

การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะแบคทีเรียที่ก่อโรคเหี่ยวกระชาย (*Boesenbergia rotunda* L.) ในจังหวัดพิจิตร

Isolation and Characterization of Bacteria Causing Bacterial Wilt in Fingerroot (*Boesenbergia rotunda* L.) in Phichit Province

บุญยาพร ภาคภูมิ^{1*} วาสนา สุภาพรหม² และเกษร แชมชื่น²

Boonyaporn Parkpoom^{1*} Watsana Supaprom² and Kesorn Chaemcheun²

¹ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

¹Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand 10900

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร จังหวัดพิจิตร 66000

²Phichit Agricultural Research and Development Center, Phichit, Thailand 66000

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวของกระชายจากจังหวัดพิจิตรมาแยกเชื้อสาเหตุโรค โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูอ่อนตรงกลาง กลม ขอบเรียบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ triphenyl tetrazolium chloride (TZC) และลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน กลม มันวาว นูน เมื่อนำมาเลี้ยงต่อบนอาหาร nutrient agar (NA) ทดสอบการติดสีแบบแกรม คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าทั้ง 26 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบและมีการใช้น้ำตาล dextrose lactose mannitol maltose และ sorbitol เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* แต่ให้ผลลบกับคูไพรเมอร์ *Psol_flic-F/ Psol_flic-R* และ 759/ 760/ *Nmutl21:1F/ Nmutl21:2F/ Nmutl23:AF/ Nmutl22:lnF/ Nmutl22:RR* ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท วิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Enterobacter* spp.

คำสำคัญ: แบคทีเรีย โรค กระชาย เหี่ยว

Abstract

Samples of bacterial wilt of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) were collected from Phichit Province, Thailand. Bacterial isolates showing irregular, whitish, fluidal single colonies with a pinkish center on triphenyl tetrazolium chloride (TZC) medium were selected. On nutrient agar (NA), the colonies appeared white with an entire margin. A total of 26 bacterial isolates that fulfilled these morphological criteria were further characterized by Gram staining, as well as physiological and biochemical tests. All 26 isolates were Gram-negative and were capable of utilizing dextrose, lactose, mannitol, maltose, and sorbitol, which are characteristic of *Ralstonia solanacearum*. However, PCR detection using *R. solanacearum*-specific primer sets (Psol_{flic}-F/Psol_{flic}-R, 759/760, Nmutl21:1F/Nmutl21:2F, Nmutl23:AF/Nmutl22:InF/Nmutl22:RR) yielded negative results for all isolates. Subsequently, 16S rRNA gene sequences from five representative isolates were analyzed using BLAST against the NCBI non-redundant nucleotide database. The results indicated that these isolates were closely related to *Enterobacter* spp.

Keywords: bacteria, disease, galingale, bacterial wilt

บทนำ

กระชาย (fingerroot) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia rotunda* (L.) พืชล้มลุก เหง้าหรือลำต้นอยู่ใต้ดิน นิยมปลูกเป็นพืชสวนครัวเพราะมีกลิ่น รสชาติอันเป็นเอกลักษณ์อุดมไปด้วยสารอาหารบำรุงร่างกาย สารสำคัญในกระชาย คือ kaempferol quercetin และ panduratinA มีสรรพคุณต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้ดี ด้านการอักเสบ ลดไข้ มีสารยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเชื้อโควิด-19 เมื่อมีการจำลองภาพสามมิติในคอมพิวเตอร์ (Sanmun, 2023) ทำให้ผลผลิตกระชายเป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น เกษตรกรในจังหวัดพิจิตรจึงมีการขยายพื้นที่การปลูกกระชายจาก 795 ไร่ ในปี 2560 เป็น 1,200 ไร่ ในปี 2567 โดยพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ตั้งอยู่ในอำเภอโพธิ์ประทับช้าง และอำเภอบึงนาราง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2568) พันธุ์

กระชายที่เกษตรกรนิยม คือ กระชายพื้นเมืองที่มีลักษณะ รากสั้นและมีปุ่มตรงปลาย หรือ ที่เรียกว่ากระชายปุ่ม

