รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและการสำรวจโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

(Application of phage display technology for detection and survey of bacterial soft rot disease of crucifer plant in Thailand)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-302-55-12-35

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและการสำรวจโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

(Application of phage display technology for detection and survey of bacterial soft rot disease of crucifer plant in Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณพ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อัน

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2555

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ชาญกิจโกศล เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่อาคารสัตว์ทดลองทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ดูแลสัตว์ทดลอง และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุณ คุณมธุกร สมพงษ์ และ คุณ รุ่งทิพย์ สังข์เผือก ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชมีความสำคัญและจำเป็นในการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืช ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการระบุเชื้อและการติดตามเชื้อขึ้นมาหลากหลายวิธีโดยเฉพาะการใช้แอนติบอดี้ อย่างไรก็ตามแอนติบอดี้ที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชยังให้ประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเทคโนโลยีการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี้บนผิวเฟจ มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยผลการทดลองพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลี คือ เชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยยูเรีย ไม่เกิดกระบวนการรีดิวซ์นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถย่อยแป้งและเจลาติน สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ สามารถใช้ประโยชน์จากสารซิเตรตได้ รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl ได้สูงถึง 5% สำหรับการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคผักกาดเขียวปลีได้ โดยแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำสีน้ำตาล ขนาดเล็กกระจายบนก้านและใบภายใน 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ และเมื่อเชื้อเข้าทำลายเป็นระยะเวลา 5 วัน ขนาดแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลและส่งกลิ่นเหม็นการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค พบว่าสามารถกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะสูงและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (titer) ที่ได้อยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้คือ 1 : 25 ถึง 1:200 จากการคัดเลือกหาเฟจแอนติบอดี้ scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ biopanning ด้วยคลังของเฟจแอนติบอดีมนุษย์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเฟจแอนติบอดี scFv ที่ผลิตได้จำนวน 192 โคลน ไปตรวจความสามารถในการจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ด้วยวิธีการ ELISA พบว่า เฟจจำนวน 4 โคลน (1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10) สามารถจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูกลืนแสงที่ได้จาก BSA ซึ่งเป็น negative control นอกจากนี้พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน 1ErB10 มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สามารถเข้าทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำ เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำต่อไป

Abstract

Rapid development of techniques for characterization of bacteria over the past decade has greatly improved pathogen detection and identification. In this study, phage display technologies have been successfully introduced for recombinant antibody production to detect the bacterial soft rot of crucifer plants. After culturing on NA for 24 hours at 28 ^{0}C, the bacterium formed round, white, semitranslucent, glistening colonies. It produced similar symptoms on detached crucifer leaf as observed in the field at 3 days after inoculation. The bacterium was rod shape and gram - negative. The bacterium could utilize citrate and calcium lactate. But it was urease-negative, hydrolyze starch and gelatin and could not denitrify nitrate. It could tolerate NaCl concentration up to 5%. Moreover, the purpose of this study was to develop the monoclonal antibody for virulence strain of *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 by using the phage display technology, which allow to isolate antibodies directly from diverse repertoires of antibody genes. The result showed that human monoclonal antibodies against *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) by using phage display technology. After screening by biopanning method, the phage clone 1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10 showed high specificity with *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 strain by using phage ELISA technique. In addition to, polyclonal antibody produce from immunized rabbit with *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 showed low cross reactivity with other genus of bacteria such as Xanthomonas. The result showed that both types of antigen from pure culture could be detected by using phage clone 1ErB10. Thus, this isolated recombinant antibody could be applied for detection pathogenic bacteria in the future

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 1
1.3 ขอบเขตการวิจัย 1
1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 3
2.2 แผนการดำเนินงานตลอดทั้งโครงการ 3
2.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรค 3
2.2.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละในประเทศไทย 4
2.2.2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) 4
2.2.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย 4
2.2.3.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction) และรูปร่างของเซลล์ 4

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ (colony characteristics) 5
2.2.3.4 ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ 5
2.2.3.5 ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย 5
2.2.4 การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย 5
2.2.4.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction) 5
2.2.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) 6
2.2.5 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation) 7
2.2.5.1 การเตรียมแอนติเจน 7
2.2.5.2 การผลิตแอนติซีรั่ม 7
2.2.5.2.1 การผลิตแอนติซีรั่มในกระต่าย 7
2.2.5.2.2 การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรั่ม 8
2.2.5.3 การผลิตแอนติซีรั่มบนผิวฟาจ 9

3 ผลการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรค 11
3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละในประเทศไทย 11
3.2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) 11
3.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย 12
3.2.2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction) และรูปร่างเซลล์ 12
3.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ (colony characteristics) 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3 ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ 13
3.2.4 ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย 13
3.3 การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย 16
3.3.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction) 16
3.4 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation) 16
3.4.1 การเตรียมแอนติเจน 16
3.4.2 การผลิตแอนติซีรั่มบนผิวฟาจ 23
4 สรุปผลการวิจัย 26
บรรณานุกรม 28
ภาคผนวก 31
ประวัติคณะผู้วิจัย 38

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 วิธีการและปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย 8
3.1 แสดงผลการทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ 15
3.2 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ 15
3.3 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติเจนสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย 17
3.4 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er2 18
3.5 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er10 19
3.6 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er2+Er3+Er10 20
3.7 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er1และเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp 21
3.8 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er10 เชื้อแบคทีเรีย Rhizobium sp.และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. 22

สารบัญภาพ

รูปที่

หน้า

3.1 ลักษณะของพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรีย.....11
3.2 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแยกได้จากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียในประเทศไทยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (A) ไอโซเลต Er2(B) ไอโซเลต Er3 (C) ไอโซเลต Er10.....11
3.3 ลักษณะอาการที่เกิดบนผักกาดเขียวปลีหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr10โดยแสดงอาการเน่าเละและมีกลิ่นเหม็น.....12
3.4 ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er3 และ Er10 (จากซ้าย ไป ขวา ตามลำดับ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X.....12
3.5 ภาพแสดงผลเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต Er2 ลงบนอาหารชนิดต่างๆ A) แบคทีเรียไอโซเลต Er2 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวตรงกลางนูน, B)แบคทีเรียไอโซเลต Er2 ที่เลี้ยงบนอาหาร GYAC จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวตรงกลางนูน, C) แบคทีเรียไอโซเลต Er2ที่เลี้ยงบนอาหาร NA glucose 5% สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีสารเมือก (mucoid) ออกมา.....13
3.6 ภาพแสดงผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละผักกาดเขียวปลีที่อายุ 5 วัน รูป A-B) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, C-D) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr3, E-F) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er10, G) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CASUT007, H) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลตNB111.....14
3.7 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์เฟจด้วยวิธีการ ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการตรวจจับด้วยตัวตรวจจับ anti-M13.....23
3.8 การเปรียบเทียบการจับอย่างจำเพาะของเฟจ 1ErB10 ด้วยวิธีการ ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้อย่างจำเพาะเจาะจง.....24
3.8 ลำดับกรดอะมิโน (A) และโครงสร้างสามมิติ (B) ของเฟจ1ErB10 ที่สามารถจับกับO-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้.....25

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคเน่าเละจากแบคทีเรีย (bacterial soft rot) ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำของประเทศจีนและเนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชผักตระกูลกะหล่ำที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีจากเขตระบาดมาปลูก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีเมล็ดพันธ์พืชผักตระกูลกะหล่ำติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาและสำรวจโรคนี้อย่างจริงจังในเชิงลึก แม้ว่าจะพบพืชผักตระกูลกะหล่ำที่แสดงอาการคล้ายกับโรคเน่าเละจากแบคทีเรียในหลายพื้นที่ของการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยดังนั้นการระบุชนิดเชื้อสาเหตุสำรวจและตรวจสอบเชื้อสาเหตุ ของโรคดังกล่าวของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยจึงมีความจำเป็นเพื่อให้ทราบถึงแหล่งเพาะเชื้อและการแพร่ระบาดเพื่อเก็บรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยซึ่งวิธีการทางด้านเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และราคาถูก โดยทั่วไปวิธีการนี้อาศัยการผลิตแอนติบอดีจากกระต่าย แต่แอนติบอดีที่ได้มีข้อจำกัดในเรื่องของการเกิด cross reaction กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใกล้เคียง ทำให้การแปลผลไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงมีแนวความคิดในการนำเทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ ซึ่งสามารถคัดเลือกได้อย่างรวดเร็วในห้องทดลองจากคลังเฟจที่มีอยู่แล้ว (คลังย่าโม ๑) มาใช้ในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

1.2.2 เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละโดยใช้กระต่ายในการผลิตและเทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ

1.2.3 เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

1.2.4 เพื่อผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและผู้ช่วยนักวิจัยมืออาชีพ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงเชื้อสาเหตุลักษณะอาการการแพร่ระบาดของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในพื้นที่ปลูกเฉพาะที่สำคัญในประเทศไทยโดยใช้วิธีมาตรฐานของการศึกษาแบคทีเรีย

วิธีการตรวจสอบจะมุ่งเน้นการใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากบนผิวฟาจ (คลังย่าโม ๑) โดยจะใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยาและวิธีอื่นๆเป็นวิธีอ้างอิง

1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

1.เชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่มีรายงานในต่างประเทศคือเชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

2.เทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีบนผิวเฟจ น่าจะเป็นเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงมากในการพัฒนาแอนติบอดีสมัยใหม่ ที่ไม่ต้องพึ่งสัตว์ทดลองและแอนติบอดีที่ผลิตได้น่าจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อเป้าหมายในระดับสูง

3.วิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ยังไม่เหมาะสม ไม่รวดเร็วและไม่สะดวกสำหรับการใช้ตรวจสอบโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

4.เนื่องจากมีการนำชิ้นส่วนพืชและส่วนขยายพันธุ์จากเขตการระบาดจึงเป็นไปได้ที่จะมีสายพันธุ์พืชผักตระกูลกะหล่ำที่อ่อนแอต่อเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเพิ่มขึ้นในประเทศไทย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.สามารถระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

