การศึกษาสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสในประเทศไทย

Etiology of Angular Leaf Spot Disease of Eucalyptus in Thailand

พจณา กะสินรัมย์[1], สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3], จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์[2,3]และ วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,3*]

Photchana Kasinrum[1], Sujin Patarapuwadol[1,2,3], Jutatape Watcharachaiyakup[2,3] and Wichai Kositratana[1,2,3*]

Abstract

Surveys of disease on eucalyptus were performed in Kanchanaburi and Khon Kaen provinces during the years 2011-2012. Water-soaked and angular spot lesions with dark brown color were observed on leaves widely damaging to eucalyptus seedling production. Twenty-eight bacterial isolates were extracted from symptomatic leaves. Pathogenicity tests were performed by spraying bacterial suspension on one-month-old eucalyptus seedlings. Twenty-one isolates were revealed as causal agents of disease. The bacteria were characterized as gram-negative rods ranging in sizes from 0.5 to 0.8 µm × 1.6-3.0 µm with monotrichous flagellum and bacterial cells arranged singly or in pairs. All the tested isolates formed yellow mucoid convex colonies on YDC medium. Bacteria produce yellow pigment of xanthomonadin, require oxygen for growth and growth was inhibited on medium containing 0.2% triphenyltetrazolium chloride. Polyphasic taxonomical methods based on utilization of carbon sources, cellular fatty acid profile analysis by the Sherlock® Microbial Identification System, and comparison of multilocus sequence analysis of genes (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD*) were performed. Results strongly supported the identification of these bacteria as *Xanthomonas axonopodis*. The host range of bacteria was evaluated by inoculation on plant species which are previously reported as host of *X. axonopodis*. The isolates only infected *Eucalyptus* sp. and gave the typical symptoms. From these results, the causal organism of angular leaf spot in eucalyptus is identified as *X. axonopodis* pv. *eucalypti*

Keywords: Eucalyptus, *Xanthomonas* sp., Angular leaf spot disease, Multilocus sequence analysis

---

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

รับเรื่อง : มีนาคม 2557

*Corresponding author : agrwck@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จากการสำรวจโรคยูคาลิปตัสในช่วงปี 2554-2555 ในจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดขอนแก่น พบอาการแผลจุดเหลี่ยม ฉ่ำน้ำ และแผลจุดเหลี่ยมสีน้ำตาลดำบนใบยูคาลิปตัส ทำความเสียหายให้กับการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสอย่างรุนแรง โดยสามารถแยกเชื้อจากแผลที่แสดงอาการดังกล่าวได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคด้วยวิธีการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อบนต้นกล้ายูคาลิปตัสที่มีอายุประมาณ 1 เดือน พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลทที่ทำให้เกิดอาการของโรคและแสดงอาการเหมือนที่พบข้างต้น เชื้อทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรีย แกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรงมีความกว้าง 0.5-0.8 µm ความยาว 1.6-3.0 µm มีแฟลกเจลลาแบบ monotrichous flagellum เซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเรียงต่อกันเป็นคู่ เชื้อมีลักษณะโคโลนี สีเหลือง กลมนูน สร้างเมือกเยิ้ม บนอาหาร YDC สร้างรงควัตถุชนิด xanthomonadin ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต แต่ไม่เจริญบนอาหารที่เติม 0.2% triphenyl tetrazolium chloride เมื่อตรวจสอบลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนบางลักษณะ การจำแนกเชื้อด้วยการวิเคราะห์รูปแบบชนิดกรดไขมันด้วย Sherlock® Microbial Identification System และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multilocus sequence analysis ของยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* และเมื่อทดสอบการเกิดโรคกับพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* พบว่าเชื้อนี้เกิดโรคได้เฉพาะในยูคาลิปตัสเท่านั้น จากผลการทดลองดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมในยูคาลิปตัสที่พบ คือเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti*

