บทที่ 5

สรุป

การสำรวจการระบาดของโรคใบไหม้ของหน้าวัวและพืชอาศัยในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ภูเก็ต ตรัง นราธิวาส และสงขลา ระหว่างเดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนสิงหาคม 2545 พบการระบาดใน 13 แปลงปลูกที่ทำการสำรวจ สายพันธุ์หน้าวัวที่พบว่าเป็นโรค ได้แก่ Tropical Rapido President Safari และ Acropolis โดยสายพันธุ์หน้าวัวที่มีระดับการระบาดสูง คือ Tropical และ President ส่วนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุที่พบการระบาดของโรคได้แก่ ชานาดู โดยมีระดับการระบาดสูง

การเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ จากแปลงปลูกต่าง ๆ ได้จำนวน 90 ตัวอย่าง ตรวจพบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียจำนวน 54 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการสตรีคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ได้เชื้อบริสุทธิ์โคโลนีสีเหลืองนวล ผิวหน้าโค้งนูน เป็นมัน ขอบเรียบ จำนวน 120 สายพันธุ์ และจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อบนหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical พบว่า ทุกสายพันธุ์ก่อให้ เกิดโรคได้ภายใน 7 – 15 วัน เมื่อทำการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียตามจำนวนวันที่ทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรคใบไหม้ สามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงมาก จำนวน 33 สายพันธุ์ โดยทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรคภายใน 7-9 วัน กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ที่รุนแรงปานกลาง จำนวน 51 สายพันธุ์ โดยมทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรค 10-12 วันและกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ที่รุนแรงน้อย จำนวน 36 สายพันธุ์ ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคช้าที่สุด คือแสดงอาการหลังปลูกเชื้อ 13-15 วัน และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรครุนแรงที่สุดคือ สายพันธุ์ A 082-1 เพราะเชื้อสายพันธุ์นี้ ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคได้หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

จากการจำแนกชนิดของเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีในระดับสกุล ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหน้าวัวและชานาดูที่แสดงอาการโรคใบไหม้ ตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) จำนวน 120 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแกรมลบ โคโลนีสีเหลือง กลม ขอบเรียบ ผิวหน้าโค้งนูน และเป็นมันบนอาหาร YDC ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ลักษณะดังกล่าวนี้สอดคล้องกับสกุล *Xanthomonas* และการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อในระดับชนิด พบว่า เชื้อแบคทีเรีย สามารถเจริญได้บนอาหาร SX สร้างด่างจากโปรตีนในนม สามารถย่อยแป้ง โปรตีน และ esculin ได้ สร้างกรดจาก arabinose รวมทั้งสามารถใช้ glycerol และ melibiose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จึงสรุปได้ว่าเชื้อที่แยกได้จำนวน 120 สายพันธุ์เป็นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (McCulloch and Pirone) Vauterin *et al.*, 1995

อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ (semi-selective medium) ที่ดัดแปลงขึ้นจากอาหาร SX เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ให้ชื่อว่า SXE โดยมีลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* คือ กลม ขอบเรียบ โคโลนีใสตรงกลางมีสีม่วงเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 3 มิลลิเมตร สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมม่วงเป็นสีน้ำตาล ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่สามารถเจริญได้แต่ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหาร เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหาร SXE กับอาหาร SX พบว่าประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อบนอาหาร SXE มีประสิทธิภาพคิดเป็นร้อยละ 26.79 – 77.86 ซึ่งต่ำกว่า บนอาหาร SX ที่มีประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อร้อยละ 35.36-89.29 แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเลี้ยงเชื้อน้อยกว่า คือ บนอาหาร SXE ใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงเพียง 3 วัน ก็สามารถตรวจพบโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้โดยที่ไม่มีการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ เลย ในขณะที่บนอาหาร SX ต้องใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงถึง 5 วัน จึงจะปรากฏวงใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของอาหารนี้ อีกทั้งยังมีเชื้ออื่น ๆ เจริญได้

การตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวด้วยอาหาร SXE พบว่าสามารถตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้ดีกว่าอาหาร NA และ สามารถตรวจพบเมื่อมีเชื้อบนใบหน้าวัวได้ต่ำสุดที่ 10^3 cfu/มิลลิลิตร โดยสามารถตรวจพบเชื้อได้ 4.00×10^2 cfu/มิลลิลิตร และเมื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ใบหน้าวัวและใบบอนสีที่แสดงอาการโรค วัสดุปลูก และน้ำจากแปลงปลูก เปรียบเทียบกับอาหาร NA PSA และ SX พบว่า บนอาหาร NA และ PSA ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อสาเหตุโรคได้เนื่องจากมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ รวมทั้งมีซาโปรไฟต์เจริญจำนวนมาก บนอาหาร SX สามารถตรวจแยกเชื้อสาเหตุโรคได้ แต่ต้องบ่มเลี้ยงไว้ 5 วัน และยังมีเชื้อชนิดอื่นเจริญได้ด้วย และบนอาหาร SXE สามารถตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้ดี เมื่อเลี้ยงไว้เพียง 3 วัน

การผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นส่วนเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ซึ่งเป็นแอนติเจนจากกระต่ายพันธุ์ New Zealand White เมื่อทำการเจาะเลือดเก็บแอนติซีรัมมาตรวจวัดระดับไตเตอร์โดยวิธี simple agglutination ใน microtiter plate กับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร พบว่ากระต่ายสามารถสร้างแอนติซีรัมที่มีระดับไตเตอร์เท่ากับ 1:2560 และเมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ *P. Fluorescens*, *E. Coli*, *R. solanacearum*, *Erwinia* sp., *Bacillus* sp., *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่า แอนติซีรัมไม่ทำปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *Erwinia* sp., *Bacillus* sp. และ *E. coli* เกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *P. fluorescens* และ *R. solanacearum* ที่

ไตเตอร์ 1:40 และเกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ระดับ 1:80

การตรวจสอบไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining แบบ checker board titration พบว่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่าย เท่ากับ 1:320 และไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสี Fluorescien isothiocyanate (FITC) เท่ากับ 1:40 จึงเลือกใช้ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีทั้งสองตามระดับที่ได้ ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ต่อไป และยืนยันความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining ทดสอบกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ทั้ง 30 สายพันธุ์ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกโดยเซลล์จะเรืองแสงมากทั้งหมด ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ 30 สายพันธุ์ ให้ปฏิกิริยาการเรืองแสงน้อยหรือไม่มีการเรืองแสงเลย

จากการนำแอนติซีรัมมาตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวด้วยวิธี Indirect immunofluorescent staining พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* เมื่อมีเชื้อปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 2.6×10^3 เซลล์ต่อใบหน้าวัว 1 ตารางเซนติเมตร

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวจากแปลงปลูกที่มีการระบาดของโรค โดยเก็บใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค และไม่แสดงอาการโรคอย่างละ 50 ใบ มาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ โดยวิธี Indirect immunofluorescent staining พบว่าสามารถตรวจพบการเรืองแสงชัดเจน จากตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค 50 ตัวอย่าง และใบที่ไม่แสดงอาการโรคมีปฏิกิริยาการเรืองแสง 6 ตัวอย่าง โดยมีการเรืองแสงที่ระดับต่ำ (1+)