ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวกนกพร ถิ่นมาบแค

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริธร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ วงศ์แก้ว)

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทางเซรุ่มวิทยาในการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ โดยนำตัวอย่างใบมะเขือเทศที่เป็นโรคใบจุดจากแหล่งต่างๆ ในเขตจังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด และสกลนคร มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 33 ไอโซเลตที่แยกได้ โดยทุกสามารถทำให้เกิดโรคใบจุดบนมะเขือเทศพันธุ์ VF 134 และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น หัวท้ายมน อยู่เดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถย่อยแป้งและเพคเตทได้ ซึ่งแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบมะเขือเทศที่แสดงอาการใบจุดเป็นเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* กลุ่ม B strain

การเตรียมแอนติเจนใช้เชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ไอโซเลต LKKU-7 เป็นตัวแทน โดยเตรียมแอนติเจน 2 วิธี วิธีแรกทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator (sonicated Ag) วิธีที่สองนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที (autoclaved Ag) จากนั้นนำแอนติเจนทั้งสองชนิดไปศึกษารูปแบบแถบ (band) โปรตีนโดยวิธี sodium dodesyl sulfate polylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ารูปแบบแถบโปรตีนของแอนติเจนทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย autoclaved Ag มีแถบโปรตีนน้อยและไม่ชัดเจน ในขณะที่ sonicated Ag มีแถบโปรตีนมากและชัดเจนกว่า จากนั้นนำแอนติเจนแต่ละชนิดฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายจำนวน 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 10 วัน แล้วเก็บแอนติซีรั่ม และนำแอนติซีรั่มที่ได้ตรวจหา titer โดยวิธี indirect-ELISA พบว่าแอนติซีรั่มที่ได้จากการฉีดด้วย autoclaved Ag (auAg-As) มี titer 1:1000 ในขณะที่แอนติซีรั่มที่ได้จากการฉีด sonicated Ag (soAg-As) มี titer 1:2000 และแอนติซีรั่มทั้งสองชนิดสามารถตรวจเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^5 cfu/ml โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียทั่วไป (saprophyte) ที่แยกได้จากเมล็ดมะเขือเทศทั้ง 14 ไอโซเลต และเชื้อ *Xanthomonas campestris* pathovar ต่างๆ ยกเว้นเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ที่เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย ส่วนการตรวจโดยวิธี latex agglutination พบว่าความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่เหมาะสมของ auAg-As คือ 1:100 และ soAg-As คือ 1:200 และสามารถตรวจเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^7 cfu/ml

การตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยา 2 วิธี คือ indirect-ELISA และ latex agglutination โดยเลือกใช้แอนติซีรั่ม soAg-As เพียงอย่างเดียว ในการนำเมล็ดมะเขือเทศปลูกเชื้อความเข้มข้นต่างๆ ไปปลูกดูอาการจากต้นกล้าพบว่าต้นกล้าแสดงอาการเป็นโรคจำนวน 197 ต้น และนำเอาวิธี indirect-ELISA ควบคู่ไปกับการใช้อาหารเฉพาะ Tween B มาใช้ตรวจตัวอย่างต้นกล้าที่แสดงอาการใบจุดเหล่านั้น พบว่าเกิดปฏิกิริยา 166 ตัวอย่าง ในขณะที่พบเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเฉพาะ Tween B จำนวน 190 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจตัวอย่างจากแปลงนั้น ใช้ใบและเมล็ดมะเขือเทศจากแปลงของเกษตรกรในเขตจังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ และสกลนคร โดยใช้ใบจำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่าเกิดปฏิกิริยาบวกทั้ง 45 ตัวอย่าง และการตรวจเมล็ดมะเขือเทศของเกษตรกรจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าเกิดปฏิกิริยาบวก 23 ตัวอย่างในขณะที่การตรวจด้วยอาหารเฉพาะ Tween B พบเชื้อทั้ง 25 ตัวอย่าง ส่วนการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี latex

agglutination โดยใช้เชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* 38 ไอโซเลต เชื้อแบคทีเรียทั่วไป 14 ไอโซเลต และเชื้อ *Xanthomonas campestris* pathovar ต่าง ๆ 21 ไอโซเลต ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลแสดงคล้ายกับการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่ม ส่วนการตรวจหาเชื้อจากใบมะเขือเทศที่เป็นโรคใบจุดจากแปลงในเขตจังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ และสกลนคร จำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่า ทั้ง 32 ตัวอย่างให้ผลเป็นบวก เช่นเดียวกับการตรวจโดยใช้อาหารเฉพาะ Tween B