T159446

บทคัดย่อ

แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการต้นเหี่ยวในมะเขือเทศ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* , *Pseudomonas corrugata* และ *Ralstonia solanacearum* ได้ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียต้องห้ามสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อการส่งออก ในขั้นตอนการผลิตได้ใช้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultrasonicator นำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดหลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 10 วัน แอนติซีรั่มที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชนิดมีคุณภาพดี มีค่า titer 8,000 มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนสูงมากโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อกันและกันในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศทั้ง 3 ชนิด สามารถนำไปตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวมะเขือเทศโดยใช้ตัวอย่างลำต้นเป็นโรคยาวประมาณ 1 ซม. มีน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม เตรียมตัวอย่างโดยแช่เนื้อเยื่อที่เป็นโรคใน coating buffer 1 มล. บดเนื้อเยื่อให้แตกเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีจึงนำสารแขวนลอยที่ได้ไปตรวจตามขั้นตอนของวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตได้เจือจางใน conjugate buffer ในอัตราส่วน 1 : 1000 โดยปริมาตร และใช้ goat anti-rabbit igG/ alkaline phosphatase conjugate (Sigma) ในอัตราส่วน 1 :40,000 โดยปริมาตร จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างมะเขือเทศเป็นโรคเหี่ยวจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น หนองคาย กาฬสินธุ์ มหาสารคาม หนองบัวลำภู และสกลนคร ระหว่างพ.ศ. 2542-2544 จำนวน 101 ตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตได้มาตรวจสอบ พบว่าทุกตัวอย่างเกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* และไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* และ *P. corrugata* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียต้องห้ามสำหรับการออกใบรับรองการปลอดโรคประกอบการส่งออกเมล็ดพันธุ์

Abstract **TE 159446**

Polyclonal antisera specific to three species of bacteria causal agent of tomato wilt symptom, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* , *Pseudomonas corrugata* and *Ralstonia solanacearum* were produced. These antisera were used for detection and diagnosis of target bacteria in tomato seed production for exportation. The process of immuniztion be started with sonication whole cell target bacteria with ultrasonicator, then mixed with Freund's incomplete adjuvant. The antigen was intramuscular injection on white rabbit three times with one week interval. Bleeding was done at 10 days after the final injection. The good quality of antisera were obtained, with titer 8,000 and high specificity against target antigen without cross reaction between each species of these three target tested bacteria. These antisera were suitable for diagnosis of tomato bacterial wilt disease by indirect ELISA , using 1 cm. length ot infected stem with aprox. 0.1 gm. The infected stem tissue was crushed and soaked in 1 ml coating buffer for 30 min, then applied the crude suspension into well of ELISA plate and followed the steps for indirect ELISA. The produced antiserum for each target bacterial species could be used at dilution 1: 1000 (v/v) in conjugate buffer, and used goat anti-rabbit IgG/alkaline phosphatase conjugate (Sigma) in the ratio of 1:40,000(v/v). Tomato seed production fields in Khon Kaen, Nongkai. Kalasin, Mahasarakham, Nongboulampoo and Sakolnakorn Provinces were inspected during 1999-2001 and collecting the samples of tomato wilt disease for further indirect ELISA diagnosis using all produced antisera. Results revealed that , all diseased samples caued by *R. solanacearum* and no evidence for positive detection the *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and *P. corrugata*, the target bacteria for phytosanitary certification of exported tomato seeds.