

การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจ
การแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

นางสาวณัฐริญา เบื่อนสันเทียะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-533-414-6

**IDENTIFICATION, DEVELOPMENT OF DETECTION
METHOD AND SURVEY OF BACTERIAL NECROSIS
DISEASE OF GRAPEVINE IN THAILAND**

Miss Natthiya Buensanteai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2004

ISBN 974-533-414-6

การระบุนิคมเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจการแพร่ระบาดของ
โรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

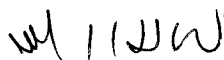
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยระดับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร. หัสไชย บุญจง)

ประธานกรรมการ




(อ. ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



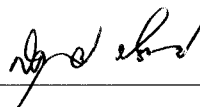
(ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด)

กรรมการ



(รศ. น.ท./ดร. สราวุฒิ สุตจิตร)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ : การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบและการ
สำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
(IDENTIFICATION, DEVELOPMENT OF DETECTION METHOD AND
SURVEY OF BACTERIAL NECROSIS DISEASE OF GRAPEVINE IN
THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว, 80 หน้า.
ISBN 974-533-414-6

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค พัฒนาการ
ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพไร่ และสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบ
ใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย ทำการศึกษาโดยนำตัวอย่างใบองุ่นที่แสดงอาการใบจุด
และเส้นใบใหม่มาแยกเชื้อบนอาหาร NA ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติ
ทางชีวเคมีของเชื้อ ผลของการศึกษาพบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดอาการใบจุดเส้นใบใหม่ (ไอโซเลต VN₃)
เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน ขนาด 0.4 – 0.8 mm บน
อาหาร NA สามารถสร้างเอนไซม์อะมิเลส ย่อยแป้ง เจลาติน ไบมัน และใช้สารซิงค์ แคดเซียม
แลคเตต น้ำตาล galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose
และ fructose ได้ แต่ไม่รีดิวซ์ไนเตรต ไม่ย่อยยูเรีย สามารถเจริญได้ในอาหารผสมเกลือ (NaCl) สูงถึง
5% ไม่หยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 33 °C และยังคงเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 °C แต่มีอัตราการเจริญ
ที่ช้ามาก ลักษณะและตำแหน่งของแฟลกเจลลาเป็นแบบ monotrichous flagella มีเส้นเดี่ยว
บริเวณปลายของเซลล์แบคทีเรีย และเมื่อเลี้ยงในอาหาร galactose yeast extract agar CaCO₃
(GYAC) พบว่าเชื้อสามารถสร้างเมือกและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว การใช้ primer ที่ออกแบบ
สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเชื้อ *Xylophilus ampelinus* ซึ่งได้รับรายงานว่า
เป็นสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่นในอเมริกาและยุโรป คือชุด primer S3, S4 ซึ่งมีลำดับ
นิวคลีโอไทด์ คือ 5'-GGT GTT AGG CCG AGT AGT GAG-3' และ 5'-GGT CTT TCA
CCT GAC GCG TTA-3' และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR พบว่า
ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในประเทศไทยเป็นดีเอ็นเอ
เป้าหมาย และการใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อดังกล่าว ในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างเชื้อ *Xy.*
ampelinus ของชุดตรวจสอบ *Xylophilus ampelinus* ELISA kit ของบริษัท LOEWE
Biochemical GmbH, Germany ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ ขณะที่แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อใน
ประเทศไทยให้ปฏิกิริยาบวกกับตัวอย่างโรคที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง
สุรินทร์และพิจิตร ทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ และ anti *Xy. ampelinus* ของบริษัทให้ผลลบกับทุก
ตัวอย่างในประเทศไทย แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่นในประเทศไทย
ไม่ใช่เชื้อ *Xy. ampelinus* แต่เป็นเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* สำหรับการศึกษา

ทางด้านเซรุ่มวิทยา พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรัมสำหรับใช้ตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี direct antigen coating indirect ELISA คือ 1 : 1,000 โดยแอนติซีรัมสามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 8×10^2 cfu/ml โดยเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับเชื้อ *X. axonopodis* pv *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้ม แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อพืช พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นฝอยแล้วนำไปปรับสภาพแอนติเจนด้วยการต้มหรือนึ่งภายใต้ความดันไอก่อนนำมาตรวจสอบด้วยวิธี DAC Indirect – ELISA ให้ประสิทธิภาพการตรวจสอบสูงสุด และวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน การสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ในพื้นที่ปลูก 5 จังหวัด คือ จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์และพิจิตร ด้วยวิธี DAC Indirect – ELISA และ Immunofluorescence microscopy โดยใช้แอนติซีรัมที่เตรียมได้จากเชื้อไอโซเลต VN₃ พบว่าทั้ง 68 ตัวอย่างที่ตรวจสอบติดเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

NATTHIYA BUENSANTEAI : IDENTIFICATION, DEVELOPMENT OF
DETECTION METHOD AND SURVEY OF BACTERIAL NECROSIS
DISEASE OF GRAPEVINE IN THAILAND. THESIS ADVISOR : SOPONE
WONGKAEW, Ph.D. 80 PP. ISBN 974-533-414-6

VEIN NECROSIS/GRAPEVINE/*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*/IDENTIFY/
SEROLOGICAL DETECTION METHODS

The objectives of this study were to identify the causal agent of bacterial necrosis on grapevine, to develop the detection method and survey of the disease on grapevine in Thailand. A bacterium was isolated from leaf spot and vein necrosis samples collected from Nakhon Ratchasima and Saraburi provinces on nutrient agar (NA). After culturing on NA for 72 hours at 26 °C, the bacterium (VN₃ isolate) formed round, white, semitranslucent, slightly raised, glistening colonies with 0.4-0.8 mm in diameter. It produced similar symptoms on detached grape leaf as observed in the field 5 days after inoculation. The bacterium was rod shape and gram - negative. It was able to utilize galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose and fructose as carbon sources and was catalase positive. The bacterium could lyse Tween 80, hydrolyze starch and gelatin and utilize citrate and calcium lactate. But it was urease-negative and could not denitrify nitrate. It could tolerate NaCl concentration up to 5%. It was able to grow well at 33 °C and still grew at 37 °C but at a very low growth rate. The bacterium grew very fast on galactose yeast extract agar CaCO₃ (GYAC) and produced large amount of gum. With silver staining and transmission electron microscopy, the bacterium appeared to have a monotrichous

flagellum. By using specific primers S3 and S4 designed specifically for detection of *Xylophilus ampelinus* on grapevine in America and Europe, the primers failed to amplify the target DNA extracted from VN₃ isolate after completion of the PCR cycle. Result of a direct antigen coating indirect ELISA test using *Xylophilus ampelinus* antiserum of LOEWE Biochemical GmbH company, Germany also was negative with VN₃ isolate and all other diseased samples collected in Thailand. In contrast the antiserum prepared against the VN₃ isolate gave positive ELISA results with all samples tested. From the results it was concluded that the causal agent of bacterial leaf spot and vein necrosis of grape in Thailand was *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* and not *Xy. ampelinus* as earlier anticipated. For serological study, the suitable dilution of the VN₃ antiserum for the detection of grape infection was 1 : 1,000 in which as low as 8×10^2 cfu/ ml of the bacterium could be detected. The antiserum could cross react with *X. axonopodis* pv *citri* but not with other bacteria species. The detection efficacy could be improved when the diseased samples were cut into small pieces and the oozing bacteria were boiled or autoclaved prior to the ELISA test. With this technique the bacteria could be detected as early as 5 days after inoculation. All 68 diseased samples collected from Nakhon Ratchasima, Saraburi, Rayong, Surin and Pichit gave positive results with the DAC Indirect – ELISA and Immunofluorescence microscopy using anti - VN₃, indicating the widespread of this disease in Thailand.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2004

Student's Signature *Notthiya Pm*

Advisor's Signature *Sopone Wongkeawit*

Co-advisor's Signature *Natth. P...*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ เอาใจใส่อย่างดียิ่ง และเป็นแบบอย่างนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดจน ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หัสไชย บุญสูง ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ คุณลุงมานพ ชับซ้อน ผู้พาเข้าเก็บตัวอย่างจากสวนองุ่นในจังหวัดต่าง ๆ

ขอขอบคุณคุณครู โรงเรียนบ้านหนองไทร โรงเรียนนครบุรี และอาจารย์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่ให้การประสิทธิ์ประสาทสติปัญญา วิชาความรู้ และอบรมสั่งสอนตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวกและให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้สนับสนุนทุนสำหรับการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสวนองุ่นฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รัตนธงชัย โชคชัย แกรนมอนเต้ ฮอติเคิลปาร์ค เขาใหญ่ไวน์เนอร์รี่ สวนจิตรรา ตะวันแก้ว วิลเลจฟาร์ม จ. นครราชสีมา, สวนองุ่นลำสมพุง จ. สระบุรี, สวนองุ่นชาละวัน จ. พิจิตร, สวนองุ่นสุภัทราแลนด์ จ. ระยอง และสวนองุ่นพรหมมา บ้านเขว้า จ. สุรินทร์ ที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณพี่สาวที่แสนดี ขนิษฐา มากรุ่ง และเพื่อนที่แสนน่ารัก สุรทิน ใจดี, มนัญญา คงเจริญ และศรีสุกัญญา คำจิ้น รวมทั้งขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และชมรมอนุรักษ์สภาพแวดล้อม มทส. ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจ

ขอบคุณแรงใจจาก คุณ จักรชัย ศิริพานิช ที่ผลักดันให้มีความมุ่งมั่นในการศึกษาครั้งนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา น้องสาว น้องชายและญาติ ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	๗
สารบัญรูป.....	๘
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ

บทที่

1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น.....	4
2.2 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xy. ampelinus</i> สาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่องุ่น.....	6
2.3 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่น.....	7
2.3.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อจากอาการของโรคที่ปรากฏ.....	7
2.3.2 การตรวจสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ.....	8
2.3.3 การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	8
2.3.4 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้านเซรุ่มวิทยา.....	9
2.3.5 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้าน nucleic acid.....	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3	วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1	การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระที่เป็นโรค	16
3.2	การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอุจจาระแสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบ ใหม่ในประเทศไทย	16
3.2.1	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	16
3.2.2	การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย	17
3.2.2.1	การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรมและรูปร่างเซลล์ ..	17
3.2.2.2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ	17
3.2.2.3	การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด	17
3.2.2.4	การตรวจลักษณะแฟลกเจลลาด้วยการย้อมแบบ silver impregnation	18
3.2.2.5	การศึกษาลักษณะของแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน	18
3.2.3	ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ	19
3.2.4	ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย	19
3.2.4.1	การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง	19
3.2.4.2	การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน	19
3.2.4.3	การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็น แหล่งคาร์บอน	20
3.2.4.4	การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	20
3.2.4.5	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิทเรต	20
3.2.4.6	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารแคลเซียมแลคเตต	21
3.2.4.7	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีน	21
3.2.4.8	การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ	21
3.2.4.9	การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน	21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4.10	การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะคะเลส	22
3.2.4.11	การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบนินทรีย์ในเตรตเป็น แก๊สไนโตรเจน	22
3.3	การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียของงุ่นใน ประเทศไทย	22
3.2.3	วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง	22
3.2.4	วิธี DAC indirect - ELISA	24
3.4	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ ของงุ่นในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)	25
3.5	การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรัม	26
3.5.1	การเตรียมแอนติเจน	26
3.5.2	การผลิตแอนติซีรัม	26
3.5.3	การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และความไว (sensitivity) ของ แอนติซีรัม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย	27
3.5.4	การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)	27
3.6	การพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม	27
3.6.1	Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)	27
3.6.2	Immunofluorescence microscopy	28
3.7	การสำรวจการแพร่ระบาดของโรคจากแปลงปลูก	28
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล	29
4.1	การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างงุ่นที่เป็นโรค	29
4.2	การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากงุ่นแสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบ ไหม้ในประเทศไทย	29
4.2.1	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	29
4.2.2	การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2.1	การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการเชื่อมแกรมและรูปร่างเซลล์..34
4.2.2.2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ34
4.2.2.3	การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด36
4.2.2.4	การตรวจลักษณะแฟลกเจลลาด้วยการเชื่อมแบบ silver impregnation.....37
4.2.2.5	การศึกษาลักษณะของแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน.....37
4.2.3	ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ38
4.2.4	ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย38
4.2.4.1	การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง38
4.2.4.2	การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน.....38
4.2.4.3	การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็น แหล่งคาร์บอน.....38
4.2.4.4	การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส38
4.2.4.5	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิทเรต39
4.2.4.6	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารแคลเซียมแลคเตต.....39
4.2.4.7	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีน39
4.2.4.8	การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ39
4.2.4.9	การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน39
4.2.4.10	การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะเลส39
4.2.4.11	การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบนินทรีย์ในเตรตเป็น แก๊สไนโตรเจน39
4.3	การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นใน ประเทศไทย48
4.3.1	วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง.....48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2	วิธี DAC indirect - ELISA.....	49
4.4	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing).....	49
4.5	การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม	50
4.5.1	การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่ม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย	50
4.5.2	การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)	51
4.6	การพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม	52
4.6.1	Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)	52
4.6.2	Immunofluorescence microscopy	54
4.7	การสำรวจการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูก	56
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	57
	รายการอ้างอิง	62
	ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย	69
ภาคผนวก ข	การเตรียมสารเคมี	75
	ประวัติผู้เขียน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยที่แยกได้จากองุ่นที่แสดงอาการของโรค ที่เก็บได้จากพันธุ์และสถานที่ต่างๆ32
4.2	ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และระดับความไว (sensitivity) ของแอนติซีรัมที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายที่ระดับต่าง ๆ50
4.3	ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธี indirect - ELISA.....51
4.4	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เตรียมแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วมีการปรับสภาพของแอนติเจน ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยวิธี indirect - ELISA.....53
4.5	ปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC ของตัวอย่างที่เตรียมแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วมีการปรับสภาพของแอนติเจน โดยวิธี Immunofluorescence microscopy55
4.6	ผลการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นจากพื้นที่แหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยตรวจหาด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy และ indirect - ELISA56
5.1	เปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากองุ่นที่แสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบไหม้ในประเทศไทย ไอโซเลต VN ₃ กับเชื้อ <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> (Nayudu, 1972), <i>X. ampelinus</i> and <i>X. axonopodis</i> (Holt, Krieg, Sneath, Staleg and Williams., 1994)...61

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.1	ลักษณะอาการของใบอ่อนที่แสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบใหม่ 30
4.2	(A) โคลโรซีของเชื้อแบคทีเรียแยกได้จากใบอ่อนที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ จากแบคทีเรียของอ่อนในประเทศไทย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (B) ลักษณะ โคลโรซีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอ่อนแสดงอาการเส้นใบใหม่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (C) ลักษณะอาการที่เกิดบนใบกิ่งชำอ่อนพันธุ์ Perlette Seedless หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN ₃ โดยแสดงอาการจุดสีเหลี่ยมมน้ำสีน้ำตาล – คำขนาดเล็กกระจายบนใบ(D) ลักษณะของแผลหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN ₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 31
4.3	(A) ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN ₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000x (B, C และ D) ลักษณะ โคลโรซีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN ₃ หลังจากเลี้ยงบนอาหาร NA, NA glucose 5% และ GYAC ตามลำดับ..... 35
4.4	ลักษณะพื้นผิวภายนอกของอ่อนที่แสดงอาการต่าง ๆ ของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียของอ่อนในประเทศไทย ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 36
4.5	ลักษณะแฟลกเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต VN ₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า 37
4.6	การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง..... 40
4.7	การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน 41
4.8	การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน 42
4.9	การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส..... 43
4.10	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรต..... 44
4.11	การทดสอบปฏิกิริยาการใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีน 45
4.12	การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ..... 46
4.13	การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบไนโตรเจนในเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน 47
4.14	แสดงผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) โดยใช้ชุด primer 2,3 . 48
4.15	แสดงปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN ₃ จากการทดสอบด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy..... 54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
As	=	antiserum
cfu	=	colony forming unit
CTAB	=	cetylmethylammonium bromide
DAC	=	direct antigen coating
ELISA	=	enzyme - linked immunosorbent assay
EtBr	=	ethidium bromide
IgG	=	immunoglobulin
NA	=	nutrient agar
PBS	=	phosphate buffer saline
PBS – T	=	phosphate buffer saline tween 20
PCR	=	polymerase chain reaction
rpm	=	round/min
SDS	=	sodium dodecylsulfate

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.) เป็นไม้ยืนต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มไม้เลื้อย (นันทกร บุญเกิด, 2543) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่น แต่องุ่นบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อน (วิณณรงค์ เหล่าประคิษฐ์, 2542) องุ่นเป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากในแทบทุกประเทศรวมถึงประเทศไทย พบว่าในปี 2542 ทั่วโลกมีการปลูกองุ่นรวมทั้งสิ้นประมาณ 46,302,944 ไร่ ให้ผลผลิตรวม 59,403,680 ตัน (CAB International, 1999) สำหรับในประเทศไทยในปัจจุบัน มีการปลูกองุ่นเป็นพื้นที่ประมาณ 24,600 ไร่ กระจายอยู่ทั่วประเทศ ผลผลิตทั้งหมดประมาณ 40,050 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) โดยพื้นที่ปลูกองุ่นในปี 2532 ได้ขยายจากภาคตะวันตกของประเทศไทยไปในหลายพื้นที่ของภาคต่าง ๆ ซึ่งมีสภาพอากาศแห้ง เช่น ในแถบภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง อยุธยา สระบุรี และลพบุรี แถบภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด แถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ อุบลราชธานี อุตรธานี ขอนแก่น และเลย ส่วนแถบภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดน่าน อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ เชียงราย และลำปาง จากรายงานการศึกษาโดยกรมส่งเสริมการเกษตร ในปี 2542 พบว่าองุ่นที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน แบ่งเป็นองุ่นรับประทานผลสดมีเมล็ด ได้แก่ พันธุ์ไวท์มาลากา (White malaga) คาร์ดินัล (Cardinal) เคียวโฮ (Kyoho) แบล็คควีน (Black queen) และองุ่นรับประทานผลสดไม่มีเมล็ด ได้แก่ พันธุ์ทอมสันซีดเลส (Thomson seedless), บิวตี้ซีดเลส (Beauty seedless) นอกจากการปลูกเพื่อรับประทานสด องุ่นยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์อื่น ๆ เช่น แยม น้ำองุ่น ลูกเกด องุ่นบรรจุกระป๋องและที่สำคัญที่สุด คือนำมาทำเป็นสุราผลไม้หรือไวน์

องุ่นเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับไม้ผลชนิดอื่น แต่การปลูกองุ่นมีอุปสรรคค่อนข้างมาก โดยเฉพาะปัญหาด้านโรคพืชและแมลงศัตรูพืช สำหรับแมลงศัตรูที่สำคัญ ได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น หนอนกระทู้หอม กระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น (นันทกร บุญเกิด, 2543) การปลูกองุ่นในประเทศไทยยังพบว่ามีภาวะระบาดของโรคต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดความ

เสียหายต่อคุณภาพ และผลผลิตขององุ่น ซึ่งได้แก่ โรคราน้ำค้าง (downy mildew) โรคราสนิม (rust) โรคสแคบ (scab) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และโรคกิ่งแห้ง (dead arm) นอกจากนี้ในต่างประเทศยังพบโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรีย (bacterial necrosis) ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกองุ่นของประเทศฝรั่งเศส อิตาลี สเปน กรีซ ตุรกี และทวีปแอฟริกา (Botha, Serfontein, Greyling and Berger., 2001) และเนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์องุ่นที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีจากเขตระบาดมาปลูก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีกิ่งพันธุ์องุ่นติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาและสำรวจโรคนี้ อย่างจริงจัง แม้ว่าจะพบองุ่นที่แสดงอาการคล้ายกับโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียในหลายพื้นที่ของการปลูกองุ่นในประเทศไทย ดังนั้นการระบุชนิดเชื้อสาเหตุ สำรวจ และตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวขององุ่นในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นเพื่อให้ทราบถึงแหล่งเพาะเชื้อและการแพร่ระบาดเพื่อเก็บรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
- 1.2.3 เพื่อสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

1.3 สมมติฐานการวิจัย

- 1.3.1 เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่มีรายงานในต่างประเทศ คือ เชื้อ *Xylophilus ampelinus*
- 1.3.2 วิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ยังไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจสอบโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
- 1.3.3 เนื่องจากมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์องุ่นจากเขตการระบาดจึงเป็นไปได้ที่จะมีองุ่นติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในประเทศไทย

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในพื้นที่ปลูกเฉพาะที่สำคัญในประเทศไทย โดยใช้วิธีมาตรฐานของการศึกษาแบคทีเรีย วิธีการตรวจสอบจะมุ่งเน้นเฉพาะวิธีที่ใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา โดยใช้วิธีอื่น ๆ เป็นวิธีอ้างอิง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 สามารถระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
- 1.5.2 สามารถพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
- 1.5.3 สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตองุ่นต่อไป

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น

องุ่นมีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณเอเชียไมเนอร์ แถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และแพร่ขยายออกไปทั้งทางตะวันออกและตะวันตกไปสู่ทวีปยุโรป อเมริกา เอเชีย และแหล่งอื่น ๆ ของโลก พันธุ์องุ่นทั้งหมดของโลกมีมากกว่า 8,000 พันธุ์ ซึ่งมีชื่อและลักษณะแตกต่างกันออกไป และมีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ที่ปลูกกันเป็นพันธุ์เพื่อการค้า (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542)

