gladioli pv. *gladioli* และ Cating and Hong (2008) รายงานการเกิดโรคเน่าเละของกล้วยไม้สกุลแวนดาจากแบคทีเรีย *Dickeya chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) ในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคลำต้นเน่าข้าวโพด จากแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* (พรภิมล จันทร์อ่อน และคณะ, 2550) ทั้งนี้แบคทีเรีย *E. chrysanthemi* จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน A2 list No. 53 ของ Europion Plant Protection Organization (OEPP/EPPO, 1982) ซึ่งมีพืชอาศัยมากกว่า 50 ชนิด รวมถึงกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส และไม้ดอกไม้ประดับอีกหลายชนิด จัดเป็นแบคทีเรียทนร้อน ที่สามารถเจริญและเข้าทำลายพืชที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในสภาวะโลกร้อน ที่มีผลทำให้อุณหภูมิเฉลี่ยสูงขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญได้รวดเร็ว และเข้าทำลายพืชได้มากขึ้น จำเป็นต้องมีการวิจัยเพื่อการป้องกัน และการจัดการโรคในอนาคต

โรคใบจุดแบคทีเรีย แสดงอาการบนกล้วยไม้สกุลต่างๆ ข้อสังเกตพบว่าอาการแผลจุดมีลักษณะที่คล้ายกัน แต่ลักษณะของสีของบริเวณแผลอาจแตกต่างกัน เนื่องจากการตอบสนอง (Defense mechanism) ของสายพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสม ซึ่งมีการผสมข้ามกับกล้วยไม้ต่างสกุลกันหลายสายพันธุ์ ทั้งนี้สภาพอุณหภูมิและความชื้นอาจเป็นปัจจัยรองในการพัฒนาอาการ และขนาดของแผล เมื่อเปรียบเทียบอาการกับรายงานของ Miller (1990) พบมีลักษณะที่ต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากเป็นการรายงานอาการบนกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส ซึ่งพบแผลที่มีรูปร่างการทำลายไม่แน่นอน กลางแผลมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำ ทั้งนี้ไม่มีการกลาวถึงขอบแผล halo เหลือง แต่มีลักษณะที่เหมือนกันคือ แผลมีลักษณะเป็นแอ่ง ตรงกลางยุบตัว โรคใบจุดแบคทีเรียพบการเข้าทำลายมากในกล้วยไม้สกุลแวนดา ระยะกล้า ที่เลี้ยงจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้องเยื่อ ทำให้เกษตรกรต้องคัดต้นเป็นโรคออกทิ้งจำนวนมาก เสียรายได้ และยังพบปัญหาการเข้าทำลายต้นกล้วยไม้ระยะเจริญออกดอก ทำให้เสียคุณภาพ นอกจากนั้นบนกล้วยไม้สกุลช้าง ซึ่งมีใบที่อวบน้ำ พบการแพร่ระบาดของโรค

ค่อนข้างมาก ทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้ในระยะที่กำลังเจริญออกดอก โดยเกษตรกรบางรายยังขาดความรู้ และเข้าใจว่าเป็นโรคที่เกิดจากรา ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเวลาในการจัดการที่ไม่สามารถควบคุมโรคได้

โรคดอกเน่า กลีบดอกไหม้ เป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกสกุลม็อคคาร่า เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักทำให้ช่อดอกตกเกรด จนถึงจำหน่ายไม่ได้ และหากมีเชื้อสาเหตุโรคติดไปกับการส่งออกทำให้ดอกเน่าที่ประเทศปลายทาง อาจเป็นผลเสียที่ทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียรายได้มหาศาล จำเป็นต้องเร่งศึกษาสาเหตุ จำแนกชนิดแบคทีเรีย และหาวิธีการในการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพโดยเร็ว จากการสืบค้นเอกสาร ไม่พบการรายงานโรคดังกล่าว

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจโรคในแหล่งปลูกกล้วยไม้ 18 จังหวัด พบโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย 4 โรค เก็บรวมรวมแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ 220 ไอโซเลท จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบส จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ 4 ชนิด และจำแนกยังไม่ได้ 1 ชนิด ดังนี้