คำนำ

โรคใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัส เป็นโรคสำคัญที่เข้าทำลายต้นกล้ายูคาลิปตัสที่พบในประเทศไทย ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกิ่งปักชำลดต่ำลง ต้นกล้าที่ได้ไม่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่ต้องการ ส่งผลให้ผลิตต้นกล้าพันธุ์ดีไม่เพียงพอกับความต้องการ โดยลักษณะอาการเริ่มแรกที่พบ คือ ใบมีจุดฉ่ำน้ำ แผลขยายขนาดเป็นจุดเหลี่ยมสีน้ำตาล หรือน้ำตาลดำ การกระจายตัวของแผลเกิดบริเวณเส้นกลางใบ ขอบใบ หรือกระจายทั่วใบ ซึ่งลักษณะอาการโรคที่กล่าวมาข้างต้น ยังไม่มีการรายงานในประเทศไทยว่าเกิดเนื่องจากเชื้อสาเหตุชนิดใด พบรายงานลักษณะอาการที่คล้ายกันนี้ ในประเทศออสเตรเลีย แอฟริกาใต้ บราซิล นิวซีแลนด์ อุรุกวัย และอาร์เจนตินา โดยพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas eucalypti* (Truman, 1974) เชื้อ *Erwinia psidii* และ *Pantoea ananatis* (Coutinho *et al*., 2002) *X. axonopodis, Pseudomonas cichorii* และเชื้อในวงศ์ Rhizobiaceae (Goncalves *et al*., 2008) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสที่พบในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมป้องกันโรคนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างใบยูคาลิปตัสที่แสดงอาการ แผลจุดเหลี่ยมฉ่ำน้ำ และสีน้ำตาลดำ จากแหล่งเพาะชำกล้ายูคาลิปตัสจาก 2 จังหวัด คือ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดขอนแก่น ระหว่างช่วงปี 2554-2555 จำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 9 ตัวอย่างเป็นยูคาลิปตัสลูกผสมระหว่าง *Eucalyptus camaldulensis* และ *Eucalyptus urophylla* นำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Cross Streak Plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ย้ายโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ลูปแตะโคโลนีแบคทีเรีย มาใส่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 500 µl เขย่ากระจายเชื้อด้วยเครื่อง vortex mixer นำมา cross streak บนอาหาร NA ตรวจสอบลักษณะโคโลนี และทำซ้ำจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ (Kositratana, 2006)

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับความเข้มข้นเชื้อโดยนำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 (จะมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^7 cfu./ml) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic20$^+$, Milton Roy, USA.) นำมาผสมกับสาร Triton X-100 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% ก่อนนำไปปลูกเชื้อบนต้นกล้ายูคาลิปตัสลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* และ *E. urophylla* ที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ด้วยวิธีการฉีดพ่นบริเวณใบจนทั่วต้น โดยใช้การฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีควบคุม คลุมต้นกล้าด้วยถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเปิดถุงพลาสติกออก สังเกตอาการทุกๆ วัน เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ (Coutinho *et al*., 2002; Goncalves *et al*., 2008)

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติของผนังเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม (Gram's staining) และ ศึกษาชนิดของแฟลกเจลลาแบคทีเรียด้วยวิธี Dip preparation โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตัดวุ้นบริเวณที่มีโคโลนีเชื้อใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 500 µl รอจนกระทั่งแบคทีเรียว่ายออกมาอยู่ในน้ำ จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อหยดลงบนแผ่นกริดด้านที่เคลือบ Formvar film ทิ้งไว้ 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและใช้กระดาษกรองซับออก แล้วย้อมสีโดยหยดสาร 1% uranyl acetate ลงบนกริด ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและซับให้แห้ง นำไปตรวจลักษณะรูปร่างเซลล์ และแฟลกเจลลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (Jeol Model JEM 1220, Japan) (Schaad *et al*., 2001)

การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา fermentation และ oxidation การเจริญบนอาหาร YDC การสร้างรงควัตถุและสาร xanthomonadin โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดใน methanol ช่วงความยาวคลื่น 350-550 nm การสร้างรงควัตถุเรืองแสง Fluorescent ตามวิธีการของ Schaad *et al*., (2001) ทดสอบการเจริญในอาหาร YPA ที่เติม triphenyltetrazolium chloride 0.2% ตามวิธีการของ Young *et al*., (2010) ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนด้วยชุดตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนสำเร็จรูป GN2 MicroPlate ™ (Biolog Inc., USA)

การจำแนกเชื้อด้วยรูปแบบชนิดกรดไขมัน ด้วย Sherlock® Microbial Identification System

