บทที่ 3

ผลการทดลอง

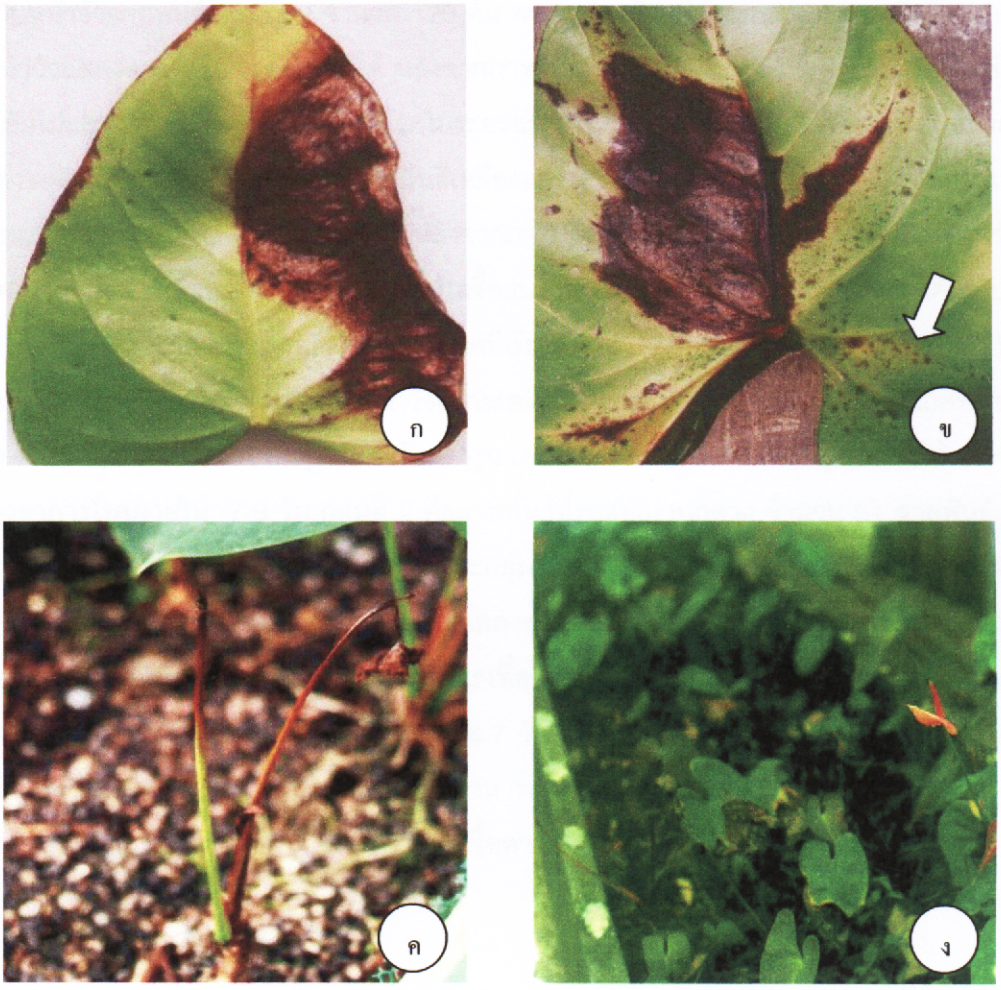
1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ จากแปลงปลูกต่าง ๆ ในพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างเดือนธันวาคม 2544- เดือนสิงหาคม 2545 ได้จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยพบการระบาดของโรคใน 13 แปลงที่ทำการสำรวจ อาการของโรคที่สังเกตได้คือ ใบไหม้แห้งจากขอบใบ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน จุดแผลฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบและดอก รวมทั้งใบไหม้แห้งและตายทั้งต้น (ภาพที่ 3) ในสภาพอากาศชื้นจะพบกลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial ooze) บริเวณใต้ผิวใบ

จากการสำรวจการระบาดของโรคใบไหม้ของหน้าวัว และพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุ โดยการวัดระดับการระบาดของโรคในแปลงปลูกตามวิธีการของ Little และ Hills (1978 อ้างถึงใน Norman and Henny, 1986) พบการระบาดของโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ Tropical Rapido President Safari และ Acropolis โดยสายพันธุ์หน้าวัวที่มีระดับการระบาดสูงสุด คือ Tropical และ President ส่วนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุที่พบการระบาดของโรค ได้แก่ ซานาดู (Xanado) ซึ่งมีระดับการระบาดสูงสุด (ตารางผนวกที่ 1)

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้

การตรวจกลุ่มของแบคทีเรียจากตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ จำนวน 90 ตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound พบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียจำนวน 54 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 1) จากนั้นนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการสตรีคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ได้เชื้อบริสุทธิ์โคโลนีเดี่ยว ๆ ลักษณะสีเหลืองเป็นมัน เยิ้ม ขอบเรียบ จำนวน 120 สายพันธุ์ ย้ายเลี้ยงในหลอดอาหาร PSA โดยเก็บเชื้อ 1 สายพันธุ์ ต่ออาหาร 1 หลอด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3 อาการโรคใบไหม้ของหน้าวัวที่เกิดจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* และความเสียหาย

ก. อาการที่เกิดจากเชื้อเข้าทำลายทางต่อมคายน้ำ

ข. อาการที่เกิดจากเชื้อเข้าทำลายทางปากใบ (ลูกศรชี้)

ค. อาการไหม้แห้งทุกส่วนของลำต้น (systemic)