จากการลงพื้นที่เพื่อสำรวจสภาพปัญหาการผลิตกระชายในพื้นที่จังหวัดพิจิตร พบว่า โรคเน่าเป็นปัญหาหลักของการผลิตกระชายในพื้นที่ โดยทำให้ต้นกระชายแสดงอาการเส้นใบเหลือง ใบไหม้ และม้วน ลามเข้าหาขอบใบ บริเวณโคนต้นและหน่อที่แตกมีลักษณะฉ่ำน้ำ เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต่อมาเน่าเปื่อยหลุดจากเหง้า ซึ่งอาการดังกล่าวถูกวินิจฉัยว่าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย และในการจัดการโรคพืชของเกษตรกรใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ฉีดพ่นทางใบ จากการรายงาน พบว่าเกิดอาการเน่าสามารถเกิดได้จากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Fusarium* sp. (กนิษฐา สังคะหะ และคณะ, 2549) และเชื้อรา *Sclerotium* sp. (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) และเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* (ศักดิ์ สุนทร

สิงห์, 2537; Jibat and Alo, 2020) โดยโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคที่จัดว่ามีความสำคัญและสร้างความเสียหายให้กับพืชที่ปลูกมากที่สุด อย่างไรก็ตาม การเกิดโรคเน่าของกระชายในจังหวัดพิจิตร ยังไม่มีการจำแนกเชื้อสาเหตุของโรค ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ระบุและจำแนกเชื้อสาเหตุโรค ในต้นกระชายที่มีอาการคล้ายอาการจากเชื้อแบคทีเรียจากกระชายที่แสดงอาการเหี่ยวในพื้นที่ของจังหวัดพิจิตรให้บริสุทธิ์ พิสูจน์การก่อโรค ตรวจระบุชนิดและจำแนกกลุ่มของเชื้อสาเหตุบางประการ เพื่อนำไปสู่การจัดการโรคพืชที่ถูกวิธี ให้ได้ผลผลิตที่ดี มีคุณภาพตามความต้องการของตลาดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างต้นกระชายที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง ใบไหม้ และม้วน ลามเข้าหาขอบใบ บริเวณโคนต้น และหน่อที่แตกมีลักษณะฉ่ำน้ำ เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต่อมาเนาเปื่อยหลุดจากเหง้าโดยง่ายแต่จะไม่มีการกลืนเห็บ (Figure 1) ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ตามรายงานของ (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537; Jibat and Alo, 2020; Kumar et al., 2014) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างพืชเป็นรูปตัว x แต่ละจุดห่างกัน 1.5-2.0 เมตร รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ในพื้นที่การเพาะปลูกอำเภอโพธิ์ประทับช้าง และอำเภอบึงนาราง จังหวัดพิจิตร ช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2566 จากนั้นนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ณ ห้องปฏิบัติการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

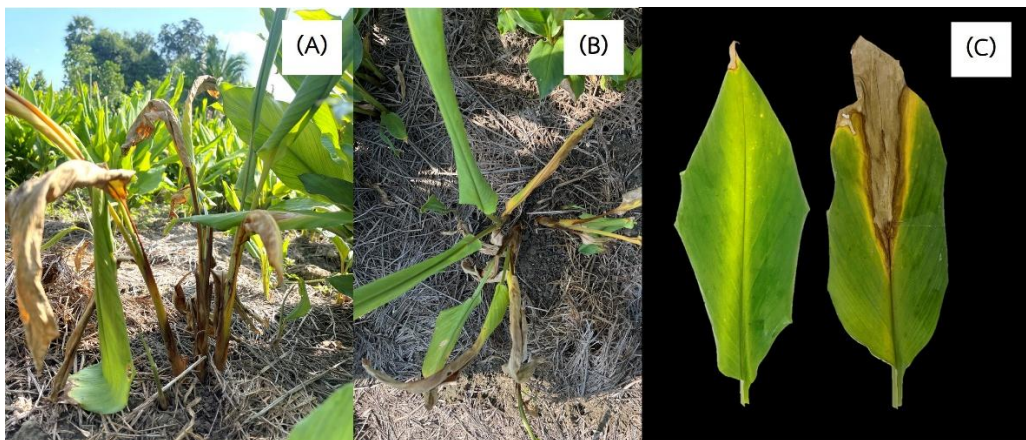


Figure 1 Symptoms of wilt on natural infected field fingerroot (A-B), Symptom on fingerroot leaf (C)