1. โรคเน่า ลักษณะอาการเน่าช้ำเป็นสีน้ำตาลถึงดำเข้ม ส่วนใหญ่พบอาการจากขอบใบเน่าเข้ามาถึงกลางลำต้น จำแนกเชื้อเป็น *Burkholderia gladioli* พบอาการโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ม็อคคาร่า แวนดา และสกุลช้าง (เขาแกะ)

2. โรคเน่าเละ จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ 2 ชนิด คือ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* พบเข้าทำลาย กล้วยไม้ออนซิเดียม ลักษณะอาการเน่าเละบริเวณลำต้นเป็นสีน้ำตาล เนื้อเยื่อเละ อาการลามไปที่ใบเน่าช้ำ ตัวอย่างเน่าเละมีกลิ่นเหม็นฉุน และแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* พบเข้าทำลายกล้วยไม้สกุลแวนดา หวาย ฟาแลนอปซิส แคทลียา และสกุลช้าง ใบช้ำเป็นสีน้ำตาลอมเหลืองหรือสีเขียมอมน้ำตาล เนื้อใบเปื่อยยุ่ยเละแยกจากผิวใบ ส่วนใหญ่พบอาการผิวใบพองจากก๊าซที่แบคทีเรียสร้างขึ้น จากการจำแนกสาเหตุโรค 48 ไอโซเลท จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ 44 ตัวอย่าง เป็น *Erwinia chrysanthemi* และ 4 ไอโซเลทเป็น *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* เป็นสาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ชนิดใหม่ที่แพร่ระบาดมากในประเทศไทย ที่ต้องเฝ้าระวัง และให้ความรู้กับเกษตรกร เพื่อสามารถป้องกันกำจัดได้ทันเวลา

3. โรคใบจุดแบคทีเรีย หรือโรคใบจุดเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนดา มีลักษณะอาการแผลจุดเหลืองถึงน้ำตาล เป็นแอ่งตรงกลาง มี halo สีเหลืองล้อมรอบ เกษตรกรเรียกโรคตากบ จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็น *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Yeast-extract Dextrose $CaCO_3$ แบคทีเรียมีโคโลนีสีส้มอมน้ำตาล มีคราบบางใส ขอบไม่เรียบล้อมรอบ และบนอาหาร Tween agar แบคทีเรียมีโคโลนีสีขาวขุ่น สร้างฝ้ารอบโคโลนี ซึ่งอาหารทั้งสองชนิดเหมาะสำหรับการแยกเชื้อจากตัวอย่างกล้วยไม้ พบการเกิดโรคในแหล่งปลูกกล้วยไม้สกุลแวนดา และลูกผสม สกุลแอสโคเซนดา (Ascocenda) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะ

แรนเธอร่า (ลูกผสมอะแรคนิสและรีแนนเธอร่า) และสกุลช้าง (Rhynchostylis) โรคใบจุดแบคทีเรียสร้างความเสียหายมากในกล้วยไม้สกุลแวนดาและช้าง ซึ่งเป็นกล้วยไม้กระถางที่มีราคาสูง ควรต้องเผยแพร่ความรู้ และหาวิธีป้องกันกำจัดเพื่อลดความเสียหาย

4. โรคดอกเน่าและกลีบดอกไหม้ พบแพร่ระบาดเป็นปัญหาในการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกสกุลม็อคคาร่า แยกได้แบคทีเรีย และพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคได้ แต่ยังจำแนกชนิดแบคทีเรียไม่ได้ ควรต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อการจำแนกเชื้อ และหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับเกษตรกรต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เผยแพร่ข้อมูลลักษณะอาการโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยการอธิบายต่อเกษตรกรโดยตรง ตีพิมพ์ผลงานวิจัย นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุม มากกว่า 10 เรื่อง

2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำงานวิจัย เรื่องการควบคุมโรคใบจุดโดยชีววิธี การตรวจจำแนกเชื้อโรคใบจุดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีควบคุมโรคเน่ากล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เป็นงานเพื่อแก้ปัญหาให้กับเกษตรสวนกล้วยไม้ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม

เอกสารอ้างอิง

ทัศนาพร ทัศคร และสุรภี กีรติยะอังกูร. โรคกล้วยไม้ หน้า 3-31. *ใน* โรคไม้ดอก. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร. 50 หน้า

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2551. เตือนภัย! โรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้. วารสารข่าว No. สมาคมผู้ประกอบการสวนกล้วยไม้ไทย ร่วมกับศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดสมุทรสาคร (พืชสวน).