ง. ความเสียหายที่เกิดขึ้นในแปลงปลูกของเกษตรกร

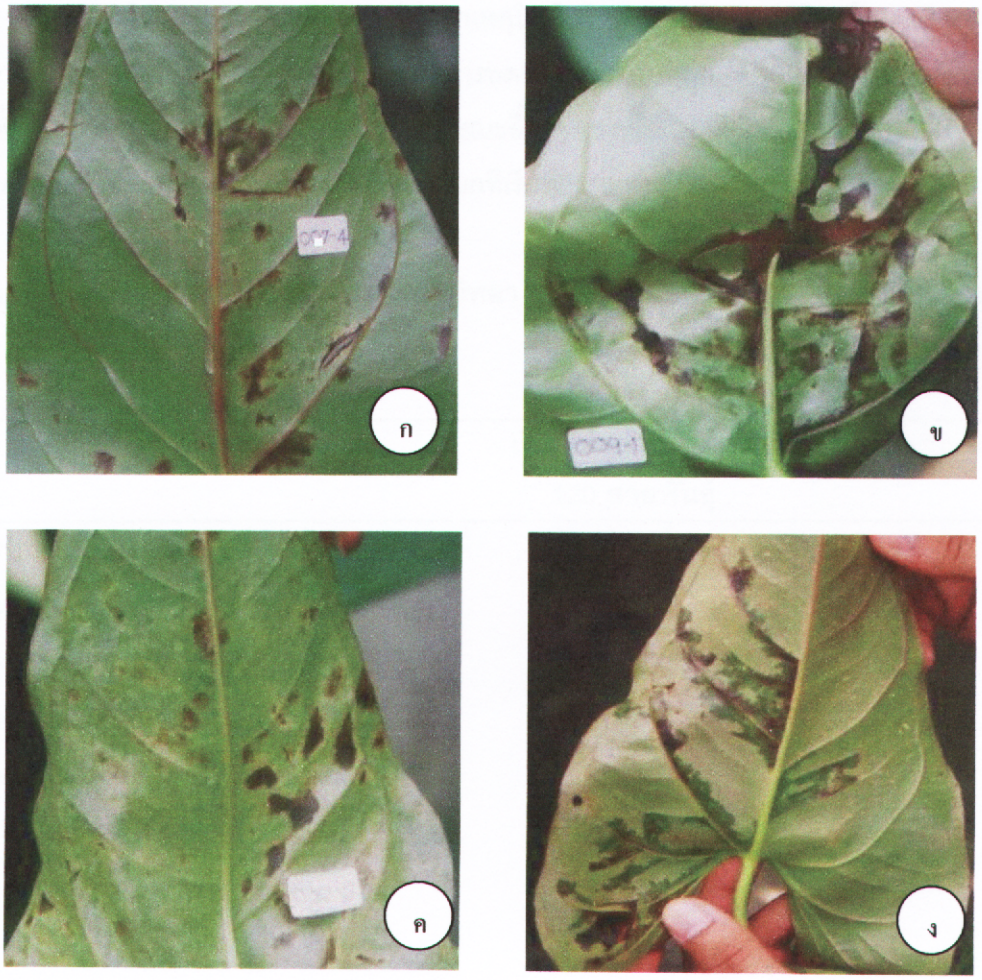
3. การทดสอบการเกิดโรค

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 จำนวน 120 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical จำนวน 120 ต้น พบว่าเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 120 สายพันธุ์สามารถทำให้หน้าวัวแสดงอาการของโรคใบไหม้ได้ หลังจากการปลูกเชื้อ 7-15 วัน ส่วนชุดควบคุมซึ่งฉีดพ่นโดยน้ำกลั่นไม่แสดงอาการโรค โดยอาการโรคในระยะแรกเป็นจุดแผลฉ่ำน้ำบนใบสีเขียวเข้ม ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและน้ำตาลตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 และขยายมากขึ้นจนใบไหม้และแห้งตายทั้งต้นหลังจากการปลูกเชื้อ 40-50 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสภาพอากาศชื้น ใบที่แสดงอาการโรคจะมีกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเกาะติดเนื้อเยื่อผิวใบบริเวณใต้ผิวใบ

การคัดเลือกสายพันธุ์รุนแรงของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 120 สายพันธุ์ (ตารางผนวกที่ 1) โดยศึกษาจำนวนวันที่เชื้อแบคทีเรียทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรค พบว่าสามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียได้ 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 (ตารางที่ 1) และเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรครุนแรงที่สุดคือ สายพันธุ์ A 082-1 เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคได้หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน และไหม้แห้งเกือบทั้งใบภายใน 27 วัน (ภาพที่ 4) จึงคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ และใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตแอนติบอดีมาศึกษาพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อทางเซรุ่มวิทยาต่อไป

ตารางที่ 1 ระดับความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยศึกษาจากจำนวนวันที่ทำให้หน้าวัวพันธุ์ Tropical เริ่มแสดงอาการโรค

ระดับความรุนแรงของเชื้อ	สายพันธุ์	จำนวนวันที่ทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรค
รุนแรงมาก	082-1	7
	001-1,006-3,009-1,014-3,015-1,025-2, 025-3,036-2,036-3,053-1,053-2,081-2, 081-3 และ 081-4	8
	001-2,007-1,014-2,015-2,025-1,028-1, 036-1,039-1,073-1,073-2,073-3,073-4, 082-2,083-1,083-2,083-3,084-1 และ 084-2	9
รุนแรงปานกลาง	002-1,007-2,014-1,015-3,021-2,028-2, 035-3,052-1,054-1,055-1,055-2,055-3, 057-1,058-1,058-2,058-3,085-1,086-1, 087-1,088-1,088-2 และ 088-3	10
	002-2,007-3,012-2,015-4,021-1,029-1, 035-2,052-2,074-1,074-2,074-3,074-4, 074-5 และ 074-6	11
	003-1,007-4,012-1,015-5,020-3,029-2, 035-1,071-1,071-2,071-3,072-1,076-1, 079-1,080-1 และ 081-1	12
รุนแรงน้อย	003-2,007-5,011-3,016-1,020-2,030-1, 034-2,075-1,075-2,077-1 และ078-2	13
	006-1,009-2,011-2,017-1,020-1,030-2, 034-1,060-1,061-1,063-1,064-1,065-1, 078-1,078-3 และ 078-4	14
	006-2,011-1,017-2,017-3,031-1,031-2, 066-1,070-1,070-2 และ 070-3	15



ภาพที่ 4 ความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ บนหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical **หลังการปลูกเชื้อ** 21 **วัน**

ก. อาการโรคจากการปลูกเชื้อสายพันธุ์เชื้อ A 007-4

ข. อาการโรคจากการปลูกเชื้อสายพันธุ์เชื้อ A 009-1

ค. อาการโรคจากการปลูกเชื้อสายพันธุ์เชื้อ A 030-2

ง. อาการโรคจากการปลูกเชื้อสายพันธุ์เชื้อ A 082-1

4. การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสกุลและชนิด

4.1 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสกุล

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยทำการทดสอบในระดับสกุล ลักษณะที่สำคัญบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ ตลอดจนลักษณะอื่น ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 120 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 จึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์คือ *Xanthomonas*

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัวในระดับสกุล

ลักษณะ	เชื้อที่ทำการทดสอบ 120 สายพันธุ์	*Xanthomonas*[a]
Gram reaction	+	+
Grows anaerobically	-	-
Grows aerobically	+	+
Colonies mucoid on YDC at 30°C	+	+
Diffusible non-fluorescent pigment on	+	+
KB Fluorescent pigment on KB	-	-
Urease	-	-
Oxidase	-	-
Grows at 40°C	-	-
More than four peritrichous flagella	-	-
Growth on D1M agar	-	-
Spores formation	-	-
Aerial mycelium	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลการทดลองเป็น positive

- หมายถึง ให้ผลการทดลองเป็น negative

[a] ข้อมูลจาก Schaad และคณะ (2001)

4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับชนิด

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยทำการทดสอบในระดับชนิด ลักษณะที่สำคัญบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ ตลอดจนลักษณะอื่น ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 120 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 จึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์คือ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (McCulloch and Pirone) Vauterin *et al.*, 1995

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัวในระดับชนิด

ลักษณะ	เชื้อที่ทำการทดสอบ 120 สายพันธุ์	*X. axonopdis* pv. *dieffenbachiae*[a]
Mucoid growth on YDC	+	+
Grows at 35°C	+	+
Grows on SX	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Esculin hydrolysis	+	+
Protein digestion	+	+
Acid or alkaline production from milk	Alkaline	Alkaline
Ice nucleation	-	-
Acid form arabinose	+	+
Utilization of glycerol	+	+
Utilization of melibiose	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลการทดลองเป็น positive

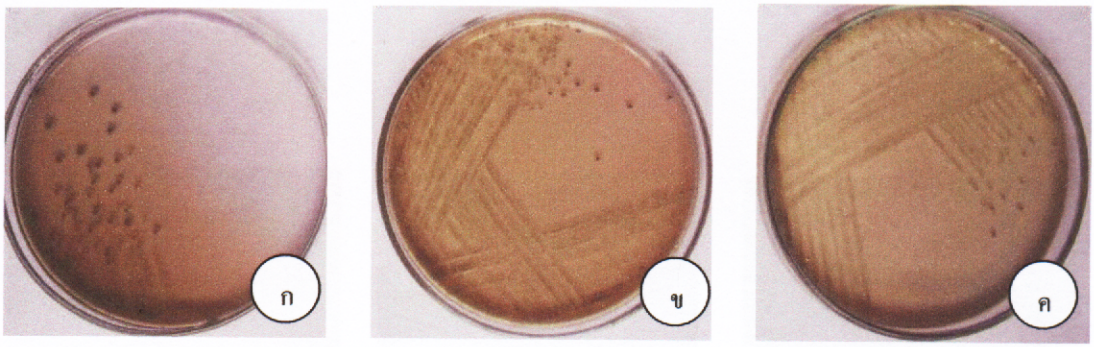
- หมายถึง ให้ผลการทดลองเป็น negative

[a] ข้อมูลจาก Schaad และคณะ (2001)

