

การตรวจเชื้อแบคทีเรียโรคไหม้มันสำปะหลังจากใบและดิน

Detection of Cassava Blight Bacteria from Leaf and Soil

ชลิดา เล็กสมบุญ นิพนธ์ ทวีชัย วิชัย โขสิตรัตน และ อำไพวรรณ ภารัตน์วัฒน์¹

Chalida Leksomboon, Niphone Thaveechai, Wichai Kositratana and Ampaiwan Paradornuwat

ABSTRACT

Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Xcm) causing cassava blight by the method of indirect immunofluorescent staining (IF) using antiserum produced in New Zealand White rabbit against membrane protein complex (MPC) of Xcm can be done at the minimum of 10^2 cells/cm² of leaf and 10^3 cfu/g of amended soil. A semiselective SXM medium was developed for detection of Xcm containing (g/l) : K₂HPO₄ 0.8, KH₂PO₄ 0.6, yeast extract 0.7, soluble starch 8.0, glucose 1, agar 15, methyl green 0.01, methyl violet 2B 0.001, cephalixin 0.01, gentamicin sulfate 0.001, and cycloheximide 0.25. The medium showed 90 - 100% inhibition of soil saprophytes and can be used to detect Xcm from soil and leaf at the minimum of 10^3 cfu/g of soil and 10^2 cfu/cm² of leaf, respectively. This experiment was the first report to demonstrate the use of IF and semiselective medium for detection of Xcm from leaf and soil. Efficiency in detection of the two methods was nearly the same in which either can be chosen when appropriated especially for epidemiological study.

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Xcm) สาเหตุของโรคไหม้มันสำปะหลัง ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining (IF) โดยใช้แอนติซีรัมที่ได้จากการฉีด membrane protein complex (MPC) ของเชื้อ Xcm ในกระต่าย New Zealand White สามารถตรวจเชื้อจากใบได้ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ 10^2 เซลล์/ตร.ซม. และในดินคลุกเชื้อที่ 10^3 cfu/ดิน 1 กรัม อาหารกึ่งเฉพาะ SXM ที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วย (กรัม/ลิตร) K₂HPO₄ 0.8,

KH₂PO₄ 0.6, yeast extract 0.7, soluble starch 8.0 glucose 1, agar 15, methyl green 0.01, methyl violet 2B 0.001, cephalixin 0.01, gentamicin sulfate 0.001 และ cycloheximide 0.25 สามารถยับยั้งเชื้อซาโปรไฟท์ ได้ร้อยละ 90 - 100 และตรวจเชื้อในดินได้ต่ำสุดที่ 10^3 cfu/ดิน 1 กรัม และบนใบที่ 10^2 cfu/ตร.ซม. รายงานนี้แสดงเป็นครั้งแรกถึงการใช่วิธี IF และการสร้างสูตรอาหารสำหรับตรวจเชื้อ Xcm จากใบและดิน วิธีการทั้งสองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน สามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมโดยเฉพาะในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรค

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

คำนำ

โรคไหม้ของมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Arthaud - Berthet & Bondar) Dye จัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของมันสำปะหลังที่ปลูกในทวีปต่าง ๆ เช่น อเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย (Lozano, 1986) การทราบวิธีการแพร่ระบาดและการอยู่อาศัยข้ามฤดูของเชื้อจะช่วยให้การวางแผนป้องกันกำจัดเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจหาเชื้อได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีความไว (sensitive) นับเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาดังกล่าว ในปัจจุบันวิธีที่นิยมคือ วิธีทางเซรุ่มวิทยา (serology) และการใช้อาหารเลือกเฉพาะ (selective medium) การทดสอบทางเซรุ่มวิทยาจะได้ผลดีขึ้นอยู่กับคุณภาพของแอนติซีรัม และวิธีทดสอบ (Schaad, 1979) วิธีทดสอบแบคทีเรียโรคพืชที่มีความไว ได้แก่ immunofluorescent staining (Domen and Alvarez, 1978; Malin *et al.*, 1983; Schaad, 1980) enzyme - linked immunosorbent assays (ELISA) (Alvarez and Lon, 1985; Civerolo and Fan, 1982) และ dot - immunobinding assay (DIBA) (Leach *et al.*, 1987) โดยต้องใช้กับแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะ (specific) จึงจะได้ผลดี แอนติซีรัมที่ผลิตจาก MPC ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้ถึงระดับ subspecies หรือ pathovar (pv.) (Thaveechai and Schaad, 1986; Yakrus and Schaad, 1979) ส่วนอาหารเลือกเฉพาะได้มีการพัฒนาสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Agrobacterium*, *Corynebacterium* (= *Clavibacter*), *Erwinia*, *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* (Chen and Echandi, 1982; Kado and Heskett, 1970; New and Kerr, 1971; O'Neill and Logan, 1975)

