บทที่ 4

วิจารณ์

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 ซึ่งเป็นสายพันธุ์สีแดงสด เป็นที่ต้องการของตลาด เกษตรกรปลูกเลี้ยงจำนวนมาก ส่วนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุที่พบการระบาดของโรคได้แก่ ซานาดู โดยมีระดับการระบาดสูง จะเห็นได้ว่าระดับการระบาดของโรคในแต่ละพื้นที่ขึ้นกับสายพันธุ์หน้าวัว นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศ ขณะที่ทำการสำรวจ ซึ่งช่วงเวลาก่อนการสำรวจมีฝนตกชุก ทำให้บรรยากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงจึงส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคใบไหม้ได้อย่างกว้างขวาง (Mckey and Zumoff, 1987)

เก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ จากแปลงปลูกต่าง ๆ ได้จำนวน 90 ตัวอย่าง ตรวจพบกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 54 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการสตรีคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ได้เชื้อบริสุทธิ์โคโลนีสีเหลืองนวล ผิวหน้าโค้งนูน เป็นมัน ขอบเรียบ จำนวน 120 สายพันธุ์ และเมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อบนหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical พบว่าทุกสายพันธุ์ก่อให้ เกิดโรคได้ภายใน 7 – 15 วัน อาการโรคในระยะแรกเป็นจุดแผลฉ่ำน้ำบนใบสีเขียวเข้ม ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและน้ำตาลตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ Norman และ Alvarez (1994) ในสภาพอากาศชื้นใบที่แสดงอาการโรคมี bacterial ooze เกาะติดเนื้อเยื่อผิวใบบริเวณใต้ใบซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับรายงานของ Pohronezny และคณะ (1985) นอกจากนี้พบว่ารอยแผลที่เกิดขึ้นมีการขยายลุกลามจากจุดแผลเล็กๆ ที่มีลักษณะฉ่ำน้ำสีเขียวเข้ม ขยายมากขึ้น รอยแผลเชื่อมต่อกันเป็นแผลใหญ่ลามลงสู่ก้านใบและลำต้นทำให้แห้งตายทั้งต้นภายใน 40-50 วัน ซึ่ง Alvarez และคณะ (1992) และ Norman และ Alvarez (1994) รายงานไว้ว่า อาการโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ มีทั้งอาการแบบเฉพาะที่และอาการแบบมีการเคลื่อนที่ตลอดทุกส่วนของลำต้น ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ สภาพแวดล้อม และระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลายพืชเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ใบไหม้ ลำต้นแห้งและตายในที่สุด เมื่อทำการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียตามจำนวนวันที่ทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรคใบไหม้ สามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงมาก จำนวน 33 สายพันธุ์ โดยทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรคภายใน 7-9 วัน กลุ่มที่ 2 คือ สายพันธุ์ที่รุนแรงปานกลาง จำนวน 51 สายพันธุ์ โดยทำให้หน้าวัวเริ่มแสดงอาการโรค 10-12 วันและกลุ่มที่ 3 คือ สายพันธุ์ที่รุนแรงน้อย จำนวน 36 สายพันธุ์

ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคช้าที่สุด คือ แสดงอาการหลังปลูกเชื้อ 13-15 วัน และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรครุนแรงที่สุดคือ สายพันธุ์ A 082-1 เพราะเชื้อสายพันธุ์นี้ ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคได้หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน จะเห็นได้ว่าความรุนแรงของการเกิดโรค แตกต่างไปตามสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ ไม่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ เนื่องจากเชื้อที่แยกได้จากบริเวณเดียวกันมีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคต่างกัน ดังนั้นจึงอาจขึ้นอยู่กับความผันแปรทางพันธุ กรรมของเชื้อแบคทีเรีย (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2531)

จากการจำแนกชนิดของเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีในระดับสกุล ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหน้าวัวและขานาดูที่แสดงอาการโรคใบไหม้ 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 เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* คือ SXE ใช้ esculin แทนแป้ง ซึ่งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Chen and Echandi, 1982) และเป็นสารที่ทำให้อาหารนี้มีคุณสมบัติพิเศษอีกประการ คือ เป็นอาหารแยกความแตกต่าง (differential medium) ได้ด้วย โดยทำให้ลักษณะโคโลนีแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* มีลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ โคโลนีใสตรงกลางมีสีม่วงเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 3 มิลลิเมตร สีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมม่วงเป็นสีน้ำตาล ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่สามารถเจริญได้แต่ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหาร เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิ ภาพการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหาร SXE กับอาหาร SX พบว่าประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อบนอาหาร SXE มีประสิทธิภาพคิดเป็นร้อยละ 26.79 – 77.86 ซึ่งต่ำกว่าบนอาหาร SX ที่มีประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อร้อยละ 35.36-89.29 แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเลี้ยงเชื้อน้อยกว่า คือ บนอาหาร SXE ใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงเพียง 3 วันก็สามารถตรวจพบโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้โดยที่ไม่มีการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ เลย ในขณะที่บนอาหาร SX ต้องใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงถึง 5 วัน จึงจะปรากฏวงใสรอบโคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเด่นของอาหารนี้ อีกทั้งยังมีเชื้ออื่น ๆ เจริญได้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบราคาต้นทุนของอาหารทั้งสอง แม้ว่า esculin จะมีราคาแพงกว่าแป้ง 3 เท่า แต่ปริมาณการใช้ที่แตกต่างกัน 5 เท่า คือ อาหาร SXE ใช้ esculin ในปริมาณ 2 กรัม