5. **พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ**

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะที่พัฒนาจากอาหาร SX โดยผสม esculin ในปริมาณ 2 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ที่ผสม esculin ในปริมาณ 2 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีขนาดโคโลนี 1 – 3 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ใส ตรงกลางโคโลนีมีสีม่วงเข้มและเชื้อสามารถเปลี่ยนสีของอาหารรอบ ๆ ขอบโคโลนีจากสีฟ้าอมม่วงเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 5) จึงเลือกสูตรที่ประกอบด้วย esculin 2 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่พัฒนาสำหรับศึกษาต่อไปและให้ชื่อว่า SXE (semi-selective media for *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)

ส่วนประกอบของ SXE ประกอบด้วย (ต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) esculin 2 กรัม beef extract 1 กรัม NH_4Cl 5 กรัม K_2HPO_4 2 กรัม methyl violet 2B 1% 1 มิลลิลิตร methyl green 1% 2 มิลลิลิตร agar 15 กรัม และ Cycloheximide 5% 5 มิลลิลิตร



ภาพที่ 5 การเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082-1 **บนอาหาร SXE อายุ 3 วัน**

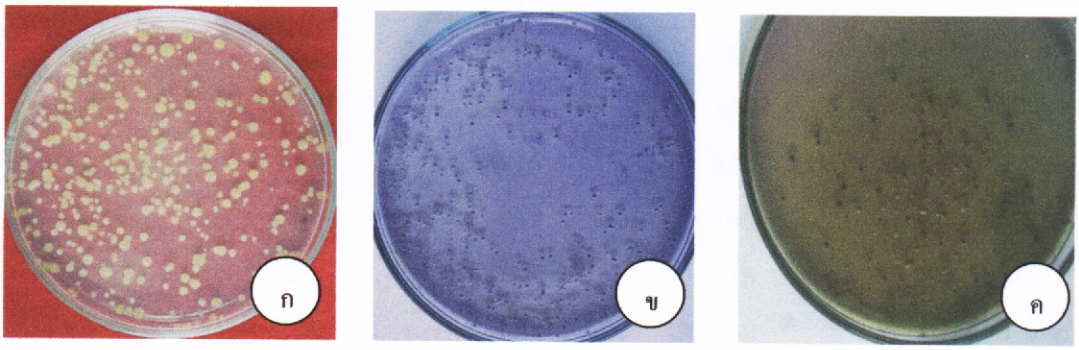
ก. อาหาร SXE ผสม esculin ในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร

ข. อาหาร SXE ผสม esculin ในปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร

ค. อาหาร SXE ผสม esculin ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

6. การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ SXE เปรียบเทียบกับอาหาร SX โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นอาหารมาตรฐานต่อการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จำนวน 20 สายพันธุ์ และเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ รวมทั้ง *E. coli* และ *Bacillus* sp. พบว่า บนอาหาร SX เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* มีการเจริญเฉลี่ยร้อยละ 35.36 – 89.29 ในขณะที่บนอาหาร SXEเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* มีการเจริญเฉลี่ยร้อยละ 26.79 - 77.86 (ตารางที่ 4) เมื่อเลี้ยงไว้ 3 วันเท่ากัน โดยบนอาหาร SX มีจำนวนโคโลนีของเชื้อมากกว่า แต่โคโลนีมีขนาดเล็ก วงใสไม่ชัดเจน ในขณะที่บนอาหาร SXE ลักษณะโคโลนีเด่นชัด สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีน้ำตาลชัดเจน (ภาพที่ 6) และจากการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดต่าง ๆ คือ *Erwinia* sp. *Pantoea* sp. *P. fluorescens* *R. solanacearum* 2 สายพันธุ์ และ *X. axonopodis* pv. *citri* รวมทั้ง *E. coli* และ *Bacillus* sp. พบว่า บนอาหาร SX มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ทำการทดสอบทุกสายพันธุ์ ในขณะที่บนอาหาร SXE มีเพียงเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ 1084-2 และ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่สามารถเจริญได้ เมื่อเลี้ยงไว้ 5 วัน โดยมีลักษณะโคโลนี กลม สีม่วง ขนาด 1 – 3 มิลลิเมตร และไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารรอบ ๆ โคโลนี



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082 -1 **บนอาหารชนิดต่าง ๆ**

ก. ลักษณะโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร NA อายุ 3 วัน

ข. ลักษณะวงใสรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร SX อายุ 5 วัน

ค. ลักษณะสีน้ำตาลรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร SXE อายุ 3 วัน

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหาร SX และ SXE เมื่อนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร NA ได้เฉลี่ย 280 โคโลนี เมื่อเลี้ยงไว้ 3 วัน

สายพันธุ์	อาหาร SX		อาหาร SXE	
	จำนวนโคโลนี[1/]	ประสิทธิภาพ[2/] การเจริญ(%)	จำนวนโคโลนี	ประสิทธิภาพ การเจริญ(%)
A 001-1	113	40.36	78	27.86
A 003-2	118	42.14	82	29.26
A 006-3	158	56.43	136	48.57
A 009-1	138	49.29	100	35.71
A 011-1	218	77.86	184	65.71
A 014-3	99	35.36	75	26.79
A 015-5	110	39.28	92	32.86
A 020-3	136	48.57	102	36.43
A 025-3	188	67.14	156	55.71
A 029-1	219	78.21	194	69.29
A 031-1	174	62.14	134	47.86
A 035-2	205	73.21	186	66.43
A 039-1	236	84.28	199	71.07
A 052-2	202	72.14	183	65.36
A 054-1	178	63.57	145	51.79
A 066-1	250	89.29	218	77.86
A 072-1	153	54.64	132	47.14
A 078-4	136	48.57	101	36.07
A 082-1	158	56.43	120	42.86
A 087-1	183	65.35	153	56.64

[1] ค่าเฉลี่ยจากการตรวจ 3 ซ้ำ

[2] ประสิทธิภาพการเจริญบนอาหาร (%) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหารทดสอบ}}{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหาร NA}} \times 100$

7. การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SXE จากใบหน้าวัว

7.1 การตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SXE

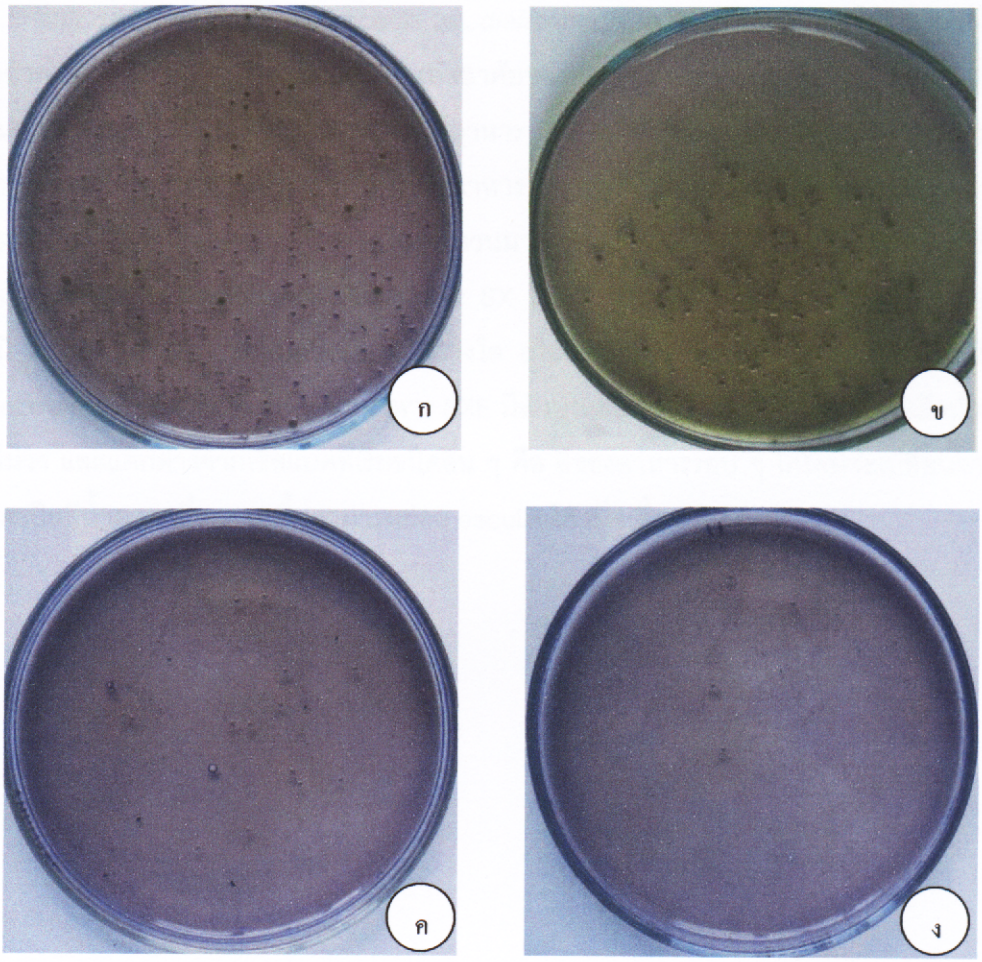
ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้จากใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยตัดใบหน้าวัวขนาด 3 ตารางเซนติเมตร นำมาบดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวหน้าอาหาร SXE และ NA เกลี่ยด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล นำไปบ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ฉีดพ่นบนใบหน้าวัวที่สามารถตรวจพบโดยใช้อาหาร SXE เท่ากับ 10^3 cfu/ มิลลิลิตร (ตารางที่ 5 และภาพที่ 7) ในขณะที่บนอาหาร NA ไม่สามารถตรวจนับโคโลนีของเชื้อได้เนื่องจากมีเชื้ออื่น ๆ เจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

ตารางที่ 5 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ที่ตรวจพบจากใบหน้าวัวเมื่อฉีดพ่นด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้อาหาร SXE

แหล่งที่มาของเชื้อ	ปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่นบนใบหน้าวัว (cfu/มิลลิลิตร)	ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ[1/] (cfu/มิลลิลิตร)
ใบหน้าวัว	10	-[2/]
	10^2	-
	10^3	4.00×10^2
	10^4	2.00×10^3
	10^5	6.70×10^4
	10^6	1.00×10^5
	10^7	2.56×10^6
	10^8	2.98×10^7

[1/] ค่าเฉลี่ยจากการตรวจ 3 ซ้ำ

[2/] ไม่มีเชื้อเจริญ



ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082-1 **บนอาหาร SXE อายุ 3 วัน ที่ระดับปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่นบนใบหน้าววัต่าง ๆ**

ก. ที่ระดับปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่น 10^8 cfu/ มิลลิลิตร

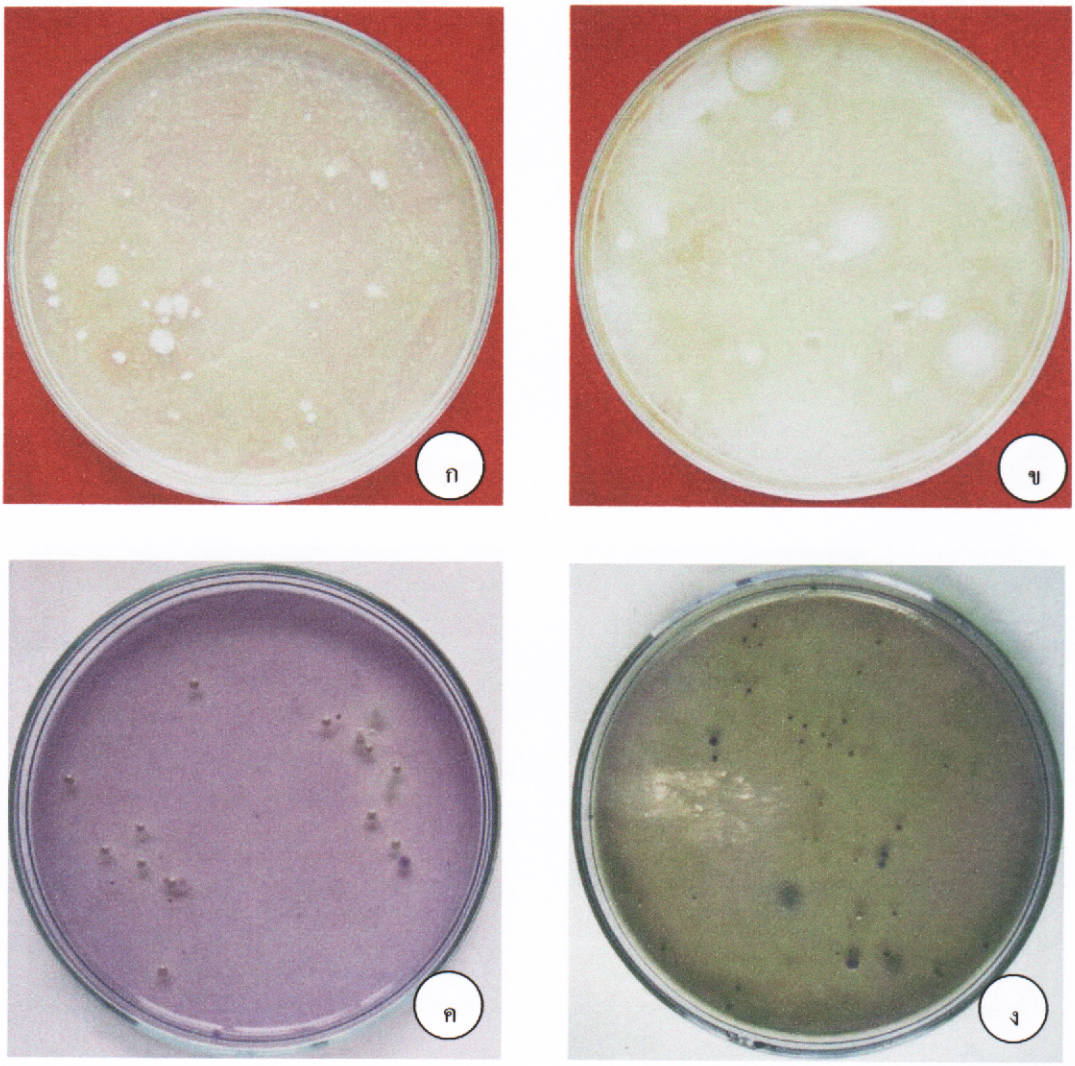
ข. ที่ระดับปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่น 10^6 cfu/ มิลลิลิตร

ค. ที่ระดับปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่น 10^4 cfu/ มิลลิลิตร

ง. ที่ระดับปริมาณเชื้อ ที่ฉีดพ่น10^3 cfu/ มิลลิลิตร

7.2 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ (SXE)

ทำการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค (ภาพที่ 8) ใบบอนสีซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค (ภาพที่ 9) วัสดุปลูก (ภาพที่ 10) และน้ำจากแปลงปลูก (ภาพที่ 11) โดยใช้อาหาร SXE เปรียบเทียบกับอาหาร NA PSA และ SX พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคได้บนอาหาร NA และ PSA เนื่องจากมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ รวมทั้งมีซาโปรไฟต์ (saprophyte) เจริญจำนวนมาก เมื่อเลี้ยงไว้ 3 วัน สามารถตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากอาหาร SX โดยมีลักษณะโคโลนี กลม สีเขียวเข้มตรงกลางโคโลนี สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นวงใส เมื่อเลี้ยงไว้ 5 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหาร SXE มีลักษณะโคโลนี กลม ผิวหน้าโค้งนูนเล็กน้อย เป็นมัน สีม่วง และแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมม่วงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเชื้อสามารถย่อย esculin ได้ เมื่อเลี้ยงไว้ 3 วัน



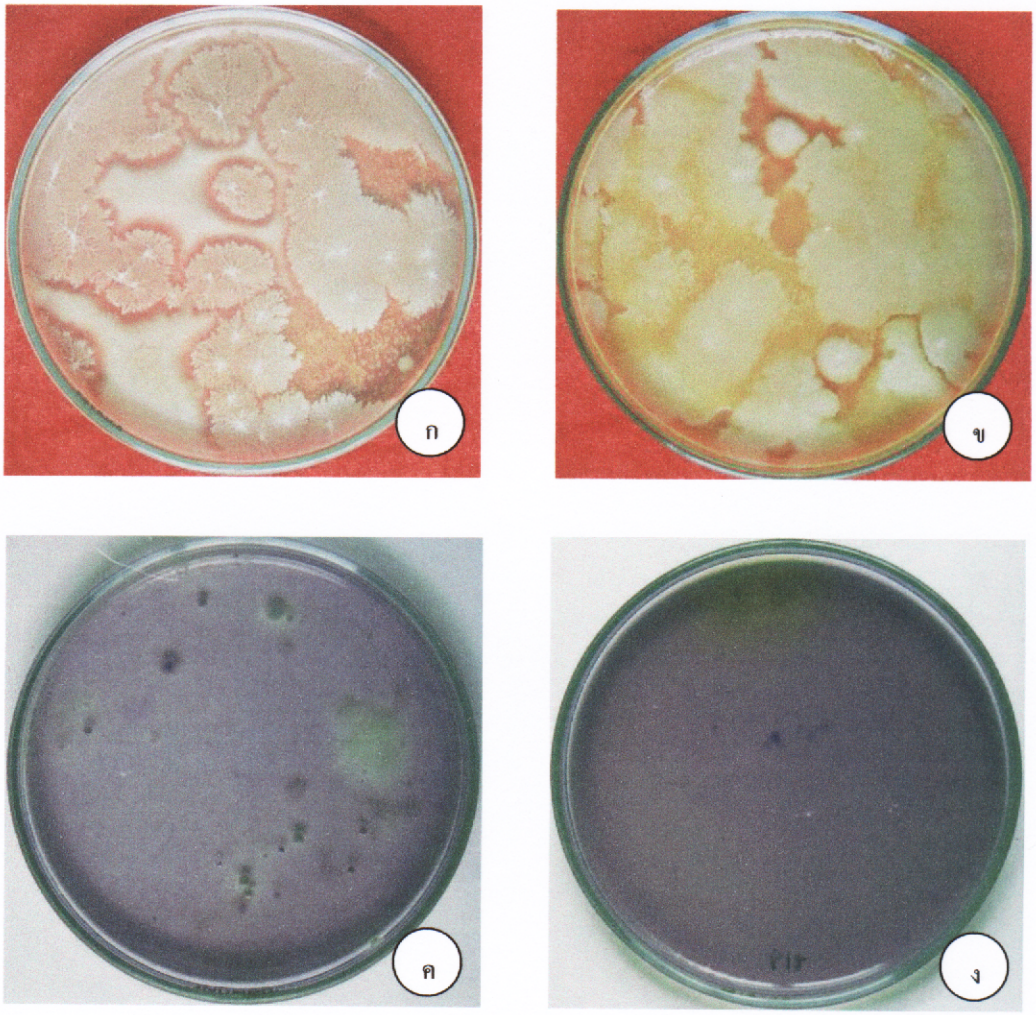
ภาพที่ 8 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

ก. อาหาร NA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ข. อาหาร PSA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ค. อาหาร SX หลังจากบ่มไว้ 5 วัน

ง. อาหาร SXE หลังจากบ่มไว้ 3 วัน



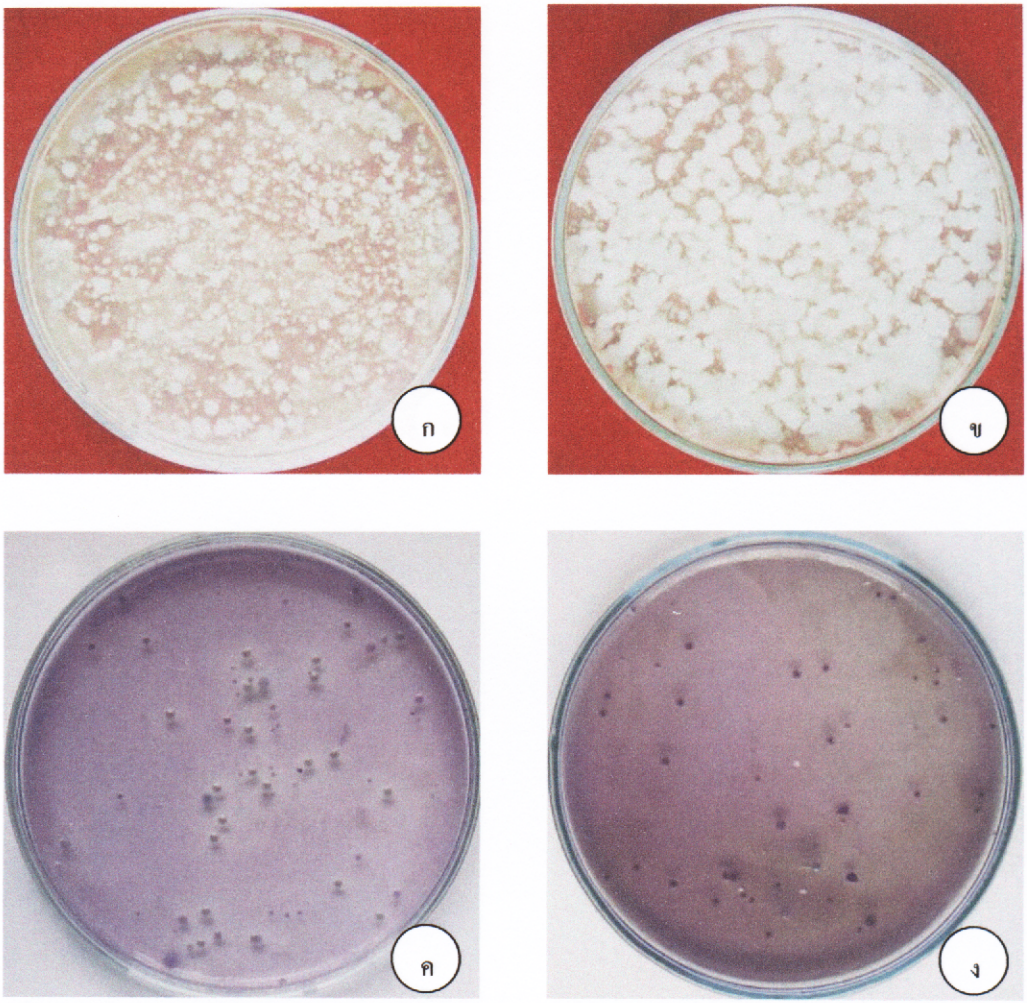
ภาพที่ 9 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบบอนสีที่แสดงอาการโรคด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

ก. อาหาร NA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ข. อาหาร PSA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ค. อาหาร SX หลังจากบ่มไว้ 5 วัน

