บทคัดย่อ

T 150235

นำเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) สาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม จำนวน 100 ไอโซเลต มาจัดกลุ่มตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นกล้าได้จำนวน 5 กลุ่ม เมื่อปลูกเชื้อ (inoculated) บนต้นกล้าแตงกวาและตรวจผลภายใน 5 วัยหลังการปลูกเชื้อ และจัดกลุ่มตามรูปแบบแถบโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ได้ 8 clusters ในการผลิตแอนติซีรั่ม (polyclonal antiserum) ต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac โดยการฉีดแอนติเจน 2 ชนิด คือ (1) นำ sonicated-Ag และ (2) นำ autoclaved-Ag โดยฉีดเข้ากระต่าย 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 10 วัน จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเทคนิค indirect-ELISA พบว่าแอนติซีรั่ม (SAg-As) ที่ได้จากการฉีด sonicated Ag มีค่า titer 1:18,000 ส่วนแอนติซีรั่ม (AAg-As) ที่ได้จากการฉีด autoclaved Ag มีค่า titer 1:20,000

การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแอนติเจน โดยวางแผนการทดลองแบบcompletely randomized design (CRD) 4 ซ้ำ 5 หน่วยทดลอง ดังนี้ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง(ข้ามคืน) (2) บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง(ข้ามคืน) (3) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (4) บ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ (5) บ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า 37° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุด การทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสมระหว่าง BSA, Tween20 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ BSA ผสมกับ Tween20 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 15 หน่วยการทดลอง พบว่า 1-3% BSA และ 0.1-0.2% Tween20 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย Aac ในสารละลายและน้ำคั้นใบแตงโม

จากการทดลองเปรียบเทียบระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติเจนระหว่าง 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงใช้ BSA2% + Tween20 ความเข้มข้น 0.1% เป็น blocking solution และบ่มแอนติเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงใช้ BSA ความเข้มข้น 2% เป็น blocking solution โดยวิธี indirect-ELISA พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สามารถลดระยะเวลาในการทำ indirect-ELISA ได้อย่างน้อย 9 ชั่วโมง และแอนติซีรั่มทั้งสองชนิดที่ได้ก็มีความไวในการตรวจและจำเพาะต่อเชื้อ Aac สามารถตรวจหาเชื้อ Aac ด้วยเทคนิค indirect-ELISA ได้ที่ระดับ 10^4 cfu/ml

การใช้ buffer ในการสกัดเชื้อแบคทีเรีย Aac จากเมล็ดโดยนำไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน buffer 4 ชนิด คือ nutrient broth, phosphate buffer saline , selective medium broth และ peptone buffer พบว่าการสกัดเชื้อแบคทีเรีย Aac จากเมล็ดโดยการใช้ phosphate buffer saline เป็น buffer ที่ดีที่สุด โดยใช้เวลาเขย่า 6 ชั่วโมง

Abstract

TE 150235

One hundred isolates of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) cause of watermelon fruit blotch, could be categorized in 5 pathogenicity groups by inoculating into the cucumbit seedlings and by notifying the disease severity on the fifth day after inoculation. Moreover they could be computerized into 8 clusters by SDS-PAGE protein pattern. Polyclonal antiserum production of Aac was made by injecting the rabbit with the antigen from two antigen preparation methods: (1) sonicated cell (sonicate-Ag) and (2) autoclaved cell (autoclaved-Ag), for 5 times at 10 days interval. By employing the indirect-ELISA, antiserum produced from sonicated-Ag had the titer at 1:18,000 while the antiserum produced by autoclaved-Ag had titer at 1:20,000.

To find out the proper on antigen incubation temperature and period, it was investigated by using completely randomized design (CRD) comprising 4 replications and 5 treatments : (1) 4^{0}C for 12 hours (overnight), (2) 25^{0}C for 12 hours (overnight), (3) 37^{0}C for 1 hour, (4) 37^{0}C for 3 hours and (5) 37^{0}C for 5 hours. The result showed that there was statistical difference among the treatment and the best incubation was at 37^{0}C for 3 hours. For obtaining the suitable blocking solution, various concentrations of BSA, Tween20 and their combination were used as blocking solution. The experiment was assessed and computerization in CRD with 4 replications. It is obvious that absorbance 1-3% BSA and 0.1-0.2% Tween20 was not statistical different when applied to detect the Aac in suspension and cucumbit leaf sap.

When the proper antigen incubation and the suitable blocking solution as investigated above were employed to modify indirect-ELISA. The improvement in less time consuming at least 9 hours was recorded without the effect on sensitivity at minimun concentration 10^{4} cfu/ml and specificity where compared with the indirect-ELISA commonly performed.

Four extraction buffers for Aac from seeds were (1) nutrient broth, (2) selective medium broth, (3) peptone buffer and (4) phosphate buffer saline . The result showed that incubation in saline buffer for 6 hours was the most proper condition Aac extraction from seeds.