การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม กระเทียม เพื่อการส่งออก

Surveillance and Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Onion and Garlic Plantation for Exportation

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รุ่งนภา ทองเคริง
พรพิมล อธิปัญญาคม
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสำรวจแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ดำเนินการโดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหอม กระเทียม หรือในพืชหัว (bulb) แต่พบรายงานการเกิดโรคไหม้ของกระเทียม (blight of leek) และโรคไหม้ของหอมแดง (bacterial blight of shallot) ที่เกิดจากเชื้อ *P. syringae* pv. *porri* ในต่างประเทศ สำหรับประเทศไทย พบรายงานโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในหอมและกระเทียม ได้แก่ โรคใบแห้ง (bacterial leaf blight หรือ Xanthomonas blight) ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* และโรคเน่าเละ (soft rot หรือ bacterial soft rot) ที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* เท่านั้น หาแหล่งปลูกหอมและกระเทียมพร้อมทั้งวางแผนการสำรวจโรค ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2556 ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และราชบุรี จำนวน 98 ตัวอย่าง นำมาตรวจในห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงบน King's medium B ได้จำนวน 42 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย 3% KOH และคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถใช้สาร Arginine ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อ fluorescent Pseudomonas ที่ส่วนใหญ่เป็น saprophyte ไม่ใช่คุณสมบัติของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ที่ไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ ยืนยันผลการตรวจโดยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer B1 และ B2 หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *Syringae*

รหัสโครงการ 03-04-54-03-06-00-08-54

คำนำ

ในปี 2552 ประเทศอินโดนีเซียได้ออกกฎระเบียบ The Regulation of the Minister of Agriculture No. 18/permentan/OT. 140/2/2008 (Plant Quarantine Requirements and Measures Toward the Importation of Fresh Plant Products in the Form of Fresh Bulb Vegetables into the Territory of Republic of Indonesia) เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2551 มีผลบังคับใช้ตั้งแต่เดือนเมษายน 2551 โดยมีข้อกำหนดในการนำเข้าสินค้าพืชสดประเภทพืชหัวกลุ่ม bulb ต้องผ่านการตรวจรับรองและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช ประเทศไทยส่งออกหัวหอมไปยังประเทศอินโดนีเซีย มูลค่าประมาณ 300 ล้านบาท เมื่อกฎระเบียบมีผลบังคับใช้ทำให้เกิดปัญหากับการส่งออกหัวหอม เนื่องจากประเทศไทยมีเชื้อศัตรูพืชที่เป็นศัตรูกักกันพืชของอินโดนีเซีย ได้แก่ ราเขม่าดำสาเหตุเกิดจาก *Urocystis cepulae* และแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ทำให้การส่งออกหอมแดงและกระเทียมไปประเทศอินโดนีเซียต้องมีใบรับรองปลอดจากโรคทั้งสองชนิดกำกับไปด้วย จากการสืบค้นข้อมูลบัญชีรายชื่อโรคพืชที่พบในประเทศไทย พบว่าไม่มีรายงานการพบแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียมในประเทศไทย แต่มีรายงานของ พัฒนาและคณะ (2537) พบแบคทีเรีย *P. syringae* ในพริกไทย เมื่อสืบค้นข้อมูลต่างประเทศ พบว่า CABI (2007) ได้รายงานว่า ในประเทศไทยพบแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพืชหลายชนิดได้แก่ มะเขือเทศ พริก พริกไทย ส้มโอ หอมกระเทียม เป็นต้น จากข้อมูลที่สืบค้นดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกันทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ในปัจจุบันของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียมส่งออก ติดตามสถานการณ์ของโรคนี้ว่ามีในประเทศไทยหรือไม่ ซึ่งเป็นการศึกษาการเฝ้าระวังและการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกพืชทั้งสองชนิด เพื่อที่จะรายงานและตีพิมพ์ผลงานเพื่อเป็นการปลดโรคชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกหอมและกระเทียมในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler)

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วย PCR

วิธีการ

แบบการวิจัย การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคของพืชหัว (bulb) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันที่สำรวจ ตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์ (พิกัด GPS) เป็นต้น

3. การสำรวจ โดยกำหนดพื้นที่แหล่งปลูกหอมและกระเทียมในเขตภาคเหนือ (เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศรีสะเกษ ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และสุรินทร์) และภาคกลาง (อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์) วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว ทำการสุ่มตรวจทุกเดือนในระหว่างฤดูปลูก

4. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

5.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มหัวหอมและกระทียมที่มีลักษณะนิ่มคล้ายจะเน่ามาแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* โดยตัดส่วนของพืชระหว่างรอย ต่อของบริเวณที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 4 ตร.มม. แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และ streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร King's medium B บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างสารเรืองแสงภายใต้แสง UV คัดเฉพาะโคโลนีที่สร้างสารเรืองแสง (fluorescent pigment) และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลายๆ ครั้ง เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใน 15% กลีเซอรอล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษา

5.2 การทดสอบด้วยสารละลายด่างและคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อมากวนในสารละลายด่าง 3% KOH สังเกตที่ปลายลูป หากมีสารเหนียวติดปลายลูปเมื่อยกลูปขึ้น แสดงว่าปฏิกิริยาเป็นบวกเชื้อจะมีการติดสีแบบแกรมลบ หากไม่มีสารเหนียวเกิดขึ้นเชื้อจะมีการติดสีแบบแกรมบวก

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้มาเลี้ยงใน Thornley's medium แล้วปิดทับด้วย paraffin oil ถ้าเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ โดยอาหารจะไม่เปลี่ยนสีจากชมพูเป็นสีแดง

5.3 ยืนยันผลด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แตะเชื้อ 1 ลูป

ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primer B1 (5'-CTT TCC GTG GTC TTG ATG AGG-3') และ B2 (5'-TCG ATT TTG CCG TGA TGA GTC-3') หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X TopTaq master mix (Qiagen, USA), 0.5 µM ไพรเมอร์ B1 และไพรเมอร์ B2, ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม และน้ำ นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที ดีเอ็นเอจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing temperature) ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบน 1.5% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gel Pilot 100 bp plus ladder (Qiagen, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้ Gel Documentation UV transilluminator พร้อมทำการบันทึกภาพ

6. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค. 53 – ก.ย. 56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกหอมและกระเทียมของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคของพืชหัว (bulb) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อแบคทีเรีย และลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ที่พบในหอมและกระเทียม เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจ มีรายละเอียดของเชื้อดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Pseudomonadales
Family	Pseudomonadaceae

เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต รูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.7-1.2 x 1.5 ไมครอน เคลื่อนที่ได้ มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว สามารถสร้างสารเรืองแสงได้บนอาหาร King's medium B ไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ และไม่สร้างเอนไซม์ oxidase (Holt *et al*., 1994, Schaad *et al*., 2001)

จากการสืบค้นข้อมูลในพืชหัว (corm) พบโรคแกลดิโอลัส สแคป (Gladiolus scab) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *P. syringae* อาการเริ่มแรกเป็นจุดกลมสีเหลืองซีด ช้ำน้ำ จากนั้นแผลจะยุบตัวลงและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ขอบแผลนูนขึ้นคล้ายอาการแผลสะเก็ด และมีสารเหนียวสีอำพันไหลออกจากแผล แบคทีเรียสามารถอยู่ข้ามฤดูได้บนหัว (corm) เมื่อนำหัวที่มีเชื้อไปปลูกพบอาการจุดขนาดเล็กสีแดงบนใบ จากนั้นขยายเป็นแผลยุบตัวสีเข้ม หากขยายเป็นบริเวณกว้างทำให้เกิดอาการเน่าเละที่ส่วนของคอหรือโคนต้น (Cornell University, 2001) ไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหอม กระเทียม หรือในพืชหัว (bulb) แต่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อ *P. syringae* pv. *porri* ได้แก่ โรคไหม้ของกระเทียม (blight of leek) อาการของโรคบนใบเป็นจุดสีเหลืองช้ำน้ำที่ปลายใบ แผลขยายไปตามความยาวของใบเป็นแถบยาวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง ใบบิด และเหี่ยวในที่สุด บนก้านดอกมีอาการช้ำน้ำสีเขียวเข้ม (Samson *et al*., 1998; Koike *et al*., 1999) และโรคไหม้ของหอมแดง (bacterial blight of shallot) อาการบนใบไหม้เป็นสีเหลืองหรือน้ำตาล หากอาการรุนแรงใบจะแห้งเหี่ยวและตายในแปลงปลูก (Myung *et al*., 2012)