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาสาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้สกุลแวนดา. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 วันที่ 17-20 มีนาคม 2552.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2552. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้. (เสนอผลงานวิจัย-บรรยาย) ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เทิดไท้องค์ภูมี ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” วันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2552. โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ จ.อุบลราชธานี

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สุรีย์พร บัวอาจ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และ ศรีสุข พูนผลกุล, 2553. โรคเน่า

กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าและการควบคุมโรค. การประชุมวิชาการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา พืช. 15-17 มิถุนายน 2553. โรงแรมเฟลิกซ์ อ.เมือง จ.กาญจนบุรี

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2553. โรคของช้าง..ราชินีกล้วยไม้ฤดูหนาว. วารสารข่าว No.12 ฉบับที่ 12 ประจำเดือน มิถุนายน-ตุลาคม 2553. หน้า 14-18 สมาคมผู้ประกอบการสวยกล้วยไม้ไทย ร่วมกับศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดสุมทรสาคร (พืชสวน).

Anonymous. 2007. Orchid (Orchidaceae) Plant Health Problems. http://www.ct.gov/case/cwp/view.asp?a=2823&q=377850 searched date: 24-08-2550

Chuenchitt, S., Dhirabhava, W., Karnjanarat, S., Buangsuwon, D., and Uematsu, T. 1983. A new bacterial disease on orchids Dendrobium sp. Caused by 1984. *Pseudomonas gladioli*. Kasetsart J. 17: 26-36.

Keith, L. M. Sewake, K.T. and Zee. F.T. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. Plant Dis. 89: 1273-1278.