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากต้นกระชายที่แสดงอาการเหี่ยว ฟอกฆ่าเชื้อโดยตัดเอาโคนต้นบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่แสดงอาการ จากนั้นแช่ใน 70% EtOH

เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งนาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากนั้นบดชิ้นพืชในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไป spread plate บนอาหาร triphenyl tetrazolium chloride (TZC) แล้วบ่มที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีเป้าหมายมีลักษณะสีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูตรงกลางโคโลนี ขอบเรียบของเชื้อ (single colony) นำมาเลี้ยงต่อบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียใน 60% glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ

ทำการตรวจสอบ 2 วิธี ประกอบด้วย (1) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีจากการย้อมสีแบบแกรมตามวิธีการของ (Schaad et al., 2001) และ (2) การใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ dextrose lactose maltose mannitol และ sorbitol ตามวิธีการของ (Hayward, 1964) โดยน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดที่เลือกนำมาทดสอบเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา เมื่อมีการใช้น้ำตาลจะทำให้สื่อน้ำเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สกัด genomic DNA แบคทีเรียโดยใช้วิธี modified CTAB (Sambrook et al., 1989) นำดีเอ็นเอตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาด้วยไพรเมอร์ 759: 5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3' / 760: 5'-GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATGG-3' / Nmutl21: 1F: 5'-CGTTGATGAGGCGCGCAATTT-3' / Nmutl21: 2F: 5'-AAGTTATGGACGGTGGAAGTC-3' / Nmutl23: AF: 5'-ATTACAGAGCAATCGAAAGATT-3' / Nmutl22: InF: 5'-ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA-3' / Nmutl22: RR: 5'-TCGCTTGACCCTATAACGAGTA-3' (Xu et al., 2009; Waki et al., 2013; She et al., 2017) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 2 แถบ โดยแถบที่ 1 ระบุว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ขนาด 280 bp และดีเอ็นเอแถบที่ 2 ระบุ phylogroup ของเชื้อแบคทีเรีย *R.*

solanacearum สามารถสังเคราะห์ได้ 4 ขนาด โดยขนาด 144 bp จัดอยู่ในกลุ่ม phylogroup I แถบดีเอ็นเอขนาด 372 bp จัดอยู่ในกลุ่ม phylogroup II แถบดีเอ็นเอขนาด 91 bp จัดอยู่ในกลุ่ม phylogroup III และกลุ่ม phylogroup IV แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 213 bp ในส่วนของยีน *egl* และคูไพรเมอร์ PsoI *flic*-F: 5'-GAACGCCAACGGTGCGAACT-3' / PsoI *flic*- R: 5'-GGCGGCCTTCAGGGAGGTC-3' (Schönfeld et al., 2003) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *flic* ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยชุดปฏิกิริยา TP1000 ExcelTag (Smobio, Taiwan) สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ T-Professional (Biometra, Germany) แยกขนาดของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่มีผลการจัดจำแนกเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทำการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA จำนวน 5 ไอโซเลทโดยใช้ไพรเมอร์ F8: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3' / rP2: 5'-ACGGCTACCTGTACGACTT-3' (Wahid et al., 2013) แล้วส่งให้บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไป blast เปรียบเทียบในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (cell suspension)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษานบนอาหาร NA อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างโคโลนีบนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($OD_{600\text{ nm}}$) ทำการเจือจางให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ที่มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (Spectrophotometer, Thermo fisher scientific evolution 300 PC, USA)

พิสูจน์การก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย (Koch's postulation)