องุ่นเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ *Vitaceae* ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียวที่เป็นผลไม้รับประทานได้ องุ่นเป็นประเภทไม้เลื้อย มีมือจับเพื่อเกาะ เป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตอากาศอบอุ่น แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตอากาศกึ่งร้อนถึงอากาศร้อน แบ่งเป็นสกุลย่อยอีก 2 สกุลย่อย (subgenera) คือ *Euvitis* และ *Muscadinia* โดยยึดหลักความแตกต่างของลักษณะและจำนวนโครโมโซม คือ *Euvitis* มีจำนวนโครโมโซม 38 ส่วน *Muscadinia* มี 40 (นันทกร บุญเกิด, 2543)

ในอดีตประเทศไทยมีการปลูกองุ่นในแถบภาคตะวันตก เช่น จังหวัดราชบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี ในปี 2542 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นรวม 24,615 ไร่ ทั้ง ๆ ที่ในปี 2527 เคยมีพื้นที่ปลูกสูงถึง 27,275 ไร่ แต่เนื่องจากปัญหาความเสียหายจากโรคและแมลง ทำให้เกษตรกรจำนวนมากได้เปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นแทนองุ่น ส่งผลให้พื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่ดังกล่าวลดลง อย่างไรก็ตามในปี 2532 พื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายจากภาคตะวันตกของประเทศไทยไปในหลายพื้นที่ของภาคต่าง ๆ ซึ่งมีสภาพอากาศแห้ง เช่น ในแถบภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง อยุธยา สระบุรี และลพบุรี แถบภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด แถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ อุบลราชธานี อุดรธานี ขอนแก่น และเลย ส่วนแถบภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดน่าน อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ เชียงราย และลำปาง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542)

ระหว่างปี 2525 ถึง 2530 ประเทศไทยส่งออกผลผลิตองุ่นประมาณ 1,500 – 2,000 ตัน คิดเป็นร้อยละ 6 ของผลผลิตทั้งหมด และมีมูลค่าการส่งออก 20 – 40 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามมูลค่าการส่งออกลดลงเหลือ 1 – 6 ล้านบาทต่อปีในช่วงปี 2531 ถึง 2535 เนื่องจากคุณภาพไม่

สม้าเสมอ ผลมีขนาดเล็ก อายุการเก็บรักษาสั้นและต้นทุนการผลิตสูง จึงไม่สามารถแข่งขันกับประเทศอื่นที่ผลิตองุ่นรับประทานผลสดที่มีคุณภาพ ปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าองุ่นสดจากต่างประเทศ ซึ่งในปี 2541 มีปริมาณสูงถึง 1,004 ตัน คิดเป็นมูลค่า 90 ล้านบาท เนื่องจากพันธุ์องุ่นที่ปลูกเพื่อรับประทานผลสดในประเทศไทยมีน้อยพันธุ์ จึงมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์องุ่นที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีจากเขตที่มีสภาพภูมิอากาศใกล้เคียงกับประเทศไทยเข้ามาปลูก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542)

เนื่องจากองุ่นรับประทานผลสดและอุตสาหกรรมการผลิตไวน์องุ่นในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ดังนั้นจึงมีการนำเข้าไวน์องุ่นจากต่างประเทศเพิ่มขึ้นทุกปี จาก 68.6 ล้านบาท (0.92 ล้านดอลลาร์) ในปี 2530 เป็น 158.5 ล้านบาท (1.51 ล้านดอลลาร์) ในปี 2533 สำหรับในปี 2536 มีการนำเข้าคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 182 ล้านบาท โดยนำเข้าจากประเทศฝรั่งเศสร้อยละ 50 และจากประเทศออสเตรเลียร้อยละ 16 ส่วนที่เหลือเป็นการนำเข้าจากประเทศอเมริกาและอิตาลี มูลค่าการนำเข้าดังกล่าวเมื่อถูกขายปลีกมายังตลาดผู้บริโภคจะมีมูลค่าทางการตลาดสูงถึง 600 ล้านบาท

องุ่นเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับไม้ผลชนิดอื่น แต่การปลูกองุ่นมีอุปสรรคค่อนข้างมาก โดยเฉพาะปัญหาด้านโรคและแมลง สำหรับแมลงศัตรูที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยไฟ หนอนกระทุ้งหอม หนอนกระทุ้งผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น (นันทกร บุญเกิด, 2543) การปลูกองุ่นในประเทศไทยยังพบว่ามีการระบาดของโรคต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและผลผลิตขององุ่น ซึ่งได้แก่ โรคราน้ำค้าง โรคราสนิม โรคสแคบ โรคแอนแทรคโนส และโรค กิ่งแห้ง ซึ่งคล้ายกันกับที่พบในต่างประเทศ (นันทกร บุญเกิด, 2543) นอกจากนี้โรคเหล่านี้แล้วในต่างประเทศยังพบแผลจุดบนจากแบคทีเรีย (*grapevine bacterial canker disease : GVBCD*) ที่เกิดจากเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศอินเดีย และบราซิล (Lima., 2001) และพบโรคไหม้ (*bacterial blight, bacterial necrosis*) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกองุ่นของประเทศฝรั่งเศส อิตาลี สเปน กรีซ ทวีปยุโรปตอนใต้ และทวีปแอฟริกา (Botha *et al.*, 2001) ซึ่งทั้ง 2 โรคยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับโรค Pierce's disease ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* (Albibi and chen., 1998) เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสภาพอากาศแถบยุโรปและอเมริกามีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ โรคใบไหม้จากแบคทีเรียจึงทำความเสียหายในบางฤดูปลูกเท่านั้น โรคดังกล่าวมีรายงานพบครั้งแรกในองุ่น ประเทศกรีซ โดยในปี 1969 Panagopoulos (อ้างถึงใน Botha *et al.*, 2001) ได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุ และให้ชื่อว่า *Xanthomonas ampelina* ขณะที่ในปี 1895 Ravaz (อ้างถึงใน Botha *et al.*, 2001) ชาวฝรั่งเศสได้รายงานว่าพบโรค *maladie d' Oleron* ในองุ่นที่แสดงอาการคล้ายกัน แต่เกิดจากเชื้อ *Erwinia vitivora* ซึ่งปัจจุบันได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อชนิด

เดียวกันกับที่พบในกรีซ ต่อมาในปี 1987 Willems และคณะ (อ้างถึงใน Grall and Manceau., 2003) ได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุและจัดกลุ่มเชื้อตามชนิดของพืชอาศัย เนื่องจากลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อดังกล่าวเข้าทำลายในท่อน้ำขององุ่น จึงเปลี่ยนชื่อเป็น *Xy. ampelinus* โรคนี้สามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตขององุ่น ซึ่งจะเริ่มสังเกตอาการของโรคได้ชัดเจนหลังจากองุ่นแตกตา 2 – 3 สัปดาห์ โดยองุ่นที่เป็นโรคจะแสดงอาการ เนื้อเยื่อของท่อน้ำ (xylem vessels) ตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ กิ่งและก้านเกิดแผลจุดนูน ใบขององุ่นจะพบแผลจุดเหลี่ยมสีดำหรือน้ำตาลขนาด 1 – 2 mm. กรณีที่เนื้อเยื่อปลายยอดตาย จะทำให้ยอดองุ่นเหี่ยวแห้ง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญเติบโตของกิ่งองุ่นจะอ่อนแอ และแคระแกรน ตาขององุ่นอาจจะแตกช้ากว่าปกติ หรืออาจจะเสื่อมและตายในที่สุด ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตลดลงมากกว่า 80% (Botha *et al.*, 2001) ความรุนแรงของการเกิดโรคจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูก สภาพอุณหภูมิ ฤดูกาล และพันธุ์องุ่น สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับโรคดังกล่าว

2.2 ชีวิตวิทยาของเชื้อ *Xy. ampelinus* สาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่น

Kingdom Prokaryotae

Division Gracilicutes

Class Proteobacteria

Genus *Xylophilus*

Species *ampelinus*

เชื้อ *Xy. ampelinus* สาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นที่พบในต่างประเทศ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram – negative) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ขนาดเล็ก กว้าง 0.4 – 0.8 ไมโครเมตร และยาว 0.6 – 3.3 ไมโครเมตร มี flagellum 1 อัน (monotrichous) สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 6 - 33 องศาเซลเซียส และเมื่อเลี้ยงในอาหาร NA พบว่าเชื้อสร้าง โคลินี (colony) กลมมนูน ขอบเรียบ สีเหลือง - ขาว ผิวเป็นมัน ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ urease activity, denitrification และ glutamine utilization นอกจากนี้สามารถใช้น้ำตาลกาแลคโทส (galactose) และอะราบินโนส (arabinose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ มีความสามารถในการทนเกลือ 1% (Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams., 1994) เชื้อดังกล่าวเข้าทำลายองุ่นโดยไปอาศัยและเจริญอยู่ในเซลล์ท่อน้ำขององุ่นตลอดทั้งต้นและสามารถเคลื่อนย้ายและเพิ่มจำนวนได้ในท่อน้ำขององุ่น สามารถทำให้เกิดอาการได้ทั้งบนใบ ก้านและกิ่งขององุ่น โดยในระยะแรกใบจะแสดงอาการจุด

สีเหลืองน้ำขนาดใหญ่ (water soaked) ต่อมาแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น กลายเป็นแผลจุดเหลือง สีน้ำตาล (brown necrotic spot) ขนาด 1 – 2 mm บางแผลอาจมีวงแหวนสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ ถ้าอาการรุนแรงส่งผลให้ใบเหลืองแห้งตาย หรืออาจพบว่าเนื้อเยื่อของท่อน้ำจะตาย กลายเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ (dark brown to black necrotic tissue) บางกรณีพบอาการขอบใบแห้ง (marginal necrosis) ร่วมด้วย อาการบนกิ่ง ใบ และก้าน พบลักษณะเป็นแผลจุดขนุน (canker) ใจกลางแผลผิวจะขรุขระและมีสีน้ำตาลอ่อน กรณีที่เนื้อเยื่อปลายยอดตาย (necrosis) จะทำให้ยอดอ่อนเหี่ยวแห้ง ส่งผลให้ปริมาณและ คุณภาพผลผลิตลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญเติบโตของกิ่งอ่อนจะอ่อนแอ (weak) และแคระแกรน (stunt) ตาของยอดอ่อนจะแตกช้ากว่าปกติ (budbreak delayed) อาจจะมีและตายในที่สุด ความรุนแรงของการเกิดโรคจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูก สภาพอุณหภูมิ ฤดูกาลและพันธุ์ยอด

การแพร่ระบาดของเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางกิ่งพันธุ์ ท่อนพันธุ์ การติดตา ต่อกิ่ง จากต้นที่เป็นโรคและสามารถถ่ายทอดโดยพัดพาไปกับลม ระบบการให้น้ำและน้ำฝน ฉะนั้นโรคนี้ จึงแพร่ระบาดในฤดูฝนและแหล่งเพาะปลูกที่มีการใช้ระบบชลประทานชนิดสปริงเกอร์โดยสามารถเข้าสู่ยอดได้ปากใบ ยอด กิ่ง ก้าน และมือจับ ในด้านการป้องกันกำจัดและการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียของยอดมีอยู่หลายวิธีเช่น การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้ชิ้นส่วน เช่นกิ่งพันธุ์ของยอดที่ปราศจากโรคในการปลูก (pathogen free) และหลีกเลี่ยงระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์

2.3 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ของยอด

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช จำเป็นต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ ขบวนการติดเชื้อ การแพร่ระบาด การพัฒนาอาการของโรคของพืช ตลอดจนตำแหน่งของการ ติดเชื้อ หรือแหล่งอาศัยประจำของเชื้อในต้นพืช

ปัจจุบันวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียในตัวอย่างพืชมีหลายวิธีที่ปฏิบัติ การที่จะเลือกวิธีใดมาใช้ในการตรวจสอบวินิจฉัยโรคพืชขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำ และระดับความไวที่ต้องการ ซึ่งการตรวจหาเชื้อที่ให้ผลแม่นยำ และมีความไวสูง นับเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการศึกษา ซึ่งวิธีในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียมีอยู่หลายวิธีได้แก่

2.3.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อจากอาการของโรคที่ปรากฏ (symptoms)

การตรวจลักษณะและสังเกตอาการของโรคที่ปรากฏขึ้นบนต้นพืชเป็นเกณฑ์ ประการหนึ่งที่สำคัญในการวินิจฉัยสภาพการติดเชื้อ เนื่องจากพืชที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียจะแสดง ความผิดปกติที่มีลักษณะอาการค่อนข้างเด่น โดยพืชที่เป็น โรคจากแบคทีเรียจะแสดงอาการน้ำ

หรืออาจพบว่าเนื้อเยื่อตายกลายเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำเมื่อตัดเนื้อเยื่อแผลจะพบว่ามียีสกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมากที่รวมตัวกันอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช (ooze) ไหลออกมา ซึ่งในเนื้อเยื่อพืชปกติจะไม่มี ooze ไหลออกมา ซึ่งสามารถช่วยในการวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุได้ (วัลลา คิฐพงษ์พิชญ์, 2526)

2.3.2 การตรวจสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective medium)

การตรวจสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเป็นวิธีตรวจสอบที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวก โดยจะมีการเติมสารเฉพาะบางอย่าง เช่น การเติมสารอาหารที่เชื้อต้องการ การปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ต้องการศึกษา การเติมสารปฏิชีวนะเพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไม่ต้องการ เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อ saprophyte สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ต้องการศึกษา ปัจจุบันมีการคิดค้นอาหารสำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* สาเหตุโรคพืช (Chang, Donaldson, Crowley and Pinnow, 1989) เช่น *X. campestris* pv. *campestris* (Randhawa and Schaad, 1984); *X. campestris* pv. *juglandis* (Fatmi and Schaad, 1988) ซึ่งในปี 1981 Mulrean และ Schroth ได้พัฒนาอาหารสูตร brilliant cresyl blue - starch เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *juglandis* และต่อมาได้มีการพัฒนาใช้อาหาร XPSM ซึ่งมีการเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาล glucose เพื่อใช้ในการตรวจหาและแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *pruni* พบว่าการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบนอาหาร XPSM เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าบนอาหาร NA และสามารถตรวจพบแม้ว่าเชื้อมีความเข้มข้นเพียง 10^2 cfu/ml (Civerolo, Sasser, Helkie and Burbage, 1982) นอกจากนี้ Schaad and Forster (1985) ใช้อาหารสูตร XTS ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *translucens* สาเหตุของโรคในข้าวสาลี พบว่าอาหาร XTS สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ 91% ซึ่งโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร XTS มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองเป็นมันวาว

2.3.3 การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

การตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นวิธีที่ใช้สำหรับบ่งชี้สภาพการติดเชื้อและรูปร่างลักษณะ ตลอดจนโครงสร้างของเซลล์เชื้อ ในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สามารถช่วยในการตรวจเกี่ยวกับรูปทรงของเชื้อและสภาพการอยู่อาศัย หรือการเกาะกินเซลล์ขององุ่น และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) สามารถบอกได้ถึงตำแหน่งหรือบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อที่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และสามารถบอกการจัดเรียงตัวจำนวน และตำแหน่งแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กทรอนิกส์ เป็นการตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุของโรคหรือไม่ ซึ่งต้องกระทำควบคู่ไปกับวิธีอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยทำให้สามารถพิสูจน์ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าว

2.3.4 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้านเซรุ่มวิทยา (serology)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยามาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้รวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำในระดับที่น่าเชื่อถือ วิธีการทางเซรุ่มวิทยาที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

1. เทคนิค latex agglutination test (LAT)

เทคนิค latex agglutination test (Slack *et al.*, 1979 cited in Seal and Elphinstone, 1994) เป็นการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัมที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนชนิดนั้น ๆ (สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชิรธาดา, 2539) โดยแอนติเจนจะถูกเชื่อมโยงด้วยแอนติซีรัม จับกันจนมีขนาดใหญ่ เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอนสีขาวขุ่นขึ้น (agglutination) มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นภายใต้ตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตัวกลางที่จะนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาต้องมีลักษณะสำคัญ โดยจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน เช่น parafilm oil, collodion เป็นต้น มีการใช้เทคนิค LAT ในการตรวจหาโรคพืชหลายชนิด เช่น ตรวจหาเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และไฟโตพลาสมา (Omura, Hibino, Ussgi, Inoue, Morinaka, Tsurumachi, Ong, Putta, Tsuchizaki and Saito, 1984) โดยสามารถตรวจสอบได้ในอาหารเนื้อเยื่อพืช และแมลง ซึ่ง Fletcher and Slack (1986) ได้ตรวจหาเชื้อ *Spiroplasma citri* จากอาหาร พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^7 cfu/ml Denski, Bay and Khan (1986) รายงานว่าจากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี LAT สามารถตรวจหาเชื้อ bean yellow mosaic (BYMV), clover yellow vein (CYVY), alfafa latent (ALT) ที่ระดับ 0.5, 0.5 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้ กนกพร ถิ่นมาบแค (2542) สามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^7 cfu/ml และความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่เหมาะสม คือ 1 : 200

2. เทคนิค Ouchterlony diffusion

เทคนิค Ouchterlony diffusion (Ouchterlony and Nilsson, 1973 cited in Seal and Elphinstone, 1994) เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาการรวมกันระหว่าง

แอนติเจนและแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน โดยดูจากการให้แอนติเจนและแอนติซีรั่ม ซึมผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นเข้าหากัน เมื่อมีปฏิกิริยาเกิดขึ้น จะเกิดการรวมตัวเห็นเป็นตะกอนขาวขุ่น ซึ่งตะกอนแสดงถึงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่มแต่ละคู่ วิธีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อตรวจหา potato virus x potexvirus (PVX) และ potato virus S carlavirus (PVS) ซึ่งแพร่ระบาดเป็นจำนวนมาก

3. เทคนิค Immunofluorescence microscopy

การตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเรือง (fluorescence microscope) เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคในเนื้อเยื่อพืชได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจหาเชื้อที่มีในปริมาณที่น้อยในเนื้อเยื่อพืช เช่นมีเชื้อประมาณ 100 – 200 เซลล์ ถ้านำไปตรวจดูด้วย Bright Field นั้นจะมองเห็นตัวอย่างที่ต้องการตรวจดูไม่ชัดเจน เนื่องจากมีเนื้อเยื่ออื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นการที่จะสร้างความแตกต่างระหว่างเชื้อสาเหตุและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืชสามารถทำได้โดยการย้อมสีซึ่งมีสารเรืองแสงเป็นองค์ประกอบ วิธีการ Immunofluorescence (Malin, Roth and Belden, 1983) เริ่มใช้ครั้งแรกในการจำแนกแบคทีเรีย สาเหตุโรคพืชในปี ค.ศ. 1943 และใช้กันอย่างแพร่หลายในปี ค.ศ. 1965 วิธีนี้เป็นการตรวจหาเชื้อ สาเหตุของโรคพืชโดยใช้ปฏิกิริยาการจับยึดกันระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่ม ด้วยการย้อมสีติด ฉลากกับแอนติซีรั่มเข้าร่วมในปฏิกิริยา (Malin *et al.*, 1983; สุรนนท์ ศิริระวัฒนพงษ์ และ อรทัย กังวาลศิริธาดา, 2539) ซึ่งสามารถติดฉลากสารเรืองแสงเหล่านี้บนแอนติซีรั่มได้โดยไม่ทำให้ คุณสมบัติของแอนติซีรั่มสูญเสียไป สารที่นิยมนำมาติดฉลาก ได้แก่ Fluorescein isothiocyanate (FITC) สีพวกนี้จะมีความสามารถเรืองแสงได้ จะเห็นวัตถุที่ถูกย้อมสีเกิดการเรืองแสงขึ้นมา แสงที่ ส่องมีความเข้มสูงใช้ประกอบกับที่กรองแสง ซึ่งกรองแสงสีอื่น ๆ ไว้หมด นอกจากอุลตราไวโอเล็ต และแสงที่มีช่วงแสงใกล้เคียงกัน ตัวอย่างที่ส่องนั้นนำมาย้อมสีก่อนด้วยสีเขียวอย่างเช่น FITC ตรงเลนส์ที่ตาใส่ที่กรองแสงสีเขียวไว้ด้วย และที่กรองแสงสีเขียวตรงเลนส์ที่ตา จะทำให้เกิดฉากสี ดำขึ้น วัตถุที่ย้อมสีเขียวไว้จะเรืองแสงในแสงอุลตราไวโอเล็ต และฉายแสงสีเขียวออกมา ผ่านมาที่ กรองแสงสีเขียวที่เลนส์ที่ตา ปรากฏออกมาเป็นรูปเป็นร่างของเชื้อสาเหตุของโรคพืช สารเรืองแสง แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการดูดซับและปล่อยแสงสีเขียวที่ 517 นาโนเมตร สามารถตรวจผลได้ โดยส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง และต่อมามีรายงานว่าได้นำวิธีการนี้มาใช้ในการ ตรวจหาและศึกษาคำแหน่งของเชื้อแบคทีเรียในชิ้นส่วนพืชและในดิน โดย ชนิดา เล็กสมบูรณ์ (2535) ทำการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของ โรคใบจุดของมันสำปะหลัง โดยใช้วิธี indirect immunofluorescent staining (IF) พบว่าสามารถ ตรวจหาเชื้อบนใบมันสำปะหลังได้ประมาณ 10^3 เซลล์ต่อพื้นที่ใบ 1 ตารางเซนติเมตร และตรวจหาเชื้อ