2.แอนติบอดีที่ไม่ต้องพึ่งสัตว์ทดลองและมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อเป้าหมาย

3.วิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

4.สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำต่อไป

5. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาอย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

พืชผักตระกูลกะหล่ำมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่นแต่พืชผักตระกูลกะหล่ำหลายสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนพืชผักตระกูลกะหล่ำเป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากในแทบทุกประเทศรวมถึงประเทศไทยพบว่าในปี 2542 ทั่วโลกมีการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำรวมทั้งสิ้นมากกว่าหนึ่งล้านไร่ให้ผลผลิตรวมมากกว่าสองล้านตัน (CAB International, 1999) สำหรับในประเทศไทยในปัจจุบันมีการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำเป็นพื้นที่ประมาณสี่หมื่นไร่กระจายอยู่ทั่วประเทศผลผลิตทั้งหมดประมาณแปดหมื่นตัน (วิลาวรรณ์ และคณะ, 2549) โดยพื้นที่ปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำในปี 2520 ได้ขยายไปในหลายพื้นที่ของภาคต่างๆเช่นจังหวัดเชียงใหม่เชียงรายและพะเยาจากรายงานการศึกษาโดยกรมส่งเสริมการเกษตรในปี 2542 พบว่าพืชผักตระกูลกะหล่ำที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันแบ่งเป็นพืชผักตระกูลกะหล่ำรับประทานสดและพืชผักตระกูลกะหล่ำบรรจุกระป๋อง

พืชผักตระกูลกะหล่ำเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างในระดับดีเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผักชนิดอื่นแต่การปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำมีอุปสรรคค่อนข้างมากโดยเฉพาะปัญหาด้านโรคพืชและแมลงศัตรูพืชสำหรับแมลงศัตรูที่สำคัญได้แก่หนอนกระทู้หอมกระทู้ผักด้วงหมัดผัก และหนอนใยผักเป็นต้น (เกษม พิลึก, 2524; วิลาวรรณ์ และคณะ, 2549) การปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยยังพบว่ามีการระบาดของโรคต่างๆที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและผลผลิตของพืชผักตระกูลกะหล่ำซึ่งได้แก่โรคใบจุด (alternaria leaf spot)โรคและรากเน่า (damping off) (เมืองทอง ทวนทวี และสุรีรัตน์ ปัญญาโตนะ, 2555)นอกจากนี้ในต่างประเทศยังพบโรคเน่าเละจากแบคทีเรีย (bacterial soft rot) ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำของประเทศจีนและเนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชผักตระกูลกะหล่ำที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีจากเขตระบาดมาปลูก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542; วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, 2551) จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีเมล็ดพันธ์พืชผักตระกูลกะหล่ำติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาและสำรวจโรคนี้อย่างจริงจังในเชิงลึกแม้ว่าจะพบพืชผักตระกูลกะหล่ำที่แสดงอาการคล้ายกับโรคเน่าเละจากแบคทีเรียในหลายพื้นที่ของการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยดังนั้นการระบุชนิดเชื้อสาเหตุสำรวจและตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยจึงมีความจำเป็นเพื่อให้ทราบถึงแหล่งเพาะเชื้อและการแพร่ระบาดเพื่อเก็บรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

2.2 แผนการดำเนินงานตลอดทั้งโครงการ

2.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรค

นำตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำที่แสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียจากพื้นที่ปลูก อำเภอสันทราย จ. เชียงใหม่ และอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate method ตามวิธีการของ Schaad (1980) โดยล้างใบพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรคให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณแผลเดี่ยว โดยให้คาบเกี่ยวระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติ จำนวน 5 แผลต่อตัวอย่าง นำชิ้นส่วนที่ตัด ล้างใน 10% chlorox จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ด้ามเข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อและรอให้เย็นบดชิ้นส่วนพืชให้ละเอียด จากนั้นใช้ loop แตะสารแขวนลอยที่ได้มา streak บนอาหาร NA นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกเอาโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ สีขาวเป็นมัน ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มา streak บนอาหาร NA slant บ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ

2.2.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละในประเทศไทย

2.2.2.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ตามวิธีการของ วิลาวรรณ์เชื้อบุญ, (2551)โดยนำเชื้อแบคทีเรีย isolate ต่างๆ ที่แยกได้ ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ (bacterial suspension) ให้ได้ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นด้วย heamacytometer นำสารแขวนลอยเชื้อผสมกับ celite ให้ได้ความเข้มข้น 1 %(v/w) ใช้สำลีก้านจุ่ม นำมาถูลงบนพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เตรียมไว้มาใช้เป็นพืชทดสอบที่เตรียมไว้ โดยใช้น้ำกลั่นผสม celite เป็นตัวเปรียบเทียบหลังจากปลูกเชื้อเสร็จแล้ว คลุมถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นแก่พืชผักตระกูลกะหล่ำ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก ตรวจผลการเกิดโรคและวันแรกที่พืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรค

2.2.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย

2.2.3.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction) และรูปร่างของเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคสายพันธุ์รุนแรง เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการติดสีแกรมตามวิธีของ Schaad (1980) โดย smear เชื้อบาง ๆ บน แผ่นสไลด์ที่สะอาด 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 ล้างจนกระทั่งใสไม่มีสี ล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดด้วย safranin O solution ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้จนแห้ง นำไปตรวจผล โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อแบคทีเรียเป็นแกรมลบ (gram negative) จะติดสีแดงของ safranin O และถ้าเป็นแกรมบวก (gram positive) จะติดสีม่วงของ

crystalviolet จากนั้นทำการถ่ายภาพรูปร่างเซลล์แบคทีเรียเพื่อบันทึกผล และวัดขนาดโดยเทียบกับไมโครมิเตอร์ วัดขนาดจาก 100 เซลล์ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของขนาดเซลล์แบคทีเรีย

2.2.3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ (colony characteristics)

นำเชื้อแบคทีเรีย isolate Er2, Er3 และ Er10ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการของ ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ (2547) คือ galactose yeast extract agar CaCO3 (GYAC), NA และ NA glucose 1, 2, 3, 4 และ 5% บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีบนอาหารแต่ละชนิด

2.2.3.4 ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละสายพันธุ์รุนแรงใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา มาเลี้ยงบนอาหาร NA ตามวิธีการของ ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ (2547) ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร NA และ NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 และ 42 องศาเซลเซียล ตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ

2.2.3.5 ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละสายพันธุ์รุนแรงใช้เป็นตัวแทนในการศึกษามาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)ทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) ทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity) ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase activity) ทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจนตามวิธีการของ Schaad, (1980).

2.2.4 การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

2.2.4.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction)

วิธีการนี้ใช้เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละที่แยกได้จากพืชผักตระกูลกะหล่ำในอำเภอสันทราย จ. เชียงใหม่ และอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย เป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* หรือไม่ โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงของ *E. carotovora pv. carotovora* เป็นตัวตรวจสอบโดยนำแบคทีเรียที่ได้รับการตรวจสอบเบื้องต้นว่าสามารถทำให้เกิดโรค ไอโซเลตรุนแรงที่เลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ ใส่ตัวอย่างใน microfuge tube ดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากวิธีของ CTAB method (1973) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Botha และคณะ (2001)โดยใช้ชุด primer S3, S4 ซึ่งเป็น specific primer ได้มาจากการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovora* 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 PCRคือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียล นาน 5 นาที ปรับอุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียล นาน 50 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียลนาน 2 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียล นาน 2 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ และปรับอุณหภูมิ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียล นาน 5 นาที (Botha *et al*., 2001) สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ใน จากนั้นตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (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 ลง ในแต่ละช่องของแผ่นเจลช่องละ 1 ตัวอย่าง และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 bp เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ กำหนดค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าคงที่ในอัตรา 5 volt/cm จากนั้นตรวจสอบแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV transilluminators) (ยี่ห้อ Vilber lourmate Cat. No. V037411) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกภาพ

2.2.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงใช้เป็นตัวแทนในการสกัดดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ ใส่ตัวอย่างใน microfuge tube นำมาสกัดดีเอ็นเอจากวิธีของ CTAB method (1973) เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด primer Yในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย 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 องศาเซลเซียล นาน 2 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียล นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียล นาน 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียล นาน 1 นาที 50 วินาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ และจากนั้นปรับอุณหภูมิ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียล นาน 7 นาที ตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บน 1% agarose gel

2.2.5 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation)

2.2.5.1 การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละสายพันธุ์รุนแรง ที่เลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเตรียมแอนติเจน โดยละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง 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 องศาเซลเซียล ใช้เป็น autoclaved antigen

2.2.5.2 การผลิตแอนติซีรั่ม

2.2.5.2.1 การผลิตแอนติซีรั่มในกระต่าย

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 องศาเซลเซียล เพื่อใช้เป็น normal serum ในการทดลองนำแอนติเจนที่เตรียมไว้จากข้อ 12.4.1 มาผลิตแอนติซีรั่ม โดยฉีดเข้าไปในกระต่ายซึ่งเป็นกระต่ายตัวเดียวกันกับที่ใช้ในการเก็บ 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 (intraveinous injection) บริเวณใบหู โดยไม่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant การฉีดแอนติเจนแต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน หลังการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 10 วัน ทำการเจาะเก็บแอนติซีรั่มลักษณะเดียวกับการเก็บ normal serum

ตารางที่ 2.1 วิธีการและปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

วันที่	**วิธีการ**	**ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีด**
1	ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ intravenously (IV)	0.5 มิลลิลิตร
2	IV	0.5 มิลลิลิตร
3	IV	1.0 มิลลิลิตร
4	IV	1.5 มิลลิลิตร
5	IV	2.0 มิลลิลิตร
6-12	พักการกระตุ้น	
13	การตรวจคุณภาพของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ Erwinia	

2.2.5.2.2 การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรั่ม

2.2.5.2.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่ม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย

นำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้มาประเมินหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายได้ (titer) ด้วยวิธี direct antigen coating indirect ELISA (DAC indirect - ELISA) พร้อมทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามวิธีการของโสภณ วงศ์แก้ว (2536) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี DAC-indirect ELISA ยกเว้นมีการทำการเจือจางแอนติซีรั่มที่ผลิตที่ได้ที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 1 : 8 – 1 : 2048 และใช้ normal serum และ carbonate coating buffer เป็น negative control

2.2.5.2.2.2 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบดูความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ (Breitling, et al. 1991) เนื่องจากกรณีที่แอนติซีรั่มไม่มีความเฉพาะเจาะจง จะเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับแอนติเจนชนิดอื่น ๆ ทำให้ผลการทดลองที่ได้ผิดพลาด จึงต้องมีการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ ด้วยวิธี DAC indirect - ELISA โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย isolate VN3 และเชื้อแบคที่เรียไอโซเลตต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้จากองุ่นที่แสดงอาการของโรคดังกล่าว 10 ไอโซเลต รวมทั้งเชื้อ *E. chrysantimi, Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* มาเลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 72 ชั่วโมง นำไปเตรียมสารแขวนลอยเชื้อ ด้วยการละลายเชื้อ 1 ลูปใน carbonate coating buffer จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ไปตรวจด้วย DAC indirect ELISA โดยในวิธีการทดสอบความเฉพาะเจาะจงจะใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตที่ได้ที่ระดับความเจือจาง 1 : 1,000

2.2.5.3 การผลิตแอนติซีรั่มบนผิวฟาจ

ผลิตแอนติซีรั่มบนผิวฟาจจากการทดลองของโครงการย่อยที่ 1 โดยนำ antigen ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 จะนำไปใช้ในการทำ biopanning เพื่อคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม ๑ เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมาะสม จากนั้นพัฒนาแอนติบอดีจากผิวเฟจให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการตรวจสอบเพปไทด์ที่คัดเลือกได้จากคลังเฟจที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคเน่าและทำการคัดหาแอนติบอดีจากคลังแอนติบอดีของมนุษย์ที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ Phage Display Biotechnology Research Unit มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยวิธีการ Biopanning ตามวิธีการของ Kirsch, et al. (2008) ที่ได้พัฒนาขึ้นมาแล้วในห้องปฏิบัติการ โดยการตรึง O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์รุนแรงที่ละลายอยู่ใน 100 mM $NaHCO_3$, pH 8.5 ลงบนหลอด imunosorbent ปริมาณ 20 µgแล้วบ่มไว้ที่ 4 ℃ เป็นเวลาข้ามคืนจากนั้นล้างโปรตีนเป้าหมายส่วนที่ไม่ถูกตรึงออกจากหลอดด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งและ blocked ด้วย 2% (w/v) skimmed milk powder ที่ในสารละลาย PBS (2% MPBS) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง เมื่อล้างเสร็จแล้วทำการเติมคลังเฟจแอนติบอดี 10^{12} อนุภาค ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเฟจส่วนที่ไม่จับออกออกด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.1% Tween 20 (PBST) จำนวน 5 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 5 ครั้ง เฟจส่วนที่จับกับโปรตีนเป้าหมายจะถูก elute ออกด้วยสารละลาย trypsin ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 400 µl และ 100 mM glycine- HCl pH 2.0 ปริมาตร 200 µl (ในส่วนของที่ elute ด้วย Glycine-HCl จะต้องทำการ neutralizedด้วยสารละลาย neutralization 200 µl(0.2 M sodium phosphate buffer)นำส่วนของเฟจที่ elute ออกมาได้ infect ด้วย *Escherichia coli* DH5µF' ที่อยู่ในระยะ log phase บ่มที่ 37 ℃ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น spread ลงบนอาหาร 2XTY ที่มี ampicillin (100 µg/mL) และกลูโคส (1% w/v) และบ่มไว้ที่ 37 ℃ เป็นเวลาข้ามคืน

2.2.5.3.1การทดสอบความสามารถของ phage scFV antibody ต่อการจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์รุนแรง

ทำการเลือกโคโลนีแบบสุ่ม เพื่อทำการผลิตเฟจที่แสดงแอนติบอดีscFvตามวิธีการของ Lewis, L. and Lloyd, C. (2012) ที่ได้พัฒนาขึ้นมาแล้วในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า จากนั้นนำ phage ที่ผลิตได้ มาตรวจสอบความสามารถในการจับกับการจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia* sp. ด้วยวิธี ELISA โดยการตรึงO-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia* sp. ที่ละลายอยู่ใน 100 mM $NaHCO_3$, pH 8.5 ลงบนเพลท ELISA ปริมาณ 5 µg (ในการทดลองนี้ใช้ BSA เป็น negative control) แล้วบ่มไว้ที่ 4 ℃ เป็นเวลาข้ามคืนจากนั้นล้างโปรตีนเป้าหมายส่วนที่ไม่ถูกตรึงออกจากเพลทด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งและ blocked ด้วย 2% (w/v) skimmed milk powder ที่ในสารละลาย PBS (2% MPBS) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง เมื่อล้างเสร็จแล้วทำการเติม 4% (w/v) MPBS 50 µl และ เฟจแอนติบอดี 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา ล้างเฟจส่วนที่ไม่จับออกออกด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.1% Tween 20 (PBST) จำนวน 3 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งเติม anti-M13 ที่ conjugate ด้วย HRP (เจือจาง 1:5000) 100 µlตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.1% Tween 20 (PBST) จำนวน 3 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งจากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท ABTS ที่มี 0.05% H_2O_2 ปริมาตร 200 μl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีและ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

2.2.5.3.2การประเมินความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของโคลนเฟจด้วยเทคนิค ELISA

ประเมินความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของเฟจที่คัดเลือกมาได้ โดยนำเฟจที่คัดเลือกมาได้ มาทดสอบความสามารถในการจับด้วยเทคนิค ELISA ดังที่กล่าวแล้วข้างบน ด้วยแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *E. coli* DH5αF' *Bacillus* sp. *Bradyrhizobium* sp. DOA9 และแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* และ*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์ต่างๆ

2.2.5.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

นำเฟจที่คัดเลือกมาได้ มาทำการ infect และเพาะเลี้ยงใน *E. coli* DH5αF' จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (Mini Prep: Qiagen, Germany) แล้วส่ง DNA ไปหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen (Seoul, Korea) โดยใช้ไพร์เมอร์-96gIII primer (5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3') และYamo_5 (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3') นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม ExPASy และนำกรดอะมิโนมาวิเคราะห์ต่อด้วย IgBLAST (Ye, Ma, Madden, & Ostell, 2013) และV BASE2 (Retter, Althaus, Munch, & Muller, 2005) นอกจากนี้แล้วทางคณะผู้วิจัยได้นำเอาลำดับกรดอะมิโนมาสร้างโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม PyMOL (www.pymol.org) อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรค

จากการเก็บตัวอย่างพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียในประเทศไทย (รูปที่ 3.1) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการเน่าเละบนอาหาร NA ซึ่งโคโลนีมีลักษณะกลมนูนยกสูงจากผิวหน้าอาหารขอบเรียบสีขาวเป็นมัน (รูปที่3.2) เก็บเชื้อไว้ทั้งหมดจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตEr1, Er2, Er3, Er4, Er5, Er6, Er7, Er8, Er9 และ Er10

รูปที่3.1ลักษณะของพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรีย

รูปที่3.2 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแยกได้จากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียในประเทศไทยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (A)ไอโซเลต Er2(B)ไอโซเลต Er3 (C)ไอโซเลต Er10

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากพืชผักตระกูลกะหล่ำแสดงอาการของโรคเน่าเละในประเทศไทย

3.2.1การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

จากการทดลองทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าเละ 10 ไอโซเลตบนผักกาดเขียวปลีพันธุ์ max018 คลุมถุงพลาสติกเพื่อเก็บความชื้นนำไปวางไว้ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er3, และ Er10 สามารถก่อให้เกิดโรคกับผักกาดเขียวปลีได้รุนแรงโดยแสดงเริ่มอาการ

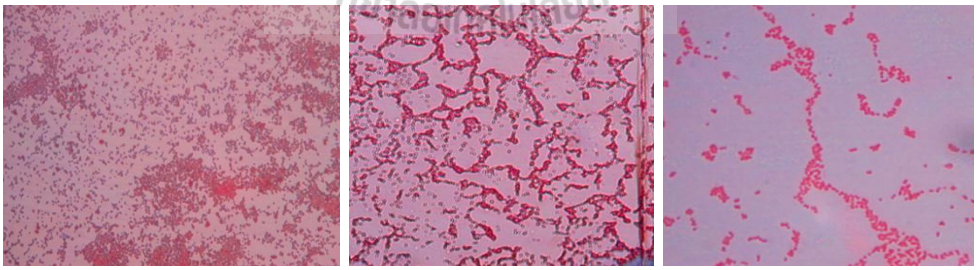
เน่าเละและมีกลิ่นเหม็นภายใน 1 วัน (รูปที่3.3) ต่อมาแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นลามถึงกันส่งผลให้ผักกาดเขียวปลีแสดงลักษณะอาการเละ

รูปที่3.3 ลักษณะอาการที่เกิดบนผักกาดเขียวปลีหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr10โดยแสดงอาการเน่าเละและมีกลิ่นเหม็น

3.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการย้อมแกรม (gram staining reaction) และรูปร่างเซลล์