วิธีทางเซรุ่มวิทยาได้นำมาศึกษากับเชื้อ Xcm

โดยวิธี direct และ indirect immunofluorescent staining และ ELISA เพื่อศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ การตรวจหาเชื้อบนใบ การถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ด และการแพร่ระบาดโรคโดยแมลง (Daniel *et al.*, 1980; Daniel and Boher, 1981a; 1981b; Elango and Lozano, 1979; 1981) แต่ยังไม่เคยมีการตรวจหาเชื้อ Xcm จากดิน และใบโดยใช้แอนติซีรัมจากการใช้ MPC เป็นแอนติซีรัม สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะถึงแม้จะมีการพัฒนาสำหรับเชื้อ *Xanthomonas campestris* หลาย pathovar ก็ตาม (Claffin *et al.*, 1987; Kuan and Minsavage, 1985; Rhandhawa and Schaad, 1984; Schaad and Kendrick, 1975) แต่ยังไม่มีการพัฒนาสำหรับเชื้อ Xcm การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IF โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตจากการใช้ MPC เป็นแอนติเจน และพัฒนาสูตรอาหารเลือกเฉพาะ สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียโรคไหม้ของมันสำปะหลังจากใบและดิน

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรียและการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ต่าง ๆ และแหล่งที่มาสำหรับในงานทดลองนี้ (Table 1) ประกอบด้วยเชื้อ Xcm สายพันธุ์ CBa และ Xm 248-1 เชื้อแบคทีเรียโรคพืชต่าง ๆ และซาโปรไฟท์ (Saprophyte) ที่ได้จากดิน และใบมันสำปะหลังรวมทั้งสิ้น 40 ชนิด ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยง Yeast extract - dextrose - CaCO_3 (YDC) agar (Wilson *et al.*, 1967) หรือ Nutrient glucose (NGA) agar (Schaad, 1980) และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 - 5°C. เพื่อใช้ตลอดการทดลอง ส่วนการเพิ่มปริมาณเชื้อจะเพิ่มปริมาณโดยย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว 523 หรืออาหารแข็ง YDC เป็นเวลา 24 - 48 ชม. ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์มาใช้ทดลอง

Table 1 Bacterial strains, source and reaction of indirect immunofluorescent staining with antiserum against membrane protein complex (MPC) of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strain CBa.

Bacteria	strain	Source ^{1/}	IF reaction ^{2/}
<i>Xanthomonas campestris</i>			
pv. <i>manihotis</i>	CBa	This study	4 +
pv. <i>campestris</i>	BR	N. Thaveechai	—
pv. <i>glycines</i>	Xcg018,021	S. Prathuangwong	—
pv. <i>oryzae</i>	8003,8210	S. Pawichit	—
	B715,719,780,783	N.W. Schaad	—
<i>Bacillus</i> sp.	CH4, CH6	N. Thaveechai	—
<i>Clavibacter michiganense</i>			
subsp. <i>michiganense</i>	—	W. Kositratana	—
<i>Erwinia carotovora</i>			
subsp. <i>carotovora</i>	PE	N. Thaveechai	1 +
<i>Escherichia coli</i>	—	N. Thaveechai	—
<i>Pseudomonas cepacia</i>	—	W. Kositratana	—
<i>P. corrugata</i>	—	W. Kositratana	—
<i>P. fluorescens</i>	CH8	B. Inwhang	—
	B4	This study	—
<i>P. solanacearum</i>	BK	S. Suntarasingh	1 +
	KPS	S. Suntarasingh	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	C199	N.W. Schaad	—
pv. <i>tomato</i>	C197	N.W. Schaad	1 +
Unknown from cassava field soils	SKK1 - SKK12	This study	—
Unknown from cassava leaves	EKK1 - EKK4	This study	—

^{1/} Source of bacterial cultures obtained for this study.

^{2/} Cells of bacteria were stained with MPC antiserum of Xcm at dilution of 1/64 and counterstained with affinity purified goat antirabbit IgG (H + L) antiserum conjugated FITC (Kirkegaard and Perry laboratories, Inc., MD, U.S.A.) at dilution of 1/64. Symbols : 4 + = strong fluorescence, 1 + = weak fluorescence, - = no fluorescence.