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค 5 ไอโซเลท ไอโซเลทละ 2 ซ้ำ ไปวิเคราะห์รูปแบบชนิดกรดไขมัน (Cellular fatty acid analysis by Gas Chromatography; FAME) ด้วยระบบ Sherlock® Microbial Identification System (MIDI, Inc., Newark DE, USA) (Sasser, 1990) โดยนำส่งเชื้อตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

การจำแนกเชื้อโดยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA)

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัสที่บริสุทธิ์ 2 ไอโซเลท คือ KJB14-1-2011ซึ่งเป็นตัวแทนของโคโลนีกลุ่มกลมใหญ่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 mm และ KJB-2-2011 ซึ่งเป็นตัวแทนของโคโลนีกลมเล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 mm มาเลี้ยงในอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อมาเจือจางในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 200 µl เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 3 µl ใส่ในสารที่ทำปฏิกิริยา PCR สังเคราะห์ยีน ได้แก่ ยีน *dnaK* (XdnaK1F:

GGTGGAAGACCTGGTCAAGA , XdnaK1R : TCC TTGACYTCGGTGAACTC) ยีน *fyuA* (XfyuA1F : AGCTACGAYGTGCGYTACGA, XfyuA1R: GTTCAC GCCRAACTGGTAG) ยีน *gyrB* (XgyrB1F: ACGAGT ACAACCCGGACAA, XgyrB1F: ACGAGTACAACC CGGACAA) และยีน *rpoD* (XrpoD1F: TGGAACAGG GCTATCTGACC, XrpoD1R: CATTCYAGGTTGGTC TGRTT) (Young *et al*., 2008) ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, dNTP ชนิดละ 0.2 mM, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ของแต่ละยีน อย่างละ 0.4 µM และ Taq DNA polymerase 1 U ในปริมาตรสุดท้าย 20 µl โดยใช้รอบในการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นที่ 1 predenaturation 94 ºC 3 นาที ขั้นที่ 2 denaturation 94 ºC 30 วินาที ขั้นที่ 3 annealing 56 ºC 50 วินาที ขั้นที่ 4 extension 72 ºC 1 นาที และ ขั้นที่ 5 final extension 72 ºC 7 นาที ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ (ดัดแปลงจาก Young *et al*., 2008) โดยเครื่อง Thermal cycler ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นเจล 1.0% ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene, Cambridge, UK) บันทึกภาพ และสกัด PCR product ด้วยชุดสกัด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Jhongli, Taiwan) ตามวิธีการที่แนะนำจากผู้ผลิต จากนั้นโคลนชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy (Promega, Madison, USA) และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock transformation ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเจ้าบ้าน และนำมาสกัดพลาสมิดและส่งพลาสมิดวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนไพรเมอร์ของพลาสมิดเวกเตอร์ออกด้วยโปรแกรม VecScreen ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html) และเรียงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ยีน โดยเรียงลำดับจากยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* (Young *et al*., 2008) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW จัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและจัดทำ Phylogenic tree โดยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 (Tamura *et al*., 2011) เชื้อแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) ที่นำมาเปรียบเทียบอยู่ในฐานข้อมูล International Collection of Micro-organisms from Plant (ICMP) ได้แก่ *X. albilineans* (ICMP 10041), *X. arboricola* (ICMP 35), *X. axonopodis* (ICMP 50), *X. axonopodis* pv. *citri* (ICMP 21), *X. fuscans* (ICMP 239), *X. euvesicatoria* (ICMP 109), *X. bromi* (ICMP 12545), *X. campestris* (ICMP 13), *X. cassavae* (ICMP 204), *X. codiaei* (ICMP 9513), *X. cucurbitae* (ICMP 2299), *X. cynarae* (ICMP 16775), *X. dyei* pv. *dyoxyli* (ICMP 2415), *X. fragariae* (ICMP 5715), *X. gardneri* (ICMP 16689), *X. hortorum* (ICMP 453), *X. hyacinthi* (ICMP 189), *X. melonis* (ICMP 8682), *X. oryzae* (ICMP 3125), *X. perforans* (ICMP 16690), *X. pisi* (ICMP 570), *X. populi* (ICMP 5816), *X. sacchari* (ICMP 16916), *X. theicola* (ICMP 6774), *X. translucens* (ICMP 5752), *X. vasicolar* (ICMP 3103), *X. vesicatoria* (ICMP 63), *X. dyei* (ICMP 5382), *X. dyei* (ICMP 6041) และ *Stenotrophomonas maltophilia* (ICMP 17033)