พิสูจน์การก่อโรคในขึ้นแครอทและขิงหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาลงบนขึ้นแครอทและขิงที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนผิวพืชด้วยวิธีการหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อ 1 ขึ้น กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตอาการ 2-3 วันหลังจากการปลูกเชื้อ ดัดแปลงจากวิธีของ (Jayathilaka et al., 2006) สำหรับการพิสูจน์การก่อโรคบนหัวหอมใหญ่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนผิวพืช โดยฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียลงบนหัวหอมใหญ่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อ 1 หัว กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน ดัดแปลงจากวิธีการของ (Nishijima et al., 2004) และพิสูจน์การก่อโรคในต้นกระชายอายุ 1 เดือน โดยฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเข้าบริเวณลำต้นกระชาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 ต้นกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยปลูกเชื้อช่วงเวลาเย็น คลุมด้วยถุงพลาสติกนาน 12 ชั่วโมง แล้วนำถุงออก สังเกตอาการเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์หลังจากการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน ดัดแปลงจากวิธีของ (Paret et al., 2008) บันทึกผลเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะทำให้ขึ้นขิงเนื้อเยื่อขาวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต้นกระชายแสดงอาการเหี่ยว เส้นใบเหลือง ใบไหม้ ม้วน และลามเข้าหาขอบใบ ส่วนแครอทและหอมหัวใหญ่แสดงอาการปกติ

ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างกระชายจำนวน 13 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการเหี่ยว เส้นใบเหลือง ใบไหม้ และม้วน ลามเข้าหาขอบใบคล้ายตัว V ส่วนลำต้นพบบริเวณท่อน้ำ ท่ออาหารและบริเวณเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มาแยกเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TZC พบลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูอ่อนตรงกลางโคโลนี ขอบเรียบ จากนั้นย้ายโคโลนีเดียวของเชื้อมาเลี้ยงต่อบนอาหาร NA พบโคโลนีแบคทีเรียมีลักษณะสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน เยิ้ม มันวาว นูน (Figure 2) จำนวนทั้งสิ้น 26 ไอโซเลท ซึ่งโคโลนีบนหน้าอาหาร TZC และ NA มีลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์คล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* และสอดคล้องกับ (Jayathilaka et al., 2006; She et al., 2017) แต่การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนหน้าอาหารทำได้เพียงการคัดเลือกลักษณะโคโลนีที่สงสัยมาเพื่อศึกษาต่อไป เพราะเชื้อแบคทีเรียในบางจีโนม เช่น *Pectobacterium* spp. สาเหตุโรคเน่าและก็มีลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* เมื่ออยู่บนหน้าอาหาร NA จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการอื่นๆ ในการระบุและจำแนกเชื้อแบคทีเรียต่อไป



Figure 2 Colony characterization incubated at room temperature for 48 hours; triphenyl tetrazolium chloride (TZC) (A), nutrient agar (NA) (B)

การย้อมสีแบบแกรมและทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย

การย้อมสีแบบแกรม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ย้อมติดสีแดงของ safranin o เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ และมีการใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ dextrose lactose mannitol maltose และ sorbitol โดยอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* (positive control) ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *R. solanacearum* biovar 3 โดยน้ำตาทั้ง 5 ชนิด ที่นำมาศึกษาสามารถจัดจำแนก *R. solanacearum* biovar 1 ถึง 5 ได้ในเบื้องต้น จากการศึกษาของ Waki et al. (2013) รายงานว่าเชื้อ *R. solanacearum* ในพืชตระกูลขิงจากประเทศจีน ออสเตรเลียและอินโดเนเซียสามารถจำแนกได้เป็น *R. solanacearum* biovar 4 ส่วนประเทศญี่ปุ่นและไทยระบุเป็น เชื้อ *R. solanacearum* biovar 3 และ 4 ตามลำดับ โดยเชื้อ *R. solanacearum* biovar 3 มีการใช้น้ำตาล lactose maltose และ dextrose ส่วน biovar 4 ใช้น้ำตาล lactose maltose mannitol dextrose และ sorbitol (Schaad et al., 2001) แต่การย้อมสีแบบแกรมและทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรียยังไม่สามารถ