การผลิตแอนติซีรัม

เลี้ยงเชื้อ Xcm สายพันธุ์ CBa ในอาหารเหลว 523 บนเครื่องเขย่าวงกลม (Lab Line Junior orbital shaker) ในเวลา 36 ชม. แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Sorvall RC-5 centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง ก่อนนำมาสกัด MPC ด้วย 0.2 M LiCl (Thaveechai and Schaad, 1986; Yakus and Schaad,

1979) ที่อุณหภูมิ 45°C. นาน 3 ชม. เก็บเกี่ยว MPC และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยมี bovine serum albumin (Sigma Co, U.S.A.) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

นำสารละลาย MPC 1 มล. (มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัม) ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant (Difco Co, Detroit, U.S.A.) 1 มล. ให้เข้ากันแล้วฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อเนื้อตะโพกของกระต่ายพันธุ์

New Zealand White ทุกสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งที่ 3 ทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูเพื่อนำมาตรวจหาไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัม ทุกสัปดาห์ติดต่อกัน 8 ครั้ง เติมน้ำละลาย 0.5% NaN_3 ในแอนติซีรัมและเก็บรักษาไว้ที่ 4°C . ตลอดจนการทดสอบแอนติซีรัมที่เตรียมได้ถูกนำมาทำการดูดซับ (cross - absorption) ด้วย MPC ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, และ pv. *campestris* จำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดปฏิบัติการที่ไม่จำเพาะ (nonspecificity) ก่อนนำมาทดสอบต่อไป

การเตรียมตัวอย่างและการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี IF

การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี IF ทำตามวิธีของ Schaad (1978) โดยนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จำนวน 40 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหาร YDC เป็นเวลา 24 – 48 ชม. แล้วทำเป็น suspension โดยการย้ายเชื้อจำนวน 2 ลูป (loop) มาใส่ใน 3 มล. ของ 0.85% NaCl ที่ผสมด้วย 0.3 มล. ของ 40% formalin เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และตั้งไว้ 10 นาที หยด suspension ของเชื้อแต่ละชนิดในหลุมบนแผ่นกระจกสไลด์ (multiwells slide) จำนวนหลุมละ 2 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง หยดสารละลาย Kirkpatrick's fixative ให้ท่วมทุกหลุม และล้างด้วยสารละลายเค็ม ทิ้งไว้ให้แห้ง ย้อมด้วยแอนติซีรัม MPC ของเชื้อ Xcm สายพันธุ์ CBa ที่ความเข้มข้น $1/64$ ทิ้งไว้ในที่ชื้นและมีมืด 30 นาที ล้างออกด้วย 0.85% NaCl, phosphate buffer saline pH 7.2 และน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ ตามลำดับ ย้อมทับด้วย แอนติซีรัมของ goat anti - rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescein isothiocyanate, FITC (Kirkegaard & Perry Lab, U.S.A.) ทำการล้างเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แล้วนำมาตรวจด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ แบบ epi - fluorescence (Olympus BH, Japan) ด้วยกำลังขยาย 100 x ที่มี BG12 เป็น exciting filter และ O 515 เป็น barrier filter โดยมี high pressure mercury arc lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสง

ตัวอย่างเชื้อ Xcm จากดินและใบ ที่นำมาตรวจด้วยวิธี IF กระทำดังนี้ ตัวอย่างเตรียมโดยนำดินมาผสมเชื้อ Xcm สายพันธุ์ CBa อายุ 24 – 48 ชม. ให้มีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^2 ถึง 10^9 colony forming unit (cfu)/ดิน 1 กรัม ผสมด้วย 0.85% NaCl 9 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 15 นาที นำน้ำใสเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 500 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใส 3 มล. มาเติม 40% formalin จำนวน 0.3 มล. แล้วดำเนินการตามวิธีที่กล่าวข้างต้นเพื่อศึกษาด้วยวิธี IF ตัวอย่างเชื้อจากใบเตรียมโดยนำเชื้อแต่ละความเข้มข้นที่ 10^2 ถึง 10^9 cfu/มล. มาฉีดพ่นบนใบมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 ปลอ่ยให้แห้ง ตัดใบมา 3 ตร.ซม. บดใบใน 3 มล. ของ 0.85% NaCl แล้วนำสารละลายนี้มาตรวจเชื้อด้วยวิธี IF ตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนปริมาณเชื้อ/ตร.ซม. ของใบซึ่งใช้เป็น control ได้จากการย้อมสีแบบ simple stain ด้วย methylene blue