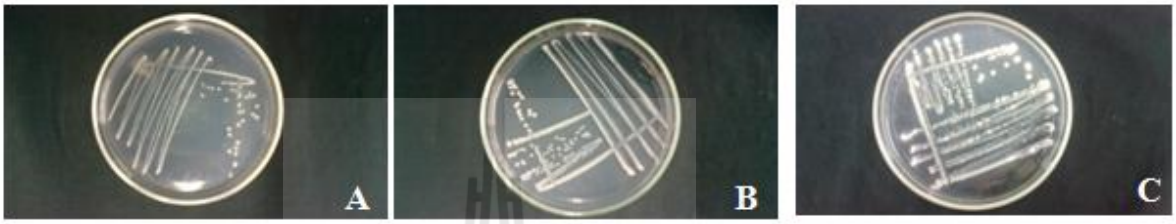
พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุเน่าเละที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา (ไอโซเลตEr2, Er3, และ Er10) ย้อมติดสีแดงของ safanin O แสดงว่าเชื้อดังกล่าวเป็นแกรมลบและเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X เชื้อมีรูปร่างเป็นท่อน (รูปที่3.4)



รูปที่3.4 ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr2, Er3 และ Er10(จากซ้าย ไป ขวา ตามลำดับ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X

3.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ (colony characteristics)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er3, และ Er10เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนอาหาร NA พบว่าเชื้อสร้างโคโลนีสีขาวตรงกลางนูน กลม (circular) ยกนูนสูงจากผิวอาหารเล็กน้อย (convex) ขอบและผิวหนา เรียบ (รูปที่3.5A) เมื่อเลี้ยงในอาหาร NA glucose 5%พบว่า เชื้อสร้างโคโลนีเหมือนกันกับที่เลี้ยงบนอาหาร NA แต่จะมีสารเมือก (mucoid) มากกว่าบนอาหาร NA (รูปที่3.5B) เมื่อเลี้ยงในอาหาร GYAC พบว่า เชื้อสร้างโคโลนีเหมือนกันกับที่เลี้ยงบนอาหาร NA glucose 5% แต่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าบนอาหาร NA และ NA glucose 5% (รูปที่ 3.5C)



รูปที่ 3.5 ภาพแสดงผลเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต Er2 ลงบนอาหารชนิดต่างๆ A) แบคทีเรียไอโซเลต Er2ที่เลี้ยงบนอาหารNAจะมีลักษณะโคโลนีสีขาวตรงกลางนูน, B)แบคทีเรียไอโซเลต Er2ที่เลี้ยงบนอาหารGYAC จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวตรงกลางนูน, C) แบคทีเรียไอโซเลต Er2ที่เลี้ยงบนอาหาร NA glucose 5% สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีสารเมือก (mucoid) ออกมา

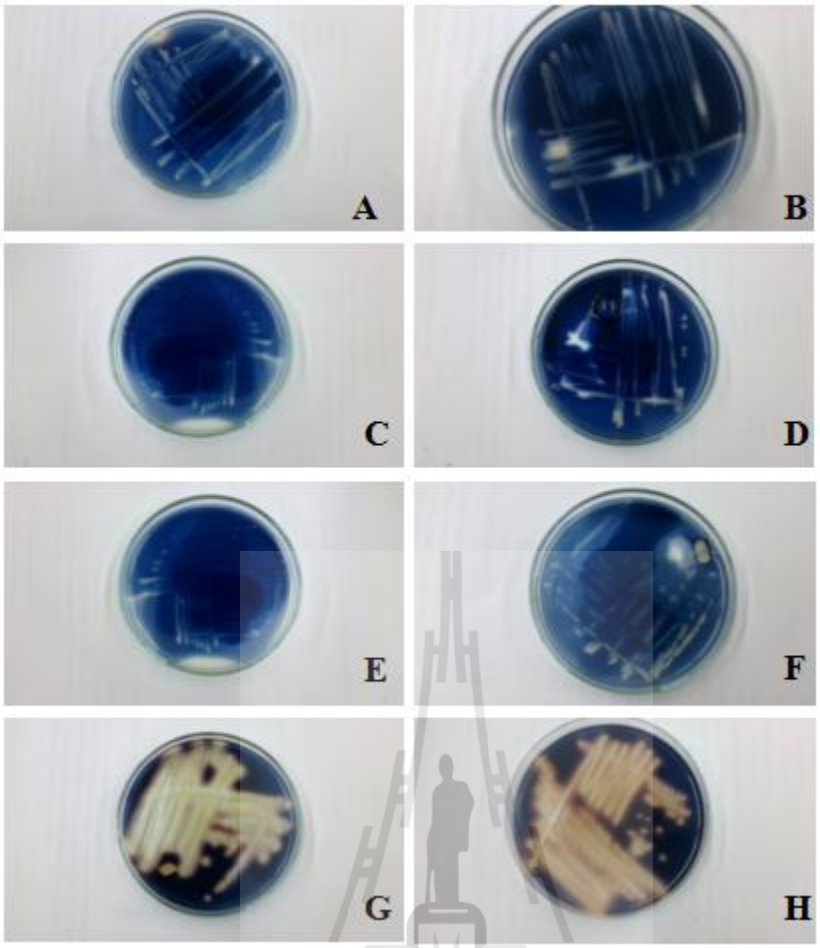
3.2.3 ปฏิกิริยาตอบสนองต่ออุณหภูมิ

พบว่าหลังจากบ่มเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er3, และ Er10เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 26 และ 33 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามาก

3.2.4 ปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

โดยตรวจการย่อยแป้งของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคด้วยการหยดสารละลายไอโอดีน (Lugol's iodinesolution) ลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อให้ท่วมเชื้อตรวจสอบการเกิดบริเวณโปร่งแสงรอบโคโลนี (clearzone) แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ พบว่า เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละผักกาดเขียวปลีที่แยกได้ทุกไอโซเลต คือ Er2, Er3 และ Er10ไม่สามารถย่อยแป้งได้ เนื่องจากไม่มีการสร้าง clearzone เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (รูปที่3.6)



รูปที่ 3.6ภาพแสดงผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและผักกาดเขียวปลีที่อายุ 5 วัน รูป A- B) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr2, C-D) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr3, E-F) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตEr10, G) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CASUT007, H) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลตNB111

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.4.2 การทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน

เมื่อเขย่าขวดที่บรรจุอาหาร Nitrate broth พบว่าขวดที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er5, Er7 และ NB111 ไม่เกิดฟองของแก๊สขึ้น แสดงว่าไม่เกิดกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er6, Er9, Er10 และ CASUT007 เกิดฟองของแก๊สขึ้น แสดงว่ามีการเกิดกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอินทรีย์ไนเตรต (ตารางที่3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทดสอบกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ

เชื้อทดสอบ	วันที่ตรวจผล		
	2	4	7
Er2	-	-	-
Er 3	-	-	-
Er 10	+	+	+
CaSUT 007	+	+	+
NB 111	-	-	-

**หมายเหตุ (+) = เกิดแก๊สไนโตรเจนในขวด

(-) = ไม่เกิดแก๊สไนโตรเจนในขวด

3.2.4.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity)

พบว่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Er2, Er3 และ Er10ไม่สามารถย่อยไขมันได้เนื่องจากบริเวณรอบโคโลนีไม่มีการสร้างจุดทึบขนาดเล็กทึบแสง แต่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CASUT007 และ NB111 สามารถย่อยไขมันได้ ซึ่งจะสังเกตเห็นรอบ ๆ โคโลนีจะเป็นจุดทึบขนาดเล็กรวมกันทำให้มีลักษณะขุนและทึบแสง (ตารางที่3.2)

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน (lipolytic activity) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ

เชื้อทดสอบ	วันที่ตรวจผล		
	2	4	7
Er 2	-	-	-
Er 3	-	-	-
Er 10	-	-	-
CaSUT 007	-	+	+
NB 111	+	+	+

** หมายเหตุ (+) = รอบๆ โคโลนีจะเป็นจุดทึบขนาดเล็กรวมกัน มีลักษณะขุ่นและทึบแสงเชื้อสามารถย่อยไขมันได้ (-)=สีอาหารจะใสเชื้อไม่สามารถย่อยไขมันได้

3.2.4.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เมื่อเอียงหลอดที่บรรจุอาหาร gelatin medium พบว่าหลอดที่ทำปลูกเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต Er2, Er3, Er10และ NB111ไม่สามารถไหลเป็นน้ำ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CASUT007 สามารถไหลเป็นน้ำ แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้

3.3 การยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

3.3.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction)

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละสายพันธุ์รุนแรงที่แยกได้จากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย และผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคมาตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพร์เมอร์primer Y ซึ่งออกแบบมาจาก conserved sequences ของยีน pelB และ pel153 ของเชื้อแบคทีเรีย *E.carotovora* pv. *carotovora* พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน pel ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ขนาด 434 bpโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน pel ของ *E. carotovora* pv. *carotovora* เท่ากับ 97%

3.4 การเตรียมแอนติเจนและแอนติซีรั่ม (antigen and antiserum preparation)

3.4.1 การผลิตแอนติซีรั่มในกระต่าย

3.4.1.1การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (titer) และความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย ด้วยวิธี agglutination test โดยผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 1: 25 ถึง 1: 12800 ซึ่งผลการทดสอบ พบว่า แอนติเจนของเชื้อแต่ละไอโซเลต ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลตEr2 Er3 Er10สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 1: 25 ถึง 1:200 ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติเจนสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย

ชนิดแอนติเจน	ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม									
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Er10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Er2	+++	++	++	+++	+	+	-	-	-	+
Er10+Er2+Er3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Er10+Rhi	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	++	+++
Er10+Rhi+Xan	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

หมายเหตุ :
- ++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
- +++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
- ++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
- + แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- - แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

3.4.1.2 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มชนิดต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er10Er2Er3 และแบคทีเรียชนิดอื่นๆพบว่าแอนติซีรั่มสามารถทำปฏิกิริยาได้ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.4-3.8 และ normal serum ที่นำมาใช้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบนั้นไม่แสดงการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 3.4 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต Er2

ชนิดแอนติซีรั่ม	**ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม**									
	1/25	**1/50**	**1/100**	**1/200**	**1/400**	**1/800**	**1/1600**	**1/3200**	**1/6400**	**1/12800**
Er10	–	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
Er2	++	++	++	++	+++	+++	+++	-	–	-
Er10+Er2+Er3	–	-	-	-	-	-	-	-	–	-
Er10+Rhi	–	-	-	-	-	-	-	-	–	-
Er10+Rhi+Xan	–	-	-	-	-	-	-	-	–	-

หมายเหตุ :
++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
+++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
+ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.5 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora*ไอโซเลต Er10

ชนิดแอนติซีรั่ม	ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม									
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Er10	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++
Er2	-	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Er10+Er2+Er3	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Er10+Rhi	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Er10+Rhi+Xan	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+++

หมายเหตุ :
- ++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
- +++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
- ++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
- + แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- - แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลตEr2+Er3+Er10

ชนิดแอนติซีรั่ม	**ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม**									
	1/25	**1/50**	**1/100**	**1/200**	**1/400**	**1/800**	**1/1600**	**1/3200**	**1/6400**	**1/12800**
Er10	-	-	-	+	++	++	++	++	+++	+++
Er2	+	+	+	+	++	++	++	+++	++	+++
Er10+Er2+Er3	+	+	+	++	++	++	+++	+++	++++	++++
Er10+Rhi	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++
Er10+Rhi+Xan	++	+	+	+	+	+	+	++	++	++

หมายเหตุ :
- ++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
- +++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
- ++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
- + แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- - แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.7 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora*ไอโซเลต Er10 และเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp.