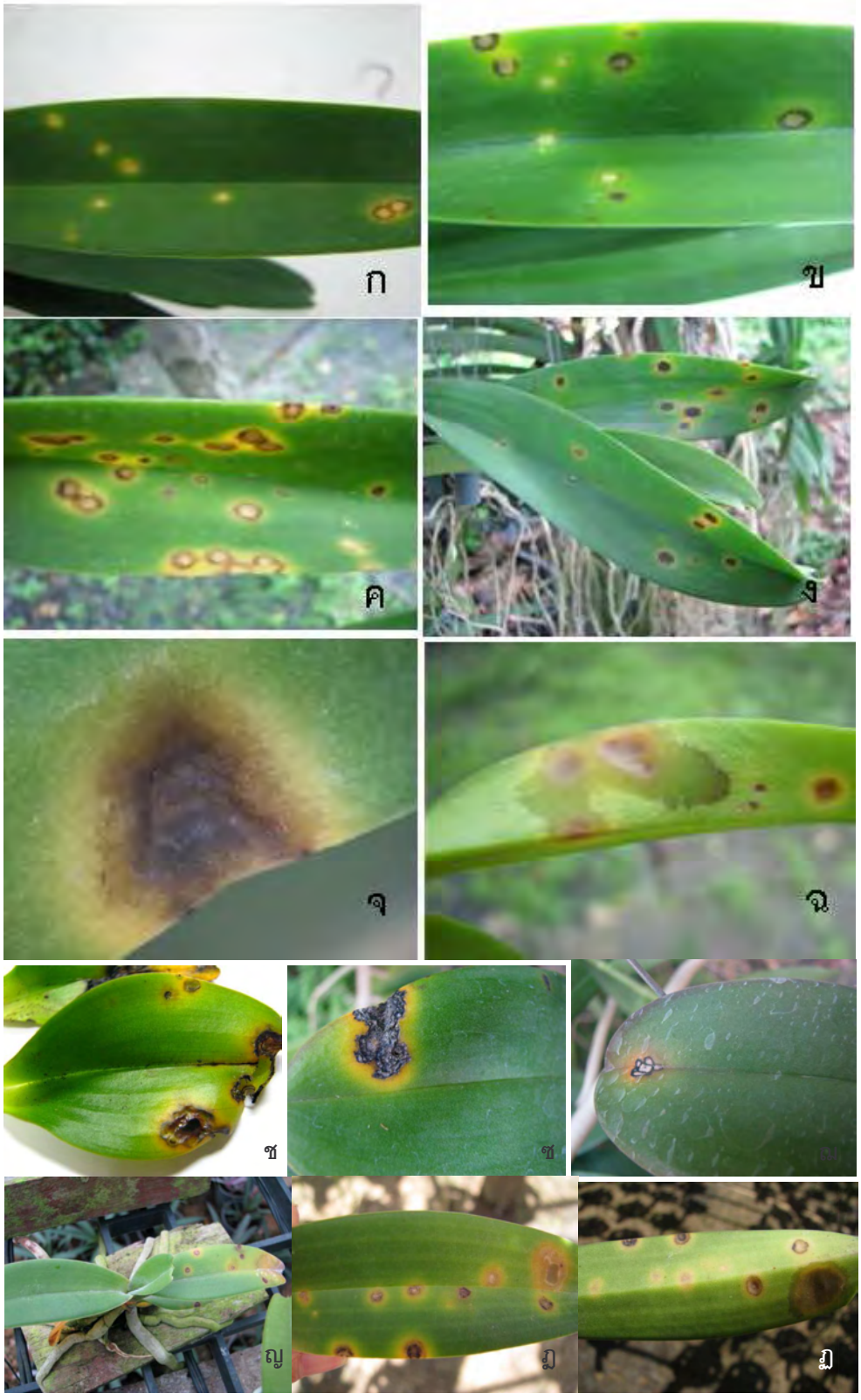
Miller, J. W. 1990. Bacterial Brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. Plant Pathology Circular no. 330.

Divinagracia, G.G., Candole., B.L., Cadapan, E.T. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) Saverlesco. Summary in Philippine Phytopathology V20(1-2) p. 3-4. http://www.fao.org/agris/search/display.do;jsessionid-OAFA16C68D30999F6D009CO searched 24-08-2550

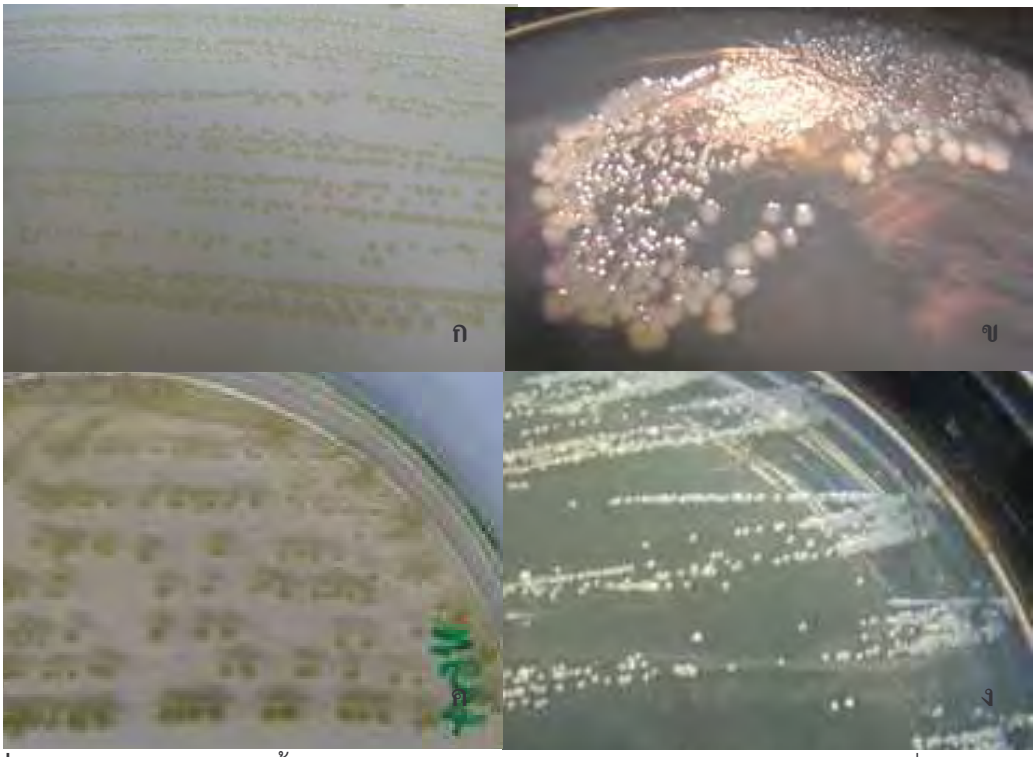
Thammakijjawat P., Kositcharoenkul N., Pumhirun J. 2010. Occurrence of bacterial brown spot of orchids caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino 1911) Willems *et al*. 1992 in Thailand. ICPPB proceeding, ICPPBconference 7-11 June 2010, St. Denis, Reunion, France (Abstract)