การพัฒนาสูตรอาหารเลือกเฉพาะและการตรวจหาเชื้อ

ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Xcm โดยใช้อาหาร 4 ชนิด คือ YDC, NGA (Schaad, 1980) Nutrient - starch - cycloheximide (NSCA) agar (Schaad and Kendrick, 1975) และ Basal medium (Clafflin *et al.*, 1987) หลังจากนั้นนำมาผสมกับสารปฏิชีวนะ และสี (dye) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ Xcm ได้จากใบและดินได้โดยไม่ยับยั้งหรือยับยั้งเชื้อ Xcm น้อยที่สุด ศึกษาเปรียบเทียบกับผลการเจริญของเชื้อต่าง ๆ บนอาหารที่พัฒนาได้

กับอาหาร NGA และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อซาโปรไฟท์

การตรวจเชื้อ Xcm จากตัวอย่างดิน ทำโดยนำดินผสมเชื้อ 1 กรัมผสมกับ 9 มล. ของ 0.85% NaCl เขย่าให้เข้ากันหลังจากได้ suspension ของเชื้อก็นำมาทำให้เจือจางลง แล้วไปเลี้ยงบนอาหารที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับอาหาร NGA, NSCAA (Randhawa and Schaad, 1984) และ modified D - 5 (Kuan and Minsavage, 1985) การตรวจเชือบนใบใช้สารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นจำนวน 5 ไมโครลิตรหยดลงบนใบ 1 ตร.ซม. ทิ้งให้แห้งแล้วนำไปมาบดทำให้เป็น suspension ดังกล่าวแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเลือกเฉพาะที่พัฒนาได้เปรียบเทียบกับอาหาร NGA

ผล

แอนติซีรัมและการตรวจเชื้อด้วยวิธี IF

แอนติซีรัมที่ผลิตได้ มีไตเตอร์ 1/1024 มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* บาง pathovar คือ pv. *campestris* และ pv. *glycines* แต่หลังจากทำการดูดซับด้วย MPC ของเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ตามที่กล่าวในอุปกรณ์วิธีการ พบว่าแอนติซีรัมมีความจำเพาะสูง คือทำปฏิกิริยา 4+ เฉพาะกับเชื้อ Xcm (Figure 1a, b) แต่ไม่มีปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ยกเว้น เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *P. solanacearum* และ *P. syri-nage* pv. *tomato* ที่ทำปฏิกิริยาเล็กน้อย (1+) โดยวิธี IF (Table 1, Figure 1 c, d)

การตรวจเชื้อ Xcm สายพันธุ์ CBa ที่ผสมในดิน 3 ชนิด คือ ดินจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น, สถานีวิจัยศรีราชา และสถานีวิจัยเขาคันทรง พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อดินมีปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ 10^3 cfu/ดิน 1 กรัม (Table 2) โดยเซลล์ของเชื้อ Xcm จะเรืองแสง

สีเขียว (Figure 1b) ส่วนเชื้อจากใบสามารถตรวจได้ต่ำสุด 10^3 เซลล์/ตร.ซม.

อาหารเลือกเฉพาะและการตรวจเชื้อด้วยอาหารเลือกเฉพาะ

อาหารเลือกเฉพาะที่พัฒนาขึ้นสำหรับเชื้อ Xcm มีคุณสมบัติเป็นอาหารกึ่งเฉพาะโดยมีชื่อเรียกว่า SXM (semiselective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นยกเว้นเชื้อ Xcm และเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *P. fluorescens* และ pathovar ต่าง ๆ ของเชื้อ *Xanthomonas* (Table 3) แต่เชื้อเหล่านี้จะมีลักษณะและสีของโคโลนีแตกต่างกันจึงทำให้มีคุณสมบัติเป็นอาหารแยกชนิดได้ด้วย (differential medium) อาหารกึ่งเฉพาะ SXM ประกอบด้วย (กรัม/ลิตร) คือ K_2HPO_4 0.8, KH_2PO_4 0.6, yeast extract 0.7, soluble starch 0.8, glucose 1, agar 15, methyl green 0.01, methyl violet 2B 0.001, cephalixin 0.01, gentamicin sulfate 0.001 และ cycloheximide 0.25

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ซาโปรไฟท์ ในดินทั้ง 3 ตัวอย่างของอาหารกึ่งเฉพาะ SXM เท่ากับ 90 - 100% สำหรับการตรวจหาเชื้อ Xcm จากดินและใบโดยอาหาร SXM นั้น พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อจากดินได้ต่ำสุดที่ปริมาณเชื้อ $10^2 - 10^3$ cfu/ดิน 1 กรัม (Table 2) ในขณะที่บนอาหาร NGA, NSCAA และ modified D - 5 (Figure 2) ไม่สามารถตรวจได้ การตรวจเชือบนใบพบว่า สามารถตรวจเชื้อได้เมื่อใบมีเชื้อปริมาณต่ำสุด 10^2 cfu/ตร.ซม. (Table 2)