การทดสอบพืชอาศัยอื่น ๆเพื่อระบุ Pathovar

เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อดังวิธีการที่กล่าวข้างต้น นำไปปลูกเชื้อลงบนใบต้นกล้ายูคาลิปตัสลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* และ *E. urophylla,* บีโกเนีย (*Begonia* sp.), มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*), ละหุ่ง (*Ricinus communis*), ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*), สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia* sp.), ฝรั่ง (*Psidium guajava*), ต้นหว้า (*Syzygium cumini*), ผักกาดหอม (*Lettuca sativa*), มะนาว (*Citrus aurantifolia*), ต้นคริสต์มาส (*Euphorbia pulcherrima*), ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*), มะละกอ (*Carica papaya*), พริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum*), ถั่วเหลือง (*Glycine max*), มะขาม

(*Tamarindus indica*), ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*), และมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) ซึ่งพืชเหล่านี้มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* (Coutinho *et al*., 2002; Goncalves *et al*., 2008, Vauterin et al., 1995; Young et al., 2008) โดยปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดพ่นบริเวณใบจนทั่วต้น และใช้น้ำเป็นกรรมวิธีควบคุม ปลูกเชื้อในพืชแต่ละชนิดจำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี และคลุมต้นด้วยถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเปิดถุงพลาสติกออก สังเกตอาการทุกๆ วัน เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

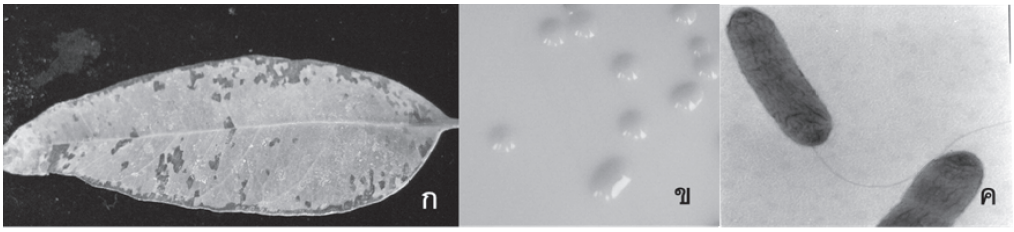
จากตัวอย่างใบยูคาลิปตัส ที่แสดงอาการใบจุดเหลี่ยมฉ่ำน้ำ และแผลจุดเหลี่ยมสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 1ก) ที่เก็บจากแหล่งเพาะชำกล้ายูคาลิปตัสในจังหวัดกาญจนบุรี และขอนแก่น จังหวัดละ 6 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำมาแยกเชื้อ พบเชื้อแบคทีเรีย ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* และ *Xanthomonas* คือมีลักษณะกลมนูน เป็นมันวาว สีขาวครีม จนถึงสีเหลือง ติดสีแกรมลบ ซึ่งเป็นลักษณะเชื้อดังกล่าวข้างต้นที่เคยมีรายงานว่าเป็นเชื้อทำให้เกิดโรคใบไหม้ ยอดแห้งตาย และใบจุดกับต้นกล้ายูคาลิปตัส (Coutinho *et al*., 2002; Goncalves *et al*., 2008) จำนวน 28 ไอโซเลท

การทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรค พบว่ามีเชื้อจำนวน 21 ไอโซเลท ที่เป็นเชื้อก่อโรค ทำให้ยูคาลิปตัสเกิดอาการใบจุดเหลี่ยม ฉ่ำน้ำ ภายใน 6 วัน และเป็นแผลจุดเหลี่ยมสีน้ำตาลดำ ภายใน 14 วัน หลังจากปลูกเชื้อ ซึ่งทั้ง 21 ไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม นูน มันวาว เมื่อเลี้ยงบนอาหาร YDC (ภาพที่ 1ข) ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายกับเชื้อในจีนัส *Xanthomonas*