ได้ปริมาณ 10^3 ในดิน 1 กรัม และสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ประโยชน์เพื่อใช้ในการประกอบการวินิจฉัยสาเหตุของโรคพืช ต่าง ๆ ในการตรวจดูความสัมพันธ์กันระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย ซึ่ง Grall and Manceau (2003) ได้ทำการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ในองุ่นที่แสดงอาการของโรค bacterial necrosis ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง โดยย้อมเนื้อเยื่อขององุ่นปกติและองุ่นที่แสดงอาการของโรค bacterial necrosis ด้วย green fluorescence protein-label (*gfp*) พบความแตกต่างระหว่างท่อลำเลียงน้ำขององุ่นปกติและองุ่นที่แสดงอาการของโรค bacterial necrosis โดยบริเวณที่พบเชื้อแบคทีเรียจะมีการเรืองแสงสีเขียวของ *gfp* ในขณะที่องุ่นปกติไม่พบการเรืองแสงของสารดังกล่าว ซึ่งแสดงว่าองุ่นที่แสดงอาการของโรค มีการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

4. เทคนิค Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

ได้มีการปรับปรุงการทดสอบ ซึ่งอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ให้มีความไว และความจำเพาะสูงขึ้น โดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (label) ไว้ด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารเรืองแสง (fluorescent dye) สารกัมมันตภาพรังสี (radioisotope) มาใช้ในการทดสอบเหล่านั้น ถึงแม้การทดสอบดังกล่าวจะมีความไวสูง แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการในการใช้ เช่น วิธี immunofluorescence ซึ่งใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลาก มีข้อเสีย คือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการทดสอบ เช่น กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) จึงได้มีการคิดค้นสารอื่น ๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารติดฉลากได้ และมีข้อดีกว่าสารเรืองแสง สารชนิดหนึ่งที่พบว่าสามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี คือ เอนไซม์ (enzyme) เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุล สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น (substrate) ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลาก จึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบ นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีความคงทน สามารถเก็บไว้ได้นานในสภาวะต่าง ๆ ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้นทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายและชัดเจน โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และเมื่อต้องการบันทึกผลโดยละเอียด ก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มข้นของสี หรือวัดค่าการ ดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นจากเครื่อง ELISA reader

หลักการคือการนำเชื้อสาเหตุของโรค แอนติบอดี หรือแอนติเจนมาติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะไม่ทำให้คุณสมบัติของสารเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไป เช่น เอนไซม์ alkaline phosphatase การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สามารถตรวจสอบได้โดยการใส่สารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์นั้นลงไป เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาเกิดการย่อยสารตั้งต้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง

spectrophotometer หรือ ELISA reader (สุรนนท์ ศีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชิรธาดา, 2539) ปริมาณของสารตั้งต้น ที่ถูกย่อยจะเท่ากับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่อยู่ในตัวอย่างที่นำมาตรวจ วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณน้อย (highly sensitive) และยังสามารถใช้ในการตรวจหาแอนติเจนที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เช่น โปรตีนขนาดเล็ก อนุภาค ไวรัส สปอร์เชื้อรา และเซลล์ของแบคทีเรีย (Clark, 1981) สำหรับวิธี ELISA นับเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถตรวจได้เป็นปริมาณมากในแต่ละครั้ง เหมาะสำหรับการตรวจในทางปฏิบัติ อีกทั้งยังมีราคาไม่สูงเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณชนิดตัวอย่างที่ตรวจ รวมทั้งประสิทธิภาพความไว และยังมีความจำเพาะเจาะจงในระดับที่เชื่อถือได้ และถ้าต้องการความจำเพาะเจาะจงในระดับสูงขึ้นก็อาจใช้แอนติบอดีชนิดที่เป็น โมโน โคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่ได้รับการคัดเลือกจากการกระตุ้น โดยแอนติเจนที่มีคุณสมบัติเฉพาะและความบริสุทธิ์สูง ใช้สำหรับการตรวจสอบ ในปี 1982 Civerolo และคณะ ได้ใช้วิธี double antibody sandwich – ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อที่มีความเข้มข้นเพียง $10^4 - 10^5$ cfu/ml และพบว่า การตรวจโดยวิธี ELISA มีความจำเพาะเจาะจงกว่าการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และต่อมาในปี 1989 Norman และ Alvaraz ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* โดยใช้ selective medium 3 ชนิด คือ cellobiose – starch medium, flelfhouse – sasser medium และ aesculin – trehalose medium กับวิธี ELISA พบว่าวิธี ELISA จะให้ผลรวดเร็วและแน่นอนกว่าการใช้ selective medium ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ในปี 2535 ชนิดา เล็กสมบุญญ์ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี IF (immunofluorescent staining), ELISA และวิธี dot – immunobinding assay พบว่าวิธี IF สามารถตรวจสอบได้ sensitive กว่า คือ สามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้นเพียง 9.7×10^2 cfu/ml ส่วนวิธี ELISA และ dot – immunobinding assay สามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน คือ 9.7×10^6 cfu/ml

5. เทคนิค Dot blotting

การตรวจเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยวิธี ELISA เป็นวิธีการที่ให้ผลดี และรวดเร็วมากในการตรวจวินิจฉัยโรคพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากไวรัส เนื่องจากมีความไวสูงในการตรวจสอบ และยังสามารถเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อได้จากความเข้มของสี โดยวัดค่าการดูดซับคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามการใช้ ELISA ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีนั้นบางกรณีไม่นิยมใช้กันนัก เนื่องมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียยึดเกาะกับผิวของพลาสติก (microtiter plate) ไม่ได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาใช้ nitrocellulose membrane เป็น solid phase แทนหลุมพลาสติกในการทดสอบสารแอนติเจนต่อ โมโน โคลนอลแอนติบอดี และพบว่าให้ผลดี และเรียก

วิธีการนี้ว่า dot – immunobinding assay (DIA) วิธีการดังกล่าวอาจมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น membrane immunobinding assay (MIBA) (Abad and Moyer, 1992) หรือ dot blot immunoassay (DBIA) (Hsu and Lawson, 1991) วิธีการนี้ได้มีการพัฒนาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสของพืชและเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวกระดาษไนโตรเซลลูโลส นั้นดีกว่าบนหลุม microtiter plate มีรายงานว่าวิธีการนี้ sensitive กว่าวิธี ELISA 8 เท่า เมื่อทดลองกับเชื้อไวรัส tomato spotted wilt *tospovirus* (Hsu and Lawson, 1991), cymbidium mosaic *potexvirus* ในกล้วยไม้ (Hsu, Vongsasitorn, and Lawson, 1992)

2.3.5 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้าน nucleic acid (nucleic acid technique)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านกรดนิวคลีอิก มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เทคนิคดังกล่าวอาศัยการจับคู่กันระหว่างนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกที่เป็นคู่สมกัน มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุของโรคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคดังกล่าวมีความไว แม่นยำและความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา (Seal and Elphinstone, 1994) เทคนิคที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ ดังนี้

1. ปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (polymerase chain reaction : PCR)

polymerase chain reaction : PCR เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยาร่วมกับการใช้ primer ที่จำเพาะ (พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ, 2540) ซึ่ง primer คือสายนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวท่อนสั้น ๆ มีขนาดประมาณ 20 - 30 เบสที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบโดยครอบคลุมบริเวณขึ้นหรือส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน 2 เส้นที่มีทิศทางในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเข้าหากันเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา เอนไซม์ DNA polymerase นำนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A, T, C, G) มาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอโดยใช้ primer เป็นจุดเริ่มในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสเรียงตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template)

เทคนิค PCR พัฒนาขึ้นมาเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1985 โดย Kary Mullis นักชีวเคมีของบริษัท Cetus Corporation เพื่อใช้ในการจำแนก specific DNA sequence ในสารละลายที่มีกลุ่มของ sequence DNA เป็นจำนวนมากปะปนกันอยู่ แล้วเพิ่มปริมาณส่วน targeted sequence นี้ขึ้นมาเป็นล้านเท่าโดยผ่านวิธีกึ่งอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาเพียง 1 หรือ 2 ชั่วโมงเท่านั้น (นิพนธ์ ทวีชัย, 2540) ดังนั้นจุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนในการทำงานและการใช้น้อย ต่อมาได้มีการพัฒนาปรับปรุง

ในหลายๆด้าน เพื่อให้วิธีการปฏิบัติงานง่ายขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการค้นพบเอนไซม์ polymerase ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ และการทำให้กระบวนการต่างๆ ดำเนินไปได้โดยอัตโนมัติ โดยผ่านการใช้ microprocessor- controlled thermal cyclers แม้แต่การจำแนกและเพิ่มปริมาณ RNA sequence ก็สามารถทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) เปลี่ยนให้เป็นต้นแบบ cDNA ก่อน ซึ่งเรียกว่า RT - PCR ในปัจจุบัน PCR ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาซึ่งใช้กันเป็นประจำสำหรับงานตรวจจำแนกดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเองงานด้านการโคลนนิ่ง (gene cloning) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในทางการเกษตร PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคพืช เป็นต้น

หลักการและเทคนิค PCR มีองค์ประกอบพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single - stranded DNA template) คือ สายดีเอ็นเอที่มีบริเวณส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ ซึ่งดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่จะจำลองตัวตามดีเอ็นเอต้นแบบ, primer คือ ดีเอ็นเอสั้นเดี่ยวสั้นๆ จำนวนตั้งแต่ 10 - 20 เบสต่อกัน เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (โอลิโกนิวคลีโอไทด์) ที่เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านปลาย 3' ของ ดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างสายดีเอ็นเอที่ต้องการ, dNTPs (deoxy-nucleotide triphosphate) คือเบส A, T, C, G ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของสายของดีเอ็นเอ, เอนไซม์ DNA polymerase คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอมีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถทนความร้อนสูง (93 - 95 องศาเซลเซียส) ได้, เครื่อง PCR (thermocycler) คือเครื่องเปลี่ยนอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ (เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, 2545)

ปฏิกิริยาของ PCR ในแต่ละรอบมีขั้นตอน คือ ปฏิกิริยาการแยกคู่ของสายดีเอ็นเอ (denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติจากที่เคยเป็นสายคู่กลายเป็นสายเดี่ยวเพื่อเปิดโอกาสให้ primer สามารถเข้าไปจับกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณบนสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ ขั้นตอนนี้ทำได้โดยการใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 94 - 95 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายพันธะที่ใช้ในการจับคู่กันของสายดีเอ็นเอ, ปฏิกิริยาการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (annealing) หลังจากที่ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50 - 55 องศาเซลเซียส primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสั้นเดี่ยวท่อนสั้นๆ จะเข้าไปเกาะบริเวณที่เป็นคู่สมกันบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ, ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) หลังจาก primer เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบเรียบร้อยแล้ว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นมาถึง 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานด้วยการเชื่อมต่อ

เบสทั้งสี่ชนิดโดยจะจัดลำดับการเรียงตัวของเบส ตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบจาก ขั้นตอนนี้การสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จึงเกิดขึ้น หลังจากเสร็จสิ้นสามขั้นตอนถือเป็นหนึ่งรอบของ ปฏิกริยาเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมากพอ เมื่อมีการทำซ้ำในขั้นตอน 1 - 3 ของ PCR ให้มี จำนวนรอบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมาก กล่าวได้ว่า เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคพืช โดยสามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในพืชได้ และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ เฉพาะเจาะจง และมีความไวสูง (sensitive) ซึ่ง วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์, เพชรรัตน์ ศิริวงศ์, ชีรดา หวังสมบุญดี, จุฑาทพ วัชรไชย คุปต์ และประสาน สืบสุข (2541) ได้ทำการตรวจหา *Ralstonia solanacearum* ที่ปนเปื้อนในดิน และต้นมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR โดยการใส่ primer เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายขนาด 705 bp สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้จากดิน 6 ตัวอย่างจากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง นอกจากนี้ Botha และคณะ (2001) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ nested - PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* สาเหตุของโรค bacterial blight ในองุ่น โดยใช้ specific primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-GGT GTT AGG CCG AGT AGT GAG-3' (S3) และ 5'-GGT CTT TCA CCT GAC GCG TTA-3' (S4) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด 277 bp อย่างไรก็ตามความไวและความจำเพาะเจาะจงของการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคยังมีข้อจำกัด เนื่องจากประสิทธิภาพการตรวจถูกจำกัดด้วยสารยับยั้งการเพิ่มปริมาณ DNA (PCR inhibitor) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และกรดฮิวมิก (humic acid) เป็นต้น

2. ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันด้วยการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจจับ (nucleic acid hybridization)

การตรวจด้วยวิธี nucleic acid hybridization โดยใช้ DNA probe เป็นการนำดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคพืช มาใช้ในการติดตามโดยอาศัยการจับคู่กันระหว่างนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย (target) ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และกรดคลีอิกสำหรับติดตามซึ่งเป็นที่ทั้งดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเช่นเดียวกัน วิธีการนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างและจัดกลุ่มการของเชื้อสาเหตุของโรคได้ การที่จะเกิดไฮบริไดเซชันได้จะต้องมีความคล้ายคลึงกันระหว่างกรดนิวคลีอิกเป้าหมายและ probe โดยมีการติดฉลากดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เช่น P^{32} หรือสารที่ไม่ใช่สารกัมมันตภาพรังสี เช่น biotin เพื่อทำการตรวจสอบและบ่งชี้การเกิดไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่สนใจ ซึ่ง Sela, Rechman และ Weissbach (1984) รายงานว่า วิธี nucleic acid hybridization สามารถตรวจ TMV - RNA ได้ที่ระดับ 2.5 พิโคกรัม และมีความไวเป็น 2 เท่าของวิธี ELISA

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุ้งนที่เป็นโรค

นำตัวอย่างอุ้งนที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียของอุ้งนจากพื้นที่ปลูกจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์ และพิจิตร มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate method ตามวิธีการของ Schaad (1980) โดยล้างใบอุ้งนที่เป็นโรคให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณแผลเดี่ยว โดยให้คาบเกี่ยวระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติจำนวน 5 แผลต่อตัวอย่าง นำชิ้นส่วนที่ตัด ล้างใน 10% chlorox จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ หยคน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ด้ามเข็มเย็บที่ลนไฟฆ่าเชื้อและรอให้เย็นบดชิ้นส่วนอุ้งนให้ละเอียด จากนั้นใช้ loop ตะสารแขวนลอยที่ได้มา streak บนอาหาร NA นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกลูกโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ สีขาวเป็นมัน ตรงกลางนูนสีเหลืองอ่อน ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มา streak บนอาหาร NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอุ้งนแสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ในประเทศไทย

3.2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

ซำกิ่งอุ้งนในขวดปากแคบ หลังจากอุ้งนแตกใบใหม่ นำต้นอุ้งนที่เตรียมไว้มาใช้เป็นพืชทดสอบ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃, BS₁, BS₂ และ BS₃ ที่แยกได้ ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ (bacterial suspension) ให้ได้ความเข้มข้น 10⁷ cfu/ml ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นด้วย heamacytometer นำสารแขวนลอยเชื้อผสมกับ celite ให้ได้ความเข้มข้น 1% (v/w) ใช้ลำลี้ก้านจุ่ม นำมาถูกลงบนใบอุ้งนที่เตรียมไว้ โดยใช้ใช้น้ำกลั่นผสม celite เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลังจากปลูกเชื้อเสร็จแล้ว คลุมถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นแก่อุ้งน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก ตรวจสอบผลการเกิดโรค และวันแรกที่อุ้งนแสดงอาการของโรค

3.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction)

และรูปร่างของเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรค isolate VN₃ เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการติดสีแกรมตามวิธีของ Schaad (1980) โดย smear เชื้อบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วตรึงเซลล์แบคทีเรียให้ติดแน่นกับแผ่นสไลด์ โดยการลนผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นย้อมเชื้อด้วย crystal violet solution ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดโดยให้ไหลผ่านเบา ๆ ประมาณ 5 วินาที แล้วหยด iodine solution ให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยด 95% ethanol ให้ท่วม ล้างจนกระทั่งสีไม่มีสี ล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดด้วย safranin O solution ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้จนแห้งนำไปตรวจผล โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อแบคทีเรียเป็นแกรมลบ (gram negative) จะติดสีแดงของ safranin O และถ้าเป็นแกรมบวก (gram positive) จะติดสีม่วงของ crystal violet จากนั้นทำการถ่ายภาพรูปร่างเซลล์แบคทีเรียเพื่อบันทึกผล และวัดขนาดโดยเทียบกับไมโครมิเตอร์ วัดขนาดจาก 100 เซลล์ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของขนาด

3.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ (colony characteristics)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ คือ galactose yeast extract agar CaCO₃ (GYAC), NA และ NA glucose 5% บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีบนอาหารแต่ละชนิด

3.2.2.3 การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope : SEM)

วิธีการนี้ใช้ช่างีการมีเชื้อแบคทีเรียอยู่บริเวณเนื้อเยื่อของงูที่แสดงอาการของโรค ซึ่งอาจช่วยให้สามารถวินิจฉัยยืนยันสภาพการติดเชื้อและยังทำให้ทราบถึงลักษณะรูปร่าง สัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อของงูมาตรวจเพื่อยืนยันผลภายใต้กล้อง SEM ดังนี้ ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียของงูนั้น ตัดบริเวณแผลเดี่ยวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้คาบเกี่ยวระหว่างเนื้อเยื่อของงูที่แสดงอาการของโรคและเนื้อเยื่อปกติ จำนวนตัวอย่างละ 5 ชิ้น แช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ รักษาสภาพตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายออสเมียมเทททรอกไซด์ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ขจัดน้ำออกโดยแช่ใน ethanol ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤติด้วยเครื่อง

critical point dryer ติดตัวอย่างบนแท่นรองรับตัวอย่าง ฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง นำไปศึกษาด้วยกล้อง SEM ของบริษัท JEOL รุ่น JSM 6400 electron microscope (อรรถัญญา ดันติปัญญพร, 2534)

3.2.2.4 การตรวจลักษณะแฟลกเจลลาด้วยการย้อมแบบ silver impregnation

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาตรวจลักษณะแฟลกเจลลาด้วยการย้อมแบบ silver impregnation ล้างเซลล์ของแบคทีเรียที่สะสมที่ก้นหลอด โดยใช้ micropipette ดูดน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ หยดลงไปบริเวณก้นหลอด แล้วดูดออกโดยทำซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงบนบริเวณผิวหน้าอาหารที่เชื้อเจริญเติบโต แล้วกลิ้งหลอดไปตามแนวอนเบนๆ นำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้มาเจือจางลงในอัตราส่วน 1/2, 1/4, 1/16 และ 1/32 จากนั้นหยดเชื้อแบคทีเรียในความเข้มข้นต่าง ๆ ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดที่เอียง 30 องศา จนกระทั่งสารแขวนลอยเชื้อไหลช้า ๆ ลงสู่ด้านล่างจนถึงเส้นที่ทำไว้โดยดินสอเขียนแก้ว ตั้งทิ้งให้แห้งในอากาศ จากนั้นย้อมเชื้อด้วย tannic acid solution ให้ทั่วบริเวณที่กระจายเชื้อไว้ ทิ้งไว้ 4 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด 2% ammoniated silver nitrate solution pH 10.0 ให้ทั่วบริเวณเดิม ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น เซลล์แบคทีเรียและแฟลกเจลลาจะติดสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลดำบนพื้นสีเหลือง จากนั้นทำการถ่ายภาพรูปร่างเซลล์แบคทีเรียเพื่อบันทึกผล

3.2.2.5 การศึกษาลักษณะของแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope : TEM)

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ในการศึกษาลักษณะแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย เป็นวิธีการที่นิยมกันมากในสถาบันหรือห้องปฏิบัติการที่มีกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เนื่องจากวิธีการศึกษานั้นทำได้ง่ายกว่าการย้อมสีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และให้ผลดีและรวดเร็วกว่า โดยนำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงในอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง รายละเอียดของวิธีการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.4 จากนั้นหยดเชื้อแบคทีเรียในความเข้มข้นต่าง ๆ ลงบนกริดแต่ละอันที่ได้เคลือบด้วยฟิล์ม Formvar และฉาบด้วยฟิล์มของละอองถ่านมาก่อนแล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที ชับน้ำออกด้วยกระดาษกรอง นำไปย้อมสีแบบเนกาตีฟ โดยลอยกริดบนหยดของ 1% uranyl acetate pH 4.3 เป็นเวลา 2 นาที ชับน้ำส่วนเกินให้แห้งด้วยกระดาษกรอง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ของบริษัท JEOL รุ่น JEM 2010 electron microscope

3.2.3 ปฏิกริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26, 33 และ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ

3.2.4 ปฏิกริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar (Schaad, 1980) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยตรวจสอบการย่อยแป้งของเชื้อด้วยการหยดสารละลายไอโอดีน (Lugol's iodine solution) ลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อให้ท่วมเชื้อ ตรวจสอบการเกิดบริเวณโปร่งแสงรอบโคโลนี (clear zone) แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ บันทึกผลเป็นบวก และถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งได้ บันทึกผลเป็นลบ

3.2.4.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบการย่อยเจลาตินในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร gelatin medium (Schaad, 1980) โดยใช้เข็มฉีดยาปลายแหลมแทงลงไปในอาหาร นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยนำหลอดทดลองใส่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้ อาหารในหลอดทดลองจะไม่แข็งตัว บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าอาหารยังแข็งตัว แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ บันทึกผลเป็นลบ