ระบุได้แน่นอนว่าเป็นเชื้อ *R. solanacearum* จึงต้องมีการทดสอบด้วยเทคนิคอื่นๆ สืบค้นต่อไป

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Psol_flic-F/ Psol_flic-R และ 759/760 / Nmutl21:1F / Nmutl21:2F / Nmutl23:AF/Nmutl22:InF/ Nmutl22:RR ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* (positive control) ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอมีขนาด 400 bp กับคู่ไพรเมอร์ Psol_flic-F/ Psol_flic-R และแถบดีเอ็นเอขนาด 281 bp และขนาด 144 bp จัดอยู่ในกลุ่ม phylotype I กับไพรเมอร์ 759/760 / Nmutl21:1F / Nmutl21:2F / Nmutl23:AF/Nmutl22:InF/ Nmutl22:RR เช่นเดียวกับ Waki et al. (2013) และ She et al. (2017) ใช้ไพรเมอร์ 759/ 760/ Numult21:1F/ Numult21:2F/ Numult23:AF/ Numult22:InF/ Numult22:RR และไพรเมอร์ Psol_flic-F/ Psol_flic-R ในการระบุจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* แต่ให้ผลบวกกับเชื้อแบคทีเรีย

ทั้ง 26 ไอโซเลทจากตัวอย่างกระชายที่แสดงอาการเหี่ยว จึงทำการระบุจัดจำแนกแบคทีเรียจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยใช้ ยีนบริเวณ 16s rRNA จำนวน 5 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ F8/ rP2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไป blast เปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้นและจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ถูกระบุว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter* spp. ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ หรือมีการเข้าทำลายซ้ำหลังจากเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง

พิสูจน์การก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย

(Koch's postulation)

พิสูจน์การก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลทลงพืช 4 ชนิด ได้แก่ หอมหัวใหญ่ หอมหัวเล็ก และกระชาย พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลท ทำให้หัวหอมใหญ่ และขิงแสดงอาการเน่า เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังจากการปลูกเชื้อ 10 วัน เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และแครอทที่ทำการปลูกเชื้อเริ่มแสดงอาการซ้ำที่ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นเนื้อเยื่อยุบตัวลงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อบ่มนานขึ้น เมื่อเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่น (กรรมวิธีควบคุม) (Figure 3) สอดคล้องกับ Nishijima et al. (2004) ระบุว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter* spp. และแครอทแสดงอาการเน่าสอดคล้องกับ Jayathilaka et al. (2006) ที่ระบุว่าเป็นเชื้อในกลุ่มยีส *Erwinia* spp. จากนั้นทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียลงบนต้นกระชาย เริ่มดำเนินการในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมิถุนายน 2567 ซึ่งสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการก่อโรค โดยมีอุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ในช่วงกลางวันและ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ในช่วงกลางคืน พบว่าต้นกระชายที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลทแสดงอาการปกติ เช่นเดียวกับกรรมวิธีควบคุม จากรายงานโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พืชจะแสดงอาการเหี่ยวและตายอย่างรวดเร็ว โดยแสดงอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้งร่วงในเวลาต่อมา หัวพันธุ์และบริเวณท่อน้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ (Jibat and Alo, 2020) และ

จากการศึกษาของ Paret et al. (2008) ขิงพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ทนทานจะแสดงอาการที่ระยะเวลาแตกต่างกันประมาณ 21 และ 70 วัน ตามลำดับหลังจากการปลูกเชื้อ และจากรายงานของ Nishijima et al. (2004) กล่าวว่าในปี 2001 ฮาวายเกิดการระบาดของโรคเน่าในขิง และเมื่อทดสอบการก่อโรคด้วยเชื้อ *E. Cloacae* พบว่าต้นขิงจะแสดงอาการเหี่ยว ใบเหลือง ขิงแสดงอาการซ้ำ เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเน่าในเวลาต่อมา และ Lin et al. (2020) และ Zhao et al. (2022) พบว่าโรคขิงเน่ามีการระบาดในประเทศจีน ทำให้พืชแสดงอาการเน่าบริเวณลำต้น เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล รุพุน เมื่อนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคพบเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *E. cloacae* และ *R. solanacearum* ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้ไม่สามารถแยกลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ สอดคล้องกับ Nishijima et al. (2004) ระบุว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter* spp. และแครอทแสดงอาการเน่าสอดคล้องกับ Jayathilaka et al. (2006) ที่ระบุว่าเป็นเชื้อในกลุ่มยีส *Erwinia* spp.