ชนิดแอนติซีรั่ม	**ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม**									
	1/25	**1/50**	**1/100**	**1/200**	**1/400**	**1/800**	**1/1600**	**1/3200**	**1/6400**	**1/12800**
Er10	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+++
Er2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Er10+Er2+Er3	+++	+	+	+	+	+	++	++	++	+++
Er10+Rhi	++	++	+	++	++	++	+	++	++	+++
Er10+Rhi+Xan	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++

หมายเหตุ :
- ++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
- +++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
- ++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
- + แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- - แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.8 ผลการตรวจความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด และความไวของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora*ไอโซเลต Er10 เชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp.และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp.

ชนิดแอนติซีรั่ม	**ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม**									
	1/25	**1/50**	**1/100**	**1/200**	**1/400**	**1/800**	**1/1600**	**1/3200**	**1/6400**	**1/12800**
Er10	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++
Er2	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
Er10+Er2+Er3	++	++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Er10+Rhi	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++
Er10+Rhi+Xan	++	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++

หมายเหตุ :
- ++++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดีที่สุด
- +++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มดี
- ++ แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มปานกลาง
- + แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มน้อย
- - แอนติเจนไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม

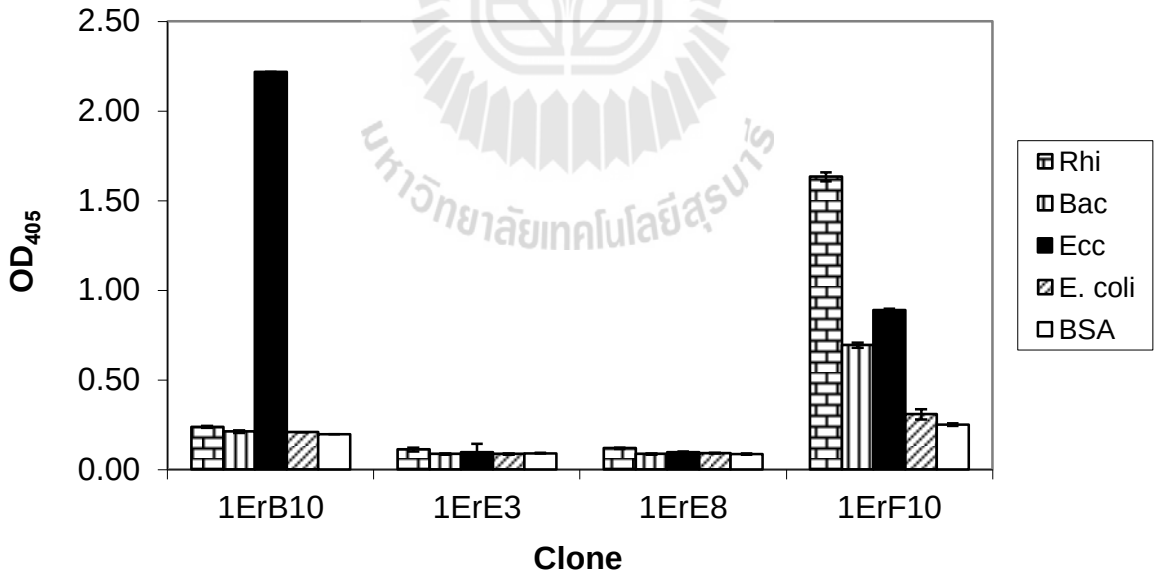
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.2 การผลิตแอนติซีรั่มบนผิวฟาจ

จากการคัดเลือกหาเฟจแอนติบอดี scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ biopanning ด้วยคลังของเฟจแอนติบอดีมนุษย์ ผลปรากฏว่า ได้ผลสำเร็จอย่างดี ซึ่งได้เฟจโคลนทั้งหมดจากการทำ biopanning รอบแรกเท่ากับ 22,800 pfuโดยในขั้นตอนต่อไป จะได้นำเฟจแอนติบอดีเหล่านี้ไปตรวจความสามารถในการจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ด้วยวิธีการ ELISA ต่อไป

3.4.2.1 การทดสอบความสามารถของ phage scFV antibody ต่อการจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia* sp.

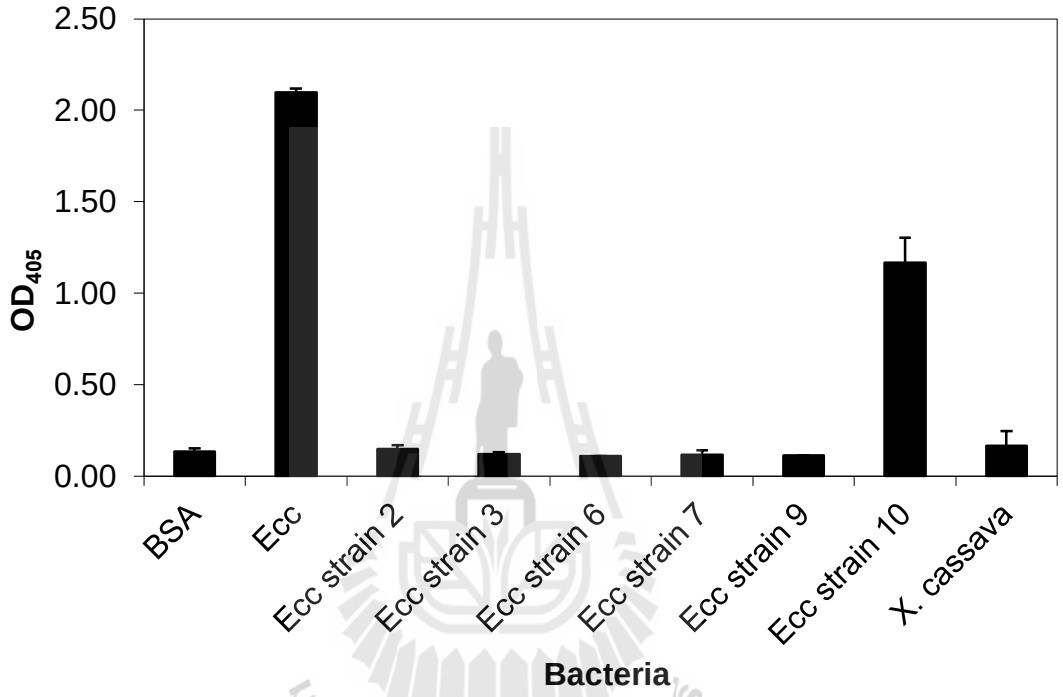
จากการนำเอาเฟจแอนติบอดี scFv ที่ผลิตได้จำนวน 192 โคลน ไปตรวจความสามารถในการจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ด้วยวิธีการ ELISA พบว่าเฟจจำนวน 4 โคลน (1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10) สามารถจับกับO-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จาก BSA ซึ่งเป็น negative control และเมื่อยืนยันการจับอีกครั้ง กลับพบว่า มีเพียงโคลน 1ErB10 ที่ความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* แต่ไม่จับกับ *E. coli* DH5αF' *Bacillus* sp. *Bradyrhizobium* sp. DOA9 และ BSA ดังแสดงในภาพที่3.7



ภาพที่ 3.7 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์เฟจด้วยวิธีการ ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora*ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการตรวจจับด้วยตัวตรวจจับ anti-M13

3.4.2.2 การประเมินความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของโคลนเฟจด้วยเทคนิค ELISA