3.2.4.3 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (acid production from carbohydrates)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Medium C slant (Schaad, 1980) ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ดังนี้ น้ำตาลกาแลคโตส (galactose), กลูโคส

(glucose), แลคโทส (lactose), อะราบินโนส (arabinose), มอลโทส (maltose), ซูโครส (sucrose), เซลโลไบโอส (cellobiose), แมนโนส (mannose), ฟรุคโทส (fructose) และไรโบส (ribose) โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 1 % นำไปป่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยตรวจสอบผลจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ บันทึกผลเป็นบวก

3.2.4.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร urea broth (Schaad, 1980) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บน shaker ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ จะย่อยยูเรียในอาหารให้แตกตัวเป็นแอมโมเนีย เพื่อนำไปใช้เป็น nitrogen source มีผลทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างมากขึ้นและเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีชมพูแดงตามสีแดงของ indicator คือ phenol red ซึ่งที่สภาพความเป็นกรดหรือด่างหรือกลาง (pH 6.9 หรือต่ำกว่า) จะมีสีเหลือง และถ้าเป็นด่างจัด (pH มากกว่า 8.5) จะเปลี่ยนเป็นสีแดง

3.2.4.5 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรต (citrate utilization)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรตบนจานอาหารทดสอบ citrate utilization agar (Schaad, 1980) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยตรวจสอบผลจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

3.2.4.6 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารแคลเซียมแลคเตต (calcium lactate)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบปฏิกิริยาการใช้สาร calcium lactate บนจานอาหารทดสอบ calcium lactate utilization (modified from Schaad, 1980) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยตรวจสอบผลจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

3.2.4.7 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีน (glutamine utilization)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ คูดสารแขวนลอยเชื้อ 100 ไมโครลิตร หยดบนอาหาร L - glutamine broth (modified from Schaad, 1980) บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บน shaker ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ

3.2.4.8 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ (NaCl tolerance)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการทนเกลือบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl 1%, 2%, 4% และ 5% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารที่มีปริมาณ NaCl ต่าง ๆ กัน บันทึกผลการเจริญเติบโต

3.2.4.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการย่อยไขมันบนอาหาร tween 80 agar (Schaad, 1980) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ ถ้าเชื้อสามารถย่อยไขมันได้จะสังเกตเห็นรอบ ๆ โคลินี้จะเป็นจุดที่ขนาดเล็กรวมกันทำให้มีลักษณะขุ่นและทึบแสง บันทึกผลเป็นบวก ขณะที่บริเวณที่ไม่ถูกย่อยสีของอาหารจะใส บันทึกผลเป็นลบ

3.2.4.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase activity)

ใช้ loop และเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา smear ลงบน สไลด์ที่สะอาด หยด 3% H₂O₂ ลงบนเชื้อ คนให้เข้ากัน ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสจะสามารถไปกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วปล่อยแก๊สออกซิเจนอิสระออกมา

3.2.4.11 การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบนินทรีย์ในเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ คูดสารแขวนลอยเชื้อหดยคบนอาหาร Nitrate Reduction Broth (Schaad, 1980) บ่มที่ 26 องศาเซลเซียสบน shaker ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ตรวจสอบในวันที่ 2, 4 และ 7 หลังจากปลูกเชื้อ บันทึกผลเป็นบวกเมื่อเกิดก๊าซไนโตรเจนขึ้นในหลอดดักก๊าซ

3.3 การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

3.3.1 วิธีเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction)

วิธีการนี้ใช้เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้ที่แยกได้จากองุ่นในประเทศไทยเป็นเชื้อ *Xy. ampelinus* และเชื้อ *Xanthomonas axonopodis pv. citri* หรือไม่ โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงของ *Xy. ampelinus* และ *X. axonopodis pv. citri* เป็นตัวตรวจสอบ โดยนำแบคทีเรียที่ได้รับการตรวจสอบเบื้องต้นว่าสามารถทำให้เกิดโรค ไอโซเลต VN₃ ที่เลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ ใส่ตัวอย่างใน microfuge tube คัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากวิธีของ CTAB method (1973) นำไปปั่นเหวี่ยงเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง จะได้ pellet ของเชื้อแบคทีเรีย เติมน้ำสกัดละลาย extraction buffer นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น เติมน้ำ 5M NaCl และ CTAB – NaCl เติมน้ำสกัดละลาย chloroform : isoamyl alcohol ให้เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด เขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นแยกตะกอนใน microcentrifuge คูดสารละลายชั้นบนเก็บในหลอดใหม่ แล้วเติมน้ำ isopropanol ลงไปเขย่าเบา ๆ นำหลอดไปปั่น จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล แล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยง เทเอทานอลทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้ายตะกอนดีเอ็นเอใส่หลอด แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Botha และคณะ (2001) โดยใช้ชุด primer S3, S4 ซึ่งเป็น specific primer ได้มาจากการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Xy. ampelinus* ที่มีในธนาคารยีน ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-GGT GTT AGG CCG AGT AGT GAG-3' (S3) และ 5'-GGT CTT TCA CCT GAC GCG TTA-3' (S4) ตามลำดับ (Botha *et al.*, 2001) และใช้ชุด primer 2, 3 ซึ่งเป็น specific

primer ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT TC-3' (primer2) และ 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT GG-3' (primer3) ตามลำดับ (Hartung Daniel and Pruvost., 1993) ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ จำนวน 25 นาโนกรัม, dATP dGTP dCTP และ dTTP ชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์, primer ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.15 ยูนิต ใน 1X PCR buffer ที่มีสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermocycler (ยี่ห้อ Thermo Hybaid Px2, Cat. No. HBPXBFB) กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชนิด โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR ของเชื้อ *Xy. ampelinus* คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปรับอุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ และปรับอุณหภูมิ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (Botha *et al.*, 2001) สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1% agarose gel ในสารละลาย TBE โดยใช้ horizontal slab gel electrophoresis (ยี่ห้อ GelMate 2000, Toyobo) ในการวิเคราะห์ใช้ตัวอย่าง (PCR product) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer (ที่มี EtBr ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันจนส่วนผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินก่อนนำไป load ลงในแต่ละช่องของแผ่นเจลช่องละ 1 ตัวอย่าง และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 bp เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ กำหนดค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าคงที่ในอัตรา 5 volt/cm จากนั้นตรวจสอบแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminators) (ยี่ห้อ Vilber lourmate Cat. No. V037411) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกภาพ

3.3.2 วิธี direct antigen coating indirect enzyme - linked immunosorbent assay (DAC indirect ELISA)

สำหรับวิธีการ DAC indirect ELISA นำมาใช้เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้ที่แยกได้จากองุ่นในประเทศไทยเป็นเชื้อ *Xy. ampelinus* หรือไม่ เช่นเดียวกันกับวิธี PCR แต่ในกรณี DAC indirect ELISA จะใช้หลักการการจับกันของ antigen – antibody complex ซึ่งการตรวจสอบใช้ *Xylophilus ampelinus* Kit complete (Cat. No. 07138) ของบริษัท LOEWE Biochemical GmbH, Germany เป็นชุดตรวจสอบ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อองุ่นที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นที่เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์ และพิจิตร มาหั่นแผลเป็นชิ้นฝอย ใส่ลงใน microfuge tube ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นละลายตะกอนด้วย carbonate coating buffer นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 นาที รวมทั้งนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทำให้เกิดโรคและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีมาละลายด้วย carbonate coating buffer นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ไปตรวจ โดยดูดสารแขวนลอยของเชื้อใส่ในแต่ละหลุมของ microtitre plate และใช้ positive control, negative control ที่บรรจุอยู่ในชุด *Xylophilus ampelinus* Kit complete นำมาละลายด้วย carbonate coating buffer จากนั้นหยอดลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 หลุม นำ microtiter plate ใส่ในกล่องพลาสติกขึ้น ใส่อุณหภูมิค้างไว้ 1 คืน เทตัวอย่างที่ทดสอบทิ้ง หยอด blocking solution ใน carbonate coating buffer (1% skim milk) บ่มในกล่องขึ้นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง microtiter plate ด้วย PBS - T 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที จากนั้นเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ใน conjugate buffer ที่ระดับความเจือจาง 1 : 400 บ่มในกล่องพลาสติกขึ้นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้าง microtiter plate ด้วย PBS - T 3 ครั้ง จากนั้นหยอด anti - rabbit IgG phosphase conjugate (Sigma, Cat. No. A3687) เจือจาง 1 : 30,000 ใน conjugate buffer แล้วหยอดใส่ในแต่ละหลุม บ่มในกล่องขึ้นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้าง microtiter plate ด้วย PBS - T 3 ครั้ง เตรียม 0.05 % *p* - nitrophenylphosphate (Gibco BRL, Cat. No. 15978-098) ใน substrate buffer หยอดใส่ในแต่ละหลุม ซึ่งสารละลายที่ใช้หยอดในหลุม microtitre plate ที่เป็นสารแสดงปฏิกิริยา (reactants) ใช้ปริมาณเท่ากับสารแขวนลอยตัวอย่าง คือ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในกล่องขึ้นจนกระทั่งหลุมของ positive control เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเห็นชัดด้วยตาเปล่า หยดปฏิกิริยาด้วย 3M KOH อ่านค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง ELISA reader

(SpectraCount™ Microplate Photometer, ยี่ห้อ Packard รุ่น AS10001) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่นในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ใช้เป็นตัวแทนในการสกัดดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ ใส่ตัวอย่างใน microfuge tube นำมา สกัดดีเอ็นเอจากวิธีของ CTAB method (1973) เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด Primer 66, 68 ซึ่งเป็น universal primer โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CA-3' (66) และ 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (68) ตามลำดับ ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ จำนวน 25 นาโนกรัม, dATP dGTP dCTP และ dTTP ชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์, primer ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.15 ยูนิต ใน 1X PCR buffer ที่มีสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermocycler (ยี่ห้อ Thermo Hybaid Px2, Cat. No. HBPXBFB) กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ primer โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 50 วินาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ และจากนั้นปรับอุณหภูมิ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1% agarose gel เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1 ทำการสกัดแถบดีเอ็นเอจาก agarose gel โดยใช้ QIA quick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN, USA นำ PCR product ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเออีกครั้ง และนำ PCR product ในรอบที่ 2 มาตรวจโดยใช้บริการของเครื่องตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ของหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, THAILAND) แล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์และทำนายลักษณะเพื่อหาชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่นจากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย โดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>)

3.5 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation)

3.5.1 การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่เลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเตรียมแอนติเจน โดยละลายในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำในส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 0.85 % NaCl โดยการปั่นเหวี่ยง ทำการล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยวิธีเดียวกัน ละลายตะกอนของเชื้อโดยการเติม 0.85 % NaCl จากนั้นนำแอนติเจนไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย และปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.85 % NaCl ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cell/ml นำแอนติเจนที่ได้ไปนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส ใช้เป็น autoclaved antigen

3.5.2 การผลิตแอนติซีรั่ม

เก็บ normal serum โดยนำกระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศเมีย ซึ่งไม่เคยได้รับการฉีดสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน แยกส่วนที่เป็นน้ำเหลืองออกจากเม็ดเลือด โดยปล่อยให้เม็ดเลือดจับตัวกัน นำน้ำเหลือง (serum) ที่แยกได้มาผสม sodium azide (NaN₃) ให้ได้ความเข้มข้น 0.02% เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อทำการเก็บ normal serum เป็นระยะเวลานาน นำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น normal serum ในการทดลอง

นำแอนติเจนที่เตรียมไว้จากข้อ 3.5.1 มาผลิตแอนติซีรั่ม โดยฉีดเข้าไปในกระต่าย ซึ่งเป็นกระต่ายตัวเดียวกันกับที่ใช้ในการเก็บ normal serum การฉีดในครั้งที่ 1 และ 2 ผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (Difco Laboratories, USA) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (v/v) จากนั้นฉีดเข้าในกล้ามเนื้อขาหลัง (intramuscular injection) ส่วนในการฉีดครั้งที่ 3 และ 4 เป็นการฉีดเข้าเส้นเลือด (intravenous injection) บริเวณใบหู โดยไม่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant การฉีดแอนติเจนแต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน หลังการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 10 วัน ทำการเจาะเก็บแอนติซีรั่ม ลักษณะเดียวกันกับการเก็บ normal serum

3.5.3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่ม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย

นำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้มาประเมินหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายได้ (titer) ด้วยวิธี direct antigen coating indirect ELISA (DAC indirect -ELISA) พร้อมทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ

ของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามวิธีการของโสภณ วงศ์แก้ว (2536) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 72 ชั่วโมง รายละเอียดของวิธีการตรวจสอบเหมือนในข้อ 3.3.2 ยกเว้นมีการทำการเจือจางแอนติซีรัมที่ผลิตได้ที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 1 : 8 – 1 : 2048 และใช้ normal serum และ carbonate coating buffer เป็น negative control

3.5.3 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบดูความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ เนื่องจากกรณีที่แอนติซีรัมไม่มีความเฉพาะเจาะจง จะเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับแอนติเจนชนิดอื่น ๆ ทำให้ผลการทดลอง ที่ได้ผิดพลาด จึงต้องมีการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ ด้วยวิธี DAC indirect - ELISA โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย isolate VN₃ และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้จากองุ่นที่แสดงอาการของโรคดังกล่าว 10 ไอโซเลต รวมทั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* มาเลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 72 ชั่วโมง นำไปเตรียมสารแขวนลอยเชื้อ ด้วยการละลายเชื้อ 1 ลูกใน carbonate coating buffer จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ไปตรวจด้วย DAC indirect ELISA วิธีการเดียวกับข้อ 3.3.2 โดยในวิธีการทดสอบความเฉพาะเจาะจงจะใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้ที่ระดับความเจือจาง 1 : 1,000

3.6 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม

3.6.1 Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

ปรับความเข้มข้นของแอนติเจนให้มีระดับความเข้มข้น 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , และ 10^6 cell/ml ใน carbonate coating buffer และแอนติซีรัมที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 : 1,000, 1 : 2,000, 1 : 3,000, 1 : 4,000 และ 1 : 5,000 ใน conjugate buffer ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาโดยวิธี DAC indirect - ELISA เพื่อหาความไวของวิธีการและความเข้มข้นของแอนติซีรัมและแอนติเจนที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่บนชิ้นส่วนองุ่นที่ได้รับการปลูกเชื้อตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการ คือ หลังจากปลูกเชื้อ 5, 10 และ 15 วัน และเมื่อปรากฏอาการแล้ว โดยใช้วิธีเตรียมเนื้อเยื่อ 2 วิธี คือ ตัดเป็นชิ้นฝอย และบดละเอียดใน carbonate coating buffer นำตัวอย่างที่เตรียมทั้ง 2 วิธี ไปปรับสภาพแอนติเจน โดยการต้ม, ไม่ต้ม, ล้างด้วย 0.1% KOH และนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำ (autoclave) จากนั้นเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับการใช้เนื้อเยื่อองุ่นปกติ

3.6.2 Immunofluorescence microscopy

นำแอนติเจนและเนื้อเยื่ออุ้งน้ชูดเดียวกันกับในการทดลองที่ 3.6.1 มาตรวจหาแอนติเจน โดยวิธีดัดแปลงจากวิธีของ Malin และคณะ (1983) ตัดบริเวณแผลเดี่ยวให้คาบเกี่ยวระหว่างเนื้อเยื่ออุ้งน้ช่ที่แสดงอาการของโรคและเนื้อเยื่อปกติ จำนวน 5 ชิ้น วางบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที คีบตัวอย่างออกจากสไลด์ ปล่อยให้สไลด์แห้ง นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง เพื่อตรึงแบคทีเรียด้วยความร้อน (heat fixed) ปล่อยให้เย็น ล้างด้วย PBS ซับผิวหน้าสไลด์ให้แห้ง จากนั้นหยดแอนติซีรัมที่เจือจางแล้ว (ใช้ 1 : 1,000) นำสไลด์ไปบ่มในกล่องขึ้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติซีรัมที่ไม่ได้เกาะด้วย PBS - T 3 ครั้ง ซับสไลด์ให้แห้ง เตรียม anti - rabbit IgG - FITC conjugate (Sigma, Cat. No. F0382) ที่เจือจาง 1 : 160 ใน PBS ลงบนสไลด์ บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS - T 3 ครั้ง ซับให้แห้ง หยด PBS - glycerine 2% ปิดสไลด์ด้วย cover glass นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แสงเรือง (ยี่ห้อ Olympus Fluorescence Microscopes and Accessories รุ่น BX 50 - 32E01)

3.7 การสำรวจการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูก

ออกสำรวจเก็บตัวอย่างในเขตปลูกต่าง ๆ เพื่อรวบรวมนำมาตรวจสอบว่ามีโรคติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้หรือไม่ โดยใช้วิธีการที่พัฒนาแล้ว รายงานผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจสอบโดยวิธี DAC indirect-ELISA จากตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

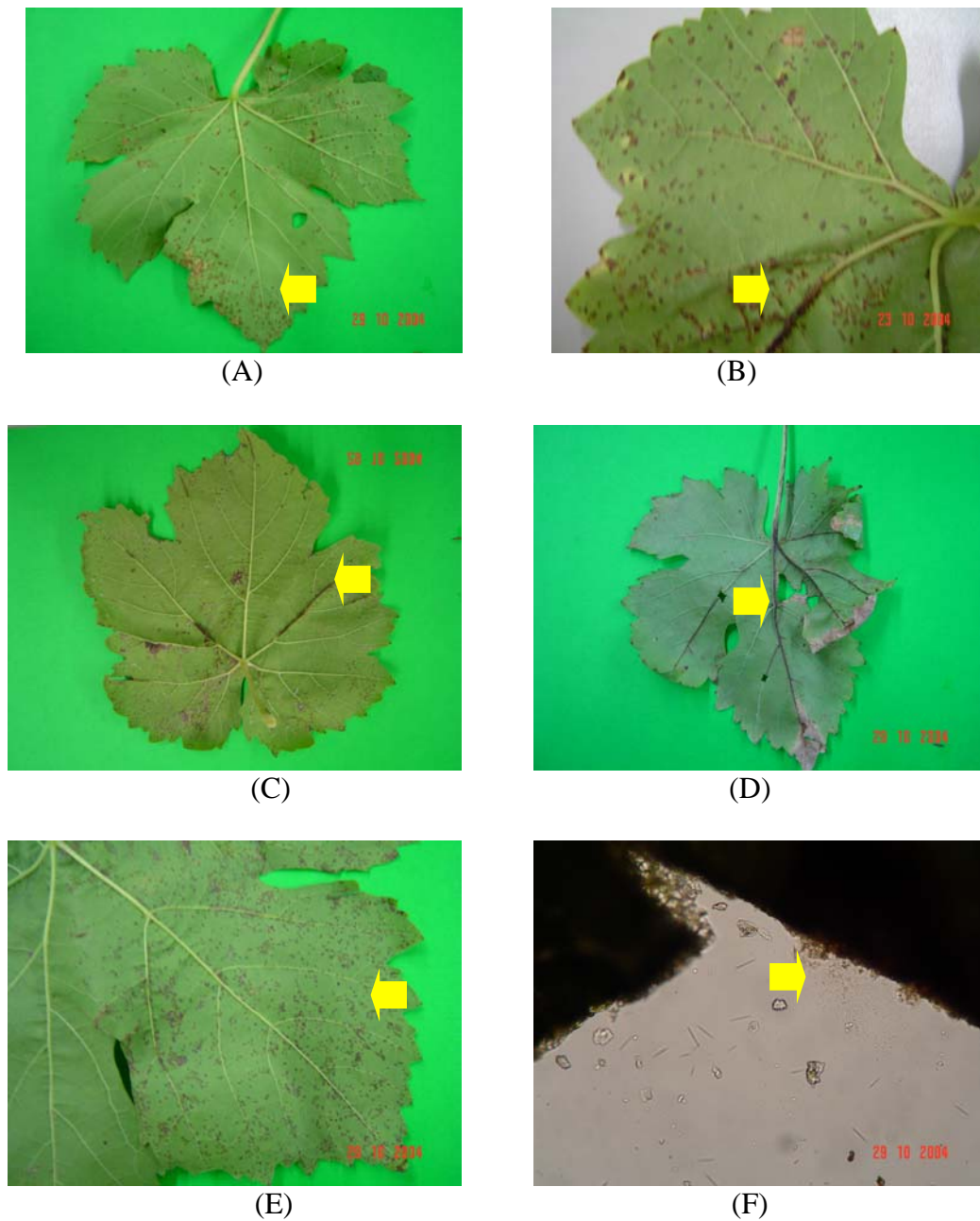
4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุ้งนึ่งที่เป็นโรค

จากการเก็บตัวอย่างอุ้งนึ่งที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียของอุ้งนึ่งในจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์ และพิจิตร (รูปที่ 4.1A - F) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากใบและเส้นใบ บนอาหาร NA ซึ่งโคโลนิมีลักษณะกลมมนูน ยกสูงจากผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบ สีขาวเป็นมัน ตรงกลางนูนสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 4.2A, B) เก็บเชื้อไว้ทั้งหมดจำนวน 53 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