วิจารณ์

แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากแอนติเจน membrane protein complex ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* ที่สกัดด้วย 0.2 M LiCl เมื่อนำมาตรวจ

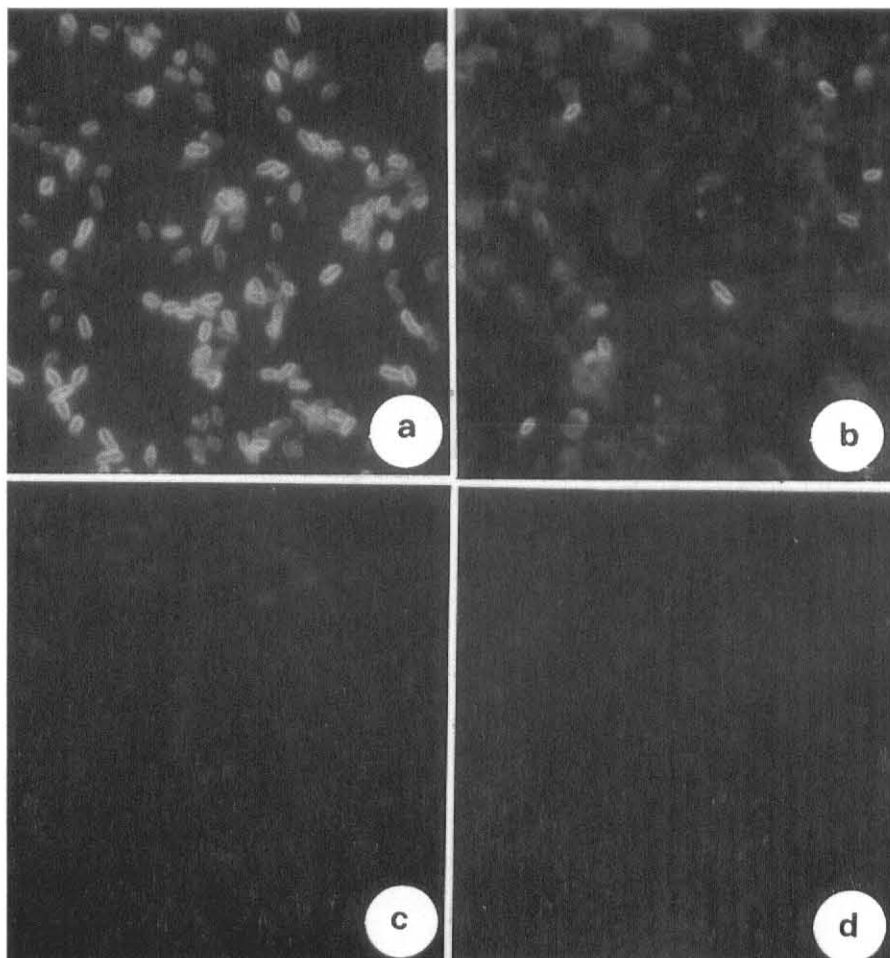


Figure 1. Indirect immunofluorescent staining of bacterial cells with antiserum against membrane protein complex of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strain CBa.

- Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strain CBa showing strong fluorescence of FITC (4 + reaction)
- Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* from cassava field soil of Field Crop Research Center, Khon Kaen (4 + reaction)
- Pseudomonas solanacearum* stain BK showing weak fluorescence of FITC (+ 1 or ± reaction)
- Unknown bacteria (strain SKK₆) from cassava field soil showing no fluorescence of FITC (- or negative reaction)

สอบโดยวิธี IF เชื้อ Xcm ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกโดยเซลล์จะเรืองแสงมากทั้งหมด ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 23 สายพันธุ์ และแบคทีเรียซาโพรไฟท์ 16 สายพันธุ์ ให้ปฏิกิริยาลบทั้งหมด โดยมีการเรืองแสงน้อยหรือไม่มีการเรืองแสงเลย แสดงว่า แอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะสูง สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ถึงระดับ species หรือ subspecies (pathovars) เช่น

เดียวกับที่มีรายงานไว้กับ *Erwinia chrysanthemi* (Yakrus and Schaad, 1979) และ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Thaveechai and Schaad, 1986) เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจหาเชื้อจากดินและใบมันสำปะหลังด้วยวิธี IF สามารถตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 10^3 cfu/ดิน 1 กรัม และ 10^2 เซลล์/ใบ 1 ตร.ซม.

