

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ไอโซเลตที่แยกได้จากแตงโม แตงเทศ ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มเมื่อจำแนกตามระดับความรุนแรงในการเกิดโรคนบนแตงโม แตงกวา และแตงเทศ จำนวน 17 ไอโซเลต นำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. 6 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่ได้จากแหล่งอื่นจำนวน 3 ไอโซเลตด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย Aac โดยกลุ่มเชื้อที่จัดแบ่งตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังไม่สามารถเชื่อมโยงเพื่อระบุถึงแหล่งที่มา ชนิดพืชอาศัย หรือกลุ่มเมื่อจัดแบ่งตามความรุนแรงในการเกิดโรคนบนพืชทดสอบ ส่วนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย Aac มาก ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก BOXAIR primer จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรีย Aac แต่เมื่อใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18, G10 และ UBC355 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 770 bp ที่พบเฉพาะในกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย Aac ซึ่งไม่พบในเชื้อ *Pseudomonas* spp. จึงคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 770 bp นี้จากไอโซเลต Aac-MEL501 มาติดฉลากด้วย digoxigenin-11dUTP และนำไปไฮบริดซ์กับ PCR product จาก primer UBC355 เมื่อใช้จีโนมของเชื้อแบคทีเรีย Aac ไอโซเลตต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Pseudomonas* spp. พบว่า Aac-MEL501 UBC355 770 bp DNA probe นี้เกิดสัญญาณไฮบริดซ์ชัดเจนมากเฉพาะกับ PCR product จากเชื้อแบคทีเรีย Aac เท่านั้น ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 770 bp นี้เข้าไปในพลาสมิด pGEM-T easy ได้ recombinant clone 2 clones เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก recombinant clones พบว่าจาก DNA probe จาก clone MEL1 ให้สัญญาณไฮบริดซ์กับ PCR product จากเชื้อแบคทีเรีย Aac ได้ชัดเจนกว่า DNA probe จาก clone MEL2 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert DNA จาก clone MEL1 แล้วออกแบบ specific primer MEL1-FW และ MEL1-RV เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ primer MEL1-FW และ MEL1-RV พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงมากกับจีโนมเชื้อแบคทีเรีย Aac

โดยไม่เกิด PCR product ขนาด 770 bp เมื่อใช้จีโนมของเชื้อ *Pseudomonas* spp., เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ ก็คือ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pantoea ananas*, *Burkholderia* sp., *Xanthomonas* sp. ที่แยกจากใบสคววื้อช, และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ *Serratia marcescens*, fluorescent *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* และแบคทีเรียจากน้ำล้างใบแตงโมที่สามารถเจริญได้บนอาหาร TA100 ซึ่งความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac นี้ดีกว่าการใช้ไพรเมอร์ WFB1/WFB2 สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้

เทคนิค Bio-PCR สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย Aac จากตัวอย่างน้ำล้างใบและน้ำล้างเมล็ดแตงโมมีขั้นตอนต่างๆ ประกอบด้วยการนำใบพืชเป็นโรคหรือเมล็ดพันธุ์แตงโมมาแช่ใน washing buffer แล้วนำบัพเฟอร์ที่ได้มาตกตะกอนแบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปเกลี่ยไว้บนผิวหน้าอาหาร TA100 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จึงนำมาล้างเซลล์แบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหาร นำไปเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบในการ PCR โดยวิธีการต้มเซลล์ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ 1 ไมโครลิตรก็เพียงพอสำหรับนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในส่วนผสม PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ MEL1-FW/MEL1-RV และโปรแกรม PCR คือ 95 °C 5 นาที จำนวน 1 รอบ และ 95 °C 30 วินาที, 65 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ, 72 °C อีก 5 นาที จึงนำมาตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยขึ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากเชื้อแบคทีเรีย Aac มีขนาด 770 bp

Total 17 isolate of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) from North-east area were selected as candidate for pathogenicity group of Aac based on reaction of watermelon, melon and cucumber seedlings. The rep-PCR DNA fingerprint of Aac isolates using BOXAIR primer was determined compared with those of 6 isolates of *Pseudomonas* spp. and 3 isolates of Aac from other source. Results showed that, genetic of Aac isolates are diversified. However, the cluster of BOXAIR fingerprinting could not indicated to their geographical, host plant or pathogenicity grouping. The fingerprinting of *Pseudomonas* spp. Were closely related to Aac isolates. Therefore, BOXAIR fingerprinting was not suitable for searching the specific DNA fragment of Aac. Based upon RAPD technique using A18, G10 and UBC355 primers indicated that 770 bp DNA fragment from UBC355 was common fragment for Aac isolates. This DNA fragment was not amplified from genome of *Pseudomonas* spp. The UBC355 770 bp DNA fragment from Aac-MEL501 genome was labeled by digoxigenin-11 dUTP and using as DNA probe. The strongly hybridized signal was obtained only UBC355 product from various isolates of Aac. The 770 bp DNA fragment from Aac-MEL501 was selected and cloned into pGEM-T easy. Total 2 recombinant clones (MEL1 and MEL2) were obtained. The insert 770 bp fragment from each recombinant clone was labeled with digoxigenin-11 dUTP for using as DNA probe. MEL1 DNA probe hybridized with 770 bp PCR products from all Aac isolates. Nucleotide sequence of insert DNA in clone MEL1 was determined and designed the specific primers for Aac as MEL1-FW and MEL1-RV primers. The specificity of MEL1-FW and MEL1-RV primers was evaluated. Results showed that the target 770 bp DNA fragment obtained from genome of Aac isolates only. The 770 bp DNA fragment was not detected from genome of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pantoea ananas*, *Burkholderia* sp., *Xanthomonas* sp.

isolated from squash leaves, *Serratia marcescens*, fluorescent *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, and other bacteria obtained from watermelon leaf wash which be grown on TA100 medium. The specificity of MEL1-FW and MEL1-RV primers to Aac is better than primers WFB1/WFB2 which previously report for Aac detection.

Bio-PCR detection for Aac from infected leaves wash or watermelon seeds wash using MEL1-FW and MEL1-RV primers were as follows. The infected leaves or seeds were soaked in washing buffer then collected the bacterial cells from washing buffer by centrifugation. Obtained bacterial cell suspension was spread on TA100 medium and incubated at 28<sup>0</sup>C for 48 hr. The bacterial cells was collected from medium for preparation of DNA template by boiling method. One microliter of DNA solution from boiled bacterial cells was enough for PCR with MEL1-FW and MEL1-RV primers. Thermal cycles program is 95<sup>0</sup> C for 5 min, then 30 cycles of 95<sup>0</sup> C 30 sec; 65<sup>0</sup> C 30 sec; and 72<sup>0</sup> C 30 sec; final extension at 72<sup>0</sup> C for 5 min. The PCR product was determined by 1.5 % agarose gel electrophoresis. Target DNA fragment for Aac was 770 bp DNA fragment