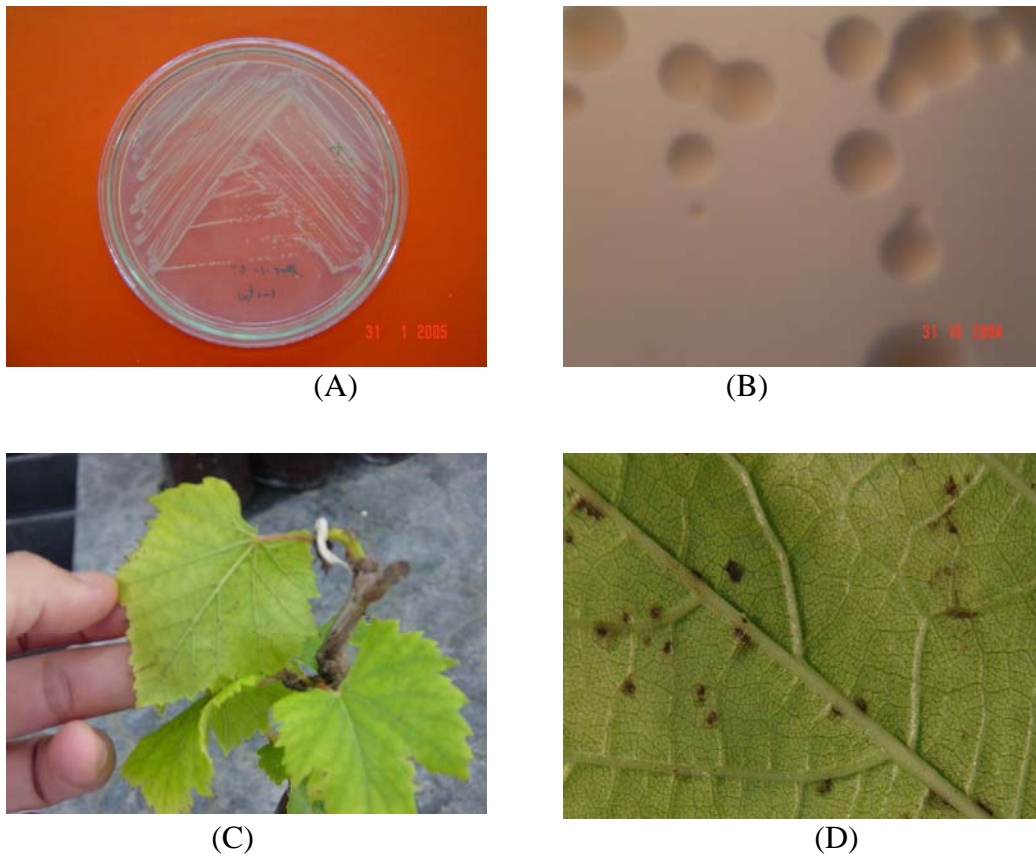
4.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอุ้งนึ่งแสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ในประเทศไทย

4.2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

จากการทดลองทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียของอุ้งนึ่งในประเทศไทย 4 ไอโซเลตบนกิ่งชำอุ้งนึ่งพันธุ์ Perlette Seedless คลุมถุงพลาสติกเพื่อเก็บความชื้น นำไปวางไว้ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคร่วมกับกิ่งชำอุ้งนึ่งได้ โดยแสดงอาการแผลจุดสีเหลี่ยมมน้ำสีน้ำตาล – ดำขนาดเล็กกระจายบนใบภายใน 5 วัน (รูปที่ 4.2C) ต่อมาแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น กลายเป็นแผลจุดเหลี่ยมสีน้ำตาล จากนั้นลามถึงก้านส่งผลให้ใบเหลืองแห้งตาย หรือทำให้เนื้อเยื่อของท่อน้ำจะตาย กลายเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ (รูปที่ 4.2D) บนกิ่งและก้าน



รูปที่ 4.1 ลักษณะของใบองุ่นที่แสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบไหม้ (A) อาการใบจุดในองุ่นสายพันธุ์ maroo seedless (B) อาการใบจุดและอาการเส้นใบไหม้ในองุ่นสายพันธุ์ Kyoho (C) อาการเส้นใบไหม้ในองุ่นสายพันธุ์ Black queen (D) อาการเส้นใบไหม้ในองุ่นสายพันธุ์ Ruby สีม่วง (E) อาการใบจุดในองุ่นสายพันธุ์ Perlette seedless และ (F) ภาพตัดแผ่อาการใบจุดในองุ่นสายพันธุ์ Perlette seedless แสดงการไหลของ ooze ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope



รูปที่ 4.2 (A) โคลนินของเชื้อแบคทีเรียแยกได้จากใบองุ่นที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ขององุ่นในประเทศไทย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (B) ลักษณะของโคลนินเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากองุ่นแสดงอาการเส้นใบใหม่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope (C) ลักษณะอาการที่เกิดบนใบกิ่งชำองุ่นพันธุ์ Perlette Seedless หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ โดยแสดงอาการจุดสีเหลี่ยม น้ำน้ำตาล - ดำ ขนาดเล็กกระจายบนใบ (D) ลักษณะของแผลหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope

ตารางที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย
ที่แยกได้จากองุ่นที่แสดงอาการของโรค ที่เก็บได้จากพันธุ์และสถานที่ต่าง ๆ กัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชิ้นส่วนที่ใช้แยก
1	Kyoho-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
2	Crimson-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
3	Maroo-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
4	Flame-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
5	Italia-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
6	Perlette-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
7	Emerald-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
8	Cardinal-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
9	Black queen-SUT	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
10	Kyoho-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้นใบองุ่น
11	Crimson-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
12	Maroo-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
13	Flame-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
14	Italia-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
15	Perlette-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
16	Emerald-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
17	Cardinal-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
18	Black queen-SUT	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
19	Red globe-PAKTHONGCHAI	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
20	Perlette-PAKTHONGCHAI	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
21	Maroo-PAKTHONGCHAI	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
22	Red globe-PAKTHONGCHAI	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
23	Perlette-PAKTHONGCHAI	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น
24	Muscat-PAKCHONG	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
25	Beauty-PAKCHONG	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
26	Perlette-PAKCHONG	จ.นครราชสีมา	ใบองุ่น
27	Muscat-PAKCHONG	จ.นครราชสีมา	เส้น ใบองุ่น

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชิ้นส่วนที่ใช้แยก
28	Beauty-PAKCHONG	จ.นครราชสีมา	เส้นใบอ่อน
29	Perlette-PAKCHONG (VN ₃)	จ.นครราชสีมา	เส้นใบอ่อน
30	Perlette-Saraburi	จ. สระบุรี	ใบอ่อน
31	Black queen-Saraburi	จ. สระบุรี	ใบอ่อน
32	Maroo-Saraburi	จ. สระบุรี	ใบอ่อน
33	Kyoho-Saraburi	จ. สระบุรี	ใบอ่อน
34	Perlette-Saraburi	จ. สระบุรี	เส้นใบอ่อน
35	Black queen-Saraburi	จ. สระบุรี	เส้นใบอ่อน
36	Maroo-Saraburi	จ. สระบุรี	เส้นใบอ่อน
37	Kyoho-Saraburi	จ. สระบุรี	เส้นใบอ่อน
38	Black queen-Pichit1	จ. พิจิตร	เส้นใบอ่อน
39	Black queen-Pichit2	จ. พิจิตร	เส้นใบอ่อน
40	Black queen-Pichit3	จ. พิจิตร	เส้นใบอ่อน
41	Black queen-Pichit4	จ. พิจิตร	เส้นใบอ่อน
42	Black queen-Pichit5	จ. พิจิตร	เส้นใบอ่อน
43	Black queen-Pichit 1	จ. พิจิตร	ใบอ่อน
44	Black queen-Pichit 2	จ. พิจิตร	ใบอ่อน
45	Black queen-Pichit 3	จ. พิจิตร	ใบอ่อน
46	Black queen-Pichit 4	จ. พิจิตร	ใบอ่อน
47	Black queen-Pichit 5	จ. พิจิตร	ใบอ่อน
48	Reisolate VN ₃ on Perlette 1SUT	จ.นครราชสีมา	ใบอ่อน
49	Reisolate VN ₃ on Perlette 2 SUT	จ.นครราชสีมา	ใบอ่อน
50	Reisolate VN ₃ on Perlette 3 SUT	จ.นครราชสีมา	ใบอ่อน
51	Reisolate VN ₃ on Perlette 1 SUT	จ.นครราชสีมา	เส้นใบอ่อน
52	Reisolate VN ₃ on Perlette 2 SUT	จ.นครราชสีมา	เส้นใบอ่อน
53	Reisolate VN ₃ on Perlette 3 SUT	จ.นครราชสีมา	เส้นใบอ่อน

หมายเหตุ : ใช้ไอโซเลต Perlette-PAKCHONG (VN₃) เป็นตัวแทนในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ

4.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย

4.2.2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction) และรูปร่างของเซลล์

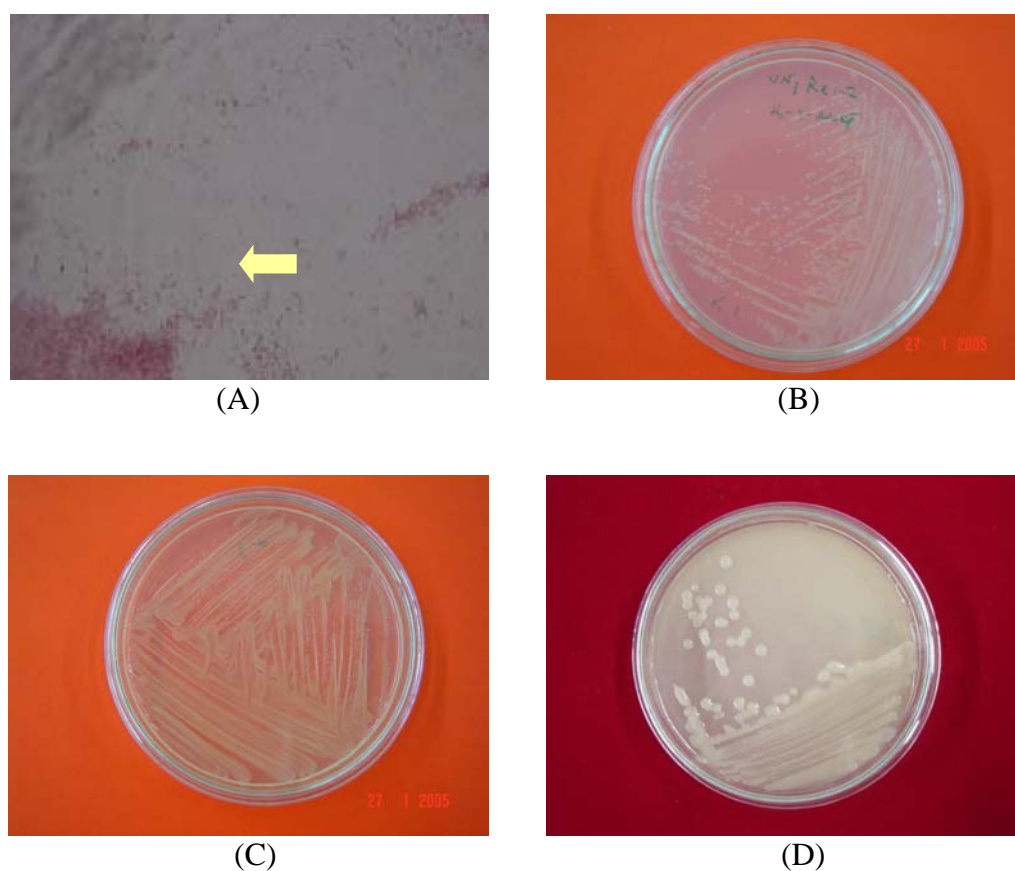
พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้ที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา (ไอโซเลต VN₃) ย้อมติดสีแดงของ safranin O แสดงว่าเชื้อดังกล่าวเป็นแกรมลบ และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X เชื้อมีรูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.6 x 1.8 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.3A)

4.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ (colony characteristics)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนอาหาร NA พบว่าเชื้อสร้างโคโลนีสีขาวตรงกลางนูนสีเหลืองอ่อน กลม (circular) ยกนูนสูงจากผิวอาหารเล็กน้อย (convex) ขอบและผิวหน้าเรียบ ผิวเป็นมัน (รูปที่ 4.3B)

เมื่อเลี้ยงในอาหาร NA glucose 5% พบว่าเชื้อสร้างโคโลนีลักษณะเหมือนที่สร้างบนอาหาร NA แต่จะมีการสร้างเมือก (mucoïd) มากกว่าบนอาหาร NA (รูปที่ 4.3C)

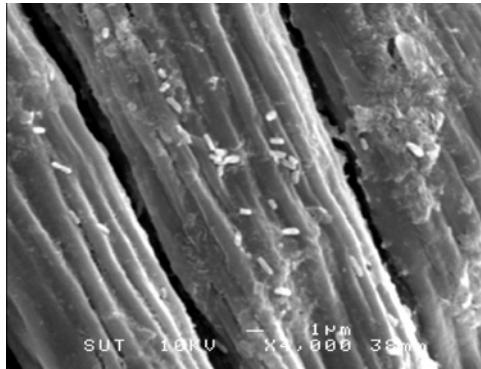
เมื่อเลี้ยงในอาหาร GYAC พบว่าเชื้อสร้างโคโลนีลักษณะเหมือนที่สร้างบนอาหาร NA glucose 5% แต่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าบนอาหาร NA และ NA glucose 5% (รูปที่ 4.3D)



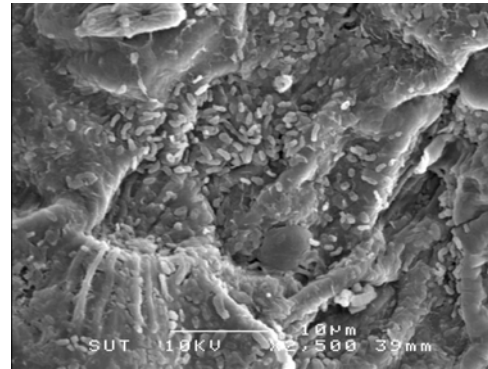
- รูปที่ 4.3 (A) ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X
- (B) ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ หลังจากเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส
- (C) ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ หลังจากเลี้ยงบนอาหาร NA glucose 5% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส
- (D) ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ หลังจากเลี้ยงบนอาหาร GYAC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

4.2.2.3 การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope : SEM)

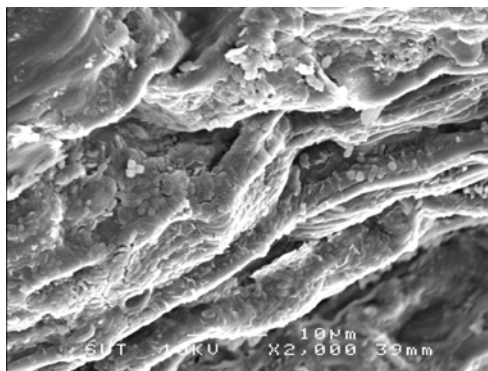
จากการใช้ SEM ในการตรวจเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นโรค พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคที่แสดงอาการใบจุด (รูปที่ 4.4B, C) และอาการเส้นใบไหม้ (รูปที่ 4.4A, D) มีสภาพการอยู่อาศัยหรือการเกาะกินเซลล์ขององุ่นอย่างหนาแน่น และรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว มีรูปร่างเป็นท่อน



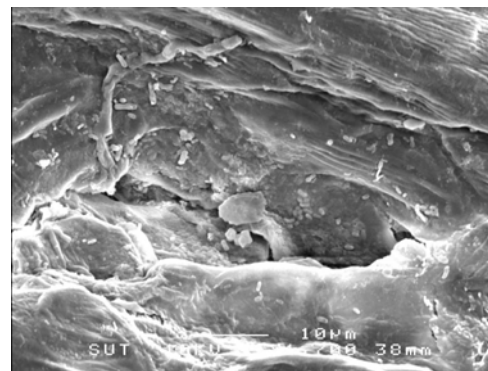
(A)



(B)



(C)



(D)

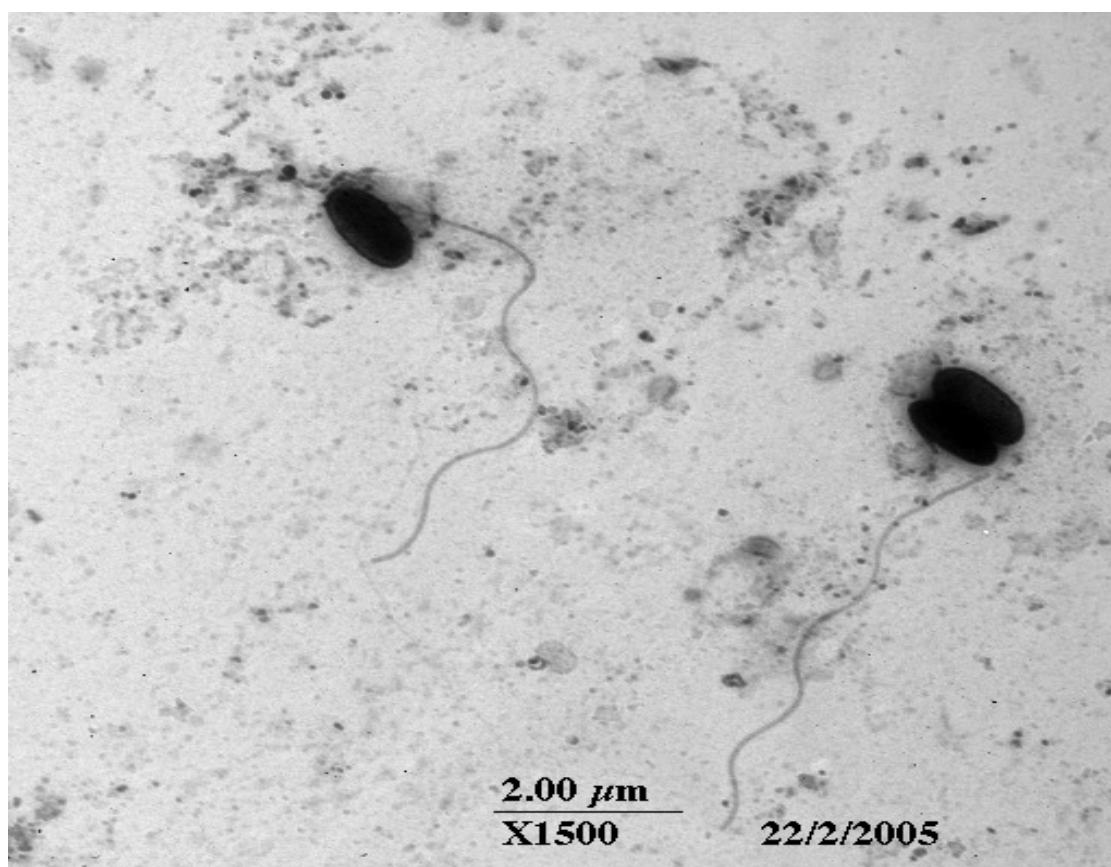
- รูปที่ 4.4 ลักษณะพื้นผิวภายนอกขององุ่นที่แสดงอาการต่าง ๆ ของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
- (A) เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบขององุ่นพันธุ์ Beauty seedless แสดงอาการเส้นใบไหม้ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า
 - (B) เนื้อเยื่อบริเวณผิวใบขององุ่นพันธุ์ Perlette seedless แสดงอาการใบจุดที่กำลังขยาย 2,500 เท่า
 - (C) เนื้อเยื่อบริเวณผิวใบขององุ่นพันธุ์ Maroo seedless แสดงอาการใบจุด ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า
 - (D) เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบขององุ่นพันธุ์ Flame seedless แสดงอาการเส้นใบไหม้ที่กำลังขยาย 2,700 เท่า

4.2.2.4 การตรวจลักษณะแฟลกเจลลาด้วยการย้อมแบบ silver impregnation

พบว่าเมื่อย้อมแบบ silver impregnation เซลล์แบคทีเรียและแฟลกเจลลา จะติดสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลดำบนพื้นสีเหลือง ลักษณะของแฟลกเจลลาเป็นแบบ monotrichous แต่บันทึกภาพได้ค่อนข้างยาก

4.2.2.5 การศึกษาลักษณะของแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope : TEM)

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในการศึกษา พบว่าลักษณะและตำแหน่งของแฟลกเจลลาของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ เป็นแบบ monotrichous flagella มีเส้นเดียวบริเวณปลายของเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ลักษณะแฟลกเจลลาของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า

4.2.3 ปฏิกริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ

พบว่าหลังจากบ่มเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 26 และ 33 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามาก

4.2.4 ปฏิกริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

4.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เมื่อหยด Lugol's iodine solution ลงบนอาหาร starch agar พบว่าอาหารที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เกิดเป็น clear zone ขึ้น แสดงว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถย่อยแป้งได้ (รูปที่ 4.6)

4.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เมื่อเอียงหลอดที่บรรจุอาหาร gelatin medium พบว่าหลอดที่ทำปลูกเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต VN₃ และ *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถไหลเป็นน้ำ แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้ (รูปที่ 4.7)

4.2.3.3 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (acid production from carbohydrates)

พบว่าอาหาร Medium C ที่เติมแหล่งคาร์บอน galactose, glucose, lactose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose, fructose และ ribose เมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ จะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองในอาหารที่เติมน้ำตาล galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose และ fructose แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาล 8 ชนิดนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (รูปที่ 4.8A) สำหรับน้ำตาล lactose และ ribose อาหารไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาล 2 ชนิดนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (รูปที่ 4.8B)

4.2.3.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

พบว่าอาหาร urea broth เมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ จะไม่เปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีชมพู - แดง แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ (รูปที่ 4.9)

4.2.3.5 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรต (citrate utilization)

พบว่าอาหาร citrate utilization agar เมื่อทำการปลูกเชื้อไอโซเลต VN₃ จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อสามารถใช้ประโยชน์จากสารซิเตรตได้ (รูปที่ 4.10)