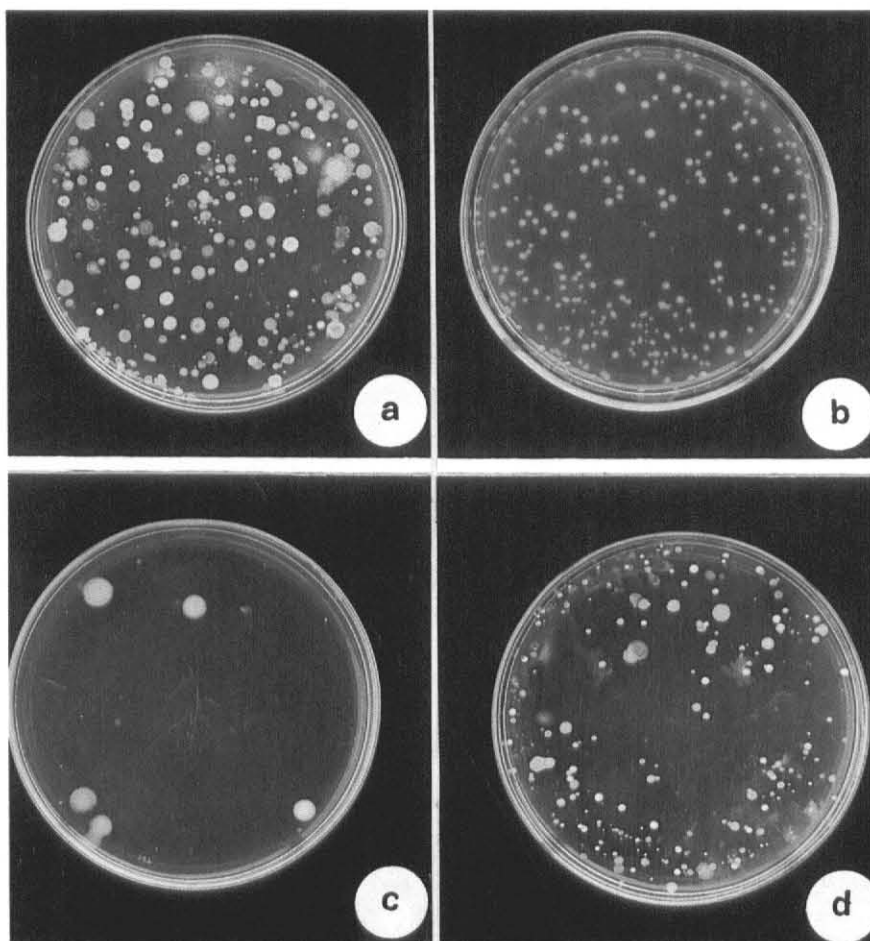


Figure 2. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* from cassava field soil of Field Crop Research Center, Khon Kaen by several media comparing to semiselective SXM medium.

- NGA plate containing numerous colonies of saprophytic bacteria and no colony of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*
- SXM plate showing only the colonies of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*
- NSCAA plate having few colonies of saprophytes but no colony of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*
- Modified D-5 plate showing similar saprophytic colonies as in NGA plate (a)

อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ (semiselective medium) ที่พัฒนาขึ้น คือ SXM เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ Xcm ประกอบด้วยสี (dye) สารปฏิชีวนะ และ soluble starch ที่เป็นส่วนสำคัญ และ soluble starch เป็นส่วนที่ทำให้มีคุณสมบัติพิเศษคือ เป็นอาหารแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย (differential medium) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารนี้โดยรอบโคโลนีจะมี

บริเวณใส และตรงกลางโคโลนีจะมีสีเขียวเข้มแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ การตรวจหาเชื้อ Xcm จากดินโดยอาหารกึ่งเฉพาะ SXM จะมีความสามารถดีกว่าอาหาร NGA, NSCAA และ modified D - 5 โดยอาหาร SXM ตรวจพบเมื่อมีเชื้อในดินได้ต่ำสุดที่ $10^2 - 10^3$ cfu/ดิน 1 กรัม และมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้ออื่นได้ 29 - 100 เปอร์เซ็นต์ (ชลิดา, 2531) ส่วนอาหารอื่น

Table 2 Sensitivity of detection of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* strain CBa from soils and leaves by indirect immunofluorescent (IF) and semiselective SXM medium.