สรุปผลการวิจัย

กระชายที่แสดงอาการเหี่ยวในจังหวัดพิจิตร จำนวน 26 ไอโซเลท มีลักษณะสัณฐานวิทยาบนหน้าอาหารและชีวเคมีสอดคล้องกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* แต่พบว่าผลศึกษาโดยเทคนิค PCR ด้วยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* ระบุว่าเป็นเชื้อ *R. solanacearum* และผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทระบุว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter* spp. สำหรับพิสูจน์การก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย (Koch's postulation) ในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลททำให้หัวหอมใหญ่ และขิงแสดงอาการเน่า

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในปัดไปควรเพิ่มเติมตัวอย่างพืช การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี และการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase Chain

Reaction (PCR) ที่มีความจำเพาะ แม่นยำมากขึ้นในการระบุและการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* spp. เพื่อใช้ในการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการสูญเสียของเกษตรกร

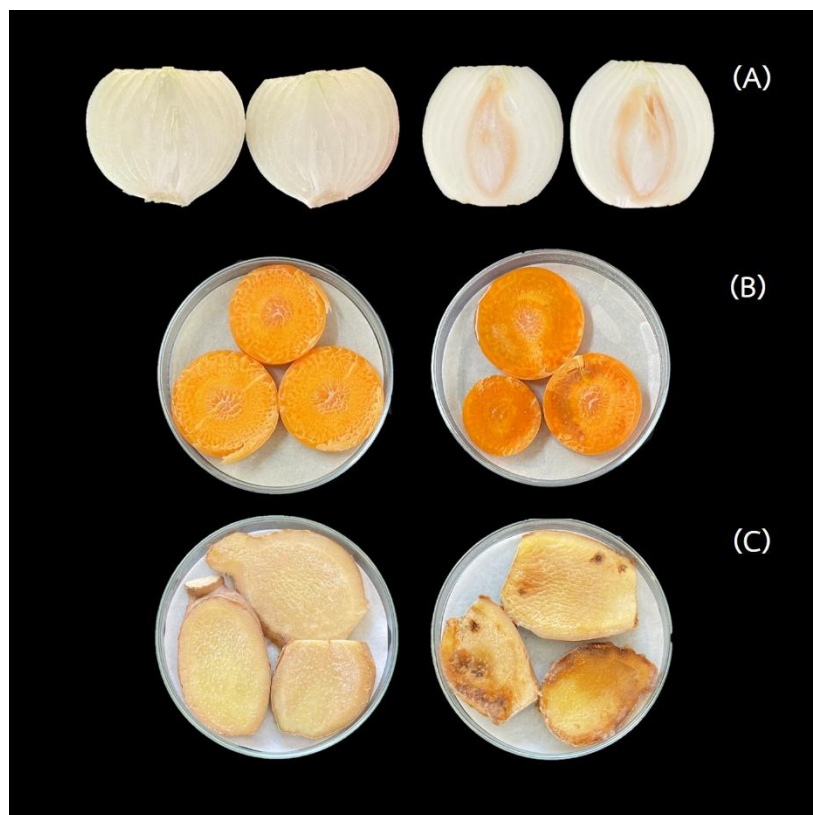


Figure 3 Symptoms produced by bacterial from fingerroot on onion bulbs and carrot and ginger slices; Healthy onion bulbs (left), and yellow onion bulbs (right), after inoculated 10 days at 25 °C. (A), Healthy carrot slices (left), Mild rot symptoms (discoloration, water-soaking) in petri dishes (right), after inoculated 10 days at 25 °C. (B), Healthy ginger slices (left), Moderate rot symptoms (discoloration, water-soaking) in petri dishes (right), after inoculated 2-3 days at 25 °C. (C)