4.2.3.6 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารแคลเซียมแลคเตต (calcium lactate)

พบว่าอาหาร calcium lactate utilization agar เมื่อทำการปลูกเชื้อไอโซเลต VN₃ จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อสามารถใช้ประโยชน์จากสารแคลเซียมแลคเตตได้

4.2.3.7 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารกลูตามีน (glutamine utilization)

พบว่าหลอดที่ทำการปลูกเชื้อไอโซเลต VN₃ และเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ไม่สามารถใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีนได้ โดยไม่เกิดการขุ่นของอาหาร (รูปที่ 4.11)

4.2.3.8 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ (NaCl tolerance)

พบว่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl 1%, 2%, 4% และ 5% ได้ (รูปที่ 4.12)

4.2.3.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity)

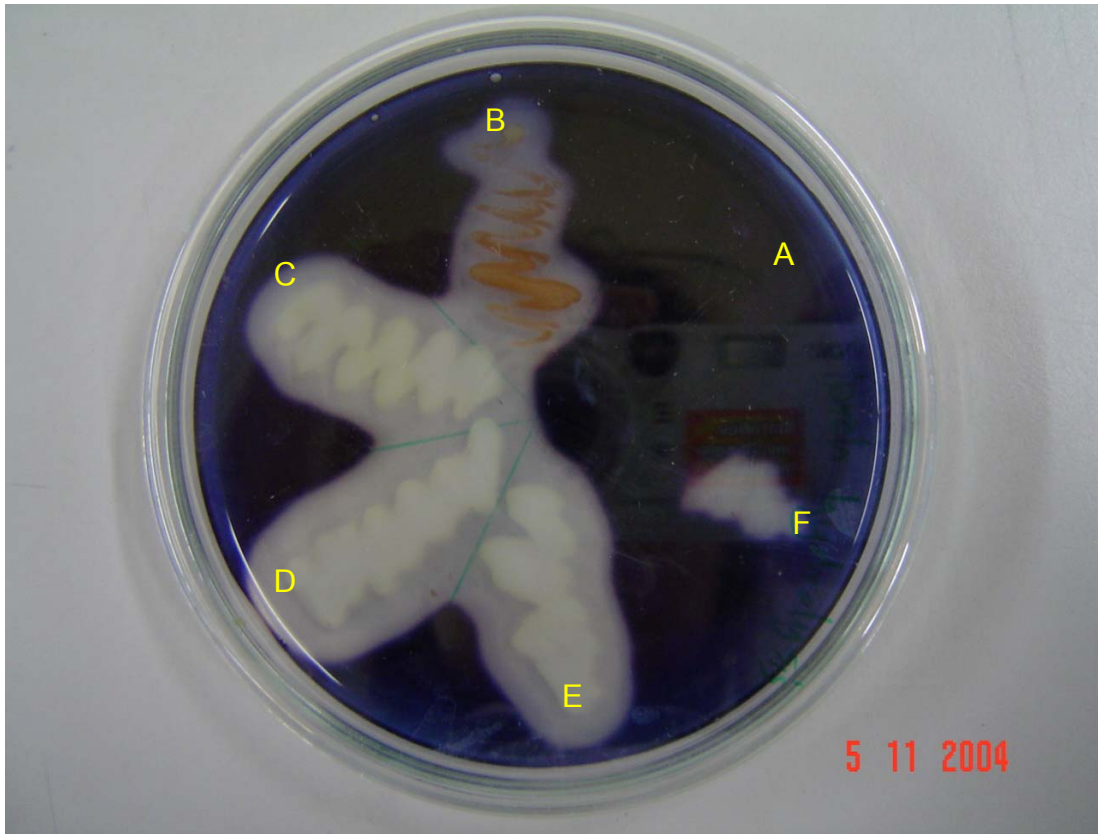
พบว่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถย่อยไขมันได้ ซึ่งจะสังเกตเห็นรอบ ๆ โคลโลนิจะเป็นจุดที่ขนาดเล็กรวมกันทำให้มีลักษณะขุ่นและทึบแสง

4.2.3.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase activity)

พบว่าเมื่อหยด 3% H₂O₂ ลงบนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จะเกิดฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

4.2.3.11 กระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน

เมื่อเขย่าหลอดที่บรรจุอาหาร Nitrate broth พบว่าหลอดที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ไม่เกิดฟองของแก๊สขึ้น แสดงว่าเชื้อไม่เกิดกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน (รูปที่ 4.13)



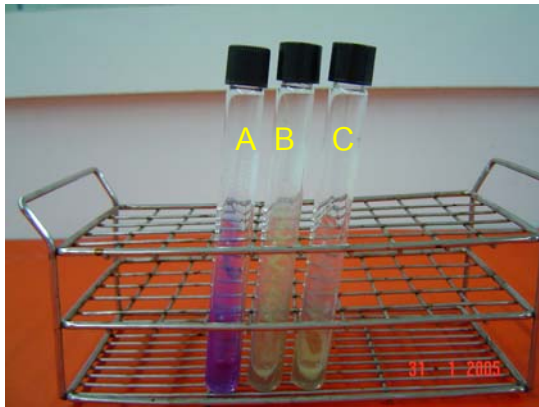
รูปที่ 4.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

- A. ไม่ได้ปลูกเชื้อ
- B. ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*
- C. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- D. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BS₁
- E. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BS₂
- F. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BS₃

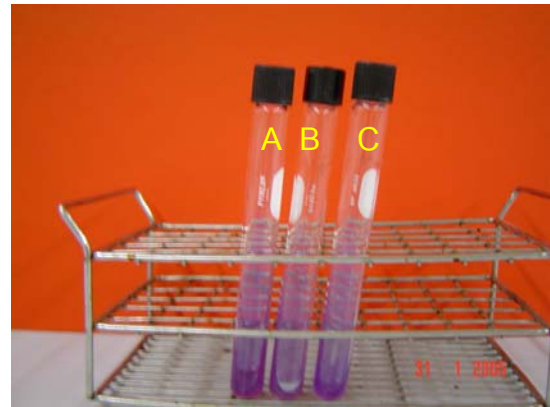


รูปที่ 4.7 ทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

- A. ไม่ได้ปลุกเชื้อ
- B. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย unknown
- C. ปลุกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- D. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (มะกรูด)



(A)



(B)

รูปที่ 4.8 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (acid production from carbohydrate)

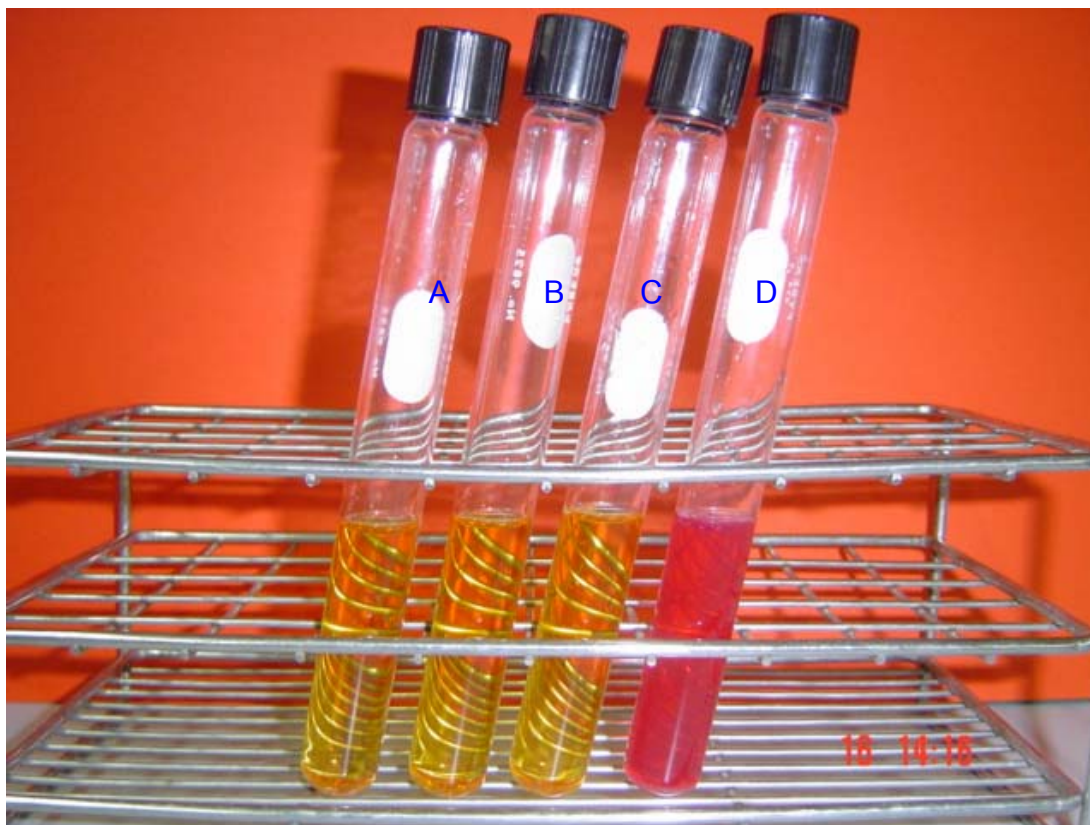
(A) อาหาร Medium C slant ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนน้ำตาล galactose

(B) อาหาร Medium C slant ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนน้ำตาล lactose

A. ไม่ได้ปลูกเชื้อ

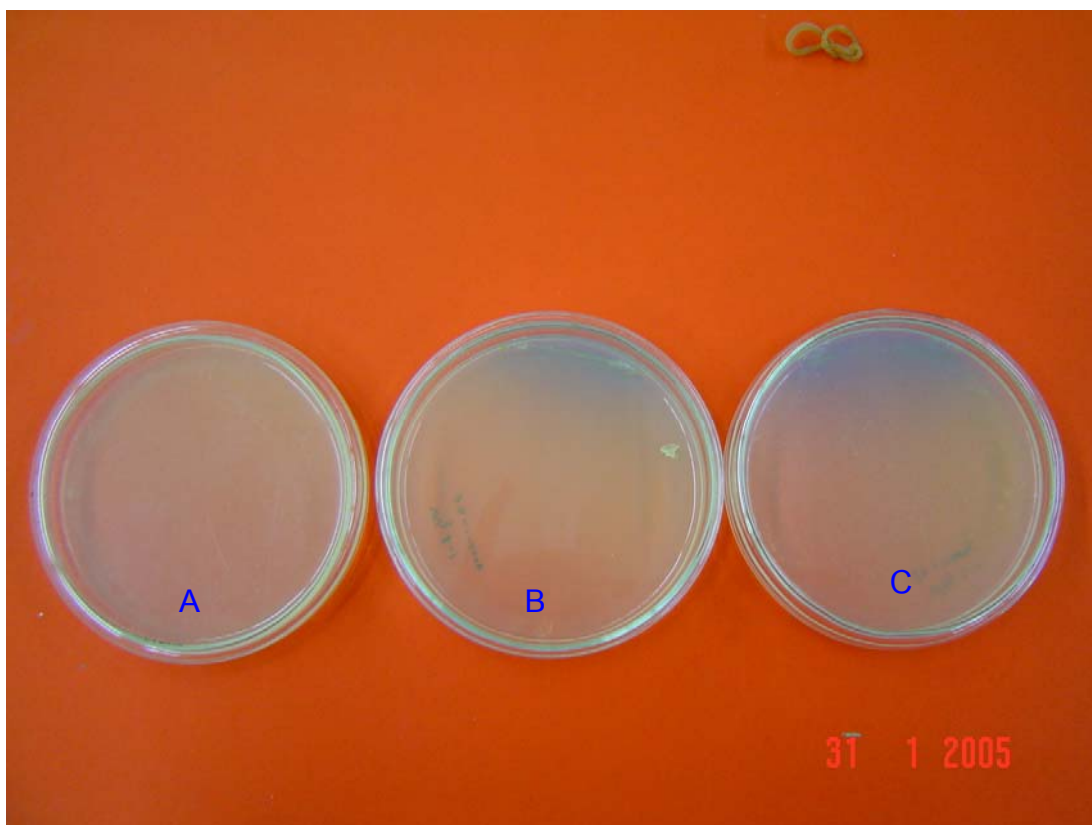
B. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃

C. ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (ส้มเขียวหวาน)



รูปที่ 4.9 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

- A. ไม่ได้ปลูกเชื้อ
- B. ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- C. ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (ส้มเขียวหวาน)
- D. ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*



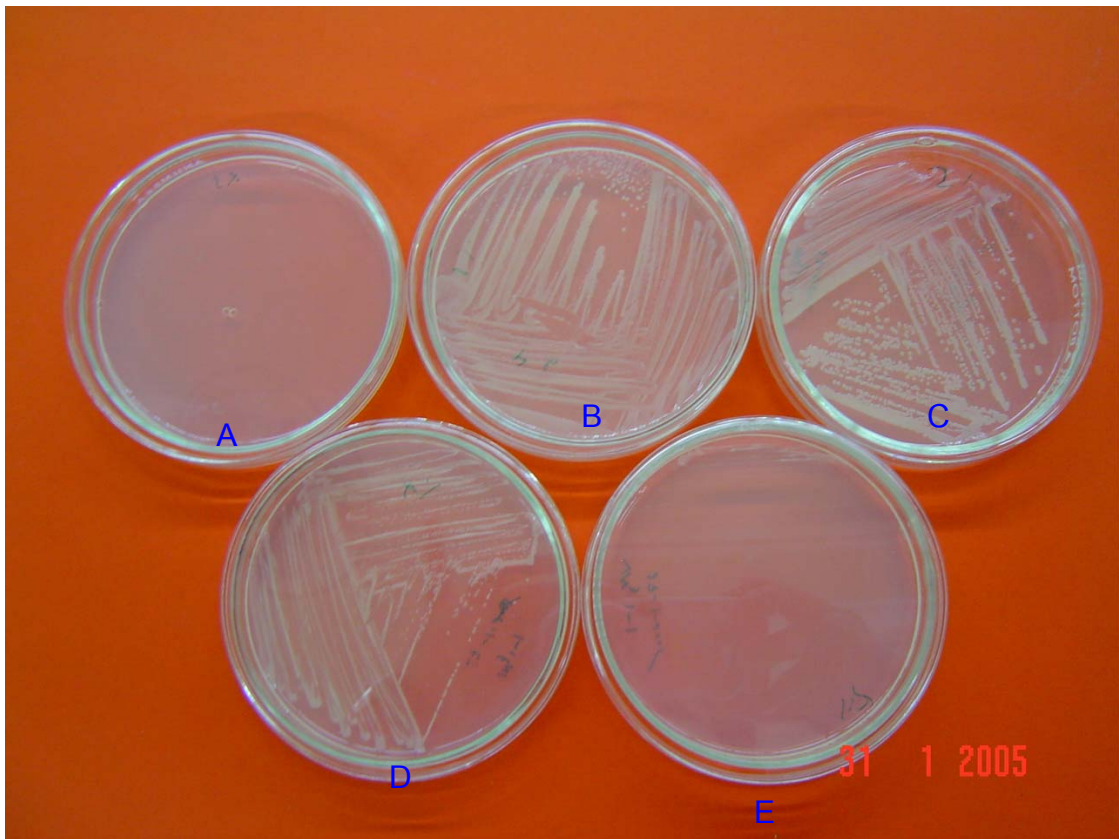
รูปที่ 4.10 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรต (citrate utilization)

- A. ไม่ได้ปลุกเชื้อ
- B. ปลุกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- C. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (ส้มเขียวหวาน)



รูปที่ 4.11 การทดสอบปฏิกิริยาการใช้ประโยชน์จากสารกลูตามีน (L - glutamine utilization)

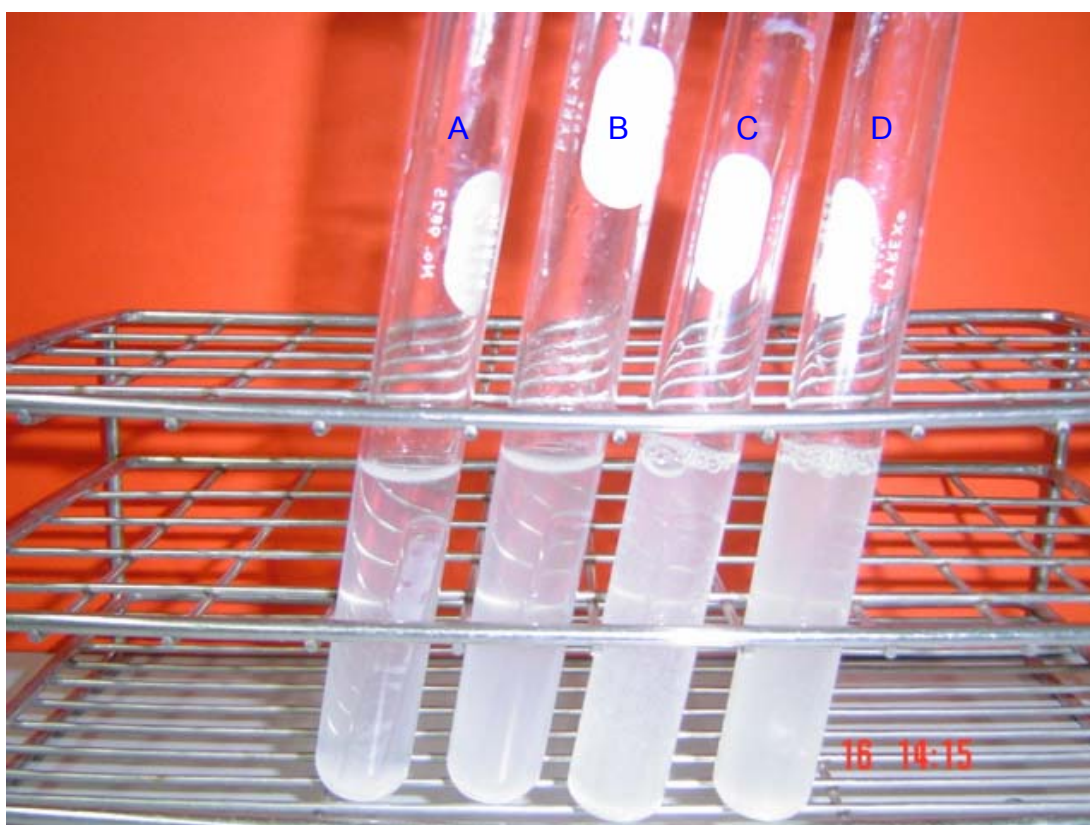
- A. ไม่ได้ปลุกเชื้อ
- B. ปลุกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- C. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (ส้มเขียวหวาน)
- D. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*



รูปที่ 4.12 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ (NaCl tolerance)

A. ไม่ได้ปลูกเชื้อ

B, C, D และ E ปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ เชื้อบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl 1%, 2%, 4% และ 5% ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบไนโตรเจนเป็นแก๊สไนโตรเจน

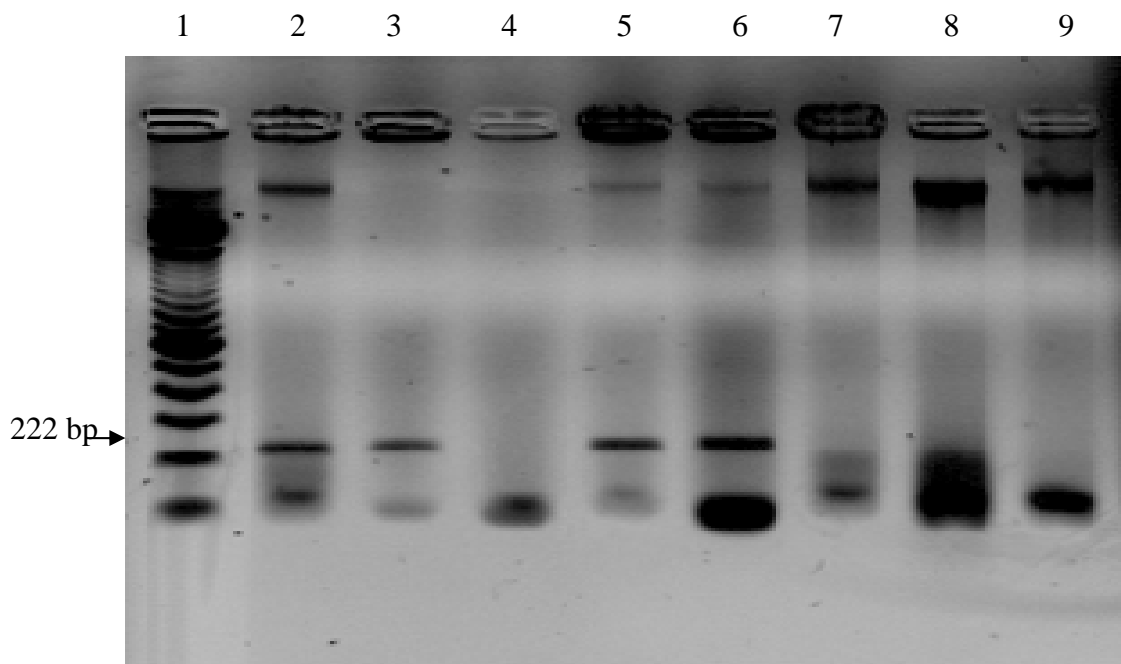
(Denitrification : N_2)

- A. ไม่ได้ปลุกเชื้อ
- B. ปลุกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃
- C. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*
- D. ปลุกเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes*

4.3 การยืนยันการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย

4.3.1 วิธีเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction)

จากการทดสอบโดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงของ *Xy. ampelinus* และเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* เป็นตัวตรวจสอบ พบว่าไม่สามารถใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคนี้อุ่นในประเทศไทยได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase Chain Reaction : PCR) โดยใช้ชุด primer 2, 3 ของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT TC-3' และ 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT GG-3' ตามลำดับ (Hartung *et al.*, 1993) โดยการทำ agarose gel electrophoresis บน 1 % agarose gel แถบที่ 1 แสดง 100 bp ladder, แถบที่ 2, 3, 5 และ 6 ขนาดแถบดีเอ็นเอ 222 bp ของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* แยกจาก มะกรูด มะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน ตามลำดับ, แถบที่ 7, 8 และ 9 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทย ไอโซเลต VN₃, BS₁ และ BS₂ ตามลำดับ และแถบที่ 4 ผลึกภัณฑ์ PCR ที่ใน master mix ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control)

4.3.2 วิธี direct antigen coating indirect enzyme - linked immunosorbent assay (DAC indirect - ELISA)

สำหรับการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยด้วยวิธีการ DAC indirect ELISA โดยใช้ *Xylophilus ampelinus* Kit complete (Cat. No. 07138) ของบริษัท LOEWE Biochemical GmbH, Germany เป็นชุดตรวจสอบ พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อองุ่นที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นที่เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์ และพิจิตร และตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทำให้เกิดโรคและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ได้ มีเพียง positive control เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมดังกล่าว

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

จากการนำ PCR product ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ มาตรวจ แล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์ทำนายลักษณะ และระบุนชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย โดยใช้โปรแกรมชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คือ มีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 95% ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

4.5 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation)

4.5.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดและความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ โดยนำมาประเมินหาว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย (เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃) และศึกษาความไว (sensitive) ของแอนติซีรั่มที่ระดับต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect – ELISA พบว่าระดับความเข้มข้นของแอนติซีรั่มทุกระดับที่ใช้ในการทดสอบสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยผลการตรวจระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 1 : 32 ถึง 1 : 2048 (v/v) สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียปริมาณต่ำสุดที่ 8×10^2 cfu/ml ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นต่ำสุดและระดับความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายที่ระดับต่าง ๆ

ระดับความ เข้มข้นของแอนติ ซีรั่ม (v/v)	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (cfu/ ml)*							
	8×10^8	8×10^7	8×10^6	8×10^5	8×10^4	8×10^3	8×10^2	8×10^1
1 : 32	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 256	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 512	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 1,024	+	+	+	+	+	+	+	-
1 : 2,048	+	+	+	+	+	+	+	-
Nomal serum (1 : 32)	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: * = ผลจากการอ่านค่า 3 ครั้ง/ ตัวอย่าง

+ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm มีค่าสูงกว่า negative control 2 เท่า ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect – ELISA

- = ค่าที่อ่านได้จากปฏิกิริยามีค่าไม่แตกต่างจากค่า Blank

4.5.2 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ของงุ่นในประเทศไทยไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้ และทำปฏิกิริยา cross reaction กับเชื้อ *X. axonopodis* pv *citri* ที่แยกได้จากมะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน ที่แสดงอาการ canker แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 และ normal serum ที่นำมาใช้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบนั้น ไม่แสดงการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธี indirect-ELISA

ไอโซเลต	ความเข้มข้นของ แบคทีเรีย (cfu/ml)	ผลการทดสอบ	
		Normal serum	แอนติซีรัม
Perlette-SUT	6.5 x 10 ⁵	NT	0.516 ± 0.010 (+)
Flame-SUT	4.5 x 10 ⁵	NT	0.389 ± 0.005 (+)
Maroo-PAKTHONGCHAI	4.5 x 10 ⁵	NT	0.401 ± 0.022 (+)
Perillet-PAKCHONG (VN ₃)	5.5 x 10 ⁵	0.070 ± 0.001 (-)	0.499 ± 0.003 (+)
Maroo-SARABURI	5.0 x 10 ⁵	NT	0.417 ± 0.006 (+)
Reisolate VN ₃ SUT1	6.0 x 10 ⁵	NT	0.429 ± 0.029 (+)
Reisolate VN ₃ SUT2	6.0 x 10 ⁵	NT	0.436 ± 0.001 (+)
Black queen-PICHIT	5.0 x 10 ⁵	NT	0.425 ± 0.004 (+)
<i>X. axonopodis</i> pv <i>citri</i>	6.0 x 10 ⁵	NT	0.250 ± 0.010 (+)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5.5 x 10 ⁵	NT	0.086 ± 0.001 (-)
<i>Bacillus cereus</i>	4.5 x 10 ⁵	NT	0.081 ± 0.001 (-)
<i>Pseudomonas spp.</i>	5.5 x 10 ⁵	NT	0.074 ± 0.001 (-)

หมายเหตุ: * = ผลจากการอ่านค่า 2 ครั้ง/ ตัวอย่าง
 + = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm มีค่าสูงกว่า negative control 2 เท่า ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect-ELISA
 - = ค่าที่อ่านได้จากปฏิกิริยามีค่าไม่แตกต่างจากค่า Blank
 NT = ไม่ได้ทดสอบ

4.6 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม

4.6.1 Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

จากการนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า และแอนติซีรั่มที่มีความเข้มข้น 1 : 1,000, 1 : 2,000, 1 : 3,000, 1 : 4,000 และ 1 : 5,000 มาทำปฏิกิริยากันด้วยวิธี DAC – indirect ELISA พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่ม เท่ากับ 1 : 1,000 โดยสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำสุด 10³ cfu/ml

การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่บนชิ้นส่วนองุ่นที่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยการใช้วิธีเตรียมเนื้อเยื่อแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วปล่อยให้ ooze ไหลออกมา และวิธีบดละเอียดพบว่าวิธีการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นฝอยแล้วนำไปปรับสภาพแอนติเจนด้วยการต้มและการนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าการไม่ต้มและล้างด้วย 0.1% KOH นอกจากนี้สำหรับวิธีการบดละเอียด พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 2 เท่าของ control และสำหรับการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการหลังจากปลูกเชื้อ 5, 10 และ 15 วัน และเมื่อปรากฏอาการแล้วพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อตั้งแต่ 5 วันหลังจากปลูกเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เตรียมแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วมีการปรับสภาพของแอนติเจน ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยวิธี indirect - ELISA

ตัวอย่างเนื้อเยื่ออ่อน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ± SE			
	ต้ม	ไม่ต้ม	นั่งภายใต้ความดันไอ	ล้างด้วย 0.1% KOH
หลังปลูกเชื้อ ไอโซเลต VN ₃ 5 วัน	0.555 ± 0.009	0.190 ± 0.002	0.737 ± 0.024	0.279 ± 0.005
หลังปลูกเชื้อ ไอโซเลต VN ₃ 10 วัน	0.566 ± 0.005	0.192 ± 0.007	0.672 ± 0.022	0.297 ± 0.007
หลังปลูกเชื้อ ไอโซเลต VN ₃ 15 วัน	0.563 ± 0.011	0.182 ± 0.009	0.704 ± 0.001	0.289 ± 0.018
ปรากฏอาการผลจุดน้ำน้ำชัดเจน	0.568 ± 0.024	0.189 ± 0.005	0.682 ± 0.020	0.275 ± 0.008
Black queen-PICHIT	0.423 ± 0.029	0.172 ± 0.002	0.714 ± 0.024	0.241 ± 0.014
Flame-SUT	0.534 ± 0.014	0.168 ± 0.002	0.734 ± 0.018	0.262 ± 0.012
Kyoho-SUT	0.535 ± 0.015	0.179 ± 0.004	0.696 ± 0.009	0.267 ± 0.019
Perlette-SUT	0.549 ± 0.022	0.191 ± 0.008	0.693 ± 0.008	0.288 ± 0.009
เชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas spp.</i>	0.095 ± 0.001	NT	NT	0.074 ± 0.002
Negative control (ใบอ่อนปกติ)	0.075 ± 0.001	NT	NT	NT

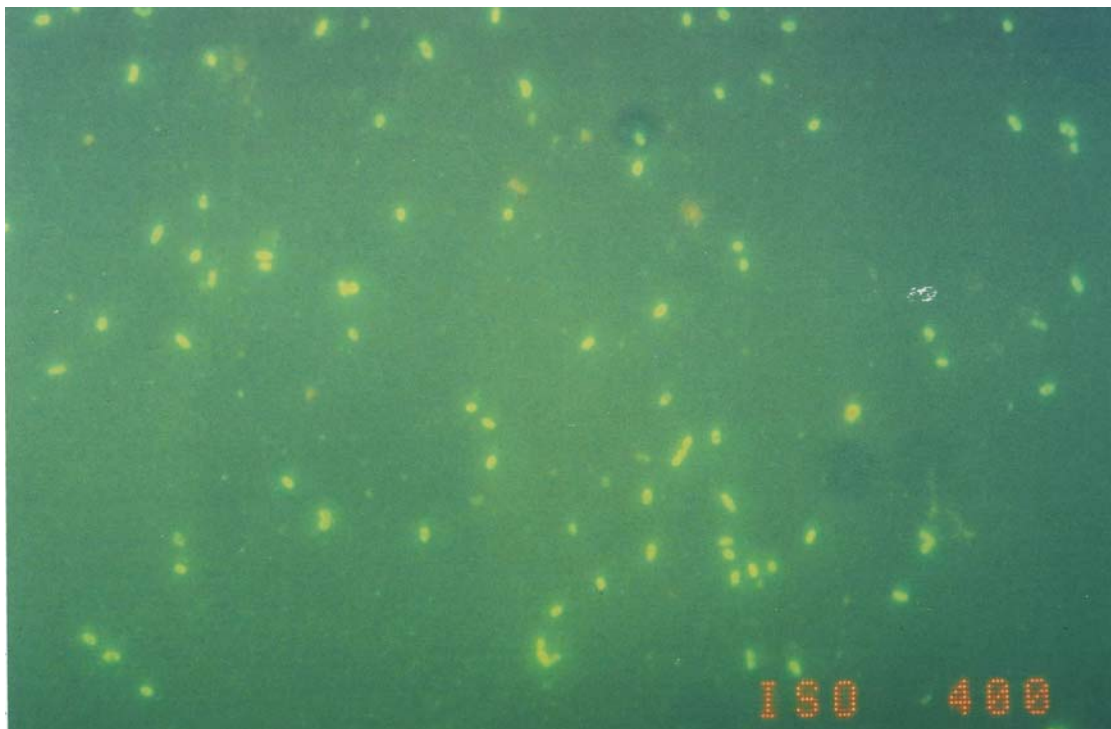
หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ผลจากการอ่านค่า 3 ครั้ง/ ตัวอย่าง ด้วยวิธี Indirect – ELISA

NT = ไม่ได้ทดสอบ

4.6.2 Immunofluorescence microscopy

จากการนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า และแอนติซีรัมที่มีความเข้มข้น 1 : 1,000, 1 : 2,000, 1 : 3,000, 1 : 4,000 และ 1 : 5,000 มาทำปฏิกิริยากันด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรัม เท่ากับ 1 : 1,000 โดยสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำสุด 10² cfu/ml

สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่บนชิ้นส่วนอนุ่งที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยใช้วิธีเตรียมเนื้อเยื่อแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วปล่อยให้ ooze ไหลออกมา และวิธีบดละเอียดพบว่าวิธีการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นฝอยแล้วนำไปปรับสภาพแอนติเจนด้วยวิธีต่าง ๆ สามารถมองเห็นปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC ภายใต้กล้อง fluorescence ได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้สำหรับวิธีการบดละเอียด เมื่อส่องดูภายใต้กล้อง fluorescence จะมีเศษพืชทำให้มองเห็นเซลล์แบคทีเรียได้ไม่ชัดเจน และสำหรับการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการหลังจากปลูกเชื้อ 5, 10 และ 15 วัน และเมื่อปรากฏอาการแล้ว พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อตั้งแต่ทำการปลูกเชื้อ 5 วัน



รูปที่ 4.15 แสดงปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต VN₃ จากการทดสอบด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy

ตารางที่ 4.5 ปฏิบัติการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC ของตัวอย่างที่เตรียมแบบตัดเป็นชิ้น
 ฝอยแล้วมีการปรับสภาพของแอนติเจน โดยวิธี Immunofluorescence microscopy

ตัวอย่างเนื้อเยื่ออ่อน	ปฏิบัติการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC			
	ต้ม	ไม่ต้ม	นั่งภายใต้ ความดันไอ	ล้างด้วย 0.1% KOH
หลังปลูกเชื้อไอโซเลต VN ₃ 5 วัน	+	+	+	+
หลังปลูกเชื้อไอโซเลต VN ₃ 10 วัน	+	+	+	+
หลังปลูกเชื้อไอโซเลต VN ₃ 15 วัน	+	+	+	+
ปรากฏอาการแล้ว	+	+	+	+
Maroo-SARABURI	+	+	+	+
Black queen-PICHIT	+	+	+	+
Maroo-SUT	+	+	+	+
Kyoho-SUT	+	+	+	+
Perlette-SUT	+	+	+	+
Flame-SUT	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = ปฏิบัติการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC ภายใต้กล้อง fluorescence ใน
 การทดสอบด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy

4.7 การสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบปลอก

ผลการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่น จากพื้นที่ปลูกองุ่นแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี พิจิตร ระยอง และสุรินทร์ ทุกตัวอย่างเมื่อตรวจดู ooze พบว่ามี ooze ไหลออกมาจากแผล และเมื่อนำมาตรวจหาด้วยวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม คือ วิธี Indirect – ELISA และ Immunofluorescence พบว่าจากตัวอย่างขององุ่นที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่น จำนวน 68 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่น จากพื้นที่ปลูกแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยตรวจหาด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy และ Indirect – ELISA

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (%)	
		Immunofluorescence	Indirect - ELISA
จ. นครราชสีมา	30	100	100
จ. สระบุรี	25	100	100
จ. ระยอง	3	100	100
จ. พิจิตร	5	100	100
จ. สุรินทร์	5	100	100

หมายเหตุ: ผลบวก = ปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC เมื่อส่องดูได้กล้อง fluorescence ในการทดสอบด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm มีค่าสูงกว่า negative control 2 เท่า ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect – ELISA

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษา การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุ รวมทั้งพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค และเพื่อสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย สรุปผลการศึกษาทดลองได้ดังนี้

1. จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี วิธีเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) และการทำ DAC indirect - ELISA เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรค พบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากองุ่นแสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียในประเทศไทยเป็นเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ไม่ใช่ *Xy. ampelinus* ที่ได้ตั้งในสมมติฐานของการทดลอง เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เพียง 2 ชนิด คือ galactose และ arabinose รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนประกอบของ NaCl ได้เพียง 1% และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 33 °C เท่านั้น (Schaad, 1980) และนอกจากนี้ไม่สามารถใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคนี้ในประเทศไทยได้ สำหรับการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการ DAC indirect - ELISA โดยใช้ *Xylophilus ampelinus* Kit complete (Cat. No. 07138) ของบริษัท LOEWE Biochemical GmbH, Germany เป็นชุดตรวจสอบ พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อองุ่นที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นที่เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์ และพิจิตร และตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทำให้เกิดโรคและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ได้ และมีเพียง positive control เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมดังกล่าว แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย *Xy. ampelinus* ดังที่มีรายงานในต่างประเทศอย่างแน่นอน แต่เชื่อดังกล่าวน่าจะเป็น *X. campestris* pv. *viticola*

เนื่องจากบนอาหาร NA เชื้อสร้างโคโลนีสีขาวตรงกลางนูนสีเหลืองอ่อน ขอบและผิวหน้ากลมมน สูงจากผิวอาหารเล็กน้อยเรียบเป็นมัน เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.6 x 1.8 ไมโครเมตร ดัดสี แกรมลบ และมีแฟลกเจลลาเป็นแบบ monotrichous ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas campestris* (Schaad, 1980) และเมื่อเลี้ยงในอาหาร GYAC พบว่าเชื้อสร้างโคโลนี สีขาวลักษณะเหมือนที่สร้างบนอาหาร NA แต่สามารถสร้างเมือกและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งของเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ที่แตกต่างจาก *X. campestris* pathovar อื่นๆ และจากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยยิวรี ไม่เกิด กระบวนการรีดิวิชันสารประกอบ อนินทรีย์ในเตรตเป็นแก๊สในโตรเจน (Nayudu., 1972 อ้างถึงใน Lima., 2001) สำหรับการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถใช้น้ำตาล galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose และ fructose ได้ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose และ ribose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสามารถย่อย แป้งและเจลาติน สามารถสร้างเอนไซม์อะมิลเลสได้ สามารถใช้ประโยชน์จากสารชีตรดได้ รวมทั้ง สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl ได้สูงถึง 5% ได้ ผลการศึกษาการเจริญ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °C แต่มีอัตราการเจริญที่ช้ามาก ซึ่ง คุณสมบัติเหล่านี้เป็นลักษณะที่ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* และจากการเปรียบเทียบ ลักษณะทั้งหมด เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทยมีลักษณะตรงกับเชื้อ แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *viticola* ที่มีการศึกษาในประเทศอินเดียและบราซิล (Lima, 2001) ดังแสดงเปรียบเทียบในตาราง 5.1 สำหรับการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อ แบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรกับกิ่งชำองุ่นได้ โดยแสดงอาการจุดสีเหลี่ยมมน้ำน้ำตาล – คำ ขนาดเล็กกระจายบนใบภายใน 5 วันหลังจากปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ (DNA sequencing) ของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อหาชนิดเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จาก แบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยและเพื่อทำให้การจำแนกและระบุชนิดเชื้อแม่นยำยิ่งขึ้น พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (identity) กับ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ถึง 95% แต่เชื้อสาเหตุของโรคในประเทศไทยยังมีคุณสมบัติทาง ชีวเคมีที่แตกต่างจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เช่น เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถ เจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl ได้เพียง 1% และสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่ง คาร์บอน เพียง 2 ชนิด คือ glucose และ sucrose เท่านั้น นอกจากนี้ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ครั้งนี้ ไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ได้ เนื่องจาก โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>) ไม่มีข้อมูลของเชื้อ *X. campestris* pv.

viticola จึงทำให้เชื้อดังกล่าวคล้ายคลึงกับ *X. axonopodis* pv. *citri* ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ที่ DNA sequence ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคราใบจุดเส้นใบใหม่ในประเทศไทยที่ได้เป็น DNA sequence ครั้งแรกของเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ซึ่งจะได้นำเสนอ DNA sequence ของเชื้อดังกล่าวในโปรแกรม BLASTS เพื่อเป็นข้อมูลของ GenBank ต่อไป

สำหรับโรค grapevine bacterial canker disease (GBCD) มีรายงานพบครั้งแรกที่ประเทศอินเดีย โดยในปี 1972 Nayudu (อ้างถึงใน Lima., 2001) พบอาการใบจุดบนใบขององุ่น ได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุและตั้งชื่อว่า *Pseudomonas vitivola* ต่อมาในปี 1999 Malavolta และคณะ ชาวบราซิลได้ศึกษาโรคนี้อองุ่นที่แสดงอาการคล้ายกัน ในรัฐ Petrolina ประเทศบราซิล รายงานว่าพบโรค GBCD จึงได้ศึกษาหาเชื้อสาเหตุในด้านลักษณะ, คุณสมบัติบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, สรีรวิทยาและคุณสมบัติการทำให้เกิดโรค ได้สรุปว่าเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวเป็นเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *X. campestris* ปัจจุบันได้รับการยอมรับแล้วว่า รายงานของ Nayudu (1972) และ Malavolta (1999) เกิดจากเชื้อชนิดเดียวกัน (Lima, 2001) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับโรคดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาค้นคว้าครั้งแรกในประเทศไทย

2. การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค พบว่าสามารถกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะสูง และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรัมที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (titer) ที่ได้ก็อยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้คือ 1 : 1,000 และการทดสอบความเฉพาะเจาะจง แอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคราใบจุดเส้นใบใหม่จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทยไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้ และทำปฏิกิริยา cross reaction กับเชื้อ *X. axonopodis* pv *citri* ที่แยกได้จากมะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน ที่แสดงอาการ canker แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้การตรวจเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธี DAC Indirect – ELISA สามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 8×10^2 cfu/ml และวิธี Immunofluorescence microscopy สามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^2 cfu/ml สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสมเพื่อตรวจหาแอนติเจนที่อยู่บนชิ้นส่วนองุ่นที่ได้รับการปลูกเชื้อโดย DAC Indirect – ELISA และ Immunofluorescence microscopy ด้วยวิธีเตรียมเนื้อเยื่อแบบตัดเป็นชิ้นฝอยแล้วปล่อยให้ ooze ไหลออกมา และวิธีบดละเอียด พบว่าวิธีการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นฝอยแล้วนำไปต้มและการนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำค่าการดูดกลืนแสงสูงและสามารถมองเห็นปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC ภายใต้กล้อง fluorescence ได้ชัดเจนกว่าการไม่ต้มและล้างด้วย