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการสร้างรงควัตถุ

การทดสอบการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้ง 21 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ปลายมน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเรียงเป็นคู่ เซลล์มีขนาดความกว้าง 0.5-0.8 µm ความยาว 1.6-3.0 µm โคโลนีบนอาหาร YDC มีลักษณะกลมนูน สีเหลือง สร้างเมือกเยิ้ม ทึบแสง เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศเท่านั้น ไม่เจริญในอาหารที่เติม triphenyltetrazolium chloride 0.2% ไม่เกิดปฏิกิริยา fermentation และเมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบางไอโซเลทไปศึกษา พบว่ามีแฟลกเจลลาเป็นแบบ monotrichous flagellum (ภาพที่ 1ค) มีรงควัตถุชนิด xanthomonadin ไม่สร้างรงควัตถุเรืองแสงชนิด fluorescent ผลการทดสอบในขั้นนี้สรุปได้ว่าเชื้อจัดอยู่ในจีนัส *Xanthomonas* (Schaad *et al*., 2001) และการใช้แหล่งคาร์บอนสำเร็จรูป GN2 MicroPlate™ พบว่ามีการใช้และไม่ใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิดคล้ายกับของเชื้อ *X. axonopodis* ได้แก่ มีการใช้ D-cellobiose, Gentibiose, β-Methyl-D-glucoside, L-raffinose, Succinic acid mono-methyl-ester, Succinic acid, Bromosuccinic acid, D-alanine, L-alanine, L-alanyl-glycine และไม่มีการใช้ D-Galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, p-Hydroxy phenylacetic acid, α-keto valeric, Quinic acid, Glucuronamide, L-Proline และ Thymidine (Vauterin *et al*., 1996; Kasinrum, 2013)



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการใบจุดเหลี่ยมยูคาลิปตัส (ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร YDC ที่อายุ 48 ชั่วโมง (ข) ลักษณะ monotrichous flagellum ของเชื้อที่แยกได้จากยูคาลิปตัส (ค)

การศึกษารูปแบบชนิดกรดไขมันของเชื้อก่อโรคในยูคาลิปตัส โดยใช้ Sherlock® Microbial Identification System

จากการวิเคราะห์รูปแบบชนิดของกรดไขมันที่พบในเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ไอโซเลท คือ KJB14-1-2011, KJB14-2-2011, KJB18-2-2012, KKHD8-1-2012 และ KJB12-5-2012 จัดอยู่ในจีนัส *Xanthomonas* เนื่องจากมีกรดไขมันชนิด 11 iso, 11 iso 3OH, และ 13 iso 3OH ซึ่งเป็นกลุ่มเด่นที่พบในจีนัสนี้ และเมื่อนำรูปแบบชนิดกรดไขมันเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Sherlock® Microbial Identification System พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *X. axonopodis* โดยมีค่า Similarity index เท่ากับ 0.48, 0.58, 0.56, 0.56 และ 0.49 ตามลำดับ ซึ่งค่า Similarity index ในระดับนี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกในระดับจีนัสได้

เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท กับเชื้อ *Xanthomonas* 20 กลุ่ม ที่จัดจำแนกโดย Vauterin *et al*. (1996) พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *X. axonopodis* มากที่สุด ด้วยการพบชนิดและปริมาณของกรดไขมันได้แก่ 14:0, 16:0, 10:0 3OH, 11:0 anteiso, 13:0 iso, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso และ17:0 anteiso (ตารางที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมัน ระหว่างเชื้อ *X. dyei* pv. *eucalypti* ซึ่งเดิมจัดจำแนกเป็นเชื้อ *X. campestris pv. eucalypti* สาเหตุโรคใบจุด และยอดแห้งตายของยูคาลิปตัส ในประเทศออสเตรเลีย (Truman, 1974) กับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทในการทดลองนี้ พบว่ามีชนิดและปริมาณกรดไขมัน ได้แก่กรดไขมัน ชนิด 14:0, 15:0, 11:0 anteiso, 13:0 anteiso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso และ iso 17:1 ω 9c (Young *et al*., 2010; Kasinrum, 2013) แตกต่างกันอย่างชัดเจน (ตารางที่ 1) ซึ่งบ่งชี้ว่า เชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้ต่างจากเชื้อ *X. dyei* pv. *eucalypti* หรือ *X. campestris pv. eucalypti* อนึ่ง Vauturin *et al*. (1996) รายงานว่าการวิเคราะห์จำแนกด้วยกรดไขมัน จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ของเชื้อจีนัส *Xanthomonas* ส่วนใหญ่ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *X. axonopodis* กับ *X. arboricola* และ *X. axonopodis* กับ *X. campestris* ออกจากกัน จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ เพิ่มเติม