ง. อาหาร SXE หลังจากบ่มไว้ 3 วัน



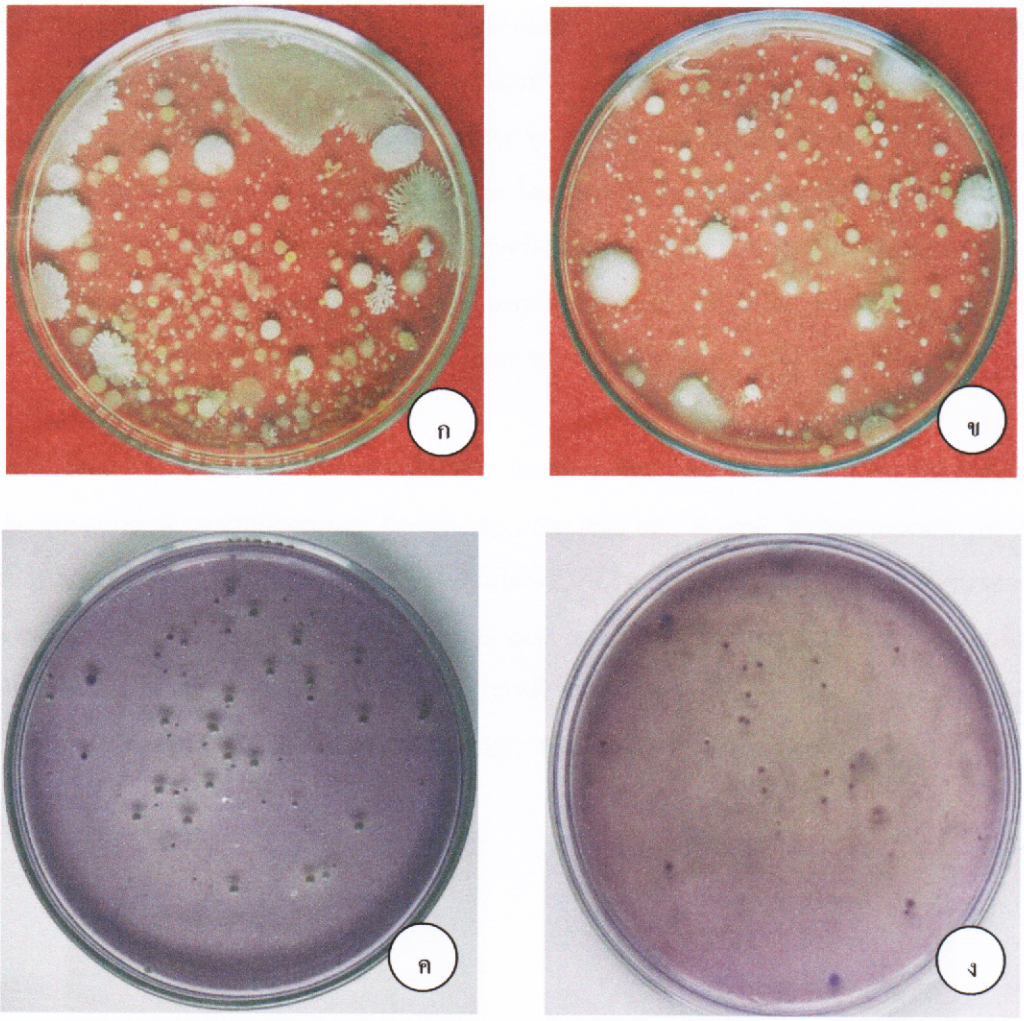
ภาพที่ 10 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากวัสดุปลูกด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

ก. อาหาร NA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ข. อาหาร PSA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ค. อาหาร SX หลังจากบ่มไว้ 5 วัน

ง. อาหาร SXE หลังจากบ่มไว้ 3 วัน



ภาพที่ 11 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากน้ำจากแปลงปลูกด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

ก. อาหาร NA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

ข. อาหาร PSA หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

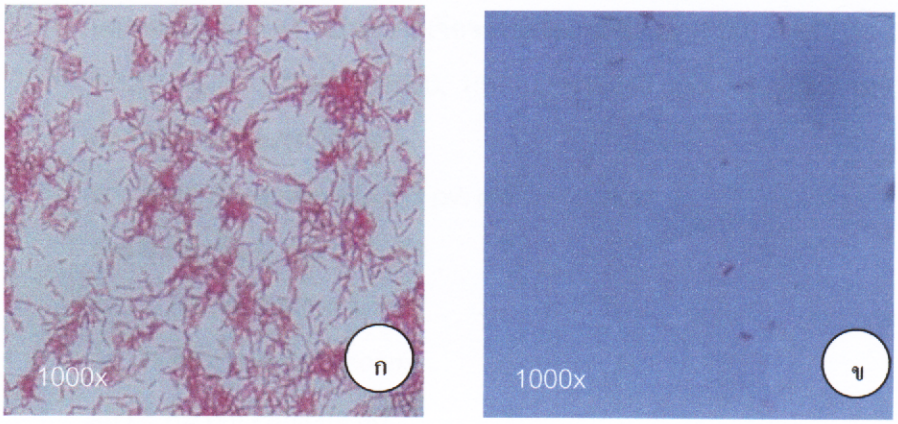
ค. อาหาร SX หลังจากบ่มไว้ 5 วัน

ง. อาหาร SXE หลังจากบ่มไว้ 3 วัน

8. การผลิตแอนติเจนและแอนติบอดี

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 โดยการใช้คลื่นเสียงทำให้ได้ชิ้นส่วนของเซลล์ (sonicated cell) ซึ่งมีการตรวจสอบการแตกของเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมแกรม (ภาพที่ 12) เมื่อนำมาทำการผลิตแอนติบอดีโดยฉีดแอนติเจนที่ปรับให้มีค่าความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทุก ๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง ที่ใต้ผิวหนังบริเวณคอด้านหลังของกระต่ายพันธุ์ New Zealand White โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ทำการเจาะเลือดเก็บแอนติซีรัมมาตรวจวัดระดับไตเตอร์โดยวิธี simple agglutination ใน microtiter plate กับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร พบว่ากระต่ายสามารถสร้างแอนติซีรัมโดยมีระดับไตเตอร์เท่ากับ 1:2560 (ภาพที่ 13)

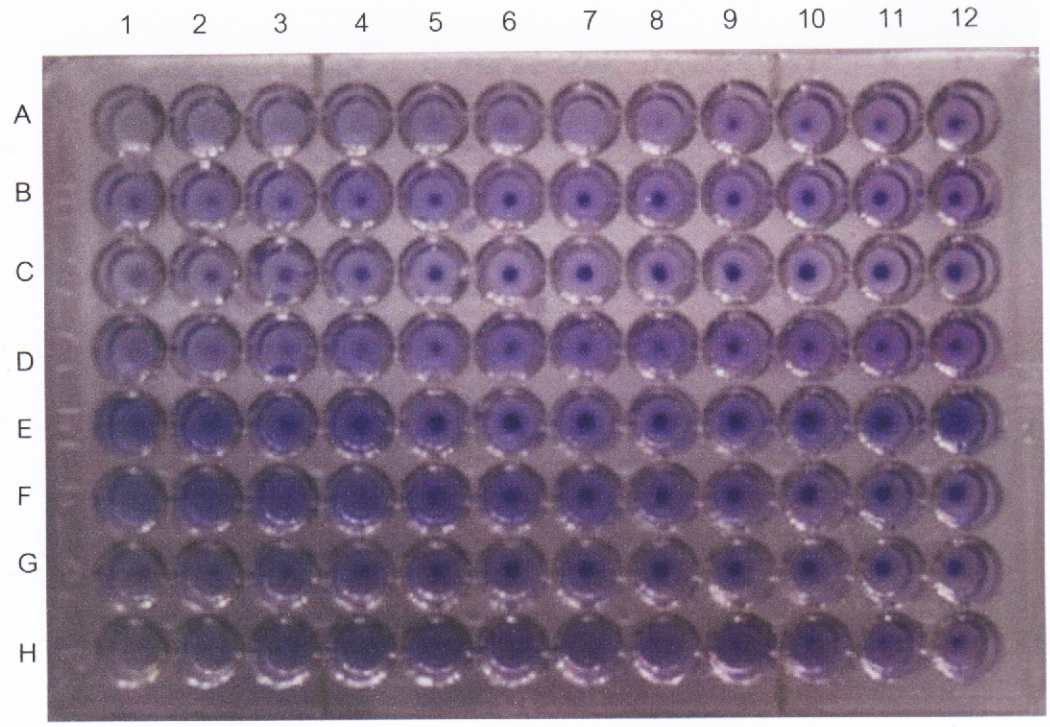
เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ คือ *Pantoea* sp., *P. fluorescens*, *R. solanacearum*, *Erwinia* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่า แอนติซีรัมไม่ทำปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *Erwinia* sp., *Bacillus* sp., *Pantoea* sp. และ *E. coli* และเกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *P. fluorescens*, *R. solanacearum*, (ภาพที่ 13) *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* (ภาพที่ 14) ที่ระดับไตเตอร์ 1:40, 1:80, 1:80 และ 1:80 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 การติดสีแกรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1