0.1% KOH สำหรับวิธีการบดละเอียด พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 2 เท่าของ control เมื่อวัดจากเครื่อง ELISA reader และเมื่อส่องดูด้วยกล้อง fluorescence จะมีเศษตะกอนชิ้นส่วนอนุ่งทำให้มองเห็นเซลล์แบคทีเรียไม่ชัดเจน ซึ่งการปรับสภาพแอนติเจนด้วยสภาวะต่าง ๆ เหล่านี้เนื่องจากปฏิกิริยาของเซลล์แบคทีเรีย *X. campestris* มีสารเมือกห่อหุ้มอยู่เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายเมื่ออยู่ในสภาพที่แห้งแล้งหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมซึ่งสารเมือกนี้มีส่วนประกอบเป็นพวก heteropolysaccharide ได้แก่กลูโคส (glucose), กาแลคโทส (galactose), ไซโลส (xylose) และกรด ยูโรนิก (uronic acid) ซึ่งสารเหล่านี้จะมี viscid substances หรือ gums ที่ทำให้แบคทีเรียในสภาพแขวนลอยมีความหนืด (viscosity) ส่งผลให้ไม่ยึดเกาะกับ microtiter plate สำหรับการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการหลังจากปลูกเชื้อ 5, 10 และ 15 วัน และเมื่อปรากฏอาการแล้ว พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อตั้งแต่ 5 วันหลังทำการปลูกเชื้อ ดังนั้นในการตรวจเชื้อจากชิ้นส่วนอนุ่งที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ในขั้นต้น ควรเลือกใช้วิธี Indirect – ELISA เนื่องจาก ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และตรวจเชื้อในปริมาณน้อย พร้อมทั้งตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากกว่าวิธี Immunofluorescence microscopy ในแต่ละครั้ง

3. การสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคในประเทศไทยจากพื้นที่ปลูกอนุ่งแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี พิษณุตร ราชอง และสุรินทร์ พบว่าโรคดังกล่าวมีการระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์อนุ่งที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีจากเขตรอบมาปลูก ดังนั้นจึงเป็นไปได้สูงที่จะมีกิ่งพันธุ์อนุ่งติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และเมื่อนำมาตรวจหาด้วยวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม คือ วิธี Indirect – ELISA และ Immunofluorescence microscopy พบว่าจากตัวอย่างของอนุ่งที่แสดงอาการของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียของอนุ่ง จำนวน 68 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด ซึ่งการตรวจพบเชื้อก่อนสามารถใช้เป็นแนวทางลดความเสียหาย และเป็นข้อมูลในการป้องกันการแพร่ระบาดในประเทศไทยต่อไป

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากองุ่นที่แสดงอาการโรคใบจุดเส้นใบ
ใหม่ในประเทศไทย ไอโซเลต VN₃ กับเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu,
1972 อ้างถึงใน Lima., 2001), *Xy. ampelinus* and *X. axonopodis* pv. *citri* (Holt,
Krieg, Sneath, Staleg and Williams., 1994)

คุณสมบัติที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ			
	ไอโซเลต VN ₃	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>Xy.</i> <i>ampelinus</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Gram reaction	-	-	-	-
flagella	monotrichous	monotrichous	monotrichous	monotrichous
Mucoid on NA + 5% Glu	+	+	-	-
Starch hydrolysis	+	NI	-	+
Gelatin liquefaction	+	V	-	-
Lipolytic activity	+	NI	-	+
Catalase production	+	NI	+	+
Urease activity	-	NI	+	-
Denitrification (N ₂)	-	-	+	-
Citrate Utilization	+	NI	+	+
Maximun NaCl tolerance %	5.0	5.0	1.0	1.0
Growth on glutamine	-	NI	+	-
Growth on calcium lactate	+	NI	-	+
Maximun growth temp, °C	37	37	33	37
Acid production from carbohydrate				
Glucose	+	+	-	+
Galactose	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	-
Maltose	+	NI	NI	NI
Mannose	+	+	-	-
Sucrose	+	NI	-	+
Ribose	-	NI	NI	NI
Lactose	-	-	NI	NI
Fructose	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	-	-

Note : + = Positive; - = Negative; V = variable +, -; NI = No information

รายการอ้างอิง

- กนกพร ถิ่นมาบแค. (2542). การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. สาเหตุโรคลบจุดในมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. กรมส่งเสริมการเกษตร. (2542). การปลูกองุ่น. พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์สำนักข่าวพาณิชย์, กรุงเทพฯ. 23 น.
- ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2535). เซรุ่มวิทยาและความรุนแรงของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* สายพันธุ์ในประเทศไทย. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 26 : 357 - 366
- นภาพร บานชื่น. (2530). ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สุภวานิชการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- นันทกร บุญเกิด. (2543). คู่มือการสร้างสวนองุ่น. พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันวิจัยและพัฒนา, เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 122 น.
- บัญชา ทรบุญสมบัติ และศุภกกาญจน์ คำมณี. (2544). จุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบสแกนนิ่งประตูลูกโลกระดับจุลภาค. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 25 หน้า.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2544). มอลลิคิวท์สาเหตุโรครดพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่นพิมพ์วัฒนา. ขอนแก่น. 482 น.
- พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ. (2540). เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR). 22 – 27 : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การตรวจและวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรครดพืชด้วยเทคนิค Hybridization และ PCR. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการอนุชีววิทยาทางโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. (2545). เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR). 4 – 26 : โครงการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี PCR ทางการเกษตร. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยี ชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. (2525). หลักรักษาโรครดพืช. บริษัทสารมวลชน จำกัด. กรุงเทพฯ.
- วันณรงค์ เหล่าประดิษฐ์. (2542). องุ่น (Grapes). วารสารส่งเสริมการเกษตร. 29 : 139. 16 – 18 น.

วัลลา คิฐพงษ์พิชญ์, เพชรรัตน์ ศิริวงศ์, ชีรดา หวังสมบุญดี, จุฑาทพ วัชรไชยคุปต์ และประสาน สืบสุข. (2541). การพัฒนาและการใช้เทคนิคดีเอ็นเอสำหรับตรวจหาแบคทีเรียสำคัญของ มะเขือเทศและพริก. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 156 หน้า.

สุรนนท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชिरชดา. (2539). ปฏิบัติการระหว่างแอนติเจนและ แอนติบอดี; วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2536). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

โสภณ วงศ์แก้ว. (2536). โรคไวรัสถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมไร่ นา กรม ส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อรวิดี หาญวิวัฒน์วงศ์. (2539). อิมมูโนโกลบูลิน วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อรัญญา ตันติปัญจพร. (2534). การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบสแกน. วารสารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย 1(2) : 170 - 179.

Abad, J. A., and Moyer, J. W. (1992). Detection and distribution of sweet potato feathery mottle virus in sweetpotato by in vitro – transcribed RNA probes (riboprobes), membrane immunobinding assay and direct blotting. **Phytopathology** 82 : 300 – 305.

Albibi, R. and Chen, J. (1998). RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from a vineyard in North Florida. **FEMS Microbiology Letters** 165(2): 347-352.

Alfred, N. (1984). **Introduction to Molecular Immunology**. 2nd. Toppan Company, Limited, Tokyo, Japan.

Alvarez, A. M. and K. Lou. (1985). Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by ELISA. **Plant Dis.** 69: 1082-1086.

- Anderson, M. J. and S. T. Nameth. (1990). Development of a polyclonal antibody-based serodiagnostic assay for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium plant. **Phytopathology** 80: 357- 360.
- Atlas, R. M. (1993). **Microbiological Media**. London: CRC Press, Inc.
- [On – line serial]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>.
- Bell, C. R., Dickie, G. A., Harvey, W. L. G. and Chan, J. W. Y. F. (1995). Endophytic bacteria in grapevine. **Can. J. Microbiol.** 41 : 46 – 53.
- Berisha, B., Chen, Y. D., Zhang, G. Y. (1998). Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **European Journal of Plant Pathology** 104(5) : 427 - 433.
- Botha, W. J., Serfontein, S., Greyling, M. M. and Berger, D. K. (2001). Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cutting using a nested polymerase chain reaction. **Plant Pathology** 50 : 515 – 526.
- Bouzar, H., J. B. Jones, R. E. Stall, N. C. Hodge, G. V. Minsavage, A. Benedict and A. M. Alvarez. (1994). Physiology, chemical, serological, and, pathogenic analysis of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. **Phytopathology** 84 : 39 - 44.
- Bradbury, J. F. (1991). *Xylophilus ampelinus*. IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1050. **Mycopathologia** 115 : 63 - 64.
- CAB international. (1999). Crop protection compendium [CD]. Walingford : CA visual object.
- Chang, C. J. and Schaad, N. W. (1982). In vitro antibiotic susceptibility of xylem-limited plant pathogenic rickettsia-like bacteria. **Phytopathology** 72 : 1006 – 1009.
- Chang, C. J., R. Donaldson, M. Crowley and D. Pinnow. (1989). Comparison of the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds in four smiselective media. **Phytopathology** 79 : 140 – 145.

- Civerolo, E. L., M. Sasser, C. Helkie and D. Burbage. (1982). Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Plant Dis.** 66 : 39 – 43.
- Clark, M. F. (1981). Immunosorbent assays in plant pathology. **Ann. Rev. Phytopatol.** 19: 83- 106.
- Davis, M. J., Purcell, A. H. and Thomson, S. V. (1980). Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology** 70 : 425 – 429.
- Demski, J. W., D. C. Bay and M. A. Khan. (1986). Simple latex agglutination test for detecting flexuous rod – shape virus in forage legumes. **Plant Dis.** 70 : 777 – 779.
- Erasmus, H. D., Matthee, F. N, Louw, H. A. (1974). A comparison between plant pathogenic species of *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Erwinia* with species reference to the bacterium responsible for bacterial blight of vein. **Phytophylactica** 6 : 11 - 18.
- Fasy, P. C. and G. J. Persley. (1983). **Plant bacteria disease : A diagnosis guide**. New York : Academic Press Harcourt Brace Jorandovich Publishers.
- Fatmi, M. and N. W. Schaad. (1988). Selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology** 78 : 121 - 126.
- Fletcher, J. and S. A. Slack. (1986). Latex agglutination as a rapid detection assay for *Spiroplasma citri*. **Plant Dis.** 70 : 754 – 756.
- Freitag, J. H. (1951). Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology** 41 : 920 - 934.
- Fry, S. M. and Milholland, R. D. (1990). Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology** 80 : 61 - 65.

- Grall, S. and Manceau, C. (2003). Colonization of *Vitis vinifera* by a green fluorescence protein – label, *gfp* – marker strain of *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 : 1904 – 1912.
- Hampton, R. Ball, E. and S. De Boer. (1990). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens.** Minnesota USA: APS Press st. Paul.
- Hartung, J. S., J. f. Daniel and O. P. Pruvost. (1993). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by polymerase chain reaction method. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 1145 – 1147.
- Hill, B. L. and Purcell, A. H. (1995). Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology** 85 : 1368 – 1372.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. A. H., Staley, J.T. and Williams, S. T. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9 edition. London: CRC Press, Inc.
- Hopkins, D. L. and Purcell, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and Other Emergent Disease. **Plant Dis.** 86 : 1056 - 1066.
- Hopkins, D. L. (1989). *Xylella fastidiosa*: xylem limited bacterial pathogen of plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** 27 : 271 – 290.
- Hsu, H. T. and Lawson, R. H. (1991). Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. **Plant Dis.** 75 : 292 – 295.
- Hsu, H. T., Vongsasitorn, D. and Lawson, R. H. (1992). An improved method for serological detection for Cymbidium mosaic potexirus infection in orchids. **Phytopathology** 82 : 491 – 495.
- Lima, M. F. (2001). Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* [On line] www.cpatsa.embrapa.br/artigos/cancro.html.

- Malin, E.M., Roth, D. A. and Belden, E. L. (1983). Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Dis.** 67 : 645 - 647
- Manceau, C., Coutaud, M., Guyon, R. (2000). Assessment of subtractive hybridisation to select species and subspecies specific DNA fragments for the identification of *Xylophilus ampelinus* by polymerase chain reaction (PCR). **European Journal of Plant Pathology** 106 : 243 - 253.
- Manceau, C., Grall, S., Brin, C. and Guillaumes, J. (2003). Bacterial DNA extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and microwell plate detection system. **European Journal of Plant Pathology** 106 : 243 - 253.
- Milholland, R. D. (1991). Muscadine grapes: some important diseases and their control. **Plant Dis.** 75 : 113 - 117.
- Minsavage, G. V., Thomson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C. and Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology** 84 : 456 – 461.
- Mulrean, E. N. and M. N. Schroth. (1981). A semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* from walnut buds and oakkins. **Phytopathology** 71 : 326 – 339.
- Norman, D. and Alvarez, A. (1989). A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other *Xanthomonas*. **Plant Dis.** 73 : 654 – 658
- OEPP/EPPO. (1984). Data sheets on quarantine organisms No. 133, *Xanthomonas ampelina*. **Bulletin. OEPP/EPPO Bulletin.** 14 : 39 – 43.
- OEPP/EPPO. (1986). Data sheets on quarantine No. 531, *Xylophilus ampelinus*. **Bulletin. OEPP/EPPO Bulletin.**

- Omura, T., Hibino, H., Ussgi, T., Inoue, H., Morinaka, T., Tsurumachi, S., Ong, S., Putta, C. A., Tsuchizaki, M. and Saito, Y. (1984). Detection of rice viruses in plants and individual insect vector by latex flocculation test. **Plant Dis.** 68 : 374 – 378.
- Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (1991). Compendium of grape diseases. St. Paul, Min : American Phytopathological Society.
- Philip, I. C. (1965). **Immunology and Serology**. W. B. Saunders Company. U. S. A.
- Purcell, A. H., Finlay, A. H. (1979). Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology** 69 : 393 - 395.
- Raju, B. C., Goheen, A. C., Frazier, N. W. (1983). Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. **Phytopathology** 73 : 1309 - 1313.
- Randhawa, P. and N. W. Schaad. (1984). Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from crucifer seeds. **Phytopathology** 74 : 268 – 272.
- Schaad, N. W. (1980). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria APS**. St. Paul. MN.
- Schaad, N. W. and Forstor, R. L. (1985). A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology** 75 : 260 – 263.
- Seal, S. E. and J. G. Elphinstine. (1994). Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In : Hayward A. C., and Hartman G. L. (ed.) : bacterial wilt ; The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* . CAB international, Walingford, UK.
- Sela, I., Rechman, M. and Weissbach, A. (1984). Comparison of dot molecular hybridization and enzyme – linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissue and protoplast. **Phytopathology** 74 : 385 – 389.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี
ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทย

1. Nutrient agar (NA)

Peptone	5	g
Beef extract	3	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

1.1 Preparation of medium

1.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.

1.1.2 Mix thoroughly.

1.1.3 Gently heat and bring to boiling.

1.1.4 Distribute into tubes or flasks.

1.1.5 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 °C.

1.1.6 Pour into sterile petri dishes.

2. GYAC medium

Yeast extract	10	g
D - galactose	20	g
CaCO ₃	20	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml

2.1 Preparation of medium

2.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.

2.1.2 Mix thoroughly.

2.1.3 Gently heat and bring to boiling.

2.1.4 Distribute into tubes or flasks.

2.1.5 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 °C.

3. Tween 80 agar

Peptone	10	g
NaCl	5	g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1	g
Tween 80	10	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

3.1 Preparation of medium

3.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.

3.1.2 Mix thoroughly.

3.1.3 Gently heat and bring to boiling.

3.1.4 Distribute into tubes or flasks.

3.1.5 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 °C.

3.1.6 Pour into sterile Petri dishes.

4. Starch hydrolysis test medium

Soluble starch	10	g
Beef extract	3	g
Agar	12	g
Distilled water	1000	ml

4.1 Preparation of medium

4.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.

- 4.1.2 Mix thoroughly.
- 4.1.3 Gently heat and bring to boiling.
- 4.1.4 Adjust pH 7.5 ± 0.2 at 25°C .
- 4.1.5 Distribute into tubes or flasks.
- 4.1.6 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121°C .
- 4.1.7 Pour into sterile Petri dishes or leave in tubes.

5. Nitrate Reduction Broth, Clark

Peptone	20	g
KNO_3	2	g
Distilled water	1000	ml

5.1 Preparation of medium

- 5.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.
- 5.1.2 Mix thoroughly.
- 5.1.3 Distribute into test tubes that contain an inverted Durham tube.
- 5.1.4 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121°C .

6. Gelatin hydrolysis test medium

Gelatin	120	g
Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Distilled water	1000	ml

6.1 Preparation of medium

- 6.1.1 Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L.

- 6.1.2 Mix thoroughly.
- 6.1.3 Gently heat and bring to boiling.
- 6.1.4 Distribute into tubes.
- 6.1.5 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 °C.
- 6.1.6 Allow tubes to solidify in a slanted position.

7. Medium C

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5	g
Na ₂ HPO ₄	0.5	g
Yeast extract	1	g
NaCl	5	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
1.5% brom cresol purple	0.7	ml
Agar	12	g
Distilled water	1000	ml

7.1 Preparation of carbon source

- 7.1.1 Add 1 g carbon source (sugar) to distilled water and bring volume to 100 ml.
- 7.1.2 Mix thoroughly.
- 7.1.3 Filter sterilize.

7.2 Preparation of medium

- 7.2.1 Add components, except sugar (carbon source) solution, to distilled water and bring volume to 950 ml.
- 7.2.2 Mix thoroughly.

- 7.1.4 Gently heat and bring to boiling.
- 7.1.5 Adjust pH 6.8 ± 0.2 at 25°C .
- 7.1.6 Distribute into sterile tubes 5 ml.
- 7.1.7 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121°C . Cool to 50°C .
- 7.1.8 Aseptically add 1% of sterile sugar (carbon source)
- 7.1.9 Mix thoroughly.
- 7.1.10 Allow tubes to solidify in a slanted position.

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายต่างๆ ในกระบวนการ **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

1.1 Carbonate coating buffer

ละลาย Na_2CO_3 1.59 กรัม และ NaHCO_3 2.93 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสม NaN_3 0.2 กรัม จะได้ 0.05 M sodium carbonate buffer pH 9.6

1.2 Phosphate Buffer Saline Tween (PBS-T) pH 7.4

ผสม NaCl 8.0 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 2.9 กรัม, KCl 0.2 กรัม และ NaN_3 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จะได้ PBS จากนั้นเติม Tween 20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจะได้ PBS-T

1.3 Conjugate Buffer

ผสม polyvinyl pyrrolidone 40T (PVP) และ ovalbumin (egg albumin) ลงใน PBS-T ให้ได้ความเข้มข้นอย่างละ 0.2% เตรียมเท่าที่ต้องการใช้กับงานใน 1 เดือน

1.4 Substrate Buffer pH 9.8

ละลาย Diethanolamine ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 % (v/v) ปรับ pH ด้วยกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้นจนได้ pH 9.8 จากนั้นเติม NaN_3 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02%

1.5 3M KOH

ละลาย KOH ปริมาณ 168.327 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด

** สารเคมีที่เตรียมเสร็จแล้วจะต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

2. สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายต่างๆ ในกระบวนการ **Polymerase Chain Reaction**

2.1 0.5 M EDTA

ชั่งสาร Disodium ethylenediamine tetraacetate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 186.1 กรัม เติมลงใน น้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติมสารละลาย NaOH จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้ว สะอาด และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.2 5M NaCl

ละลาย NaCl ปริมาณ 292.215 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้ว สะอาด และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.3 CTAB - NaCl

ละลาย NaCl ปริมาณ 4.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10 กรัม CTAB อย่างช้า ๆ ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้ว สะอาด และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่งสาร Sodium dodecyl sulfate ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้ว สะอาด และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.5 สารละลาย Chloroform และ Isoamyl alcohol (24:1)

ผสมสารละลาย Chloroform 24 มิลลิลิตร และ Isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร จะได้อัตราส่วนของ สารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol ความเข้มข้น 24:1 สามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

2.6 1M Tris-HCl

ชั่งสาร Tris base ปริมาณ 121.1 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติมสารละลาย HCl จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด และนำไปนิ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.7 TE buffer (Tris EDTA)

ผสม 1M Tris pH 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 0.5M EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด และนำไปนิ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.8 Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่งสาร Ethidium bromide ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จนกว่า Ethidium bromide จะละลาย เทใส่ขวดแก้วสะอาดที่นำไปนิ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ ห่อขวดแก้วด้วย foil เพื่อป้องกันแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.9 2% CTAB

ผสม 1M Tris pH 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 0.5M EDTA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม NaCl 40.88 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 490 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด และนำไปนิ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ แล้วเติม CTAB 10 กรัม แบ่งใช้ครั้งละ 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้เติม mercaptoethanol 0.02%

2.10 10X Tris Borate EDTA (TBE)

ชั่งสาร Tris ปริมาณ 108 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติม EDTA 9.3 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด และนำไปนิ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

2.11 100 bp marker

ผสมสารละลาย stock 100 bp DNA Ladder (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Loading dye ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.12 Loading dye

ผสมสาร urea ปริมาณ 2.4 กรัม, sucrose 5 กรัม จากนั้นเติมสารละลาย Bromophenol blue 1 มิลลิตร และสารละลาย xylene cyanol 1 มิลลิตร สารละลายทั้งสองชนิดนำมาจาก 0.5% ของ stock (0.05 กรัมต่อ 10 มิลลิตร) ผสมสารและสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.13 Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs)

เตรียม dNTP 2.0 mM จาก 100 mM dATP (deoxyadenosine triphosphate), dCTP (deoxycytidine triphosphate), dGTP (deoxyguanosine triphosphate), dTTP (deoxythymidineine triphosphate), ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อ นำสารละลายไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.14 70% ethanol

ผสมสารละลาย 95% ethanol ปริมาตร 73.68 มิลลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาดที่ผ่านการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐริญา เบื่อนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนต้น และมัธยมตอนปลายจากโรงเรียนครบุรี อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรีได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีน โดยศึกษาและตรวจหาการสะสมโพลีฟีนอลออกซิเดชันในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปีการศึกษา 2/2545 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปีการศึกษา 2547