เอกสารอ้างอิง

- กณิษฐา สังคหะ, ญาณิ มั่นอัน และ เฟื่องฟ้า จันทนิมม. (2549). การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูปหัวเชื้อสดควบคุมโรคเห้งงาของกระชาย. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาพืช* (น. 489-496). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2568). (12 มกราคม 2568) *ให้บริการข้อมูลสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร: กระชาย*. <https://production.doae.go.th>.
- ศักดิ์ สุนทรสิงห์. (2537). *โรคของผักและการป้องกันกำจัด* (พิมพ์ครั้งที่ 2). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of applied bacteriology*, 27(2), 265-277.
- Jayathilaka, K., Kelaniyangoda, D. B., & Ranaweera, B. (2006). *Development of a detection technique for identification of rhizome rot diseases of ginger*. Faculty of Agriculture and Plantation Management, Wayamba University of Sri Lanka.
- Jibat, M., & Alo, S. (2020). Epidemiology and management strategies of ginger bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Ethiopia. *International journal of research in agriculture and forestry*, 7(5), 41-49.
- Kumar, A., Prameela, T. P., Suseelabhai, R., Siljo, A., Anandaraj, M., & Vinatzer, B. A. (2014). Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum*. *Plant pathology*, 63(5), 1138-1148. <https://doi.org/10.1111/ppa.12189>
- Lin, J., Zhao, Z. & Wang, C. (2020). First report of rhizome rot on ginger (*Zingiber officinale*) caused by *Enterobacter cloacae* in Shandong Province, China. *Plant disease*, 105(1), 210. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1108-PDN>
- Nishijima, K. A., Alvarez, A. M., Hepperly, P. R., Shintaku, M. H., Keith, L. M., Sato, D. M., Bushe, B. C., Armstrong, J. W., & Zee, F. T. (2004). Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii. *Plant disease*, 88(12), 1318-1327. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1318>
- Paret, M. L., de Silva, A. S., Criley, R. A., & Alvarez, A. M. (2008). *Ralstonia solanacearum* race 4: Risk assessment for edible ginger and floricultural ginger industries in Hawaii. *HortTechnology*, 18(1), 90-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanmun D. (2023). Natural products to reduce the severity of coronavirus 2019: A literature review. *Science and technology Review*. 16(2), 3-15.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20013064240>
- Schönfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D., & Smalla, K. (2003). Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the

- basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7248–7256.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7248-7256.2003>
- She, X., Yu, L., Lan, G., Tang, Y., & He, Z. (2017). Identification and genetic characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex isolates from *Cucurbita maxima* in China. *Frontiers in plant science*, 8, 1794.
- Wahid, N. S., Bunawan, S. N., Amin, N. M., Hing, J. N., Kadir, M. K. A., & Ishak, Z. (2013). *Isolation and identification of bacteria from infected banana samples on TZC medium using 16S rRNA gene-cloning method*. https://mspp.org.my/files/Full-Papers_TransactionMSPPVol21.pdf
- Waki, T., Horita, M., Kurose, D., Mulya K., & Tsuchiya, K. (2013). Genetic diversity of Zingiberaceae plant isolates of *Ralstonia solanacearum* in the Asia-Pacific Region. *Japan agricultural research quarterly*, 47(3), 283-294.
- Xu, J., Pan, Z. C., Prior, P., Xu, J. S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L. Q., He, L. Y., & Feng, J. (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European journal of plant pathology*, 125(4), 641–653. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9512-5>
- Zhao, N., Yang, J., Liu, H., Li, L., Yan, H., & Liu, D. (2022). Ginger rhizome rot caused by the *Enterobacter cloacae* in Tangshan, China. *Plant Disease*, 106(4), 1293.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1812-PDN>