Bacterial Cells ^{1/} (cfu/ml)	IF ^{2/} staining				SXM ^{2/} medium			
	Soil ^{3/} (cell/gm of soil)			Leaf (cell/cm ²)	Soil ^{3/} (cfu/gm of soil)			Leaf (cfu/cm ²)
	1	2	3		1	2	3	
10 ⁹	3.1 × 10 ⁸	1.9 × 10 ⁷	6.2 × 10 ⁷	ND ^{4/}	1.7 × 10 ⁶	4.5 × 10 ⁷	6.5 × 10 ⁵	ND ^{4/}
10 ⁸	4.5 × 10 ⁷	8.8 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁷	ND	2.8 × 10 ⁵	3.6 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁵	ND
10 ⁷	6.7 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶	1.9 × 10 ⁶	ND	1.2 × 10 ⁵	8.8 × 10 ⁵	2.6 × 10 ³	ND
10 ⁶	2.5 × 10 ⁶	9.8 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁴	8.5 × 10 ³ (7.3 × 10 ⁴) ^{5/}	2.3 × 10 ⁴	1.7 × 10 ⁵	7.1 × 10 ³	ND
10 ⁵	4.2 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁴	1.7 × 10 ³ (3.3 × 10 ⁴)	8.1 × 10 ³	2.3 × 10 ⁴	3.3 × 10 ³	2.5 × 10 ³ (2.9 × 10 ³) ^{6/}
10 ⁴	6.4 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁴	5.8 × 10 ³	9.3 × 10 ² (8.2 × 10 ³)	4.3 × 10 ³	3.8 × 10 ³	7.1 × 10 ²	3.8 × 10 ² (5.4 × 10 ²)
10 ³	1.6 × 10 ²	1.1 × 10 ³	6.7 × 10 ²	3.0 × 10 (8.5 × 10 ²)	3.9 × 10 ²	9.4 × 10 ²	3.6 × 10 ²	7.7 × 10 (1.2 × 10 ²)
10 ²	0	0	0	0	0	7.5 × 10	0	0

^{1/}Log cfu/ml of Xcm strain,CBa grew in 523 liquid medium for 24 hr and amended with soil or sprayed on cassava leaf cv. Rayong I before assaying bacteria

^{2/}Average numbers of Xcm detected from soil and cassava leaf cv. Rayong I by IF staining with MPC antiserum of Xcm and SXM medium

^{3/}1 = soil from Field Crop Research Center, Khon Kaen, 2 = soil from Sriracha Research Station, Chon Buri, 3 = soil from Koahinzoan, Chachoengsao, All samples were non - sterile soils and mixed with the Xcm

^{4/}Not determined

^{5/}() = Number of bacterial cells under lightmicroscopic observation by simple stain method

^{6/}() = Number of bacterial colonies on nutrient glucose agar plate

Table 3 Efficacy of semiselective SXM medium for inhibition of bacterial strains at 4 to 7 days after plating.

Bacteria	Strain	Colony/plate		Bacterial inhibition ^{1/} by SXM (%)
		NGA	SXM	

<i>Xanthomonas campestris</i>				
pv. manihotis	Xm 248 - 1	36	28	22.0
pv. campestris	BR	57	30	47.4
pv. citri	Som - O	30	0	100.0
pv. glycines	Xcg 021	98	27	72.4
	0961	32	17	46.3
pv. malvacearum	Tak	252	0	100.0
	Loei	34	0	100.0
pv. oryzae	B 719	321	228	29.0
	8003	121	86	28.0
	8210	74	44	40.6
<i>Bacillus</i> sp.	CH4	276	0	100.0
	CH6	298	0	100.0
<i>Erwinia carotovora</i>				
subsp. carotovora	PE	57	0	100.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CH8	205	122	40.5
	B4	105	0	100.0
<i>P. solanacearum</i>	LL60	124	0	100.0
	CR11	85	0	100.0

^{1/} Inhibition efficiency (%) = $\frac{\text{colony numbers on NGA} - \text{colony numbers on SXM}}{\text{colony numbers on NGA}} \times 100$

ไม่สามารถตรวจเชื้อ Xcm และมีชาโปรไฟท์ขึ้นจำนวนมาก และสามารถตรวจเชื้อจากใบเมื่อมีปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ 10^2 cfu/ตร.ซม.