ก. ก่อนทำการ sonicate

ข. หลังทำการ sonicate



ภาพที่ 13 การทำปฏิกิริยา agglutination **ระหว่างแอนติซีรัมของเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082-1 **กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ**

โดยคอลัมน์ที่ 1-11 เป็นความเจือจางของแอนติซีรัมที่ 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240 และ 1:20480 ตามลำดับ และคอลัมน์ที่ 12 เป็นชุดควบคุม

แถว A คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

แถว B คือ เชื้อ *E. coli*

แถว C คือ เชื้อ *Erwinia* sp.

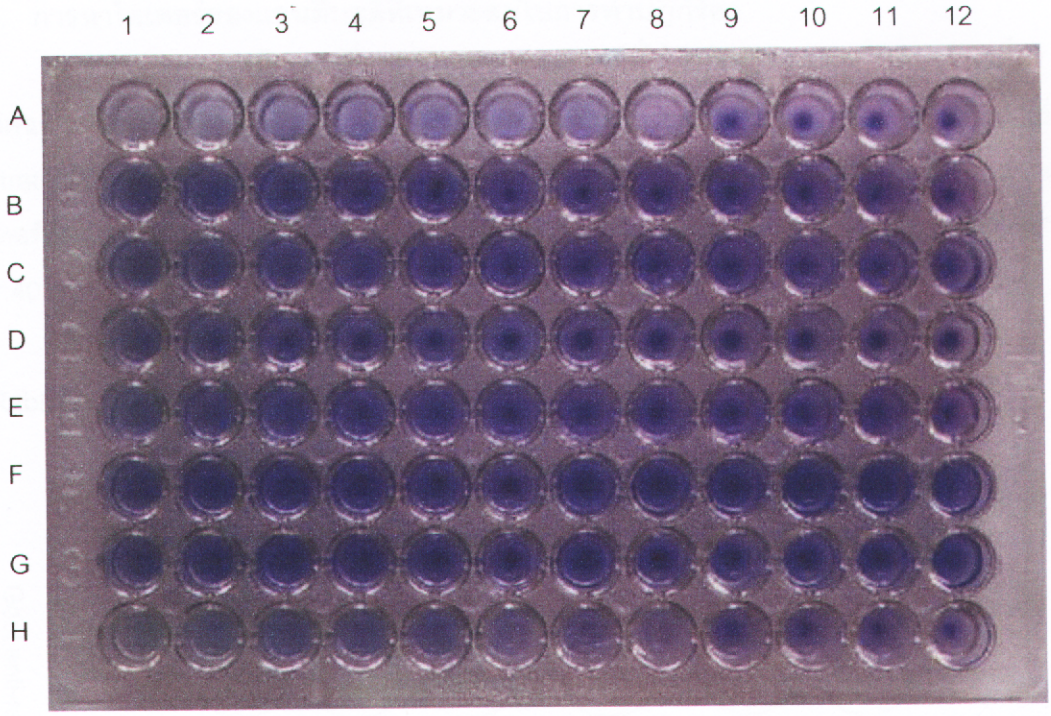
แถว D คือ เชื้อ *P.fluorescens*

แถว E คือ เชื้อ *Pantoea* sp.

แถว F คือ เชื้อ *R. solanacearum*

แถว G คือ เชื้อ *Bacillus* sp.

แถว H คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*



ภาพที่ 14 การทำปฏิกิริยา agglutination **ระหว่างแอนติซีรัมของเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์ A 082-1 กับแอนติเจนเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ และตัวอย่างใบหน้าวัว**

โดย คอลัมน์ที่ 1-11 เป็นความเจือจางของแอนติซีรัมที่ 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240 และ 1:20480 ตามลำดับ และคอลัมน์ที่ 12 เป็นชุดควบคุม

แถว A คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

แถว B คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

แถว C คือ เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

แถว D คือ ตัวอย่างใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรค

แถว E คือ ตัวอย่างใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรค

แถว F คือ ตัวอย่างใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรค

แถว G คือ ตัวอย่างใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรค

แถว H คือ ตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค

9. **การหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา**

ทำการตรวจสอบไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายกับแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงด้วยวิธี Indirect immunofluorescent staining แบบ checker board titration (ภาพที่ 15) พบว่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่าย เท่ากับ 1:320 และไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยสี Fluorescien isothiocyanate (FITC) เท่ากับ 1:40

Rabbit anti-*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ⟶

Goat anti-rabbit Ig-FITC ⟶

	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
1:20	4+	4+	4+	4+	4+	3+
1:40	4+	4+	4+	4+	4+	3+
1:80	4+	4+	4+	3+	2+	1+
1:160	4+	4+	3+	2+	1+	1+
1:320	4+	3+	2+	1+	0	0
1:320	3+	2+	1+	0	0	0

ภาพที่ 15 การหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแบบ checker board titration **โดยใช้เชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082-1 **เป็นแอนติเจน**