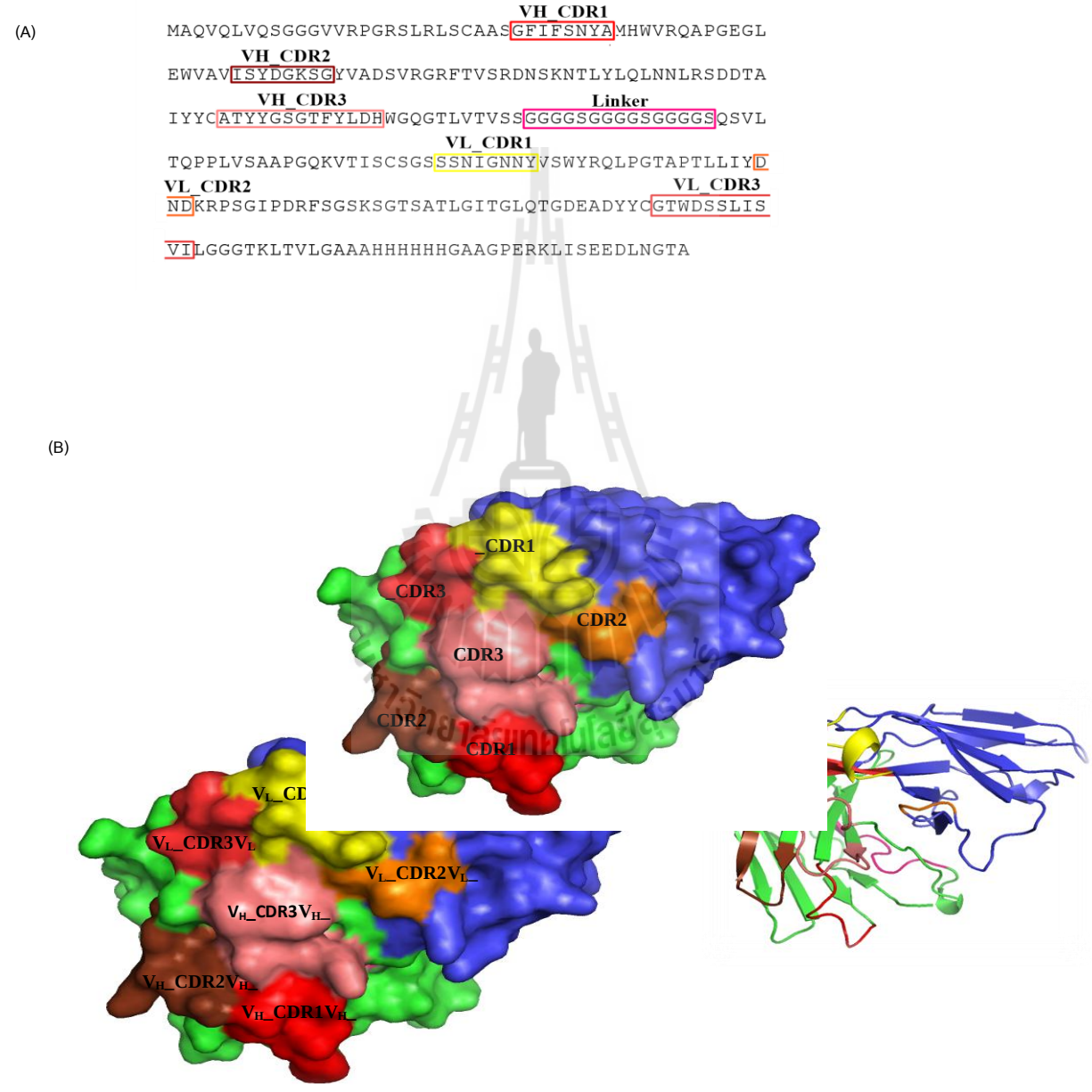
ตรวจความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของเฟจ 1ErB10 ที่คัดเลือกมาได้ โดยนำเฟจมาทดสอบความสามารถในการจับด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่าเฟจ 1ErB10 มี cross-reactivity กับเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์ Er10เพียงสายพันธุ์เดียว แต่ไม่มี cross-reactivity กับ BSA และแบคทีเรียก่อโรคพืชชนิดอื่น เช่น *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* และ เชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 3.8



ภาพที่3.8 การเปรียบเทียบการจับอย่างจำเพาะของเฟจ 1ErB10 ด้วยวิธีการ ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วนscFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย*E. carotovora* pv. *carotovora*ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

3.4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์และเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฟจ 1ErB10 ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 3.8 (A) จากนั้นนำกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ Germline พบว่า human frameworkของเฟจ1ErB10 คือ VH (IGHV3-30*04) และ V_L (IGLV1-51*01)นั่นคือจัดอยู่ใน subgroup ของ VH3 และ Vλ1 ตามลำดับ และมีสร้างโครงสร้างสามมิติดังแสดงในภาพที่ 3.8 (B)



ภาพที่ 3.8 ลำดับกรดอะมิโน (A) และโครงสร้างสามมิติ (B) ของเฟจ1ErB10 ที่สามารถจับกับO-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและการสำรวจโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุรวมทั้งพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคและเพื่อสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคเน่าเละผักกาดเขียวปลีสรุปผลการศึกษาทดลองได้ดังนี้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยา พบว่าคุณสมบัติต่างๆของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลี คือเชื้อ *E.carotovora* pv. *carotovora* เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนประกอบของ NaCl ได้เพียง 1% และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 33 ^{0}C เท่านั้น (Schaad, 1980; De Boer and McNaughton, 1986) จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยยูเรียไม่เกิดกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจน (Nayudu., 1972 อ้างถึงใน Lima., 2001) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสามารถ ไม่สามารถย่อยแป้งและเจลาตินสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้สามารถใช้ประโยชน์จากสารซิเตรตได้รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl ได้สูงถึง 5% ได้ผลการศึกษาการเจริญ ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C แต่มีอัตราการเจริญที่ช้ามากซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นลักษณะที่ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* (Schaad, 1980; De Boer,and Sasser, 1986; De Boer et al. 1987) สำหรับการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคผักกาดเขียวปลีได้โดยแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำสีน้ำตาลขนาดเล็กกระจายบนก้านและใบภายใน 3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ เละเมื่อเชื้อเข้าทำลายเป็นระยะเวลา 5 วัน ขนาดแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลและส่งกลิ่นเหม็น

การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคพบว่าสามารถกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะสูงและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (titer) ที่ได้ก็อยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้คือ1 : 25 ถึง 1:200จากการคัดเลือกหาเฟจแอนติบอดี้ scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E.carotovora* pv. *carotovora* ได้ (Allan and Kelman 1977; Batista and Neuberger 1998) โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ biopanning ด้วยคลังของเฟจแอนติบอดีมนุษย์ ผลปรากฏว่า ได้ผลสำเร็จอย่างดี ซึ่งได้เฟจโคลนทั้งหมดจากการทำ biopanning รอบแรกเท่ากับ 22,800 pfu เมื่อนำเอาเฟจแอนติบอดี scFv ที่ผลิตได้จำนวน 192 โคลน ไปตรวจความสามารถในการจับกับO-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ด้วยวิธีการ ELISA พบว่าเฟจจำนวน 4 โคลน (1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10) สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูกลืนแสงที่ได้จาก BSA ซึ่งเป็น negative control (McCafferty, et al. 1990) และ

เมื่อยืนยันการจับอีกครั้ง กลับพบว่า มีเพียงโคลน 1ErB1 ที่ความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับO-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* แต่ไม่จับกับ *E. coli* DH5αF' *Bacillus* sp. *Bradyrhizobium* sp. DOA9 และ BSA การตรวจความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของเฟจ 1ErB10 ที่คัดเลือกมาได้ โดยนำเฟจมาทดสอบความสามารถในการจับด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่าเฟจ 1ErB10 มี cross-reactivity กับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์ Er10 เพียงสายพันธุ์เดียว แต่ไม่มี cross-reactivity กับ BSA และแบคทีเรียก่อโรคพืชชนิดอื่น เช่น *Xanthomonas axonopodis*pv. *manihotis* และเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์อื่นๆ (Johnson,et al. 1999; Jostock, et al. 2004) จากการวิเคราะห์และเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฟจ 1ErB10 ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (Söderlind, et al. 1992; Schofield, et al. 2007) จากนั้นนำกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ Germline พบว่า human framework ของเฟจ 1ErB10 คือ VH (IGHV3-30*04) และ V_L (IGLV1-51*01) นั่นคือจัดอยู่ใน subgroup ของ VH3 และ Vλ1 (Andersson, 2010) ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถระบุชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย และผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละโดยใช้กระต่ายในการผลิตและเทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ รวมทั้งพบว่าวิธีการ ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตจากเฟจ 1ErB10 ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์ สามารถนำมาพัฒนาใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำ ซึ่งการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการและควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2542). การปลูกองุ่น. พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์สำนักข่าวพาณิชย์, กรุงเทพฯ. 23 น.

เกษม พิลึก. (2524). **ผักกาดและผักกะหล่ำ.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ.(2547). การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจ การแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต**สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพิช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.1-80 หน้า

เมืองทอง ทวนทวี และสุรีรัตน์ ปัญญาโตนะ. (2525).**สวนผัก**. กรุงเทพฯ: กลุ่มหนังสือเกษตร.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒิวณิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2549). การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนาภูมิต้านทานโรคของกะหล่าดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ.**วารสารเคหะการเกษตร**. 29: 271-272.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. (2551). ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ*Erwinia carotovora* pv.*carotovora*สาเหตุโรคเน่าเละของกะหล่ำดอก.**วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต** สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-120 หน้า.

โสภณ วงศ์แก้ว. (2536**). โรคไวรัสถั่วลิสงในประเทศไทย.** กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Allan, E. and Kelman, A. (1977). Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Phytopathology**. 67:1305–1312.

Andersson, R.A, Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A. and Palva, E.T. (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* : the role of *expR* (Ecc) Molecular Plant–Microbe Interactions. 13:384–393.

Batista, F.D. and Neuberger, M.S. (1998). Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. **Immunity**. 8:751–9.

Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. and Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. **Gene**. 104:147–53.

CAB international. (1999). Crop protection compendium [CD].Walingford : CA visual object.

Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature**. 352:624–8

Conway de Macario, E. and Macario, A.J.L. (1983). Monoclonal antibodies for bacterial identification and taxonomy. **ASM News**. 49:1-7.

Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J.M. and Sled, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Ann Appl Biol**. 166:18–38.

Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (1998). Antibody affinity maturation using bacterial surface display. **Protein Eng**. 11:825–32.

De Boer, S.H. and McNaughton, M.E. (1987). Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* serogroup I. **Phytopathology**. 77:828–832.

De Boer, SH. and Sasser, M. (1986). Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp.*atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. **Canadian Journal of Microbiology**. 32:796–800.

De Boer, S.H. and McNaughton, M.E. (1986). Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* serogroup I. **Phytopathology**. 77:828–832.

De Boer, S.H., Copeman, R.J. and Vruggink, H. (1979). Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. **Phytopathology**. 69:316–319.

De Boer, S.H., Verdonck, L., Vruggink, H., Harju, P., Bang, H.O. and De Ley, J. (1987). Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of Applied Bacteriology**. 63:487–495.

De Boer, S.H., Li, X.Z. and Ward, L.J.(2012). *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. **Phytopatholog**y. 102:937–947.

De Haan, E.G., Dekker-Nooren, T.C.E.M., van den Bovenkamp, G.W., Speksnijder, A.G.C.L., van der Zouwen, P.S. and van der Wolf, J.M. *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. **European Journal of Plant Pathology**. 122:561–569.