ภาพที่ 1 โรคเน่าจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* บนกล้วยไม้สกุลแวนดา (ภาพบน) อาการโรคเน่ากล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เน่าลามจากปลายใบ เน่าจากปลายยอด แผลจุดช้ำ (หน้าใบ) และ แผลจุดช้ำ (หลังใบ) (ภาพล่าง)

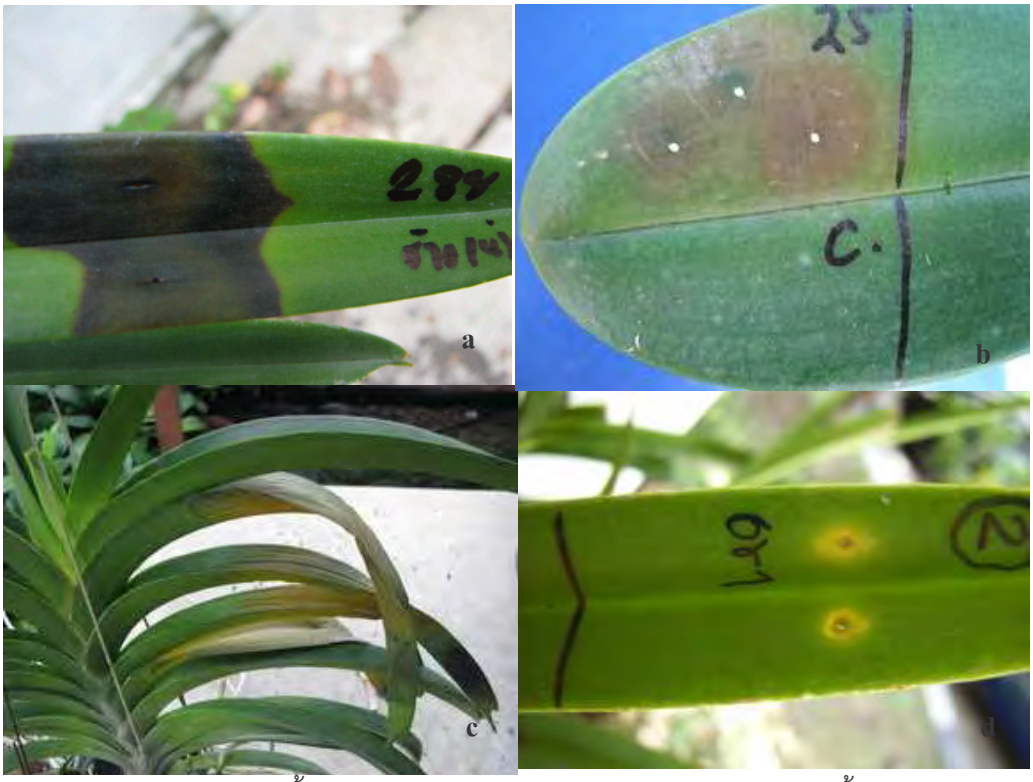
ภาพที่ 2 แสดงอาการโรคเน่าเละ จากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* บนกล้วยไม้สกุลการค้าต่าง ๆ ได้แก่ สกุลหวาย สกุลแวนดา สกุลช้าง สกุลฟาแลนอปซิส และสกุลออนซิเดียม