การตรวจหาเชื้อ Xcm โดยวิธี IF และ SXM มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน จึงสามารถเลือกใช้ได้ตามความสะดวกและเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการและผู้ใช้ แต่วิธี IF อาจดีกว่าในด้านความรวดเร็วและปริมาณในการตรวจ อย่างไรก็ตามหากใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจะช่วยให้การตรวจหาเชื้อ Xcm มีความถูกต้องแม่นยำสูงขึ้น

คำขอบคุณ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร. เจริญศักดิ์ โจนฤทธิ์พิเชษฐ์ ที่ให้ทุนสนับสนุนค่าปะหลัง และค่าปรึกษาในการทดลอง และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการสนับสนุนเงินทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา เล็กสมบุญ 2531. การตรวจหาเชื้อและการวัดระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas cam-*

- pestris* pv. *manihotis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Alvarez, A.M. and K. Lon. 1985. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. Plant Dis. 69: 1082 - 1086.
- Chen, W. - Y. and E. Echandi. 1982. Bacteriocin production and semiselective medium for detection isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* in soil. Phytopathology 72 : 310 - 313.
- Civerolo, E.L. and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzymed - linked immnuosorbent assay. Plant Dis. 66 : 231 - 236.
- Clafflin, L.E., M.D. Gasaer and A.K. Vidaver. 1987. MXP, a semi - selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Phytopathology 77 : 730 - 734.
- Daniel, J.F., B. Boher and N. Nkouka, 1980. Insect dissemination of *Xanthomonas manihotis* to cassava in the People's Republic of Congo, pp. 66 - 68. In E.R. Terry, K.A. Odura and F. Caveness (eds.). Tropical root crops: research strategies for the 1980s. International Society for Tropical Root Crops, Ibadan (Nigeria), African Branch.
- Daniel, J.F. and B. Boher. 1981 a. Fluorescent antibody technique for detection on *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* on cassava leaves, pp. 176 - 180. In. J.C. Lozano (ed.). Proceeding of an International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 5th., Centre International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Daniel, J.F. and B. Boher. 1981 b. Contamination of cassava flowers, fruit and seeds by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, pp. 614 - 617. In J.C. Lozano (ed.). Proceeding of an International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 5th., Centre International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Domen, H.Y. and A.M. Alvarez. 1978. Detection of *Xanthomonas campestris* in soil using a direct immunofluorescence technique, pp. 301 - 305. In. M. Ride (ed.). Proceeding of an International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 4th., Centre International de Agricultura Tropical, Angers, France.
- Elango, F.N. and J.C. Lozano. 1979. Transmission of *Xanthomonas manihotis* in sexual seed. Fitopatologia Colombiana 8(1) : 15 - 19.
- _____. 1981. Epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on common weeds in Colombia, pp. 203 - 209. In J.C. Lozano and P. Gwin (eds.). Proceeding of an International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 5th., Centre International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Kado, C.I. and M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60 : 969 - 976.
- Kuan, T.L. and G.V. Minsavage. 1985. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. Plant Dis. 69 : 758 - 760.
- Leach, J.M., B.A. Ramundo, D.L. Pearson and L.E. Clafflin. 1987. Dot - immunobinding assay for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* in sorghum. Plant Dis 71 : 30 - 33.
- Lowry, O.H., N.H. Rosebrough, A.L. Farr and R.H. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 - 275.
- Lozano, J.C. 1986. Cassava bacterial blight : A manageable disease. Plant Dis. 70 : 1089 - 1093.
- Malin, E.M., D.A. Roth and E.L. Belden. 1983. Indirect immunofluorescent staining for

- detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. Plant Dis. 67 : 645 - 647.
- New, P.B. and A. Kerr. 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. J. Appl. Bacteriol. 34 : 233 - 236.
- O'Neill, R. and C. Logan. 1975. A comparison of various selective isolation media for their efficiency in the diagnosis and enumeration of soft rot coliform bacteria. J. Appl. Bacteriol. 39 : 139 - 149.
- Randhawa, P. and N.W. Schaad. 1984. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. Phytopathology 74 : 268 - 272.
- Schaad, N.W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence test for identification of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 68 : 249 - 253.
- _____. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 17 : 123 - 147.
- _____. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 72 p.
- Schaad, N.W. and R. Kendrick. 1975. A qualitative method for detection *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. Phytopathology 65 : 1034 - 1036.
- Thaveechai, N. and N.W. Schaad. 1986. Immunochemical characterization of a subspecies - specific antigenic determinant of a membrane protein complex of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Phytopathology 76 : 148 - 153.
- Wilson, E.E, F.M. Zeitoun and D.L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. Phytopathology 65 : 1034 - 1036.
- Yakrus, M. and N.W. Schaad. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology 69 : 517 - 522.