การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว

Development Methods for Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the Causal Agent of Anthurium Blight

พนิดา แก้วมณี

Panida Kaewmanee

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2547

เลขหมู่ SB413.A64 N36 2547 ฉ. 1

Bib Key 242640

13 ก.ค. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว

ผู้เขียน นางสาวพนิดา แก้วมณี

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ และการผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบไหม้ของหน้าวัวทางภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างเดือนธันวาคม 2544 - สิงหาคม 2545 จำนวน 90 ตัวอย่างแยกได้เชื้อแบคทีเรียจาก 54 ตัวอย่าง ได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 120 สายพันธุ์ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical โดยการฉีดพ่นที่ใบพบว่าทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคได้ จากการจำแนกชนิดของเชื้อพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ คือ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad) (McCulloch and Pirone) Vauterin *et al.*, 1995

Semi-selective media for Xad (SXE) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเพื่อใช้ตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ซึ่งพัฒนามาจากอาหาร SX (semi-selective media for *Xanthomonas*) โดยใช้ esculin เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแป้ง ลักษณะโคโลนีบนอาหารนี้ กลม ผิวหน้านูน ขอบเรียบ ใส ตรงกลางโคโลนีมีสีม่วง สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังจากบ่มเลี้ยงไว้ 3 วัน ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อในอาหารชนิดนี้ การตรวจแยกเชื้อ Xad จากใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อบนใบหน้าวัวได้ต่ำสุดที่ 10^3 cfu/มิลลิลิตร เมื่อนำมาตรวจแยกเชื้อ Xad จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ใบหน้าวัวและใบบอนสีที่แสดงอาการโรคใบไหม้ วัสดุปลูก และน้ำจากแปลงปลูก พบว่าสามารถตรวจแยกเชื้อ Xad ได้

การผลิตแอนติซีรัมจากกระต่ายที่ฉีดด้วยชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อ Xad ซึ่งได้จากการปั่นแยกชิ้นส่วนด้วยคลื่นเสียง (sonicated cell) แอนติซีรัมที่ได้มีระดับไตเตอร์สูงถึง 1:2560 เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงโดยการทำปฏิกิริยา agglutination กับเชื้อแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ พบว่า เชื้อ *Erwinia* sp. 1 สายพันธุ์ *Bacillus* sp. 2 สายพันธุ์ *Pantoea* sp. 2 สายพันธุ์ และ *Escherichia coli* 1 สายพันธุ์ ไม่เกิดปฏิกิริยา เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* 3 สายพันธุ์ เชื้อ *Ralstonia solanacearum* 5 สายพันธุ์ *X. axonopodis* pv. *citri* 3 สายพันธุ์ และ *X. oryzae* pv. *oryzae* 2 สายพันธุ์ พบว่าเกิดปฏิกิริยาที่ระดับไตเตอร์ 1:40, 1:80, 1:80 และ 1:80 ตามลำดับ

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining (IF) โดยทดสอบกับเชื้อ Xad และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ พบว่าเชื้อ Xad ทุกสายพันธุ์เกิดการเรืองแสงมากทั้งหมด ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ มีการเรืองแสงน้อยหรือไม่มีการเรืองแสงเลย เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจหาเชื้อ Xad บนใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ Xad ด้วยวิธี IF สามารถตรวจหาเชื้อ Xad ในปริมาณเชื้อต่ำสุด 10^3 cfu/มิลลิลิตร

Thesis Title	Development Methods for Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the Causal Agent of Anthurium Blight
Author	Miss Panida Kaewmanee
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2003

Abstract

The objective of this study was to develop a semi-selective medium and an anti-serum for the diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the causal agent of anthurium leaf blight disease.

Surveys and collections of bacterial anthurium leaf blight in southern Thailand were conducted during December 2001 – August 2002. A total of 90 samples were collected and 120 bacterial strains from 54 infected samples were isolated. A pathogenicity test on Tropical anthrium cultivars was performed by means of leaf spraying. It was found that each of the isolates could cause bacterial blight. Studies on the morphological, physiological and biochemical characteristics of these isolates were carried out, and all tested isolates were identified as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad) (McCulloch and Pirone) Vauterin *et al.*, 1995.

A semi-selective media for Xad (SXE) was developed from SX (semi-selective media for *Xanthomonas*), using esculin as a carbohydrate source. The Xad colony found on the SXE was convex and circular in shape with a entire margin and purple in center. The color of this medium around the colonies was brownish, which was the dominant feature of the bacterium on this developed medium. A test to determine the minimal dose of Xad which can be diagnosed from anthurium leaves was conducted by spraying different concentration of bacterial suspension. It was found that the lowest concentration at which Xad was recoverable from the anthurium leaves was 10^3 cfu/ml. Using SXE, Xad could also be detected from leaves of anthurium and caladium that showed leaf blight diseases, potting materials and water.

After immunization with sonicated Xad antigen, rabbit anti- Xad antiserum showed high titer (1:2560) with a direct agglutination test. The specificity of this antiserum was determined against one strain *Erwinia* sp., two strains of *Bacillus* sp., two strains of *Pantoea*

sp., one strain of *Escherichia coli*, three strains of *Pseudomonas fluorescens*, five strains of *Ralstonia solanacearum*, three strains of *X. axonopodis* pv. *citri* and two strains of *X. oryzae* pv. *oryzae*. The antiserum showed a slight cross-reaction with *P. fluorescens*, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* and *X. oryzae* pv. *oryzae* at titers 1:40, 1:80, 1:80 and 1:80 respectively.

The specificity of the antiserum was also confirmed by testing with Xad and other plant disease-causing bacteria using indirect immunofluorescent staining (IF). It was found that every strain of Xad showed strongly positive result. Other plant disease-causing bacteria showed low immunofluorescence or none at all. The minimal dose of Xad which can be diagnosed from anthurium leaves was conducted by spraying the leaves with different concentrations of bacterial suspension. It was found that the lowest concentration of Xad that was recoverable from the anthurium leaves was 10^3cfu/ml.