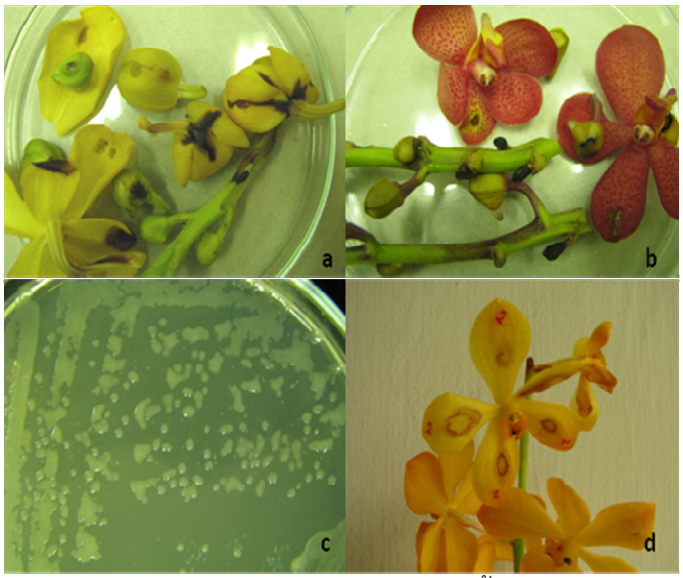
ภาพที่ 3 โรคใบจุดแบคทีเรีย จากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* บนกล้วยไม้สกุลการค้าต่าง ๆ ได้แก่ สกุลแวนดา (ก-ฉ) สกุลฟาแลนอปซิส (ช-ฌ) และสกุลช้าง (ญ-ฏ)



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ บนอาหาร NGA อายุ 48 ชั่วโมง ก *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่า ข *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละ ค *Erwinia chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละ ง *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุด



ภาพที่ 5 อาการโรคจากการปลูกเชื้อไอโซเลทต่าง ๆ a, อาการแผลเน่าจากการปลูกเชื้อ *B. gladioli* b, อาการเน่าเละ จากการปลูกเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* c, อาการเน่าเละจากการปลูกเชื้อ *E. chrysanthemi* d, อาการแผลจุดจากการปลูกเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*



ภาพที่ 6 อาการดอกเน่า กลีบดอกไหม้ ก้านช่อดอกเป็นแผลช้ำ บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า (a,b) c, ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร NGA และ d กลีบดอกเน่าช้ำจากการปลูกเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจโรคแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุลการค้า ระหว่าง ปี 2550-2553

สกุลกล้วยไม้\ โรค	โรคใบจุด (Aacat.)	โรคเน่า (Bg.)	โรคเน่าเละ (Ecc.)	โรคเน่าเละ (Ech.)
1. หวาย	-	+	-	+++
2. แวนดา	+++	++	-	++
3. แอสโคเซนดา	++	++	-	++
4. ม็อคคาร่า	-	++	-	+
5. แคทลียา	+	-	-	+
6. ออนซิเดียม	-	-	+	+
7. ช้าง	+++	-	-	+
8. ม้าวิ่ง	+	-	-	+
9. อะแรนเธอร่า	+	-	-	-
10. ฟาแลนอปซิส	++	+	-	++

หมายเหตุ; +++ พบโรคมาก, + พบโรคน้อย และ – ไม่พบการเกิดโรค

ตารางที่ 2 แสดงพืชอาศัย แหล่งปลูก และไอโซเลทเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำแนกชนิด

ไอโซเลท	พืชอาศัย (สกุลกล้วยไม้)	แหล่งปลูก	อาการ
P198	ช้าง เขาแกะ	อ. สามพราน จ.นครปฐม	ปลายใบเน่าสีน้ำตาลเข้ม
P284	แวนดา	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	ปลายใบเน่าสีน้ำตาลเข้ม
P506	ม็อคคาร่า (ดอกเหลือง)	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	ยอดเน่าสีน้ำตาล
P511	ม็อคคาร่า (ดอกส้ม)	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	ยอดเน่าสีน้ำตาล
P584	ม็อคคาร่า	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	ปลายใบเน่าสีน้ำตาลเข้ม
P166	ออนซิเดียม	เขตบางเขน กทม.	ต้นเน่าเละ มีกลิ่นเหม็นฉุน
P169	ออนซิเดียม	เขตบางเขน กทม.	ต้นเน่าเละ มีกลิ่นเหม็นฉุน
P384	หวาย	อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	ใบเน่าช้ำ ใบพอง
P392	แวนดา	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	ใบเน่าช้ำ ใบพอง
P206	แวนดา	อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	ใบจุดสีน้ำตาลมี halo
P370	แวนดา	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ใบจุดสีน้ำตาลมี halo
P377	แคทลียา	อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	ใบจุดสีดำมี halo
MR1	ม็อคคาร่า	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	ดอกเน่า
MR8	ม็อคคาร่า	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	ดอกเน่า

ตารางที่ 3 ผลทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ ด้วย Biolog® system

แหล่งคาร์บอน	**สายพันธุ์แบคทีเรีย**			
	P 207	**P 198**	**P 169**	**P 248**
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	-	-	+	+
β-methy-D-glucoside	-	-	+	+
D-psicose	-	-	+	+
D-raffinose	-	-	+	+
L-rhamnose	-	-	+	-
D-sorbitol	+	+	-	-
Sucrose	-	-	+	+
D-trehalose	-	+	-	-
Turanose	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-
Pyruvic-acid-methyl ester	+	+	+	+
Succinic acid monoethyl ester	+	+	-	-
Acetic acid	+	+	-	+
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	+	+	-	-
β-hydroxybutyric acid	+	+	-	-
ɣ-hydroxybutyric acid	-	-	-	-
P-hydroxy-phynyl acetic acid	-	-	-	-
Itaconic acid	-	-	-	-
∞-Keto Butyric acid	-	+	-	-
∞-Keto glutaric acid	+	+	-	-
∞-Keto valeric acid	+	+	-	-
D,L-lactic acid	+	+	-	-
Malonic acid	-	+	-	-
Propionic acid	+	+	-	-
Quinic acid	+	+	-	-
D-saccharic acid	-	+	-	-
Sebacic acid	+	+	-	-
Succinic acid	+	+	-	+
Bromosuccinic acid	+	+	+	+
Succinamic acid	+	-	-	-
Glucuronamide	-	-	-	-
L-alanimamide	-	-	-	-
D-alanine	+	+	-	-
L-alanine	+	+	-	-
L-alanyl glycine	-	+	-	-
L-asparagine	+	+	+	+
L-aspartic acid	+	+	+	+
L-glutamic acid	+	+	-	-
Glycyl-L-aspartic acid	-	-	-	-
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	+	+	-	-
D-L-carnitine	-	+	-	-
ɣ-amino-butyric acid	+	+	-	-
Urocanic acid	-	+	-	-
Inosine	-	-	-	-
Uridine	-	-	-	-
Thymidine	-	-	-	-
Phenyethyl-amine	-	+	-	-
Putrescine	-	-	-	-
2-aminocethanol	+	+	-	-
2-3-butanediol	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+
D-L-∞-glycerol-phosphate	-	+	-	+
∞-D-glucose-1-phosphate	-	-	-	+
D-glucose-6-phosphate	-	+	-	+

หมายเหตุ: +, สามารถใช้คาร์บอนได้ ; -, ไม่สามารถใช้คาร์บอนได้

Identification results : P207, *A. avenae* subsp. *cattleyae* ; P198, *Burkholderia gladioli*, P 169 *Erwinia carotovoral* subsp. *Carotovora* ; P 248 *E. chrysanthemi*