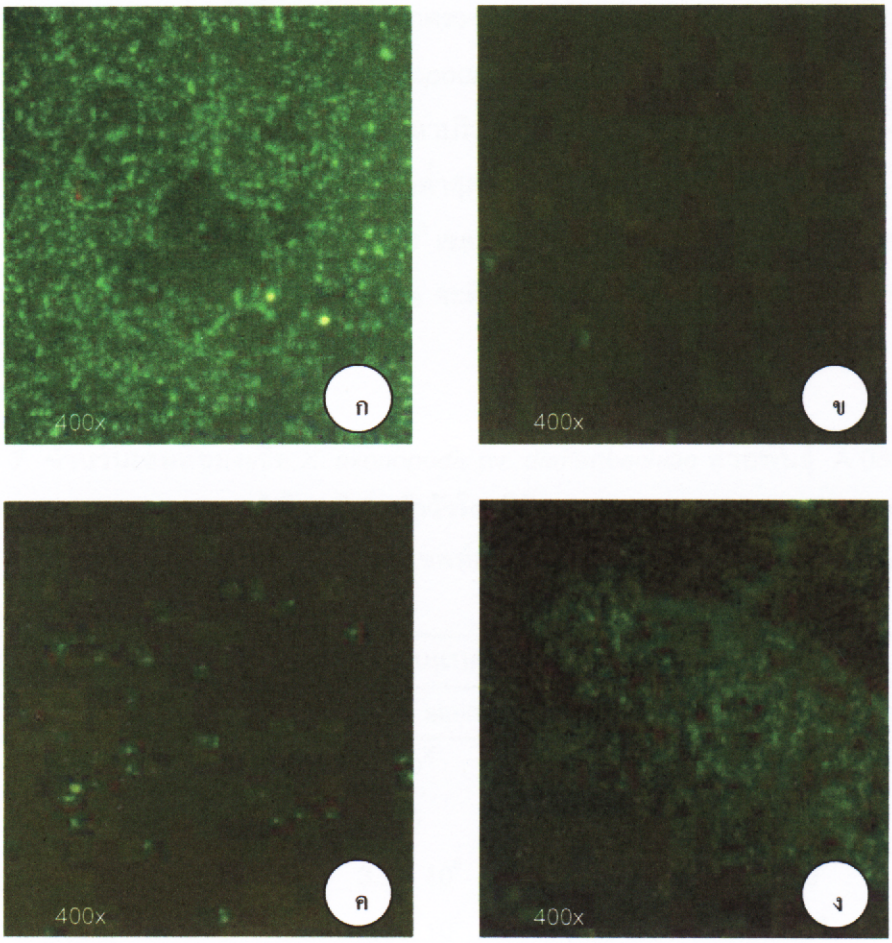
10. ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จำนวน 30 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จำนวน 30 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จำนวน 30 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่าง ส่วนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จำนวน 25 สายพันธุ์จะให้ปฏิกิริยาเป็นลบ และเชื้อ *P. fluorescens, R. solanacearum* สายพันธุ์ 1139-3 และ 1184-6, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* เกิดปฏิกิริยาการเรืองแสงน้อยที่ระดับ 1+ (ตารางที่ 6 และภาพที่16)

ตารางที่ 6 ปฏิกิริยาการทดสอบ Indirect immunofluorescent staining **โดยแอนติซีรัม ของเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์ A 082-1 กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ**

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	ปฏิกิริยา[1/]
X. axonopodis pv. *dieffenbachiae*	A001-2,002-2,003-2,006-1,007-4,009-1, 014-2,015-3,015-4,016-1,017-2,017-9, 020-1,021-2,025-1,028-1,029-2,034-2, 036-3,039-1,052-1,054-1,055-2,057-1, 058-2,060-1,064-1,082-1,083-1,083-3	4+
Bacillus sp.	B11,B12,B16,B17,B18	-
Erwinia sp.	-	-
E. coli	-	-
Pantoea sp.	-	-
P. fluorescens	-	1+
R. solanacearum	BW1003-1,1027-4,1033-3,1046-2, 1051-1,1056-5,1058-3,1065-1,1068-3, 1145-5, 1151-2,1152-1,1154-3,1156-1, 1164-5,1167-3,1180-6,1183-7,	-
	1139-3 และ 1184-6	1+
X. axonopodis pv. *citri*	-	1+
X. oryzae pv. *oryzae*	-	1+

[1/] ระดับปฏิกิริยาการเรืองแสง



ภาพที่ 16 การตรวจเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ด้วยวิธี Indirect immunofluorescent staining **โดยแอนติซีรัม** (sonicated cell) **ของเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์ A 082-1 ที่ความเข้มข้น** 1:320 **และแอนติบอดีที่มีสี** FITC **ติดอยู่ เข้มข้น** 1:40

ก. *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1

ข. *E. coli*

ค. *P. fluorescens*

ง. *X. axonopodis* pv. *citri*

11. การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบของหน้าวัวโดยใช้แอนติซีรัม

11.1 ศึกษาปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจากใบหน้าวัว

นำใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่ความเข้มข้น 10^2-10^8 cfu/มิลลิลิตร ไปตรวจหาปริมาณเชื้อโดยวิธี Indirect immunofluorescent staining พบว่า สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ฉีดพ่นบนใบหน้าวัวที่ความเข้มข้น 10^3 cfu/มิลลิลิตร หรือเมื่อมีเชื้อต่ำ สุดเท่ากับ 2.6 x 10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรบนแผ่นสไลด์ (ตารางที่ 7) และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จะติดสีเขียวเรืองแสงเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ตารางที่ 7 จำนวนเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่สามารถตรวจพบได้จากใบหน้าวัวโดยวิธี Indirect immunofluorescent staining **และจำนวนเซลล์จากการย้อมเซลล์แบบ** simple stain **ด้วยสี** methylene blue

ปริมาณเชื้อที่ฉีดพ่นบนใบ (cfu/ml)	จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร)	
	simple stain	indirect immunofluorescence[1/]
10^8	ND[2/]	2.3 x 10^7
10^7	ND	6.5 x 10^6
10^6	3.9 x 10^6	3.8 x 10^5
10^5	1.1 x 10^5	5.6 x 10^4
10^4	2.3 x 10^4	4.9 x 10^3
10^3	2.6 x 10^3	3.9 x 10^2
10^2	1.2 x 10^2	0[3/]

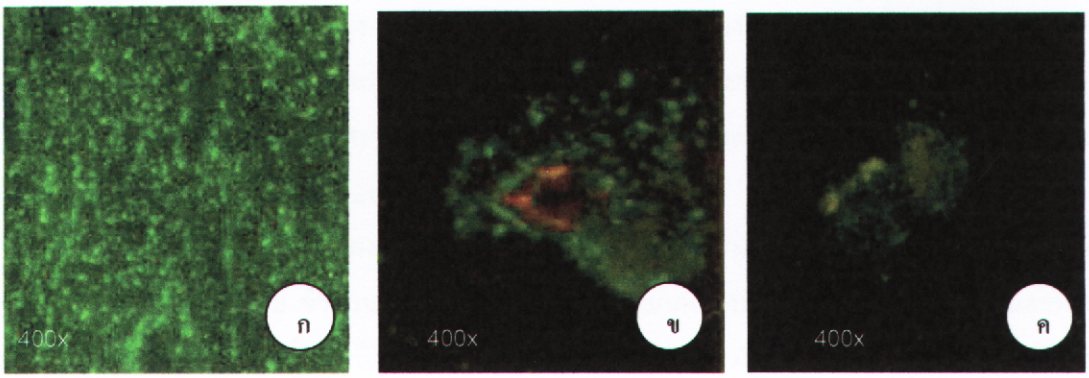
[1/] การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 โดยการตรวจนับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละ field และหาค่าเฉลี่ยจากการนับจำนวน 10 field ซึ่งใน 1 field มีพื้นที่เท่ากับ 0.0143 ตารางมิลลิเมตร ที่กำลังขยาย 1000X

[2/] เชื้อหนาแน่นมาก ตรวจนับไม่ได้ (not determined)

[3/] ไม่มีเซลล์เรืองแสง

11.2 การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคและไม่แสดงอาการโรค

การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบหน้าวัวที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการโรคใบไหม้ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining โดยแอนติซีรัม (sonicated cell) ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่ความเข้มข้น 1:320 และแอนติบอดีที่มีสี FITC ติดอยู่ เข้มข้น 1:40 พบว่า ตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค 50 ตัวอย่าง มีการเรืองแสงชัดเจน (4+) และใบที่ไม่แสดงอาการโรค 44 ตัวอย่าง ไม่มีการเรืองแสง และใบที่ไม่แสดงอาการโรค 6 ตัวอย่าง มีการเรืองแสงน้อย (1+) (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบหน้าวัวที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการโรคใบไหม้ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining **โดยแอนติซีรัม** (sonicated cell) **ของเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **สายพันธุ์** A 082-1 **ที่ความเข้มข้น** 1:320 **และแอนติบอดีที่มีสี** FITC **ติดอยู่ เข้มข้น** 1:40

ก. ใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้

ข. ใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรคใบไหม้

ค. ใบหน้าวัวที่ไม่แสดงอาการโรคใบไหม้