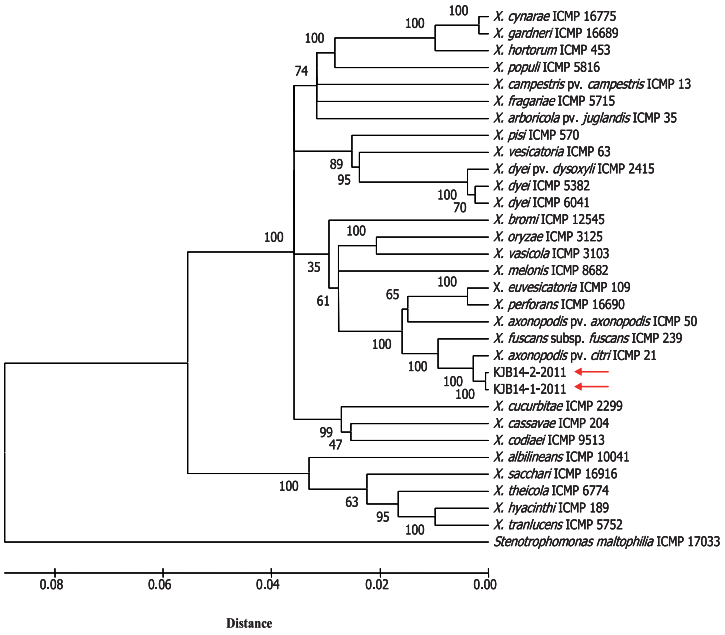
การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดย Multilocus sequence analysis

ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค Multilocus sequence analysis (MLSA) โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dnaK* (940 bp), *fyuA* (698 bp), *gyrB* (865 bp) และ *rpoD* (875 bp) ที่นำมาเรียงต่อกัน ได้ขนาด 3,378 bp พบว่าเชื้อไอโซเลท KJB14-1-2011 และ KJB14-2-2011 มีความเหมือนกันสูงถึง 99.8% และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Xanthomonas* spp. ที่เป็น type strainในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 88.95-99.41% ที่ค่า distance 0.027 พบว่าเชื้อไอโซเลท KJB14-1-2011 และ KJB14-2-2011 จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* โดยมีค่า bootstrap สนับสนุน 100% (ภาพที่ 2) โดยเชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วย

X. euvesicatoria, *X. perforans*, *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. fuscans* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 96.62-99.47% ซึ่งจากการศึกษาของ Young et al. (2008) โดยวิธีการ MLSA จัดเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อ *X. axonopodis* เมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้งสองไอโซเลทกับเชื้อ *X. campestris* พบความต่างที่ระดับ 91.4% และต่างจากเชื้อ *X. dyei* ที่ระดับ 92.4% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Young *et al.* (2008) ที่พบว่าเชื้อ *Xanthomonas* ที่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน เหมือนกันมากกว่า 96% และผลการจัดจำแนกด้วยเทคนิค MLSA ด้วยยีนทั้ง 4 นี้ยังสามารถใช้เป็นวิธีการมาตรฐาน และวิธีทางเลือกในการจำแนกเชื้อ *Xanthomonas* (Young *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2010) และเชื้อแบคทีเรียในจีนัสอื่นๆ ได้ (Gevers *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2007) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีการจำแนกมาตรฐานด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ต้องมีเชื้ออ้างอิง ที่ใช้เปรียบเทียบและมีบุคลากรที่ชำนาญการ