สำหรับในประเทศไทย โรคที่เกิดจากแบคทีเรียในหอมและกระเทียมมีรายงานล่าสุดเฉพาะโรคใบแห้ง (bacterial leaf blight หรือ Xanthomonas blight) ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* อาการของโรคเริ่มแรกเป็นจุดขนาดเล็กสีเขียวซีดบนใบหอมหรือกระเทียม ช้ำน้ำในตอนเช้าพอสายแผลแห้งกลายเป็นรูปรีแหลมหัวท้ายขยายใหญ่ไปตามความยาวของใบ เนื้อเยื่อตรงกลางแผลบางโปร่งใสขอบแผลช้ำน้ำ บางครั้งตรงกลางแผลจะแตกเป็นทางยาวหากอาการรุนแรงแผลขนาดใหญ่ทำให้ใบหักพับได้ ต่อมาใบเหี่ยวมีสีเขียวอมเทาเหมือนถูกน้ำร้อนลวก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีครีมหรือสีขาวในที่สุด เชื้อสามารถเข้าทำลายในทุกระยะการเจริญเติบโต พบระบาดตลอดปี แต่ทำความเสียหายรุนแรงในฤดูฝนและช่วงที่มีน้ำค้างลงจัดในฤดูหนาว และโรคเน่าเละ (soft rot หรือ bacterial soft rot) ที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* อาการเริ่มแรกเกิดเป็นจุดช้ำน้ำเล็กๆ จากนั้นเชื้อเจริญเติบโตขยายเข้าไปในไส้กลางต้น หัวหอมจะมีอาการนิ่มภายในเมื่อผ่าดูจะเห็นเนื้อเยื่อตรงกลางหัวเน่า มีกลิ่นเหม็น ใบหอมซีดสีขาวครีม หักพับลงทั้งต้นและฟุบติดดิน การเกิดโรคในแปลงปลูกมักเกิดในระยะที่พืชลงหัวโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยวแล้ว ระบาดทำความเสียหายรุนแรงในฤดูฝนเพราะเป็นช่วงที่มีความชื้นและอุณหภูมิสูง (นิตยา, 2545)

2. การจัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ทำการบันทึกรายละเอียดชื่อที่อยู่ของเกษตรกร ที่ตั้งของแปลง วันที่สำรวจ และตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์ (พิกัด GPS)

3. การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด โดยกำหนดพื้นที่แหล่งปลูกหอมหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียมในเขตภาคเหนือ (เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศรีสะเกษ ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และสุรินทร์) และภาคกลาง (อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์) วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียมให้ครอบคลุมในพื้นที่กำหนด ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2556 ในพื้นที่ดังต่อไปนี้

อำเภอบ้านโฮ่ง อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน

อำเภอไชยปราการ อำเภอฝาง อำเภอแม่แตง อำเภอแม่อาย อำเภอแม่วาง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย

อำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง

อำเภอสบเมย อำเภอแม่สะเรียง อำเภอแม่ลาน้อย อำเภอขุนยวม อำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน

อำเภอเมือง อำเภอหนองหงส์ อำเภอชำนิ จังหวัดบุรีรัมย์

อำเภอวังหิน อำเภอยางชุมน้อย อำเภอราษีไศล อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ

อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์

อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและซื้อผลผลิตหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียมที่สุ่มได้ในแต่ละแปลงจำนวน 20 กิโลกรัม เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ทั้งในส่วนของใบและหัวที่แสดงอาการของโรคที่มีลักษณะคล้ายเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในหอม กระเทียม ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าและใบไหม้หรือใบช้ำน้ำหากมีความชื้นเพียงพอ และไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียมให้อ้างอิง

4. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในแปลง เนื่องจากไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียมทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคที่มีลักษณะคล้ายเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลงตามแบบฟอร์ม บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ เก็บตัวอย่างหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ที่หัวมีลักษณะนิ่มคล้ายจะเน่า (รูปที่ 1) หรือใบมีอาการเป็นแผลช้ำน้ำ ได้ตัวอย่างจำนวน 98 ตัวอย่าง นำมาตรวจในห้อง ปฏิบัติการเพื่อแยกหาเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ผลการแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว และสร้างสารเรืองแสงได้บน King's medium B (รูปที่ 2) จำนวน 42 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย 3% KOH และคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถใช้สาร Arginine ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อ fluorescent Pseudomonas ที่ส่วนใหญ่เป็น saprophyte ไม่ใช่คุณสมบัติของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ที่ไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ (Holt *et al*., 1994) ทำการสกัดดี

เอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเพื่อนำมายืนยันผลการตรวจโดยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer B1 และ B2 หากเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 752 bp (Sorensen *et al*., 1998) ผลการตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 752 bp ในแบคทีเรียทุกไอโซเลท (รูปที่ 3) แบคทีเรียทั้งหมดจึงไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* และจากการตรวจตัวอย่างหัวหอมแดงที่สุ่มจากหอมแดงส่งออกไปยังอินโดนีเซียที่นำส่งโดยด่านตรวจพืชลาดกระบัง กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี เพื่อออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช (Phytosanitary Certificate; PC) ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2552– กุมภาพันธ์ 2556 ผลการตรวจไม่พบเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* และยังไม่มีรายงานการแจ้งเตือนจากประเทศอินโดนีเซียว่าพบเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหัวหอมแดงส่งออกเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสืบค้นข้อมูลไม่มีรายงานการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหอมและกระเทียมทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ แต่พบรายงานการเกิดโรคไหม้ของกระเทียม (blight of leek) และโรคไหม้ของหอมแดง (bacterial blight of shallot) ที่เกิดจากเชื้อ *P. syringae* pv. *porri* ในต่างประเทศ

ผลการตรวจตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงได้บน King's medium B จำนวน 42 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย 3% KOH และคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถใช้สาร Arginine ได้ ซึ่งไม่ใช่คุณสมบัติของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ที่ไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ ยืนยันผลการตรวจโดยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จากตัวอย่างหัวหอมแดงที่ส่งออกไปยังอินโดนีเซีย และยังไม่มีรายงานการแจ้งเตือนจากประเทศอินโดนีเซียว่าพบเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในหัวหอมแดงส่งออกเช่นเดียวกัน จากข้อมูลนี้สามารถใช้สนับสนุนการออกประกาศการปลอดศัตรูพืช โดย NPPO เพื่อเป็นการปลดเชื้อโรคพืชชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคพืชในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกหอมและกระเทียมในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นักวิชาการจากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตบุรีรัมย์ กรมวิชาการเกษตร รวมทั้งเกษตรอำเภอยางชุมน้อย เกษตรอำเภอวังหิน เกษตรอำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ เกษตรอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ เกษตรอำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน เกษตรอำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน กรมส่งเสริมการเกษตร ที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการติดต่อเกษตรกรเพื่อเข้าสำรวจโรคในแปลงปลูก

เอกสารอ้างอิง

นิตยา กันหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กองโรคพืชและจุลชีววิทยาปี 2545. 33 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International.

Cornell University. 2001. Gladiolus Scab. (Online). Available : http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/gladiolusscab.pdf (27 Nov, 2013).

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 376 p.

Koike, S.T., J.D. Barak, D.M. Henderson and R.L. Gilbertson. 1999. Bacterial blight of leek: A new disease in California caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis*. 83:165-170.

Myung, I.-S, Y.-K. Lee and H.S. Shim. 2012. Bacterial Blight of Shallot, Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, a New Disease in Korea. *Plant Pathol. J.* 28: 454.

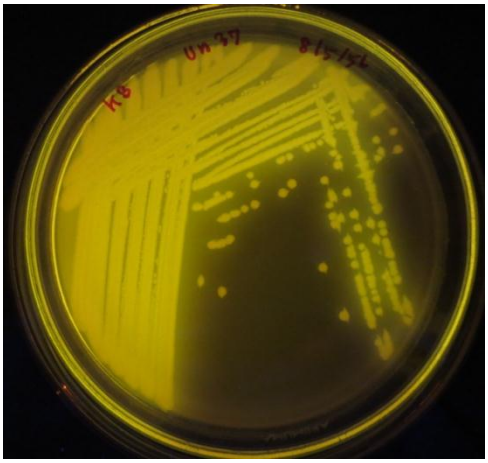
Samson, R., H. Shafik, A. Benjama and L. Gardan. 1998. Description of the bacterium causing blight of leek as *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (pv. nov.). *Phytopathol.* 88: 844-850.

Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnessota, USA. 373 p.

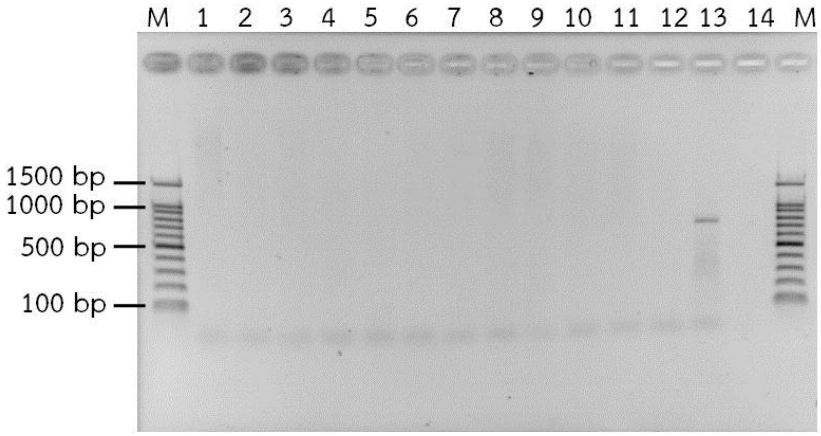
Sorensen, K.N., K.H. Kim and J.K. Takemoto. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol*. 64: 663-666.

ภาคผนวก

รูปที่ 1 ตัวอย่างหอมและกระเทียมที่มีลักษณะนิ่มคล้ายจะเน่า นำมาแยกและตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae*



รูปที่ 2 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้บนอาหาร King's medium B มาทดสอบด้วยสารละลายด่างและคุณสมบัติทางชีวเคมี Arginine dihydrolase test



รูปที่ 3 ยืนยันผลด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ specific primer B1 และ B2 ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 752 bp ของเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ในทุกตัวอย่างที่ตรวจโดย M คือ Gel Pilot 100 bp plus ladder lane 1-12 คือ แบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงได้ lane 13 คือ Positive control และ lane 14 คือ dH_2O (negative control)