ต่อลิตร ในขณะที่อาหาร SX ใช้แป้งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดราคาต้นทุนต่อ 1 จานอาหาร ก็ใกล้เคียงกัน อาหาร SXE จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะในการใช้ตรวจแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ได้

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 ส่วนบนอาหาร SXE สามารถตรวจแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้ดี เมื่อเลี้ยงไว้เพียง 3 วัน โดยมีลักษณะโคโลนีคือ กลม เป็นมัน ใส มีสีม่วงเข้มตรงกลางโคโลนี และสีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมม่วงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลาย esculin ได้ ทำให้สามารถตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* และพยากรณ์การระบาดของโรคได้รวดเร็วกว่า จึงวางแผนการป้องกันหรือกำจัดได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ การใช้วิธีนี้ยังมีประโยชน์มากในการตรวจสอบกล้าพืชที่นำเข้าจากต่างประเทศหรือแหล่งอื่น ๆ

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 ซึ่งเป็นระดับไตเตอร์ที่สูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับวิธีการอื่น ๆ ที่สะดวกและรวดเร็วได้ เช่น ELISA หรือ Dot-immunobinding assay เพื่อประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อจากชิ้นส่วนของพืชได้ และเมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *P. fluorescens*, *Erwinia* sp., *R. solanacearum*, *Bacillus* sp., *E. coli*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าแอนติซีรัมไม่ทำปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *Erwinia* sp., *Bacillus* sp. และ *E. coli* เกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *P. fluorescens* และ *R. solanacearum* ที่ไตเตอร์ 1:40 และเกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ระดับ 1:80 การที่แอนติซีรัมเกิดปฏิกิริยา agglutination กับเชื้ออื่น ๆ เนื่องจากแอนติซีรัมที่ได้เป็นชนิด polyclonal จึงเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ ทั้งนี้ถ้าหากมีการกำจัดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของแอนติซีรัมโดยวิธีการดูดซับ (absorption) ด้วยเชื้อแบคที

เรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ก็จะได้แอนติซีรัมที่บริสุทธิ์มากขึ้น สามารถนำไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้ดียิ่งขึ้น (Leach *et al.*, 1987)

เมื่อทำการตรวจสอบไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่าย และแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining แบบ checker board titration พบว่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่าย เท่ากับ 1:320 และไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสี Fluorescien isothiocyanate (FITC) เท่ากับ 1:40 จึงเลือกใช้ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีทั้งสองตามระดับไตเตอร์ที่ได้ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ต่อไป และทดสอบยืนยันความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining โดยทดสอบกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ทั้ง 30 สายพันธุ์ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกโดยเซลล์จะเรืองแสงมากทั้งหมด ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ 30 สายพันธุ์ให้ปฏิกิริยาการเรืองแสงน้อยหรือไม่มีการเรืองแสงเลย เช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้กับเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* (Yakrus and Shaad, 1979) เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* (Taveechai and Schaad, 1986) และเชื้อ *X. campestris* pv. *manihotis* (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2531)

เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวด้วยวิธี Indirect immunofluorescent staining พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* เมื่อมีเชื้อปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 2.6 X 10^3 เซลล์ต่อใบหน้าวัว 1 ตารางเซนติเมตร ใกล้เคียงกับการทดลองของ Allen และ Kelman (1977) ซึ่งได้ทำการตรวจหาเชื้อ *E. carotovora* var. *atroseptica* จากดินด้วยวิธีเดียวกันนี้

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากใบหน้าวัวจากแปลงปลูกที่มีการระบาดของโรค โดยเก็บใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค และไม่แสดงอาการโรคอย่างละ 50 ใบ มาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ โดยวิธี Indirect immunofluorescent staining พบว่าสามารถตรวจพบการเรืองแสงชัดเจน จากตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค 50 ตัวอย่าง และใบที่ไม่แสดงอาการโรคมีปฏิกิริยาการเรืองแสง 6 ตัวอย่าง โดยมีการเรืองแสงที่ระดับต่ำ (1+) ซึ่งเกิดจากเชื้ออาศัยแอบแฝงโดยที่หน้าวัวไม่แสดงอาการโรค ซึ่งตรงกับรายงานของ Alvarez และคณะ (1994) และ Fukui และคณะ (1999c) การใช้วิธีนี้จึงมีประโยชน์มากในการตรวจสอบกล้าพืชที่นำเข้าหรือช่วยในการพยากรณ์การระบาดของโรคเพื่อประโยชน์ในการวางแผนการป้องกันกำจัดโรคได้

การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* โดยวิธี Indirect immunofluorescent staining โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้ เตรียมตัวอย่างได้ง่าย ใช้เวลาในการตรวจน้อย และสามารถทราบผลได้รวดเร็วภายใน 1 วัน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ จะต้องมีห้องปฏิบัติการเฉพาะ