การทดสอบพืชอาศัยเพื่อจัดจำแนกระดับ Pathovar

พบว่า เชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้ทำให้เกิดโรคได้เฉพาะกับยูคาลิปตัสเท่านั้น ไม่พบการเกิดโรคในพืชชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีพืชอาศัยเฉพาะกับยูคาลิปตัส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Goncalves (2003) ซึ่งจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส ที่พบแพร่ระบาดในประเทศบราซิล เป็นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* และจากการทดสอบพืชอาศัยพบว่าเข้าทำลายเฉพาะยูคาลิปตัสส จึงเสนอตั้งชื่อเป็น *X. axonopodis* pv. *eucalypti*



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* ที่นำมาเชื่อมต่อกันความยาวทั้งหมดเท่ากับ 3,378 นิวคลีโอไทด์ ของเชื้อไอโซเลท KJB14-1-2011 และ KJB14-2-2011 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) ในจีนัส *Xanthomonas* โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขที่อยู่บริเวณจุดแยกเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 2000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA 5.1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติที่ใช้การทดสอบในการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุใบจุดเหลี่ยมของยูคาลิปตัส

เชื้อ	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี[5]	การใช้แหล่งคาร์บอน[6]	เปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters)												การเกิดโรคบนพืชอาศัย
			14:00	15:00	16:00	10:0 3OH	11:0 anteiso	13:0 iso	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0 iso	17:0 anteiso	17:0 iso	Iso 17:1 ω9c	
X. axonopodis[1]	+	+[7]	1.1±1.2	1.3±0.9	4.1±2.0	0.2±0.2	0.0±0.1	0.2±0.3	28.2±6.7	9.3±3.5	2.6±1.5	0.4±0.5	6.7±2.8	6.5±3.1	หลายชนิด
X.axonopodis pv. *eucalypti*[2]	+	Nd[7]	1.36	1.83	3.27	0.49	0.19	0.79	33.42	6.7	1.72	0.29	4.57	5.04	ยูคาลิปตัส
เชื้อในการทดลองนี้	+	+	2.6±0.2	5.3±0.5	6.3±0.8	0.3±0.0	0.2±0.0	0.5±0.1	28.4±1.3	9.4±0.6	1.1±0.1	0.3±0.0	2.7±0.2	3.0±0.1	ยูคาลิปตัส[8]
X. campestris[3]	+	-[7]	0.8±0.4	1.2±0.6	3.6±1.0	0.0±0.1	-	0.0±0.2	26.5±3.4	13.9±2.2	3.2±1.3	0.8±0.5	6.8±1.4	8.5±2.1	หลายชนิด
X. dyei[4]	+	Nd	4.7±2.5	0.9±0.4	5.6±2.3	0.3±0.3	0.5±0.2	0.1±0.2	23.6±10.6	15.6±6.0	0.8±0.3	-	1.9±0.7	4.4±2.6	ยูคาลิปตัส

[1] *Xanthomonas axonopodis* (Vauterin *et al*., 1996); [2]*X. axonopodis* pv. *eucalypti* (Goncalves *et al*., 2008), [3] *X. campestris* (Vauterin *et al*., 1996), [4] *X. dyei* (Young *et al*., 2010)

[5] ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ แกรมลบ รูปร่าง ท่อน แฟลกเจลลาแบบ monotrichous flagellum โคโลนีบนอาหาร YDC มีลักษณะสีเหลือง กลมนูน สร้างเมือกเยิ้ม สร้างรงควัตถุชนิด xanthomonadin ไม่สร้างรงควัตถุเรืองแสงชนิด fluorescence ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ไม่เจริญบนอาหารที่เติม 0.2% triphenyltetrazolium chloride

[6] มีการใช้แหล่งคาร์บอนบนอาหารในจานหลุม GN2 Microplate™ ได้แก่ D-cellobiose, Gentibiose, β-Methyl-D-glucoside, L-raffinose, Succinic acid mono-methyl-ester, Succinic acid, Bromosuccinic acid, D-alanine, Lalanine, L-alanyl-glycine และไม่มีการใช้ D-Galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, p-Hydroxy phenylacetic acid, α-keto valeric, Quinic acid, Glucuronamide, L-Proline และ Thymidine (Vauterin *et al*., 1996)

[7] + หมายถึง มีลักษณะตรงตามลักษณะที่ระบุ,- หมายถึง มีลักษณะไม่ตรงตามลักษณะที่ระบุ, Nd หมายถึง ไม่มีข้อมูล

[8] การทดสอบพืชอาศัยที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของ *Xanthomonas axonopodis* ได้แก่ ยูคาลิปตัสลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* และ *E. urophylla,* บีโกเนีย (*Begonia* sp.), มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*), ละหุ่ง (*Ricinus communis*), ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*), สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia* sp.), ฝรั่ง (*Psidium guajava*), ต้นหว้า (*Syzygium cumini*), ผักกาดหอม (*Lettuca sativa*), มะนาว (*Citrus aurantifolia*), ต้นคริสต์มาส (*Euphorbia pulcherrima*), ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*), มะละกอ (*Carica papaya*), พริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum*), ถั่วเหลือง (*Glycine max*), มะขาม (*Tamarindus indica*), ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*), และมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*)

สรุป

อาการใบจุดเหลี่ยมสีน้ำตาล แผลฉ่ำน้ำของยูคาลิปตัส เมื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย และพิสูจน์โรคตามหลักการ Koch's postulation และนำมาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปร่าง เป็นท่อนตรง แกรมลบ มีแฟลกเจลลาแบบ monotrichous โคโลนีสีเหลือง กลมนูน เป็นมันวาว เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ ไม่เกิดปฏิกิริยา fermentation ไม่เจริญบนอาหารที่เติม triphenyltetrazolium chloride 0.2% และเชื้อมีรงควัตถุชนิด xanthomonadin ประกอบกับการใช้แหล่งคาร์บอนคล้ายกับที่รายงานในเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* การวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบในเชื้อจีนัส *Xanthomonas* พบว่าคล้ายกับของเชื้อ *X. axonopodis* และ *X. campestris* ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้งสอง อย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* ที่นำมาเรียงต่อกัน (mutilocus sequence analysis) สามารถจำแนกเชื้อนี้เป็น *X. axonopodis* และเมื่อทดสอบการเกิดโรคกับพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* พบว่าทำให้เกิดโรคได้เฉพาะกับยูคาลิปตัสเท่านั้น จากข้อมูลทั้งหมดดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของ ยูคาลิปตัสที่พบคือเชื้อ *X. axonopodis* pv. *eucalypti*

เอกสารอ้างอิง

Coutinho, T., O. Preisig, J. Mergaert, M.C. Cnockaert, R.H. Riedel, J. Swings and M.J. Wingfield. 2002. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. Plant Disease 86: 20-25.

Gevers, D., F.M. Cohan, J.G. Lawrence, B.G.Spratt, T. Coenye, E.J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F.L. Thompson and J. Swings. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. Nature Reviews Microbiology 3: 733-739.

Goncalves, R.C. 2003. Etiology of bacterial leaf spot on eucalyptus in Brazil. D.S. Dissertation, Universidade Federal de Vicosa. (in Portuguese)

Goncalves, R.C., D. Lau, J.R. Oliveira, L.A. Maffia, J.C.M. Cascardo and A.C. Alfenas. 2008. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. Tropical Plant Pathology 33: 180-188.

Kasinrum, P. 2013. Identification of eucalyptus angular leaf spot bacteria. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Kositratana, W. 2006. Plant Pathogenic Bacteria: Laboratory., 2nd Edition. Faculty of Agri culture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. 161 P. (in Thai)

Martens, M., M. Delaere, R. Coopman, P.De Vos, M. Gillis and A. Willems, 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 489-503.

Saitou, N. And M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution 4: 406-425.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2,344 p.

Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, pp. 199-204. *In* Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands, eds. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kaido. Budapest.

Schaad, N.W., J.B. Jones and G.H. Lacy. 2001. *Xanthomonas*, pp. 175-199. *In* N. W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun, eds. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. Minnesota.

Truman, R. 1974. Die-Back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. Phytopathology 64:143-144.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Available source: http://kumarlab.net/pdf_ new/ TamuraKumar11.pdf. August 25, 2011.

Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 472-489.

Vauterin, L., P. Yang and J. Swings. 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 298-304.

Young, J.M., D.-C. Park, H.M. Shearman and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Systematic and Applied Microbiology 31: 366-377.

Young, J. M., J. P. Wilkie, D.-C. Park and D. R. W. Watson. 2010. New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. Plant Pathology 59: 270-281.