De Haan, E.G. and Van Den Bovenkamp, G.W. (2009).Test development in *Erwinia* at the NAK: BioPlex real-time PCR. **Gewasbescherming**. 40:172–175

Foote, J. and Eisen, H.N.(1995). Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 92:1254–6.

Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains.**Nucleic Acids Res**. 19:4133–7.

Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., et al.(2010). A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. **J Biotechnol**. 152:159–70

Johnson, S., Griego, S.D., Pfarr, D.S., Doyle, M.L., Woods, R., Carlin, D., Prince, G.A., Koenig, S., Young, J.F. and Dillon, S.B. (1999). A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZl9. **J Infect Dis**. 180:35–40.

Jostock, T., Vanhove, M., Brepoels, E., Van Gool, R., Daukandt, M., Wehnert, A., Van Hegelsom, R., Dransfield, D., Sexton, D., Devlin, M, et al. (2004). Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-on-phage display libraries. **J Immunol Methods**. 289:65–80.

Kirsch, M.I., Hülseweh, B., Nacke, C., Rülker, T., Schirrmann, T., Marschall, H.J., Hust, M. and Dübel, S. (2008). Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) BMC Biotechnol. 8:66.

Lewis, L. and Lloyd, C. (2012). Optimisation of antibody affinity by ribosome display using error-prone or site-directed mutagenesis. **Methods Mol Biol**. 805:139–61.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**. 348:552–4.

Schaad, N. W. (1980). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria APS. St. Paul. MN.

Schofield, D.J., Pope, A.R., Clementel, V., Buckell, J., Chapple, S.D.j., Clarke, K.F., Conquer, J.S., Crofts, A.M., Crowther, S.R.E., Dyson, M.R., et al. (2007). Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. **Genome Biol**. 8:R254.

Söderlind, E., Simonsson, A.C. and Borrebaeck, C.A.K. (1992). Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems. **Immunol Rev**. 130:109–24

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 0C.

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 ^{0}C.

3. Starch hydrolysis test medium

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 Adjust pH 7.5 + 0.2 at 25 0C.

3.1.5 Distribute into tubes or flasks.

3.1.6 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 0C.

3.1.7 Pour into sterile Petri dishes or leave in tubes.

4. Gelatin hydrolysis test medium

Gelatin	120	g
Beef extract	3	g
Peptone	5	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 Distribute into tubes.

4.1.5 Autoclave for 15 min at 15 psi pressure 121 ^{0}C.

4.1.6 Allow tubes to solidify in a slanted position.

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายต่าง ๆ ในกระบวนการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1.1 Carbonate coating buffer

ละลาย Na2CO3 1.59 กรัม และ NaHCO3 2.93 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมNaN3 0.2 กรัมจะได้ 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, KH2PO4 0.2 กรัม, Na2HPO4 2.9 กรัม, KCl 0.2 กรัมและ NaN30.2 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 NaN3 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02%

1.5 3 M KOH

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

** สารเคมีที่เตรียมเสร็จแล้วจะต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

2. สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายต่าง ๆ ในกระบวนการ Polymerase Chain Reaction

2.1 0.5 M EDTA

ชั่งสาร Disodium ethylenediamine tetraacetate . 2H2O ปริมาณ 186.1 กรัม เติมลงใน น้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 8.0ด้วยการเติมสารละลาย NaOH จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาด และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

2.2 5M NaCl

ละลาย NaCl ปริมาณ 292.215 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาดและนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

2.3 CTAB - NaCl

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

2.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

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

2.5 สารละลาย Chloroform และ Isoamyl alcohol (24:1)

ผสมสารละลาย Chloroform 24 มิลลิลิตร และ Isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร จะได้อัตราส่วนของสารละลาย 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 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

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 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

2.8 Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่งสาร Ethidium bromide ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ magnetic stirrer จนกว่า Ethidium bromide จะละลาย เทใส่ขวดแก้วสะอาดที่นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ 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 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ 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 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

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 มิลลิลิตร และสารละลาย xylene cyanol 1 มิลลิลิตร สารละลายทั้งสองชนิดนำมาจาก 0.5% ของ stock (0.05 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร) ผสมสารและสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร 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 ไมโครลิตรในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.14 70% ethanol

ผสมสารละลาย 95% ethanol ปริมาตร 73.68 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วสะอาดที่ผ่านการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ ดร. ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

Dr. Natthiya Buensanteai

2. หมายเลขบัตรประชาชน 3 3002 00788 43 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

School of Crop Production Technology
Institute of Agriculture Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000
Tel: (66) 4422-4204, (66) 4422-4261, (66) 8073-88449
Fax: (66) 4422-4281
E-mail: natthiya@sut.ac.th

5. การศึกษา

2011 **Postdoctoral Research Associate**, Unité Mixte de Recherche Eco&Sols (Ecologie fonctionnelle & biogéochimie des Sols &des Agroécosystèmes), France

2010 **Postdoctoral Research Associate**, Plant Pathology, Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, USA 2008 **Ph.D.**, Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Kasetsart University, Thailand

2005 **M.Sc,** Crop Production Technology, School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, Thailand

2003 **B.Sc**., Crop Production Technology, School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, Thailand

6. ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2553- ปัจจุบัน:	อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา ประเทศไทย
พ.ศ. 2554:	นักวิจัย ณ สถาบัน Unité Mixte de Recherche Eco&Sols (Ecologie fonctionnelle & biogéochimie des Sols &des Agroécosystèmes) ประเทศฝรั่งเศส
พ.ศ. 2551- 2553	นักวิจัย ณ มหาวิทยาลัย Texas A&M University ประเทศสหรัฐอเมริกา
พ.ศ. 2550:	ผู้ช่วยนักวิจัย ณ มหาวิทยาลัย University of Nebraska-Lincoln ประเทศสหรัฐอเมริกา

พ.ศ. 2548- 2550: ผู้ช่วยนักวิจัย ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

พ.ศ. 2544-2547: ผู้ช่วยนักวิจัย ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประเทศไทย

7. ผลงาน

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. **Buensanteai, N.,** Thammanu, K., and Prathuangwong, S. 2011. The FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava seedlings after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007. Research of Microbiology. (Manuscript in Preparation)
2. **Buensanteai, N.,** Thammanu, K., Sompong, S., and Prathuangwong, S. 2011. Use of *Trichoderma virens* SUTTv10 for the growth inhibition and disease reduction of *Botryodiplodia theobromae* causal agent stem rot disease on cassava in Thailand. Research of Microbiology. (Manuscript in Preparation)
3. **Buensanteai, N**. 2011. Homology modeling and functional prediction of the malonyl-acyl carrier protein from plant growth promoting bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*. In The 4th FEMS2011, Geneva, Switzerland. 224.
4. **Buensanteai, N**. 2011. The Tv*AP1* transcription factor gene expression and homology modeling in *Trichoderma harzianum* response to temperature change. In The 4th FEMS2011, Geneva, Switzerland. 167.
5. **Buensanteai, N.,** Thammanu, K., Prakhongka, I., and Prathuangwong, S. 2011. Changes in the cellular components of phytopathogenic fungi, *Sclerotium rolfsii* response to temperature stress using FTIR spectroscopy and enzyme activities assay. Research of Microbiology. (Manuscript in Preparation)
6. Buensanteai N, S. Mathukorn. 2011. Full report of the enhanced cassava growth promotion mediated by bacterial antagonist and phytohormone. Suranaree University of Technology, Thailand.
7. Buensanteai N, I. Prakhingka. 2011. Full report of the mechanism of pathogenic fungi, *Sclerotium rofsii* response to climate change. Suranaree University of Technology, Thailand.
8. Buensanteai N, I. Prakhingka. 2011. The enzyme activities and oxalic acid gene expression of *Sclerotium rolfsii*, causal agent tomato root rot, response to temperature change. In The 10th National Horticulture Conference 18th - 20th May 2011, Bangkok, Thailand. p 59.
9. **Buensanteai, N.,** and Plassard, C. 2011. Over-expression and purification of *Bacillus subtilis* proteinaceous phytase in *E. coli*. Protein Expression and Purification. (Manuscript in preparation).
10. **Buensanteai, N.,** and Plassard, C. 2011. Identification of *Bacillus subtilis* phytase. Microbiological research. (Submittion).
11. **Buensanteai, N.,** Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. TvPKC1 controls glucose metabolism in *Trichoderma virens* by regulating the glucose synthase gene expression and phosphorylation. MPMI. (Research are going on)
12. **Buensanteai, N.,** Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. The effect of temperature on proteome expression by the beneficial fungus *Trichoderma virens.* Proteomics. (Research are going on)
13. **Buensanteai, N.,** Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. The major facilitator superfamily transporter TvMFS is essential for efflux of the gliotoxin in the beneficial fungus *Trichoderma virens*. BMC Microbiology. (Manuscript in preparation)
14. **Buensanteai, N.,** Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. Transmembrane protein TvLac4 mediates ion and glucose transport of *Trichoderma virens.* EMBOs. (Research are going on)

15. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. Disruption of the TvLac4 from *Trichoderma virens* results in mediated structure of cell walls and reduced elicitor activities. Fungal Genetics and Biology. (Research are going on)
16. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. TvLac2, *Trichoderma virens* a novel membrane elicitor is an essential positive regulator of maize plant innate immunity. Plant Physiology. (Research are going on)
17. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. Disruption of TvLac2 affects antibiotic production, vegetative growth and cell wall synthesis of *Trichoderma virens***.** Molecular Microbiology. (Research are going on)
18. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Dangott, L.J., and Kenerley, C.M. 2010. Cloning, expression and purification of *Trichoderma virens* transmembrane elicitor TvLac2 in *Pichia pastoris* and homology modeling. Bioresource Technology. (Manuscript in preparation)
19. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Dangott, L.J., and Kenerley, C.M. 2010. Cloning, expression and purification of *Trichoderma virens* bioactive elicitor TvG2 in *Pichia pastoris* and homology modeling. Bioresource Technology. (Manuscript in preparation)
20. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. Extremes temperature-induced cell wall stress for transcription factor AP1 and PCK1 overexpression in *Trichoderma virens.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. (Revision)
21. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. The *MFS* efflux transporter gene expression in *Trichoderma virens* response to ambient pH stress and homology modelling. Mycological Research. (Revision)
22. **Buensanteai, N.** 2010. Catalase transcription level, enzyme activities and homology modeling analysis in *Rhizoctonia solani* response to temperature change. Bioresource Technology. (Manuscript in preparation)
23. Mukherjee, P.K., **Buensanteai, N.,** and Kenerley, C.M. 2010. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a Textex protein, Tex12. Appl Environ Microbiol. (Submitted)
24. **Buensanteai, N.** 2010. Homology modeling of the acyl carrier protein from plant growth promoting bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J. of Molecular Modeling. (Submitted)
25. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. The Tv*AP1* transcription factor gene expression in beneficial fungus *Trichoderma virens* response to temperature stress and homology modeling. In The 13th International Symposium on Microbial Ecology 2010, Seattle WA, USA
26. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., and Kenerley, C.M. 2010. *Trichoderma virens LAC2,* a novel CFEM membrane protein: homology modeling and transcription level analysis. In The 9th International Mycological Congress 2010, Edinburgh UK.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

27. **Buensanteai, N.** Horwitz, B.A. and Kenerley, C.M. 2010. Identification of novel elicitors of induced plant resistance from *Trichoderma virens***.** Annual Report 2010 (Plant Pathology). Texas A&M University, USA. 12 p.
28. **Buensanteai, N.,** Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Cheng, C., Dangott, L.J., and Kenerley, C.M. 2009. Expression and purification of biologically active *Trichoderma virens* proteinaceous elicitor Sm1 in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 72(1):131-131.
29. **Buensanteai, N.** Horwitz, B.A. and Kenerley, C.M. 2009. Identification of novel elicitors of induced plant resistance from *Trichoderma virens***.** Annual Report 2009 (Plant Pathology). Texas A&M University, USA. 8 p.
30. Thowthampitak, J., D. Atinuwat, **N. Buensanteai,** T. Chatnaparat and S. Prathuangwong. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 increases IAA and phenolic content for enhanced growth promotion and induced systemic resistance in IPM program of green soybean production. In The 6th International IPM Symposium 2009, Portland OR, USA. 124.
31. Prathuangwong S, **Buensanteai, N.** and G. Y. Yuen 2010. Proteome analysis of soybean seedling after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. Bioresource Technology. (Submitted)

32. **Buensanteai, N**., G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2009. Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25:1275-1286.
33. **Buensanteai, N.** 2008. Mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 on enhanced growth promotion and induced systemic resistance against bacterial pustule in soybean**.** Thesis (Plant Pathology). Kasetsart University, Thailand. 148 p.
34. Prathuangwong S., S. Tsuyumu, W. Chuaboon, T. Chatnaparat, J. Thowthampitak and **N. Buensanteai**. 2008. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 uniformly perceives in numerous experiments to improve plant health and environment. Summery Book JSPS-NRCT Core University Program (1998~2008) on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications. 84:29-30.
35. **Buensanteai, N.,** D. Athinuwat, T. Chatnaparat, G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. The extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced systemic resistance against bacterial pustule on soybean. Kasetsart Journal. 42:13-26.
36. **Buensanteai, N**., G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant. Thai Journal of Agricultural Sciences. 41 (3-4):101-116.
37. **Buensanteai, N**., G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. Proteomic analysis of plant growth promoting bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. In The 9th International Congress of Plant Pathology, Italy.

38. **Buensanteai, N.,** G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. Soybean defense proteome changes after seed sensitization with *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 for growth promotion. In The RGJ-Ph.D. Congress IX, April 4-6, 2008. Jomthien Palm Beach and Resort, Pattaya, Thailand.
39. **Buensanteai, N.,** D. Athinuwat, T. Chatnaparat, G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. The extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced systemic resistance on soybean. In The 46th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand. 342-252.
40. **Buensanteai, N**., G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. Proteomics change of soybean plant after seed treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 for growth promotion. In The APS centennial meeting 2008, Minneapolis MN, USA.
41. Prathuangwong S., **N. Buensanteai,** and G. Y. Yuen. 2008. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces indole-3-acetic acid in culture medium and its effect on growth promotion via increases proteome expression and indole-3-acetic acid content in soybean plant. In The APS centennial meeting 2008, Minneapolis MN, USA.
42. **Buensanteai, N.,** G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2007. Indole-3-acetic acid produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and effects on growth promotion of soybean. In The 8th National Plant Protection Conference, November 20-22, 2007. Amarin Lagoon Hotel, Phitsanulok, Thailand. 185-205.
43. **Buensanteai, N.,** G. Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 primed soybean for induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. In The RGJ-Ph.D. Congress VIII, April 20-22,2007. Jomthien Palm Beach and Resort, Pattaya, Thailand. P. 141.
44. **Buensanteai, N.,** D. Athinuwat, and S. Prathuangwong. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* caused agent soybean bacterial pustule with increased phenolic compounds and phenylalanine ammonia lyase. In The 45th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand. 132-142.
45. Prathuangwong S. and **N. Buensanteai**. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* Induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and 1,3-*b*-glucanase in soybean plant. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 42: 321-330.
46. Techati N., **N. Buensanteai**, S. Kasem, P. Jutawantana and S. Prathuangwong. 2007. Efficacy of antagonistic bacteria against bacterial leaf streak of corn. Proc. of 45th Kasetsart University Annual Conference. Jan 30 –Feb 2, 2007. Bangkok, Thailand.
47. Prathuangwong S., S. Kasem, C. Preecha, J. Thowthampitak, D. Athinuwat, **N. Buensanteai,** R. Detmanee and S. Tsuyumu. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 uniformly perceives in numerous experiments to improve plant health and environment. Summery Book JSPS-NRCT Core University Program (1998~2008) on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications. 84:29-30.
48. **Buensanteai, N.,** and S. Prathuangwong. 2006. Accumulation of peroxidase and β-1,3 glucanase in soybean to increase disease resistance against bacterial pustule using antagonistic *Bacillus*

amyloliquefaciens KPS46. In the 1st Legume Conference 2006, 28th – 31th Aug 2006. Chiang Rai, Thailand. p 139.

49. **Buensanteai, N.,** K. Markrung, and S. Wongkaew. 2006. Developed ELISA method for detected bacteria causal agent of leaf and vein necrosis on grapevine in Nakhon Ratchasima province. In The 44th Kasetsart University Annual Conference, 30th Jan. – 2nd Feb. 2006, Bangkok, Thailand. 289-302.
50. Athinuwat D., S. Prathuangwong, and **N. Buensanteai.** 2006. Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* strains upon pathogenesis on differential soybean cultivars and BOX-PCR analyses. Proc. of 44rd Kasetsart University Annual Conference. Jan 30 –Feb 2, 2007. Bangkok, Thailand.
51. Prathuangwong, S. and **N. Buensanteai**. 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxidases, and 1, 3-β –glucanases in soybean plants. In the Non-Specific and Specific Innate and Acquied Plant Resistance International Congress 2006, 31th Aug– 3nd Sep 2006. Hungary. P 45.
52. Athinuwat, D., **N. Buensanteai**, and S. Prathuangwong. 2005. Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* strains upon hypersensitive response, pathological, and BOX-PCR analyses. In the 7th National Plant protection Annual Conference 2nd - 4th Nov. 2005, Chiang Mai, Thailand.
53. Detmanee, R., S. Kasem, **N. Buensanteai**, C. Preecha, J. Thaothumpitak, D. Athinuwat, and S. Prathuangwong (2005). Endophytic colonization and induced resistance of bacterial antagonist strain KPS46 on soybean. In the 7th National Plant protection Annual Conference 2nd - 4th Nov. 2005, Chiang Mai, Thailand.
54. Chuaboon, W . S. Vudhivanich, C. Preecha, S., **N. Buensanteai**, and S. Prathuangwong. 2005. Plant growth promoting and induced systemic resistance using microorganisms and natural compounds in cauliflower and kale. In the 44th Kasetsart University Annual Conference, 30th Jan. – 2nd Feb. 2006, Bangkok, Thailand. 795-810.
55. Prathuangwong, S., C. Preecha, S. Vudhivanich, S. Kasem, **N. Buensanteai**, and W. Chuaboon. 2005. Occurrence and biological control of cauliflower at Suphanburi. In the ISSAAS International Congress 2005, 12th -14th Dec 2005. Hanoi, Vietnam.
56. **Buensanteai, N.,** and S. Wongkaew. 2005. Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand. TRF research report. 2005-1 : 1- 8.
57. **Buensanteai, N.,** S. Wongkaew, and K. Markrung. 2005. Identification of the bacterium causing Leaf spot and vein necrosis on grapevine in Thailand by polymerase chain reaction and indirect – ELISA. In The 5th National Horticulture Conference 26th - 29th Apr. 2005, Chonburi, Thailand. p 254.
58. K. Markrung**, N. Buensanteai,** S. Wongkaew, and. 2005. Developed ELISA method for detected *Sphaceloma ampelinum* causal agent of scab disease on grapevine. In The 5th National Horticulture Conference 26th - 29th Apr. 2005, Chonburi, Thailand. p 59.

59. **Buensanteai, N.** 2004. Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand. MS.C. Thesis (Crop Production Technology). Suranaree University of Technology, Thailand. 80 p.

60. **Buensanteai, N.**, and S. Wongkaew. 2004. Morphology and biochemical properties of bacteria causing vein necrosis of grapevine in Thailand. In The 4th National Graduate Conference 10th - 11th Aug. 2004, Chiang Mai, Thailand. p 139.

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ

1) **โครงการ** ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผิวใบมันสำปะหลังในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas camprestris* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้
แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ความสำเร็จประมาณ 100%

2) **โครงการ** การส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์และฮอร์โมนพืช
แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ความสำเร็จประมาณ 100%

3) **โครงการ** กลไกการตอบสนองของเชื้อรา *Sclerotium rofsii* ภายในสภาวะอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง **แหล่งทุน** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ความสำเร็จประมาณ 100%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี