



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) อย่างรวดเร็ว

Development of The Rapid Detection Kit for Brown Spot Bacterium of Orchid
(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

نامผู้วิจัย นางสาวรุ่งนภา ทองเครื่อง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวคณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิชัย โฉมสิริรัตน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ณัฐจิมา โฉมิตเจริญกุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้
(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) อย่างรวดเร็ว

Development of The Rapid Detection Kit for Brown Spot Bacterium of Orchid
(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

โดย

นางสาวรุ่งนภา ทองเครื่อง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2557

รุ่งนภา ทองเครื่อง 2557: การพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) อย่างรวดเร็ว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวคณ, Ph.D. 77 หน้า

โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ พบการระบาดในกล้วยไม้สกุลแวนดา ฟาแลนนอปซิส แคทลียา และมีอคการ่าในแหล่งปลูกกล้วยไม้จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร เมื่อแยกเชื้อจากตัวอย่างกล้วยไม้แวนดาและฟาแลนนอปซิส ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาลได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนตรงดิดสี่แกรมลบ เคลื่อนที่ได้ โคลนนิ่งกลมูนชอบเรียบสีขาวขุ่น ไม่สร้างเมือกสีเรืองแสงเมื่อเลี้ยงบนอาหาร King's B ทดสอบการเกิดโรคโดยปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้ที่ทำให้เกิดแผลด้วยเข็ม แสดงอาการของโรค จุดสีน้ำตาลแผลน้ำ หลังจากการปลูกเชื้อแล้ว 5-7 วัน ไม่พบอาการดังกล่าวในกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อควบคุมด้วยน้ำกลั่นนำไปจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยระบบ Biolog MicroStation™ โดยเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานบนอาหาร GN2 (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) จำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* และเมื่อตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งเป็นบริเวณ Intergenic spacer region (ISR) ระหว่างยีน 16S-23S rDNA ของเชื้อ *Acidovorax avenae* คือ SEQ ID NO: 1 และ SEQ ID NO: 2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท ที่แยกได้ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp ซึ่งเป็นขนาดจำเพาะของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในทั้ง 10 ไอโซเลท จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าโรคใบจุดสีน้ำตาลที่พบในกล้วยไม้สกุลแวนดาและฟาแลนนอปซิสมีสาเหตุจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

พัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique โดยผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายที่ฉีดด้วย membrane protein complex (MPC) ของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* นำมาคิดผลจากด้วยอนุภาคทองคำใช้เป็นตัวตรวจจับ เมื่อทดสอบการตรวจหาเชื้อจากสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจสอบนี้สามารถตรวจสอบและแสดงปฏิกิริยาผลบวก ปรากฏสีในเวลา 5 นาที และมีประสิทธิภาพตรวจแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ ที่ปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Rungnapha Thongkreng 2014: Development of The Rapid Detection Kit for Brown Spot Bacterium of Orchid (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Miss Sujin Patarapuwadol, Ph.D. 77 pages.

Brown leaf spot symptoms were observed in commercial orchid orchards in Nakhon Pathom, Ratchaburi and Samut Sakhon provinces on *Vanda*, *Phalaenopsis*, *Cattleya* and *Mokara* orchids. Ten isolates of rod shaped, motile, Gram-negative bacteria were isolated from *Vanda* and *Phalaenopsis*. On King's medium B, colonies are round, convex with smooth margin in creme to beige color and no fluorescent pigment. Pathogenicity testing of these bacteria on *Vanda* and *Phalaenopsis* orchids by inoculating on wounded leaves each with a separate bacterial isolate, brown necrosis with water soaked lesions was developed on all the inoculated plants after 5 to 7 days whereas no symptoms developed on the negative control plants. The rapid bacterial identification using carbon utilization on 95 carbon sources, GN2 microplate with MicroStation™ ID system (Biolog Inc., Hayward, CA, USA), identified these bacterial as *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. Polymerase chain reaction was carried out with *Acidovorax avenae* specific primers, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2 derived from the 16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR), were also generated an amplicon of 550 bp from pure cultures in all of 10 isolates. The results indicated that brown leaf spot in *Vanda* and *Phalaenopsis* orchids caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*.

A specific and sensitive, gold particle-based immunochromatographic test strip (Immuno-strip) for the rapid detection of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* was developed. Specific polyclonal antibody against *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* was produced in rabbit using membrane protein complex (MPC) from virulent strain. The Immuno-strip tests with suspension of 10^8 cfu/ml of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* gave the positive reading within 5 minutes. The sensitivity of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* detection on orchid using Immuno-strip was at the minimum concentration of 10^4 cfu/ml.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุจินต์ ภัทรภูวคต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร.วิชัย โฆสิตรัตน และอาจารย์ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสิ้น สมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รศ. ศศิธร วุฒิวนิชย์ ประธานการสอบและ ดร.พรพิมล อธิปัญญาคม ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ของภาควิชาโรคพืชทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อัน เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณบุคลากร และ เจ้าหน้าที่ของ ภาควิชาโรคพืชทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล หัวหน้ากลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา ที่กรุณา เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิทยาศาสตร์และสถานที่ทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณบุรณี พัวพงษ์แพทย์ คุณเยาวภา ตันตวานิช คุณทิพวรรณ กันหาญาติ และพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา ที่ให้ ความช่วยเหลือจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จ

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ Plant-Microbe Interactions อาคารปฏิบัติการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตกำแพงแสน ทุกคนที่คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ นักวิชาการ โรคพืชทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้ กำลังใจ ชี้แนะ และ สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

รุ่งนภา ทองเครื่อง
กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	26
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	65
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างโรคใบจุด สีน้ำตาลของกล้วยไม้	28
2	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ	31
3	ผลทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test) ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลทต่างๆ	35
4	ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	39
5	ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ครั้งที่ 7 ในการทำ ปฏิกิริยากับเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ที่บริสุทธิ์ และ MPC ของเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ด้วยเทคนิค indirect ELISA	40
6	ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ด้วยเทคนิค indirect ELISA	41
7	ผลการทดสอบความไวในของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ที่บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค indirect ELISA	42
8	การแยกอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ด้วยวิธี recProtien A affinity column chromatography	44
9	ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปและ เทคนิค ELISA	53
10	ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA	56
11	ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังการประกอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป	22
2	ลักษณะอาการโรคเบาจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่พบในแปลงปลูก	27
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการเบาจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้บนอาหาร Wakimoto's medium	27
4	ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี	30
5	การทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test)	34
6	ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการเบาจุดกล้วยไม้ด้วยเทคนิค PCR	36
7	แสดงผลการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog™ system ซึ่งเป็นการใช้สัปสเตรทของเชื้อจำนวน 95 ชนิด	37
8	การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน โดยวิธี Dot immunobindind assay (DIBA)	46
9	ผลการทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad	47
10	การศึกษานิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการบดตัวอย่างใบกล้วยไม้ปกติ	49
11	การศึกษานิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการบดตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่มีอาการเบาจุดสีน้ำตาล	50
12	การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป	52
13	การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป	54
14	การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการเบาจุดสีน้ำตาล	55

การพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโน้บจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้

(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) อย่างรวดเร็ว

Development of The Rapid Detection Kit for Brown Spot

Bacterium of Orchid (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

คำนำ

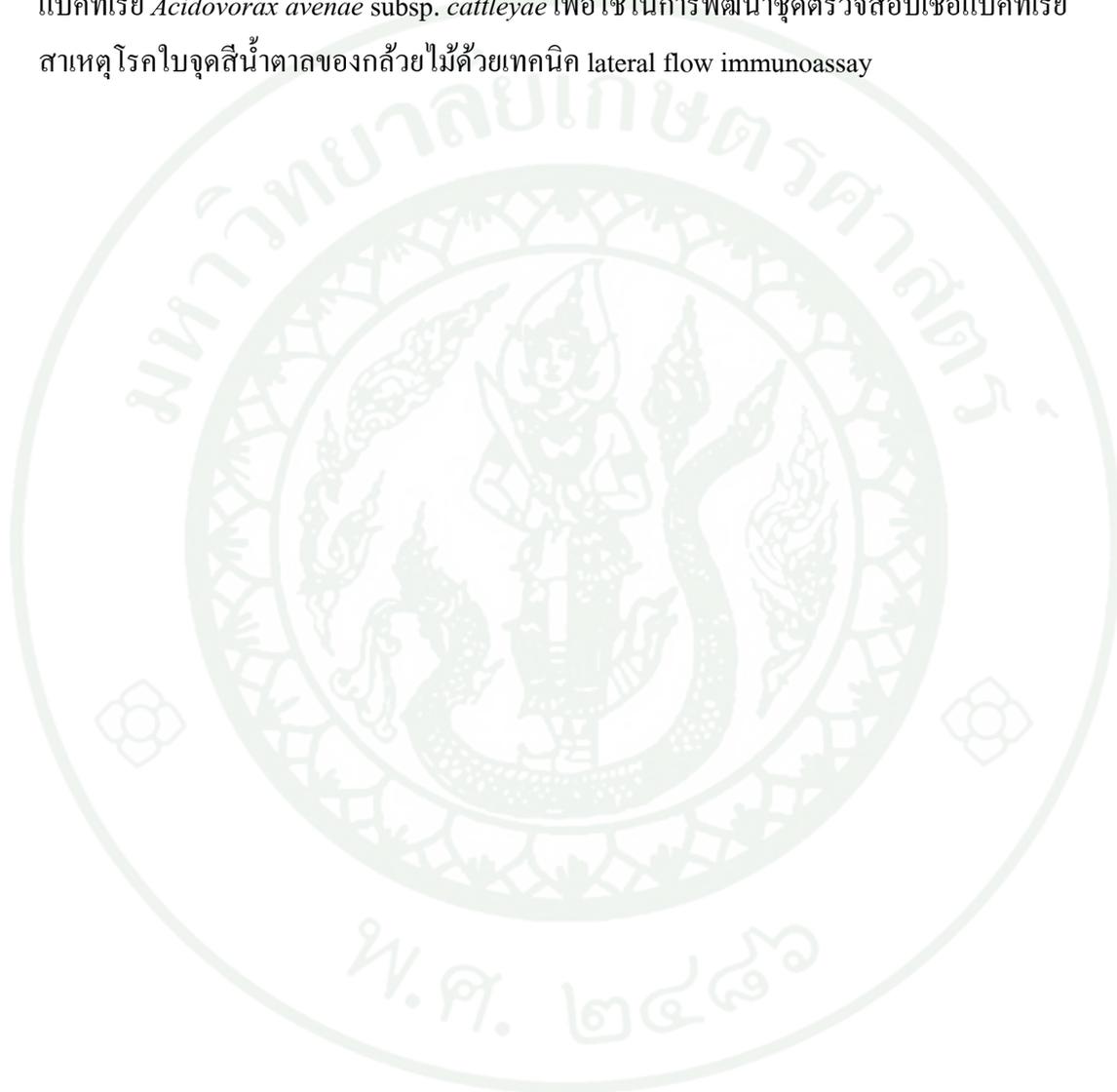
เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (ชื่อเดิม *Pseudomonas cattleyae*) เป็นสาเหตุโรคโน้บจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ พบการระบาดในกล้วยไม้สกุลผสมสกุลแวนดา (Vanda Hybrid) แคทลียา (Cattleya) ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) ซิมบิเดียม (Cymbidium) เดนโดรเบียม (Dendrobium) และออนซิเดียม (Oncidium) (Miller, 1990) โดยพบทำความเสียหายกับกล้วยไม้สกุลแวนดามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ระยะกล้า (seedling) จนถึงระยะออกดอก (เหลือองพ้งงาน, 2552) ในท้องที่ จ.ราชบุรี จ.กาญจนบุรี และจ.นครปฐม ในปัจจุบันนี้พบการระบาดของโรคโน้บจุดสีน้ำตาล ในเกือบทุกแหล่งที่มีการปลูกกล้วยไม้ สกุลแวนดา ฟาแลนนอปซิส แคทลียา ออนซิเดียม และมีอคคาร่า ซึ่งพบการระบาดของโรคโน้บจุดสีน้ำตาลมากในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำได้ดี

เทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโน้บจุดสีน้ำตาลในห้อยปฏิบัติการมีหลายเทคนิค เช่น การทดสอบทางฟิสิกส์และชีวเคมี การจำแนกเชื้อด้วยระบบ Biolog™ การใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเทคนิคดังกล่าว มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับที่แตกต่างกันและมีข้อจำกัดหลายประการ ดังนี้ ต้องมีการแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหาร ทำให้ใช้ระยะเวลาในการตรวจผลนาน ต้องมีห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการตรวจเชื้อ และมีค่าใช้จ่าย 200-2,000 บาท ในการตรวจเชื้อต่อตัวอย่าง

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโน้บจุดสีน้ำตาลที่แม่นยำและรวดเร็ว มาตรวจเชื้อในภาคสนามโดยสุรภีและคณะ (2551) ได้พัฒนาเทคนิค lateral flow immunoassay (อิมมูโนสตริป) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของ

ปทุมมาและมันฝรั่ง พบว่าตรวจสอบโรคโดยใช้เวลาเพียง 5 นาที นอกจากนี้เทคนิคนี้มีความเหมาะสมกับงานตรวจเชื้อในภาคสนาม ที่ให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay



วัตถุประสงค์

1. ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*
2. พัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค lateral flow immunoassay



การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของกล้วยไม้

กล้วยไม้ (Orchid) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceae มีหลายร้อยสกุล ประเทศไทยมีกล้วยไม้จำนวนกว่า 150 สกุล จำนวน 1,100 ชนิด กล้วยไม้แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตได้ 2 ประเภท คือ ประเภทที่เจริญเติบโตไปทางยอด ได้แก่ สกุลแวนดา อะแรนด้า และมีอคคาร่า อีกประเภทหนึ่งเจริญแบบแตกกอหรือเหง้า ได้แก่ สกุลหวาย และออนซิเดียม โดยปกติกล้วยไม้เป็นพืชที่ต้องการสภาพแวดล้อมที่ดีในการเจริญเติบโต เช่น น้ำสะอาด ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.2-6.2 แสงแดด 40-60 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 50-60 เปอร์เซ็นต์ กล้วยไม้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีค่อนข้างสูง จากรายงานสถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2556 โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2555) การส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของไทยในปี 2551-2555 พบว่าปริมาณและมูลค่าการส่งออกลดลงเฉลี่ยร้อยละ 5.02 และ 3.84 ต่อปี โดยในปี 2555 ปริมาณการส่งออก 19,424 ตัน และมูลค่า 2,046 ล้านบาท เนื่องจากผลผลิตในประเทศลดลงจากภาวะน้ำท่วมจึงมีปริมาณเหลือส่งออกน้อยลง ตลาดส่งออกกล้วยไม้ที่สำคัญของไทย คือ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป จีน เวียดนาม ลาว และกัมพูชา ซึ่งไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากเป็นอันดับ 1 ของโลก พันธุ์กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเลี้ยงเป็นการค้า คือ สกุลหวาย แคทลียา รองเท้านารี แอสโคเซนดา ฟาแลนนอปซิส ออนซิเดียม และแวนดา พื้นที่ปลูกกล้วยไม้ลดลงจากเหตุการณ์อุทกภัยในช่วงปลายปี 2554 เหลือ 18,550 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี นครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก และต้นพันธุ์กล้วยไม้ส่งออกเกษตรกรรมยังมีปัญหาในการป้องกันกำจัดโรคและศัตรูของกล้วยไม้ ซึ่งเกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดจึงทำให้เชื้อโรคเหล่านี้ติดไปกับผลผลิตที่ส่งออกไปยังต่างประเทศด้วยอันจะเกิดผลกระทบทางการค้ากับประเทศคู่ค้าตามมา โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่มีผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ การแพร่ระบาดของโรคโดยมีความรุนแรงแตกต่างกันไป ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าปีละหลายร้อยล้านบาท ฉะนั้นการป้องกันกำจัดโรคพืช การเตือนการระบาดของโรค พร้อมทั้งแนะนำวิธีการป้องกันกำจัด จึงเป็นสิ่งจำเป็น เมื่อมีปัญหาก็ได้ป้องกันแก้ไขได้ทันที (นิยมรัฐ, 2543)

โรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย

โรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดยในปี ค.ศ. 1951 มีรายงานพบโรคของกล้วยไม้ในโรงเรือน รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา ซึ่งพบโรคที่เกิดจากแบคทีเรียคือ เน่าและ (soft rot) ในกล้วยไม้สกุลแคทลียาซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ลักษณะอาการของโรคจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง โดยใบกล้วยไม้จะแสดงอาการแผลจุดน้ำน้ำ แผลจะขยายขนาดอย่างรวดเร็วและแสดงอาการเน่าทั้งใบ การควบคุมโรคสามารถทำได้ยาก วิธีการป้องกันที่ดีที่สุดคือการทำลายเศษซากพืชที่เป็นโรคด้วยวิธีการเผาทำลาย ต่อมาพบโรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Erwinia cypripedii* ในกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียม ลักษณะอาการเริ่มแรกจะพบแผลจุดน้ำน้ำมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ เมื่อแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้น จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีลักษณะแข็ง แผลจะลุกลามไปทั่วทั้งต้น ที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส และความชื้นสูงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์จะเป็นสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และนอกจากนี้ยังพบโรค Brown spot ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Phytomonas cattleyae* ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส และแคทลียาด้วย (Ark, 1951) มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* อีกชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรค soft rot ทำให้กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสและเดนโดรเบียมตายเป็นจำนวนมากในประเทศมาเลเซีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส ซึ่งพบการเกิดโรคได้ตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะต้นโตเต็มที่ (Abdullah and Kadzimin, 1993) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ได้มีรายงานระบาดในกล้วยไม้ของรัฐบาลมาตั้งแต่ปี 2003 โดยคิดเป็นมูลค่าความเสียหายกว่า 720.96 ล้านบาท ลักษณะอาการที่พบเริ่มจากแผลจุดน้ำน้ำเล็กๆ บนใบ แผลจะขยายใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว และแสดงอาการเน่าทั้งใบ พบระบาดในกล้วยไม้สกุลเดนโดรเบียม ออนซิเดียม มิลโทเนีย และกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมอื่นๆ (Keith et al., 2005)

สำหรับการศึกษาโรคของกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรียในประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบโรคเน่าของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas gladioli* ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1983 พบการระบาดในกล้วยไม้สกุลเดนโดรเบียม บริเวณเขตหนองแขม กรุงเทพมหานคร ลักษณะอาการที่พบคือ ต้นอ่อนและใบมีลักษณะอาการน้ำน้ำ แผลเน่าบนใบ มีการลุกลามอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลเข้มทั้งใบและร่วงหลุดจากต้น ในขณะที่ต้นอ่อนจะแสดงอาการเน่าทั้งต้นและตายในที่สุด พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน (Chuenchitt et al., 1983) นอกจากนี้มีการพบโรคเน่าและ (soft rot) ที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ

Acidovorax avenae subsp. *cattleyae* (นิยมรัฐ, 2544) ซึ่งต่อมามีการศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุลแวนดา ซึ่งการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าโรคใบจุดดังกล่าวเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* นอกจากนี้ยังพบโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* (ปิยรัตน์ และคณะ, 2552)

โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้

มีรายงานการพบโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ครั้งแรก ที่ประเทศอิตาลีโดย Pavarino เมื่อปี 1911 ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1946 Ask และ Thomas ได้รายงานการพบโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ในสหรัฐอเมริกา โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ พบระบาดมากในกล้วยไม้สกุลแคทลียา ฟาแลนนอปซิส แวนดา ซิมบิเดียม เคนโครเบียม และออนซิเดียม (Willems *et al.*, 1992) โดยเฉพาะในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* และพบโรคใบจุดสีน้ำตาล ของประเทศต่างๆ เพิ่มขึ้น ได้แก่ ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน อิตาลี รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา โปรตุเกส เนเธอร์แลนด์ (Huang, 2008) และรัฐ New South Wales ประเทศออสเตรเลีย (Stovold *et al.*, 2001) ซึ่งลักษณะอาการที่พบเริ่มแรกแผลจะมีอาการน้ำน้ำสีเหลืองอ่อน มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แล้วแผลจะมีการพัฒนาขยายขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลงไปจากผิวใบ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน พบได้ทั้งใบแก่และใบอ่อน ระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน หรือพบลักษณะอาการอีกแบบคือ แผลสีขาว เป็นวงสีน้ำตาลหรือเทา ที่ขอบแผลชั้นกลาง จะเป็นสีดำขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลนอกสุดมีสีเหลืองล้อมรอบ (Divinagracia *et al.*, 1984) เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สามารถเข้าสู่ใบกล้วยไม้ได้ทางบาดแผล (wound) ช่องเปิดธรรมชาติของใบ (hydrathods) เชื้อสามารถแพร่กระจายโดยกระเด็นไปกับน้ำที่ไช้รด โดยเฉพาะวิธีการให้น้ำแบบเหนือทรงพุ่ม (overhead sprinkler) จะส่งผลให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปได้ดี (Miller, 1990) โรคจะระบาดรุนแรงในช่วงอุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส และที่ความชื้นค่อนข้างสูง (Huang, 2008)

ในประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกประมาณปี 2544 เป็นโรคที่พบในกล้วยไม้สกุลแวนดาและฟาแลนนอปซิส แต่เรียกโรคนี้ว่าโรคเน่า (นิยมรัฐ, 2544) และเกษตรกรเรียกโรคใบจุดตากบ หรือโรคตากบ โรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้พบระบาดในกล้วยไม้สกุลแวนดา ลูกผสมแวนดา ช้าง และแอสโคเซนดา มีลักษณะอาการแผลจุด เป็นแอ่งตรงกลาง ขอบแผลเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม (ปิยรัตน์ และคณะ, 2552)

เชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้

เชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้เกิดจาก เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino 1911) (Willems *et al.*, 1992)

Synonymes :	<i>Pseudomonas cattleyae</i>
Phylum :	Proteobacteria
Class :	Beta Proteobacteria
Order :	Burkholderiales
Family :	Comamonadaceae
Genus :	<i>Acidovorax</i> (ชื่อเดิม <i>Pseudomonas</i>)
Species :	<i>avenae</i>
Subspecies :	<i>cattleyae</i>

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

พบเชื้อนี้ครั้งแรกในประเทศอิตาลี โดย Pavarino ปี 1911 จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอโรบิก (Hu *et al.*, 2001) มีรูปร่างเป็นท่อนตรง หรือโค้งเล็กน้อย มีขนาด 0.2-0.8 ไมครอน x 1.0-5.0 ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้ มีหาง (flagella) แบบ polar flagellum (1-2 เส้น) ติดสีแกรมลบ ให้ผลการทดสอบ oxidase เป็นบวก ไม่สร้างเม็ดสี (pigment) บนอาหาร nutrient agar สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ไม่สร้าง fluoresce บนอาหาร King medium B เกิดปฏิกิริยา Hypersensitive reaction (HR) บนยาสูบ (Schaad *et al.*, 2001) ไม่ย่อย gelatin ใช้น้ำตาล D-glucose, D-xylose, D-mannose, D-fucose, D-mannitol or D-arabitol, D-sorbitol, และ Sucrose สามารถ reduce nitrate ได้ (Schaad *et al.*, 2008) นำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบการเกิดโรคในกล้วยไม้ ปรากฏว่าใบกล้วยไม้แสดงอาการโรคภายใน 5-7 วัน (Trullillo and Hernandez, 1999) จากการศึกษาทางนิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในดินได้ระยะสั้น เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในเศษซากใบกล้วยไม้ที่เกิดโรคได้ช่วงระยะหนึ่ง เมื่อเศษซากพืชดังกล่าวย่อยสลายไป เชื้อแบคทีเรียจะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพ (นิพนธ์, 2533)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้

Song และ Kim (2002) ได้ศึกษาการใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจและจำแนกเชื้อ *Acidovorax avenae* สาเหตุโรคพืชในระดับ species, subspecies และ strain โดยใช้เทคนิค Bio-PCR ซึ่งสามารถจัดจำแนกเชื้อ *Acidovorax* ได้ในระดับ species

ต่อมา Schaad *et al.* (2008) ได้เสนอการจัดกลุ่มเชื้อ *Acidovorax* species ต่างๆ ใหม่ โดยใช้การเทคนิคการทดสอบการเกิดโรคร่วมกับเทคนิค AFLP ลักษณะทาง Phenotype และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ผลการทดสอบเชื้อ *Acidovorax* ทั้งหมด สามารถจัดแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 4 กลุ่ม คือกลุ่ม A, B, C และ D โดยเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* จัดอยู่ในกลุ่ม D ซึ่งเป็นสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้

ปี 2009 มีรายงานการผลิตตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* โดยวิธี DAS-ELISA ซึ่งใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* มีความไวในการตรวจเชื้อได้ถึง 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร สำหรับการตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืชโดยตรงต้องเจือจางน้ำคั้นพืชในอัตราส่วน 1:20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วย extraction buffer แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามของ antibody นี้กับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* และ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Anonymous, 2009)

ปี 2552 ปีรัตน์และคณะ รายงานการศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุลแวนดา ซึ่งได้ทำการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ คือ การทดสอบการเกิดโรคนกล้วยไม้สกุลแวนดา พบว่าหลังการปลูกเชื้อ 5-7 วัน กล้วยไม้เริ่มแสดงอาการแผลจุดเหลือง ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ บนอาหารทดสอบ Biolog™ GN2 Microplate ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลแวนดา ได้เป็น *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

ข้อจำกัดของเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

จากเทคนิคต่างๆ ที่ใช้เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิคชีวเคมี ELISA PCR และ Biolog™ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ

แบบที่เรียกที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้ง 5 วิธี มีข้อจำกัดคือ การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวเคมี เป็นวิธีการที่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกเชื้อจากตัวอย่างพืชในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ก่อน แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี นอกจากนี้ยังมีข้อเสียคือต้องอาศัยการทดสอบจำนวนมาก ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน และอาจได้ผลแตกต่างกันไปตามห้องปฏิบัติการเนื่องจากมาตรฐานในการปฏิบัติทดสอบแตกต่างกัน (วิชัย, 2549) สำหรับเทคนิค ELISA ซึ่งเป็นวิธีการทางเซรุ่มวิทยา (serology) ได้มีการประยุกต์ใช้ในงานด้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมาก มีความจำเพาะเจาะจงและได้มีการปรับปรุงเพื่อเพิ่มความไวให้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจแต่ละครั้งอย่างน้อย 5-6 ชั่วโมง ส่วนเทคนิค PCR มีข้อจำกัดในเรื่องการปฏิบัติงานที่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจนาน ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค BiologTM ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวบรวมการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีหลายชนิดได้พร้อมกันภายในครั้งเดียว โดยนำเอาซับเตรทเตรียมเป็นอาหารสำเร็จรูปเคลือบลงในจานหลุม จำนวน 96 ชนิด ร่วมกับการใช้คุณสมบัติการรีดิวส์ tetrazolium ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นสีม่วง และนำรูปแบบของคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ปรากฏเปรียบเทียบกับรูปแบบคุณสมบัติทางชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรียต้นแบบชนิดต่างๆ (Type strain) ในฐานะข้อมูล การตรวจเชื้อด้วย BiologTM เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบผลได้อย่างง่าย รวดเร็วและให้ผลค่อนข้างแม่นยำ แต่เทคนิค BiologTM ยังมีข้อเสียคือในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีตาม BiologTM นั้นต้องมีการทดสอบพื้นฐานเพื่อให้สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้อย่างถูกต้องมากที่สุด ใช้ระยะเวลาในการตรวจมากกว่า 24 ชั่วโมง และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ขั้นต้น 1,500-2,000 บาท/ตัวอย่าง สำหรับปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบ (detection kits) โดยนำวิธีการทางอิมมูโนวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (immunochematography) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ซึ่งนักวิชาการได้พัฒนาขึ้นใช้เอง ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ทำให้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียพืชได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และสะดวกในการใช้งาน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืช (สุรภี และคณะ, 2551)

การพัฒนาเทคนิค lateral flow immunoassay (อิมมูโนสตรีป)

เทคนิค lateral flow immunoassay มีพื้นฐานมาจากเทคนิค latex agglutination test เริ่มคิดค้นพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Singer and Plotz (1956) เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว สะดวก ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจเชื้อไวรัส ต่อมา Yallow and Berson (1959) ได้พัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี หรือ lateral flow test ขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิค คือ latex agglutination tests, sandwich assay

และโครมาโทกราฟี เพื่อใช้ตรวจหา anti-insulin antibodies จากแนวคิดที่ว่าแอนติบอดี 2 ชนิด มีความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ที่แตกต่างกันบนแอนติเจน ดังนั้นหากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง มาติดกับ solid support แล้ว เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับโดย แอนติบอดีที่ติดกับ solid support แอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีนี้จะถูกตรวจ โดยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่ง ติดฉลากกับเม็ด bead ที่มีขนาดต่างกันเช่น latex bead, erythrocytes, colloidal dyes หรือ metal bead ทำให้สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาได้จากสี bead ที่เกิดขึ้น (Garland *et al*, 1986; Borque *et al*, 1995)

หลักการของเทคนิค lateral flow immunoassay คือ การนำแอนติบอดีมาติดฉลากกับอนุภาคสารที่มีสี เมื่อให้แอนติบอดีที่ติดฉลากทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะแล้วจะเกิดเป็น antigen-antibody complex โดย complex ดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปบน solid support ด้วยแรง capillary flow จนไปถึงตำแหน่งบน solid support ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีอีกชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจน บริเวณนี้เรียกว่า test line ซึ่ง complex ข้างต้นจะถูกจับอยู่ที่ test line เกิดให้เห็นเป็นแถบสี การเกิดแถบสีจะแปรผันตามปริมาณแอนติเจนที่พบในตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก complex หรือแอนติบอดีที่เหลือจากการจับกันตรงตำแหน่ง test line ที่จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนไปถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (secondary antibody) เรียกบริเวณนี้ว่า control line ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีตัวแรกและแอนติบอดีที่ control line นี้จะทำให้เกิดแถบสีอีกแถบหนึ่ง (ศรีธรรมชา, 2551)

เทคนิค lateral flow immunoassay มีหลักการเกิดปฏิกิริยา 2 แบบ ได้แก่ (1) แบบ Double antibody sandwich assay (DAS) นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่และมี antigenic sites หลายชนิด และ (2) แบบ competitive inhibition นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและมี antigenic sites เพียงหนึ่งชนิด หลักการของวิธีนี้คล้ายกับแบบ DAS แต่ที่แตกต่างคือ ตำแหน่งของ test line จะถูกเคลือบด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่มากพอ แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนจนหมด และไม่เหลือพอที่จะจับกับแอนติเจนที่ test line เพราะฉะนั้นตำแหน่ง test line จะไม่เกิดแถบสีให้เห็น ผลที่อ่านได้จะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่าง (Wong and Tse, 2009)

โครงสร้างของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป มีส่วนประกอบสำคัญได้แก่ backing pad ทำหน้าที่รองรับ (support) องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ sample pad, releasing pad, nitrocellulose และ

absorption pad ให้เป็นโครงสร้างของชุดตรวจสอบที่สมบูรณ์ backing pad ที่ใช้ส่วนใหญ่ทำมาจาก โพลีเอสเตอร์ (polyester) sample pad เป็นส่วนที่รับตัวอย่างโดยตรง และควบคุมอัตราการไหลของ ตัวอย่าง nitrocellulose (NCM) ที่ใช้ในเทคนิค lateral flow immunoassay จะถูกออกแบบมาให้ยึด เกาะกับโปรตีน (แอนติบอดีและแอนติเจน) ได้ดี conjugate pad เป็นส่วนที่แอนติบอดีติดสลาด้วย อนุภาคทอง (detector) เคลือบไว้อยู่ ทำหน้าที่เสมือนตัวส่ง detector ไปยัง test line และ control line และ absorption pad (AP) มีหน้าที่ช่วยเพิ่มแรงดึงของแรง capillary เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ (ศรีหรรษา, 2551)

เมื่อดีสชนิดต่างๆ ซึ่งจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) การทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและ แอนติบอดี ที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ latex bead และ colloidal gold นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นเช่น erythrocytes, colloidal dye หรือ metal solution สารแต่ละชนิดจะมีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเตรียมก่อนที่จะใช้ ต้องเตรียมให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม เพราะทั้งขนาดและ รูปร่างมีผลต่อความไวและความเฉพาะเจาะจง (Anonymous, 2008)

การพัฒนาเทคนิค lateral flow immunoassay กับการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

Nader (2005) ผลิต monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) สาเหตุโรค bacterial ring rot of potato ซึ่ง เป็นศัตรูพืชกักกันของสหภาพยุโรป โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่น นำไปพัฒนาชุดตรวจเชื้อโดยใช้เทคนิค lateral flow device (LFD) พบว่าชุดตรวจเชื้อดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจง รวดเร็ว และมีค่าความไวมากกว่า 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ในการตรวจ เชื้อ *Cms* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี immunofluorescence antibody staining (IFAS) ที่มีค่าความไว เท่ากับ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และ real-time PCR

Opina and Miller (2005) นำวิธีการทางด้านเซรัมวิทยา ไปใช้ในการตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและมะเขือม่วงในประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งเชื้อ *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายพืชทั้ง 2 ชนิด เป็นเชื้อสายพันธุ์ Race 1 ในช่วงฤดูร้อนปี 2003 ได้เก็บ ตัวอย่างมะเขือม่วงจำนวน 505 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 48 แปลง นำมาทำการแยกเชื้อบนอาหาร และ ตรวจเชื้อด้วยวิธี ELISA และ Rs Immunostrip (Agdia[®], Inc., USA) ซึ่งพบว่าผลระหว่างการเลี้ยง

เชื้อบนอาหาร และการทำ ELISA ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน 69.5% ในขณะที่ การใช้ชุดตรวจ Rs Immunostrip ให้ผลเหมือนกัน 91%

สุรภี และคณะ (2551) รายงานการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปโดยวิธี Gold labeled IgG flow test (GLIFT) เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์แฝงอยู่ในหัวพันธุ์ (Latent infection) ทำให้ส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไม่ได้ เพราะเป็นศัตรูที่สำคัญทางกักกันพืชของประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป กรมวิชาการเกษตรจึงต้องตรวจสอบและออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชกำกับไปด้วยทุกครั้ง ดังนั้นการ พัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป ทำให้การตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ทำได้ สะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ และได้พัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งด้วย เพื่อการคัดเลือกหัวพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ ในการนำไปใช้เป็นปลูกเป็น ต้นพันธุ์ต่อไป

อรประไพ และคณะ (2551) รายงานการพัฒนาปรับใช้เทคนิค Gold labeled IgG flow test เพื่อผลิตชุดตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่า (bacterial fruit blotch) ของพืชตระกูลแตง และเป็นเชื้อสำคัญทางกักกันพืช ของบางประเทศ เช่น ประเทศ ญี่ปุ่น ดังนั้นการส่งออกเมล็ดพันธุ์ต้องผ่านการตรวจสอบ โรค bacterial fruit blotch ที่เกิดจากเชื้อ แบคทีเรียชนิดนี้ เนื่องจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สามารถติดไปกับเมล็ดพืชวงศ์แตง ได้ ดังนั้นการพัฒนานำเทคนิค Gold labeled IgG flow test มาใช้ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* และมีความไวในการตรวจพบเชื้อเท่ากับ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อ มิลลิลิตร ทำให้สามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็วและทำได้ง่าย นำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามโรคใน แปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อหลีกเลี่ยงเชื้อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดสีน้ำตาลและการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลต่างๆ ได้แก่ แวนดา มอคคาร่า ฟาแลนนอปซิส และแคทลียา ที่แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลบนใบ จากแหล่งปลูกกล้วยไม้ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร นนทบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี และตัวอย่างกล้วยไม้ที่ส่งมาตรวจที่คลินิกพืช ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในปี 2552-2553

แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างกล้วยไม้ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ โดยนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่เก็บมาล้างน้ำก๊อกให้สะอาด ตัดส่วนของใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการแผลจุด ขนาดประมาณ 0.5x0.5 มิลลิเมตร นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง นำไปแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปบดด้วยโกร่งที่อบฆ่าเชื้อให้ละเอียด และเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 3 มิลลิตร นำไป streak บนอาหาร Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส 2-3 วัน จากนั้นตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญ คัดเลือกโคโลนีใส ขนาดเล็ก กลมมนูน ขอบเรียบ นำไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบและจำแนกชนิดต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบแกรมเพื่อศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบนอาหารชนิดต่างๆ ดังนี้ King's medium B, Tween-80 agar, Growth at 40 องศาเซลเซียส, Levan production, Oxidase activity, Catalase, Arginine dihydrolase, Nitrate reduction, Urease, Hydrolysis of starch ทดสอบคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ คือ L-Arabinose, D-galactose, Ribose, D-Xylose, D-glucose, D-Mannose, D-Fucose, Mannitol, Sorbitol, L-Threonine, Saccharose, L-Arabitol, Dextrose, Lactose, Maltose, Adonitol, L-leucine, Propionic acid, Dextrin, D-Tryptophan (Schaad *et al.*, 2001)

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test)

พืชทดสอบ

พืชทดสอบเป็นกล้วยไม้จำนวน 2 สกุล ได้แก่ แวนดา ฟาแลนนอปซิส พืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงโม (Watermelon) แตงกวา (Cucumber) ฟักทอง (pumpkin) ชูกินี (Zucchini) น้ำเต้า (gourd) และข้าว

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ จนเป็นสารละลาย นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 (1.6×10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร)

การปลูกเชื้อลงพืชทดสอบในเรือนทดลอง

การทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค ทำการปลูกเชื้อลงพืชโดยใช้เข็มทำให้เกิดแผล (pricking method) ที่ผิวใบพืช แล้วหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียบนแผล ในชุดควบคุม (Control) จะหยดน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ หลังการปลูกเชื้อแล้วจะใช้ถุงพลาสติกพ่นน้ำละอองฝอย ไปคลุมต้นพืชทุกต้นเพื่อเพิ่มความชื้น โดยใช้ถุงพลาสติก 1 ถุงต่อ 1 ต้น คลุมไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกดังกล่าวออก บันทึกผลการเกิดโรค 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ

4. การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้ที่เป็นโรคบนอาหาร PSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยใส่ในหลอด microtube ที่มีน้ำ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เชื้อกระจาย ในน้ำใช้ 3 ไมโครลิตรของสารละลายเชื้อ ในการทำปฏิกิริยาเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ของคู่ไพรเมอร์ และ Taq DNA polymerase 0.1 หน่วย ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยใช้คู่ไพรเมอร์ในการตรวจยีน 16S-

23S rDNA ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ SEQ ID NO: 1 (5'-GTCGGTGCTAACGACATGG-3') และ SEQ ID NO: 2 (5'AGACATCTCCG CTTTCTTTCAA -3') (Song and Kim, 2002) ชนิดละ 4 พิโคโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 30 รอบ

ตรวจสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide solution (EtBr) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

5. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วด้วยระบบ Biolog™ โดยการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารตั้งต้น จำนวน 95 ชนิด (Biolog GN microplate)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงบนอาหาร NA ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ย้อมสีแกรม (Gram stain) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบปฏิกิริยา oxidase ด้วยแผ่นตรวจสอบสำเร็จรูป Bactident® Oxidase (Merck, Germany) และตรวจสอบการเจริญบนอาหาร Triple sugar iron ที่เตรียมเป็นอาหารเอียงในหลอดทดลอง เพื่อตรวจสอบการใช้น้ำตาลสามชนิด ได้แก่ กลูโคส แลคโตส และซูโครส การสร้างแก๊สจากการใช้น้ำตาล และการสร้าง Hydrogen sulfide จากการใช้น้ำ ferrous sulfate โดยทำการแทงเชื้อลงในหลอดอาหารประมาณสามส่วนสี่ของความลึกของอาหาร และเขียนชื่อบนผิว หน้าอาหารเอียง ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะและสีของอาหารในส่วนอาหารเอียง และ ส่วนอาหารที่ต่ำกว่าส่วนเอียง ในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วนำมาทดสอบตามคำแนะนำของบริษัท ดังรายละเอียดโดยย่อ นำเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร BUG™ Agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยเชื้อในสารละลาย inoculation fluid (0.4 เปอร์เซ็นต์ NaCl, 0.03 เปอร์เซ็นต์ Pluronic F-68, 0.02 เปอร์เซ็นต์ gellan gum) ที่มี 5 โมลาร์ Sodium thioglycolate นำไปวัดการส่องผ่าน ของแสง (Transmittance; T) ด้วยเครื่อง Biolog™ turbidimeter ให้ได้ 53 เปอร์เซ็นต์ T (±2) (enteric bacteria) นำสารแขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลุม Biolog™ GN micro plate ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง วัดผลทุกๆ 1 ชั่วโมง โดยนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง Microlog™ System ที่ความยาวคลื่นแสง 590 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลที่ได้กับฐานข้อมูล (วิชัย, 2549)

6. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมแอนติเจนของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในรูปของ membrane protein complex (MPC) คัดแปลงจากวิธีของ Yakrus และ Schaad (1979) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในอาหาร 523 medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น inoculum นำ inoculum เชื้อ ไปทำ Gram's stain เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ ปลูก inoculum บริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว 523 medium 1 ลิตร ในอัตราส่วน 1:100 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเชื้อด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ sodium chloride (NaCl) โดยปั่นตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกโดยการเติม 0.2 โมลาร์ lithium chloride (LiCl) ลงในตะกอนเซลล์ปริมาณ 200 มิลลิลิตรต่อตะกอนเชื้อ 10 กรัม ใส่ sterile glass beads (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิลิตร) วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยก glass beads ออกโดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปั่นเซลล์แขวนลอยเพื่อแยกตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียออกจาก MPC ที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งตะกอนเซลล์ นำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 40,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 70 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน MPC ที่ความเร็วรอบ 40,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 70 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย 1x PBS buffer ที่เติม 0.02 เปอร์เซ็นต์ sodium azide (NaN₃) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) และปรับความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นำกระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นเซรุ่มปกติ (normal serum; Ns) แล้วฉีดกระตุ้นด้วย MPC ผสม Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ในสัปดาห์ที่สอง ในครั้งต่อไป ผสม MPC กับ Incomplete Freund's Adjuvant แทน ด้วยวิธีการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ปริมาตร 500 ไมโครกรัมต่อครั้ง เก็บเลือดกระต่ายที่โบหุในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป โดยเจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดที่โบหุลงในบีกเกอร์ที่สะอาด นำเลือดกระต่ายที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเลือดแข็งตัว ใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อเขี่ยขอบบีกเกอร์ให้เลือดหลุดจากขอบบีกเกอร์ เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ควบส่วนน้ำใส่เข้าไปปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดที่ความเร็วรอบ 10000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเซรุ่มที่ได้แบ่งเก็บใส่ขวด เดิม NaN₃ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รัชนี, 2549) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6.1 การตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA คัดแปลงวิธีของ รัชนี (2549) โดยนำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (1.6×10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS pH 7.4 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วย PBST (Phosphate buffer+0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม PAb ที่ได้ทำการเจือจางแบบ 2 เท่า เป็นลำดับ (two fold serial dilution) ใน 1x PBS เริ่มจากความเข้มข้น 1:1000 จนถึง 1:128000 โดยมีตัวควบคุม (negative control) คือ normal serum เจือจาง 1:1000 ใน 1x PBS นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphates ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1 : 1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเจือจางสาร PNPP ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiscan EX, Lab system, Finland) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

6.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะ โคลิโคนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางด้วย 1x PBS ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 10^8 หน่วยโคลิโคนีต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

6.3 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 หน่วยโคลิโคนีต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางเซลล์แบคทีเรียใน 1x PBS ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคลิโคนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับสำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับ PAb ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีข้อ 6.3.1 โดยมีตัวควบคุม (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

7. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay (อิมมูโนสตริป)

การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป คัดแปลงตามวิธีการที่สุรภีและคณะ (2551) ได้พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนดังนี้

7.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำ PAb-Aact 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ กวนด้วย magnetic stirrer ชั่วๆ เติม saturated ammonium sulfate 10 มิลลิลิตร ที่ละลายขณะกวนด้วย magnetic stirrer บ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้ว dialyze ใน 0.5x PBS นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity column chromatography โดยนำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialyze ผ่านลงในคอลัมน์ โดยใช้ recProtein A affinity column chromatography (Zymed-Invitrogen, USA) จากนั้นล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ และชะ (elute) IgG ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ Glycine-HCl pH 2.7 เก็บสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดทดลองที่มี 2 โมลาร์ Tris, pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ของแอนติบอดีให้เป็นกลาง คำนวณความเข้มข้นของ IgG ตามสูตร

$$\text{O.D.}_{280/1.4} = \text{มิลลิกรัม IgG/มิลลิลิตร}$$

(ค่า Absorbance coefficient ของ IgG ของกระต่ายเท่ากับ 1.4)

7.1.1 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยาเชื้อ

A. avenae subsp. *cattleyae*

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีข้อ 6.3.1 โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์เข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ PBS เป็น negative control

7.1.2 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน โดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ทดสอบคุณภาพของ IgG ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* โดยวิธี DIBA โดยบดตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคใบจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ให้ละเอียดในถุงพลาสติกด้วย Sample buffer (extraction buffer: PBST+1% PVP) ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติเช่นเดียวกัน และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำน้ำคั้นพืชและเซลล์แขวนลอยเชื้อมาหยดลงบนแผ่น NCM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (2% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาแล้ว ย้ายแผ่น NCM ไปแช่สารละลาย IgG ที่เจือจาง 1:500 ใน TBS เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น NCM มาแช่ใน GAR เจือจาง 1:5,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย BCIP/NP หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

7.1.3 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้อนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส

7.1.4 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้อนุภาคทองขนาด 40 nm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin (BSA) กวนต่ออีก 45 นาที นำไป

หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางอนุภาคทองใน gold diluted buffer แบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 (0.3 เท่า) และ 1:4 (0.6 เท่า) เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส นำไประบายลงบนแผ่น Conjugate release pad (CRP) ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ เปรียบเทียบความเข้มข้นเส้น control line

7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

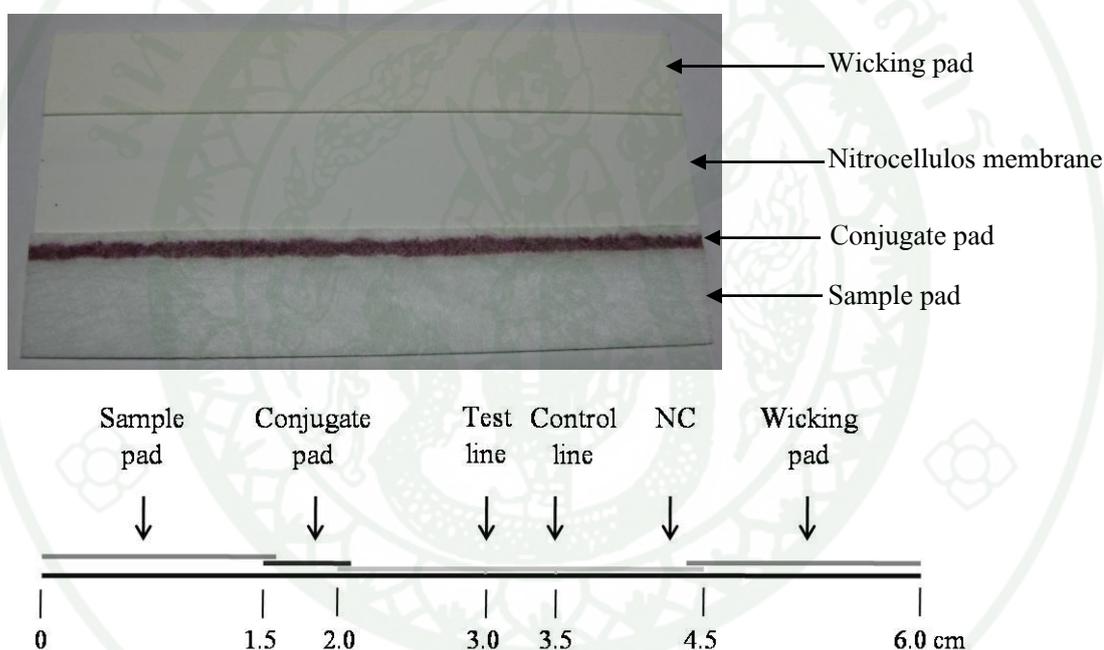
นำแผ่น Conjugate release pad ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ Backing pad ที่เลือกใช้) ใช้ฟู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร ทิศเป็นอัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอดำทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง และปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อแผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกการรองรับ (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น



ภาพที่ 1 แผนผังการประกอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

8. การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบชุดตรวจอิมมูโนสตริป

ทดสอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปกับบัพเฟอร์ที่แตกต่างกัน 10 ชนิด โดยבודตัวอย่างพืชทดสอบคือใบกล้วยไม้ปกติ และ ใบกล้วยไม้ที่ติดเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* อัตราส่วน 1 กรัม

ต่อบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ 10 ชนิด คือ 1x TBS pH 7.4, 1x TBST pH 7.4, 1x PBS pH 7.4, 1x PBST pH 7.4, 10 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 7.4, 10 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer + 0.05% Tween 20 pH 7.4, DOA Extraction buffer pH 7.5, DOA Extraction buffer2 pH 8.6, DOA Extraction buffer pH 5.6 (สุรกี และคณะ, 2551) และ BIOREBA general extraction buffer pH 7.4
 จุ่มชุดตรวจสอบในน้ำคั้นพืช ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากน้ำคั้นในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด คัดเลือกบัฟเฟอร์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน control line และไม่ทำให้เกิด false positive บน test line

9. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป เก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาลจากแปลงปลูกกล้วยไม้ และตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาลที่ได้จากการปลูกเชื้อ ล้างทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำไหลผ่าน ตัดแบ่งตัวอย่างพืชบริเวณที่แสดงอาการออกเป็น 2 ส่วน ให้มีขนาดชิ้นละ 1 กรัม นำชิ้นพืชไปบดในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) อัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป และบดชิ้นพืชในน้ำนิ่งฆ่า อัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร สำหรับนำไปตรวจสอบปริมาณเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* บนอาหาร PSA

9.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น negative control จากนั้นหยดสารละลายเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน SAP ของชุดตรวจสอบแต่ละชุด อ่านผลเมื่อเห็นปฏิกิริยาชัดเจน เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากการหยดน้ำคั้นปกติ และเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA

ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างกล้วยไม้

เตรียมตัวอย่างกล้วยไม้ที่ได้จากการปลูกเชื้อ และตัวอย่างกล้วยไม้ที่เก็บจากแปลงตามวิธีการเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้สำหรับทดสอบชุดตรวจอิมมูโนสตริปข้างต้น โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น negative control จากนั้นหยดสารละลายเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน SAP ของชุดตรวจสอบแต่ละอัน อ่านผลเมื่อเห็นปฏิกิริยาชัดเจน เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากการหยดน้ำคั้นปกติ และเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นใบกล้วยไม้ นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

9.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae*บริสุทธิ์

ทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*บริสุทธิ์ โดยเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control หยดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนชุดตรวจสอบ ดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับการทดสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติ ให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่า เหมือนข้างต้น และเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อบริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติ นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค

เตรียมตัวอย่างพืชตามวิธีการเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้ สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปข้างต้น เจือจาง 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 และ 1:2000 ทดสอบน้ำคั้นพืชแต่ละความเจือจางกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยมีน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติ

และบัฟเฟอร์เป็น negative control แล้วตรวจผลของการเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นตัวอย่างใบกล้วยไม้ตามค่าความเจือจางข้างต้น นำไปทำปฏิกิริยากับ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

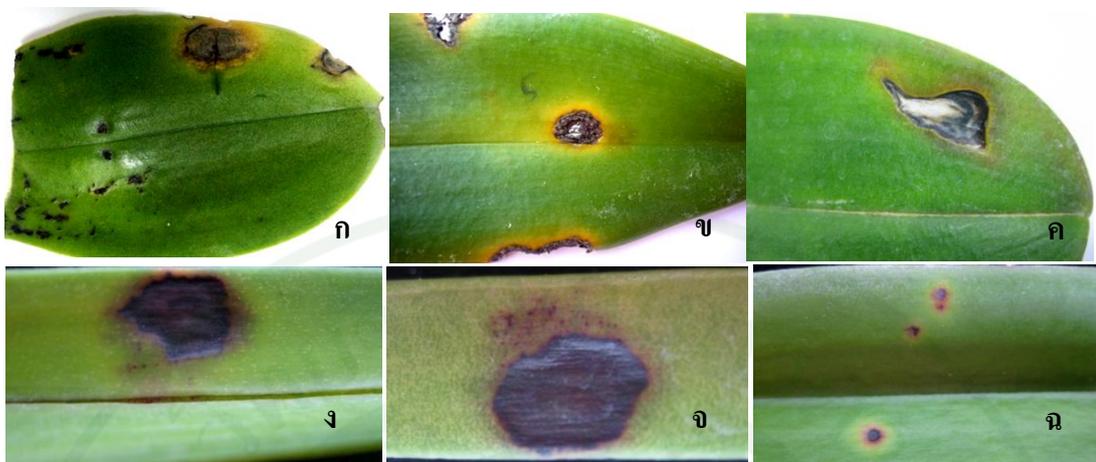


ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดสีน้ำตาลและการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนดา ฟาแลนนอปซิส และแคทลียา ที่แสดงอาการลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาล เนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลง ไปจากผิวใบ มีสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน และมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ อาจพบลักษณะอาการอีกแบบคือ แผลสีขาว เป็นวงสีน้ำตาลหรือเทา ที่ขอบแผลชั้นกลาง จะเป็นสีดำขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลนอกสุดมีสีเหลืองล้อมรอบ (ภาพที่ 2) และอาการที่มีลักษณะคล้ายหรือใกล้เคียงกับอาการใบจุดสีน้ำตาล ซึ่งได้ตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาแยกเชื้อทั้งหมดจำนวน 53 ตัวอย่าง จากการแยกเชื้อบนอาหาร Wakimoto's medium ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมมน เล็ก สีขาว ขอบเรียบ (ภาพที่ 3) ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สายพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จำนวน 10 ไอโซเลท จากกล้วยไม้สกุลแวนดา และฟาแลนนอปซิส ดังแสดงในตารางที่ 1 รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้

จากรายงานของปิยรัตน์ และคณะ (2552) ได้อธิบายถึงลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในระยะเริ่มแรกพบแผลจุดเล็กสีครีมอมเหลืองหรือแผลจุดสีเขียวอ่อน กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่ยุบตัวเป็นแอ่ง ขอบแผลสีเข้ม และวงนอกสุดล้อมรอบด้วย halo สีเหลืองหรือสีเขียวอ่อน โดยมากพบบริเวณใบยอด หรือใบอ่อน ต่อมาอาการพัฒนา มีลักษณะแผลค่อนข้างกลม กลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือเข้ม ขอบแผลเป็นวงสีน้ำตาลเข้ม กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง จากการแยกเชื้อบนอาหาร Wakimoto's medium แบคทีเรียเจริญหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 36-48 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ซึ่งพบว่าลักษณะอาการใบจุดของกล้วยไม้ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง และนำมาแยกเชื้อในการศึกษาคั้งนี้พบว่ามีลักษณะอาการ รวมถึงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหาร Wakimoto's medium ตรงกับที่เคยรายงานไว้ และสอดคล้องกับรายงานของ Miller (1990) ที่ได้รายงานการพบโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสกุลแคทลียา ซิมบิเดียม เดนโดรเบียม ออนซิเดียม และแวนดา ซึ่งลักษณะอาการเริ่มแรกจะพบจุดน้ำบนใบก่อน หลังจากนั้นแผลจะแห้งและแข็งกลายเป็นสีน้ำตาลหรือดำ



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่พบในแปลงปลูก

ก-ค ลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส

ง-ฉ ลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้สกุลแวนดา



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้บนอาหาร Wakimoto's medium

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างโรคใบจุดของกล้วยไม้

Isolate	Host	Location collected
1. Van-N 1	แวนดา	อ.สามพราน จ.นครปฐม
2. Van-N 2	แวนดา	อ.สามพราน จ.นครปฐม
3. Van-N 3	แวนดา	อ.สามพราน จ.นครปฐม
4. Van-N 4	แวนดา	อ.สามพราน จ.นครปฐม
5. Van-R 5	แวนดา	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
6. Van-R 6	แวนดา	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
7. Van-S 7	แวนดา	อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
8. Pal-R 3	ฟาแลนนอปซิส	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
9. Pal-N 1	ฟาแลนนอปซิส	อ.สามพราน จ.นครปฐม
10. Pal-N 2	ฟาแลนนอปซิส	อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม
11. <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> (Aacat)	แวนดา	กรมวิชาการเกษตร
12. <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Aac)	แคนตาลูป	กรมวิชาการเกษตร
13. <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (Burk)	แวนดา	กรมวิชาการเกษตร

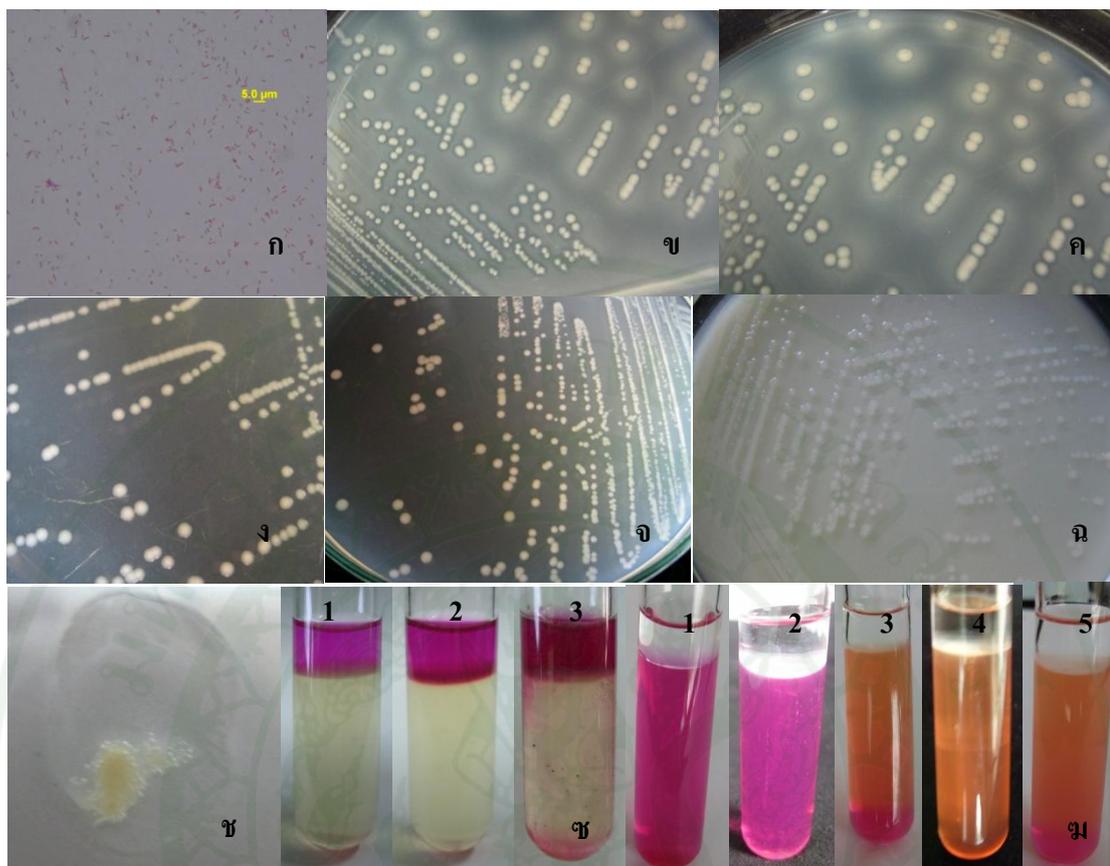
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยไม้จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง(rod shape) ไม่สร้างเม็ดสี (pigment) บน King's medium B สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อไม่สามารถย่อย gelatin ได้ สามารถย่อยแป้งได้ เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ oxidase, catalase และ urease ซึ่งสามารถเปลี่ยน urea กลายเป็นแอมโมเนียได้ สามารถเปลี่ยน NO_3 เป็น NO_2 ได้ เชื้อไม่สร้าง levan sucrose (poly-fructose) ซึ่งเป็นสาร extracellular capsular substance ของตัวเชื้อแบคทีเรีย เชื้อมี lipolytic activity เปลี่ยน Tween-80 เป็นฟลิกส์ขาวของสบู่ (soap bubble) โดยการสร้างฟลิกส์ขาวที่บวมกระจายตามรอยที่ลากเชื้อไว้ บนอาหาร

Tween-80 agar เชื้อสามารถสร้าง ammonia จาก arginine ในสภาพ anaerobe และเปลี่ยนอาหารให้เป็นต่าง (ภาพที่ 4) จากการทดสอบการใช้น้ำตาล (Utilization of carbohydrates) พบว่าเชื้อทั้งหมดสามารถใช้น้ำตาล L-Arabinose D-galactose Ribose D-glucose Mannitol Sorbitol L-Arabitol Dextrose L-leucine Propionic acid D-Tryptophan D-Fructose ไม่สามารถใช้น้ำตาล Sucrose D-Xylose D-fucose L-Threonine Adonitol Dextrin mannose และ maltose ได้ (ตารางที่ 2)

จากการศึกษาของ Schaad *et al.* (2001) พบว่าเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สายพันธุ์ FC 507 (ICPB) สาเหตุโรคในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส สามารถใช้น้ำตาล D-glucose D-mannitol D-sorbitol sodium citrate adipate D-mannose citraconate D-arabitol ethanolamine ethanol L-arabinose ducitol galactose glycerol lactose sucrose ไม่ใช้น้ำตาล D-fucose เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท ก็พบว่า มีปฏิกิริยาเหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สายพันธุ์ FC 507 (ICPB)

จากการศึกษาของ Schaad *et al.* (2001) พบว่าการที่เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สายพันธุ์ FC 507 (ICPB) ใช้ sodium citrate มีความแตกต่างกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *oryzae* การใช้น้ำตาล D-mannitol มีความแตกต่างจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สามารถใช้น้ำตาล D-arabitol ได้ ในขณะที่เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* และ *A. avenae* subsp. *oryzae* ไม่ใช้น้ำตาลชนิดนี้ แต่เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สามารถใช้น้ำตาล maltose ได้ ในขณะที่เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไม่ใช้น้ำตาลชนิดนี้ เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไม่สามารถย่อย gelatin ได้ แต่เชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* *A. avenae* subsp. *citrulli* และ *A. avenae* subsp. *oryzae* สามารถย่อย gelatin ได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่า มีปฏิกิริยาเหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สายพันธุ์ FC 507 (ICPB)



ภาพที่ 4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

ก) เซลล์เชื้อแบคทีเรียที่ย้อมสีแบบแกรม

ข-ค) การทดสอบ Lipolytic activity บนอาหาร Tween-80 agar

ง) การทดสอบ Levan formation

จ) การทดสอบการสร้างเม็ดสี fluorescent บนอาหาร King's medium B agar

ฉ) การทดสอบเชื้อบนอาหาร YDC

ช) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

ซ) การทดสอบการสร้าง Nitrite (1) เชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้ (2) เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* (3) เชื้อ *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*

ฌ) การทดสอบ Arginine Dihydrolase (1) ไม่มีเชื้อ (2) เชื้อ *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (3) เชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* (4) เชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ

Properties	unknown										Aacat ^{1/}	Aac ^{2/}	Burk ^{3/}
	Van-N 1	Van-N 2	Van-N 3	Van-N 4	Van-R 5	Van-R 6	Van-S 7	Pal-R 3	Pal-N 1	Pal-N 2			
Gram reaction	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fluorescence on KB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Growth at 41 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levan production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Gelatin Hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salt tolerance 1.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salt tolerance 3.0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salt tolerance 5.0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salt tolerance 7.0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of :													
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Propionic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Properties	unknown										Aacat ^{1/}	Aac ^{2/}	Burk ^{3/}
	Van-N 1	Van-N 2	Van-N 3	Van-N 4	Van-R 5	Van-R 6	Van-S 7	Pal-R 3	Pal-N 1	Pal-N 2			
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Tryptophan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{1/} = *A. avenae* subsp. *cattleyae* (กรมวิชาการเกษตร)

^{2/} = *A. avenae* subsp. *citrulli* (กรมวิชาการเกษตร)

^{3/} = *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (กรมวิชาการเกษตร)

N = Gram negative

+ = Positive

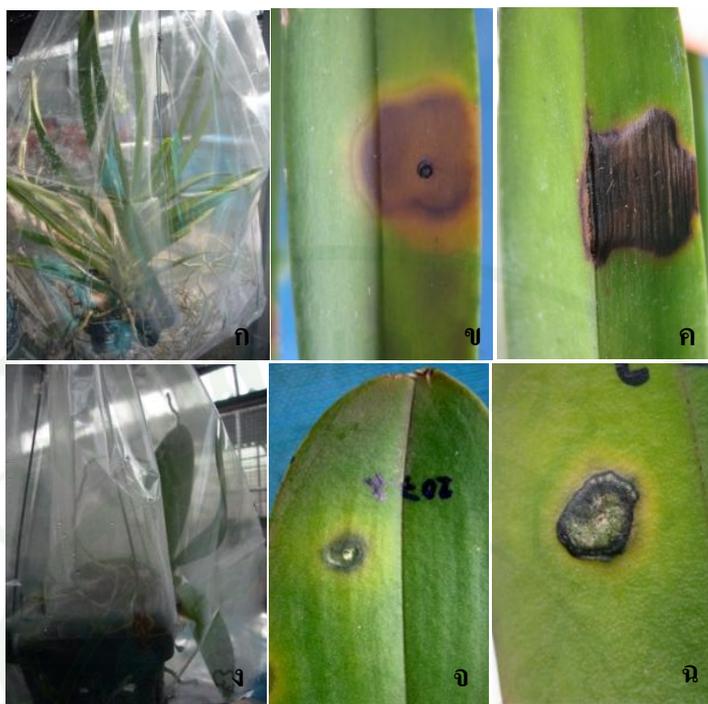
- = Negative

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test)

จากการทดสอบการเกิดโรคนบนพืชทดสอบชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการใบจุดสีน้ำตาล ทั้ง 10 ไอโซเลท และเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* หลังจากทำการปลูกเชื้อ 5 วัน ก้านไม้ทั้ง 2 สกุลเริ่มแสดงอาการแผลจุดเหลืองขนาดเล็ก และแผลจะเริ่มมีการพัฒนาชัดเจน จนกระทั่งเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลงไปจากผิวใบ มีสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง และมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายกับอาการโรคใบจุดสีน้ำตาลที่เก็บมาจากแปลงปลูกกล้วยไม้ (ภาพที่ 5) ในขณะที่เชื้อ *A.*

avenae subsp *citrulli* ไม่ก่อให้เกิดโรคบนกล้วยไม้ทั้ง 2 สกุล การทดสอบกับพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงโม (Watermelon) แตงกวา (Cucumber) ฟักทอง (pumpkin) ชูกินี (Zucchini) น้ำเต้า (gourd) พบว่าที่ทำการปลูกเชื้อด้วย *A. avenae* subsp *citrulli* พืชตระกูลแตงจะแสดงอาการแผลน้ำเน่าบนใบ เลี้ยงหลังจากทำการปลูกเชื้อ 3-5 วัน โดยแผลน้ำเน่าจะแผ่ไปตามความยาวของเส้นใบ และจะกลายเป็นแผลแห้ง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท และเชื้อ *A. avenae* subsp *cattleyae* ไม่ก่อให้เกิดโรคบนพืชตระกูลแตงทั้ง 5 ชนิด สำหรับการทดสอบในข้าว พบว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทที่แยกได้ เชื้อ *A. avenae* subsp *cattleyae* และ *A. avenae* subsp *citrulli* ไม่ก่อให้เกิดโรคในข้าว

จากการศึกษาการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ *A. avenae* subsp *cattleyae* โดย Schaad *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *A. avenae* subsp *citrulli* ทุกสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลแตง แต่ไม่ก่อโรคในข้าวโพดและกล้วยไม้ ในขณะที่เชื้อ *A. avenae* subsp *cattleyae* ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้ 2 สกุล คือ ฟาแลนนอปซิสและแคทลียา แต่ไม่เกิดโรคในกล้วยไม้สกุลเดนโดรเบียม ซึ่งจะแสดงลักษณะแผลจุดน้ำหลังจากทำการปลูกเชื้อ 7-10 วัน และเนื้อเยื่อใบจะค่อยๆ เป็นสีน้ำตาล หลังจาก 14-21 วัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลแตงและข้าว แต่ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้สกุลแวนดาและฟาแลนนอปซิส ในขณะที่เชื้อ *A. avenae* subsp *citrulli* (กรมวิชาการเกษตร) ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น ไม่ก่อให้เกิดโรคในข้าว และกล้วยไม้ทั้ง 2 สกุล ซึ่งผลการทดสอบในครั้งนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีคุณสมบัติสอดคล้องกับเชื้อ *A. avenae* subsp *cattleyae* ที่ Schaad และคณะ (2008) ได้รายงานไว้



ภาพที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test)

ก-ค) ลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้สกุลแวนดา

ง-ฉ) ลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส

ตารางที่ 3 ผลทดสอบคุณสมบัติในการเกิดโรค (Pathogenicity test) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ

พืชทดสอบ	unknown										Aacat ^{1/}	Aac ^{2/}	Burk ^{3/}
	Van-N 1	Van-N 2	Van-N 3	Van-N 4	Van-R 5	Van-R 6	Van-S 7	Pal-R 3	Pal-N 1	Pal-N 2			
กล้วยไม้													
แวนดา	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+ ^{4/}
ฟาแลนนอปซิส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+ ^{4/}
พืชตระกูลแตง													
แตงโม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
แตงกวา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ฟักทอง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ซูกินี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
น้ำเต้า	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
บวบ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ข้าว	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{1/} = *A. avenae* subsp. *cattleyae* (กรมวิชาการเกษตร)

^{2/} = *A. avenae* subsp. *citrulli* (กรมวิชาการเกษตร)

^{3/} = *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (กรมวิชาการเกษตร)

^{4/} = กล้วยไม้แสดงอาการเน่าสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*

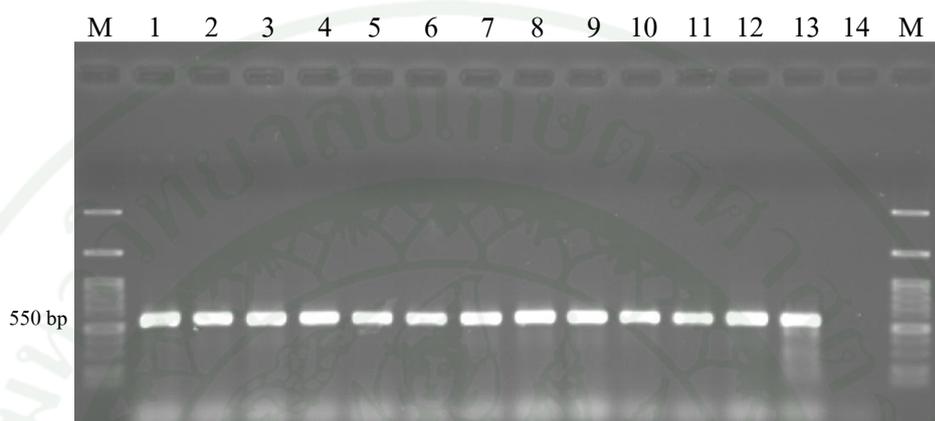
+ = Positive

- = Negative

4. การตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ มาตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ primer SEQ ID NO: 1 และ SEQ ID NO: 2 ผลการตรวจพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 10 ไอโซเลท รวมถึงเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* (กรมวิชาการเกษตร) และเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* (กรมวิชาการเกษตร) แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp ซึ่งเป็นขนาดจำเพาะ

ของยีน 16S-23S rDNA (ภาพที่ 6) ซึ่งจากผลการตรวจพบว่าคู่ไพรเมอร์ SEQ ID NO: 1 และ SEQ ID NO: 2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้งเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* และ *A. avenae* subsp. *citrulli* ได้ ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้เหมาะสมใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* ได้



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1-10) เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการใบจุดของกล้วยไม้จำนวน 10 ไอโซเลต

11) เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

12) เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

14) ตัวอย่างควบคุมลบ (non-DNA template; water)

5. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วด้วยระบบ Biolog™ โดยการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารตั้งต้นจำนวน 95 ชนิด (Biolog GN microplate)

จากการทดสอบการใช้คาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 95 ชนิดบนอาหารทดสอบ Biolog™ GN2 แบคทีเรียให้ผลบวกในการใช้คาร์บอน ได้แก่ Glycogen, Tween 40, Tween 80, L-arabinose, D-Arabitol, D-Fructose, D-Galactose, D-Mannitol, D- Psicose, D-Sorbitol, Pyruvic acid methyl ester, Succinic acid mono methyl ester, Acetic acid, Cis-Aconitic acid, D-Gluconic acid, β-Hydroxy- butyric acid, ∞-Keto glutaric acid, L-Lactic acid, Propionic acid, Quinic acid, Sebacic acid, Succinic acid, Succinamic acid, L-Alaninamide, L-Alanine, L-Asparagine, L-Aspartic acid, L-Glutamic acid, L-Leucine, L-Proline, L-Pyroglutamic acid, L-Serine, 2-

Aminoethanol, และGlycerol สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้
ไอโซเลท Van-N 3 เป็น *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยค่า similarity 0.815 และค่า probability 100
เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog™ system ซึ่งเป็นการใช้สับสเตรท
ของเชื้อจำนวน 95 ชนิด โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับฐานข้อมูลในโปรแกรม แสดงผลว่า
เชื้อสาเหตุโรคใบจุดกล้วยไม้เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

6. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

การตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในกระต่ายโดยใช้
แอนติเจนจาก Membrane protein complex (MPC) บริสุทธิ์ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ได้

ทำการเก็บแอนติซีรัมจำนวน 9 ครั้ง จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000 - 128,000 (ตารางที่ 3) โดยแอนติซีรัมที่เจาะในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีค่าเพียง 1:1,000 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2 ครั้งแรก เป็น 1:8,000 ครั้งที่ 5 และครั้งที่ 6 มีค่า 1:32,000 ในขณะที่การเจาะในครั้งที่ 7 และครั้งที่ 8 ได้แอนติซีรัมที่มีค่าไตเตอร์สูงถึง 1:128,000 (ตารางที่ 4) เนื่องจากแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปในกระต่ายเริ่มเข้าไปกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีในร่างกาย ทำให้ค่าไตเตอร์ของการเจาะเลือดครั้งแรกๆ มีค่าต่ำ เมื่อเจาะในครั้งที่ 5 และ 6 กระต่ายได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงขึ้น และในครั้งที่ 7 และ 8 ได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงสุด (ประพันธ์ และคณะ, 2527) ในขณะที่ค่าไตเตอร์เริ่มลดลงในการเจาะเลือดครั้งที่ 9 มีค่า 1:64,000 ดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 7 และครั้งที่ 8 สำหรับเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อไป และเมื่อทดสอบค่าเจือจางของแอนติบอดี พบว่าที่ค่าเจือจางระดับ 1:1000 สามารถตรวจสอบเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 5)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect ELISA พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะ โคลโรนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ให้ค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตรเป็นลบ แต่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* เชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง (Bacterial fruit blotch disease) โดยมีค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ใน genus และ species เดียวกันมีความใกล้เคียงกันมาก ต่างกันเฉพาะ subsp. ที่เกี่ยวข้องกับพืชอาศัย โดยแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* พบเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น ไม่พบในกล้วยไม้ แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในการตรวจสอบในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกล้วยไม้ (ตารางที่ 6)

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เมื่อทดสอบความไว (sensitivity) ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในการตรวจหาแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect ELISA มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.531 (ตารางที่ 7) ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ เมื่อนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา พบว่าจะสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (sensitivity) ซึ่งเฉลี่ยจากปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี fluorescent-antibody technique และ ELISA (Goto, 1992) ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียได้

ตารางที่ 4 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

แอนติซีรัมครั้งที่	ไตเตอร์	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹
1	1,000	0.98
2	1,000	1.17
3	8,000	1.36
4	8,000	1.416
5	32,000	1.366
6	32,000	1.374
7	128,000	1.546
8	128,000	1.511
9	64,000	1.412

¹ ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตเป็นเวลา 45 นาที

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ครั้งที่ 7 ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่บริสุทธิ์ และ MPC ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ค่าการเจือจางแอนติบอดี	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹			
	เชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> ²	MPC (1mg/ml)	PBS pH 7.4	Normal serum
1:1,000	3.235	3.282	0.199	0.286
1:2,000	3.2	3.257	0.23	0.276
1:4,000	3.074	3.158	0.198	0.259
1:8,000	2.965	2.97	0.196	0.264
1:16,000	2.802	2.788	0.209	0.246
1:32,000	2.425	2.493	0.176	0.252
1:64,000	1.891	1.824	0.193	0.252
1:128,000	1.329	1.361	0.188	0.232
1:256,000	0.931	0.957	0.193	0.231
1:512,000	0.663	0.695	0.198	0.249

¹ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตเป็นเวลา 45 นาที

²สารแขวนลอยเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ค่าการเจือจาง 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ
Acidovorax avenae subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 405 นาโนเมตร ¹
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	3.197
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	3.168
<i>Bukhoderia gladioli</i>	0.151
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	0.360
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.331
<i>Pantoea</i> sp.	0.383
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0.316
<i>Ralstonia solanacearum</i>	0.282
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 1	0.215
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 2	0.176
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 3	0.203
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 4	0.158
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 5	0.153
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 6	0.156
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 7	0.157
PBS pH 7.4	0.164
Normal serum	0.327

¹ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PA6 ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความไวของโพลีโคลนอลในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleiae* บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค indirect ELISA

เชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleiae</i> (หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹
10 ⁸	3.269 (+)
10 ⁷	2.646 (+)
10 ⁶	1.800 (+)
10 ⁵	0.978 (+)
10 ⁴	0.531 (+)
10 ³	0.324 (-)
10 ²	0.213 (-)
10	0.194 (-)
PBS	0.164 (-)

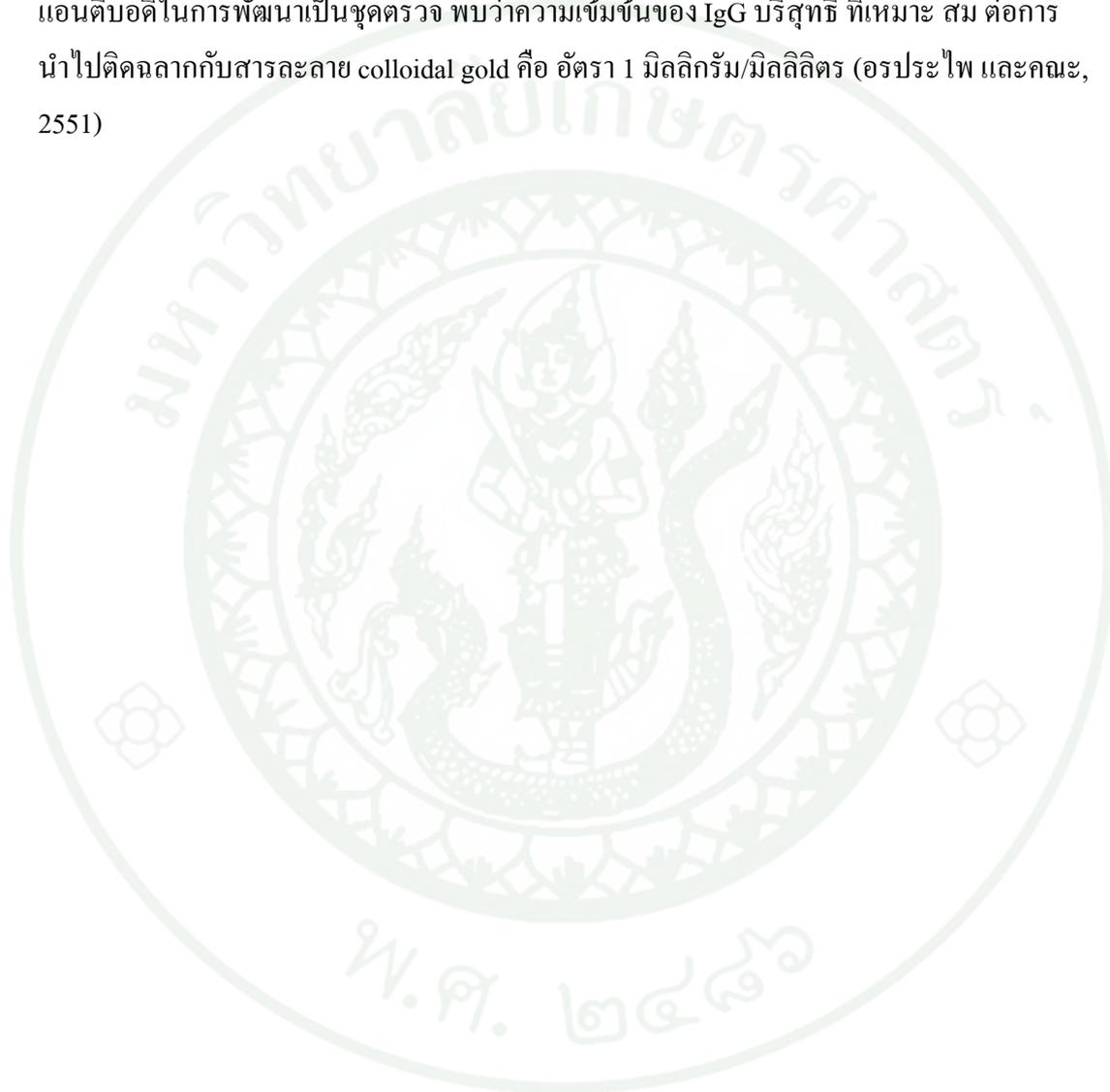
¹ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000

7. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay (อิมมูโนสตริป)

7.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleiae* โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 7 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทำ dialyse แล้ว นำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialyse ผ่านลงในคอลัมน์ โดยใช้ recProtein A affinity column chromatography เก็บ fraction ได้จำนวน 20 fraction นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ (ตารางที่ 7) ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไปติดฉลาดกับสารละลาย Colloidal gold เช่นเดียวกับการผลิตชุด GLIFT ของ

Ralstonia solanacearum ซึ่งปรับความเข้มข้นของ IgG ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณ โปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไปติดฉลากกับสารละลาย Colloidal gold (สุรสี และคณะ, 2551) จากรายงานการพัฒนาชุดตรวจแบบ Immunochromatographic strip test สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ซึ่งใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีในการพัฒนาเป็นชุดตรวจ พบว่าความเข้มข้นของ IgG บริสุทธิ์ ที่เหมาะสม สำหรับการนำไปติดฉลากกับสารละลาย colloidal gold คือ อัตรา 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อรประไพ และคณะ, 2551)



ตารางที่ 8 การแยกภูมิโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยวิธี recProtein A affinity column chromatography

Fraction ¹	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีน ² มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
W1	0.003	0.0021
W2	0.010	0.007
W3	0.038	0.027
W4	0.973	0.695
W5	2.483	1.774
E1	2.500	1.786
E2	2.696	1.883
E3	2.708	1.934
E4	2.762	1.972
E5	2.797	1.998
E6	2.257	1.612
E7	2.079	1.485
E8	2.036	1.454
E9	0.860	0.614
E10	0.637	0.455
E11	0.472	0.337
E12	0.350	0.250
E13	0.234	0.167
E14	0.166	0.119
E15	0.170	0.121

¹W fraction ที่เก็บจากการล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer

E fraction

²ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณจากสูตร O.D. 280/1.4

7.1.1 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยาเชื้อ

A. avenae subsp. *cattleyae*

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่เจือจาง 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรได้ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.469 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ

7.1.2 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding

assay (DIBA)

หลังจากปรับความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินให้เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว นำไปทดสอบคุณภาพด้วยวิธี DIBA พบว่าอิมมูโนโกลบูลินทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นตัวอย่างใบ-กล้วยไม้ที่มีอาการใบจุดสีน้ำตาลและแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลของปฏิกิริยาเป็นสีม่วง และพบว่าอิมมูโนโกลบูลินไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติ เมื่อเจือจางเป็น 1:500 (ภาพที่ 8) ซึ่งให้ผลตรงกับรายงานการผลิตชุด GLIFT ของ *Ralstonia solanacearum* (สุรภิ และคณะ, 2551) เมื่อทดสอบคุณภาพด้วยวิธี Dot- immunobinding assay (DIBA) แล้วพบว่า IgG ที่เจือจาง 1:500 ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกสีชมพูสามารถนำไปผลิตชุด GLIFT kit ได้ ส่วน control ไม่มีปฏิกิริยา

TBS	H	D	P
TBS	H	D	P



ก

ข

ภาพที่ 8 การทดสอบคุณภาพภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ก) แผนผังการทดลอง กำหนดให้

TBS	Tris-saline buffer
H	ใบกล้วยไม้ปกติ
D	ใบกล้วยไม้เป็นโรค
P	เชื้อแบคทีเรีย <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>

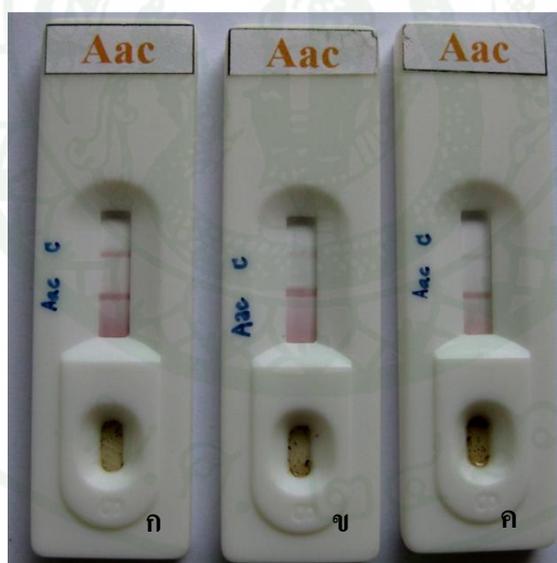
ข) ผลการทำปฏิกิริยาของอิมมูโนโกลบูลิน จุดสีม่วงแสดงผลการตรวจที่ให้ผลเป็นบวก

7.1.3 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

สารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร แสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line มีสีม่วงคมชัด จึงเป็นความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad (CRP) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* จากรายงานการพัฒนาชุดตรวจไวรัส TMV ในพืช (Byzova *et al.*, 2008) พบว่าอัตราที่ของ Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 2.0 ที่ช่วงคลื่นแสง 520 นาโนเมตร แสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่สารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร มีความเหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad (CRP) สำหรับการผลิตชุด GLIFT ของ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งจะแสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line มีสีม่วงคมชัด (สุรภิ และคณะ, 2551)

7.1.4 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

เมื่อนำสารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร มาเจือจางแบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 และ 1:4 แล้วนำไประบายลงบนแผ่น CRP จากผลการทดลองพบว่า Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีม่วงชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่ Gold conjugated IgG ที่ทำการเจือจาง 1:2 และ 1:4 จะเกิดปฏิกิริยาสีชมพูอ่อนข้างชัดเจนบน test line แต่จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีชมพูอ่อนไม่ชัดเจนบน control line (ภาพที่ 9) ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้น กิตติศักดิ์ และคณะ (2549) ได้อธิบายว่า เมื่อทำการเจือจาง Gold conjugated IgG แล้วทำให้ control line เกิดปฏิกิริยาไม่ชัดเจน เนื่องจากปริมาณของ Gold conjugated IgG ไม่เพียงพอสำหรับ control line เพราะ Gold conjugated IgG ต้อง ไหลผ่าน test line ก่อน control line จึงเหลือปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่ไปทำให้ control line มีสีเข้ม



ภาพที่ 9 ผลการทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

- ก) ความเข้มข้นของอนุภาคทองที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร
- ข) ความเข้มข้นของอนุภาคทองที่ความเจือจาง 1:2
- ค) ความเข้มข้นของอนุภาคทองที่ความเจือจาง 1:4

7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

เลือกแผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) ชนิด S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ทำ test line และ control line ในการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริป สำหรับตรวจแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เนื่องจากให้ผลของปฏิกิริยาของทั้ง test line และ control line เป็นเส้นสีม่วงคมชัด ตามวิธีการของ สุรภี และคณะ (2551) ในการคัดเลือกเมมเบรนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืช การใช้ IgG ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น test line และ ใช้ Goat anti-Rabbit (GAR) ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 สำหรับ control line พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบน test line และ control line ให้เส้นสีม่วงคมชัด (ภาพที่ 9)

8. การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบชุดตรวจอิมมูโนสตริป

จากการทดสอบชนิดของ sample buffer ทั้ง 10 ชนิด พบว่ามีสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด เมื่อนำไปบดกับตัวอย่างใบกล้วยไม้ปกติ แล้วทำให้เกิด false positive บน test line คือ DOA-Extraction buffer pH 7.5, DOA Extraction buffer 2 pH 8.6 และ BIOREBA general extraction buffer pH 7.4 สำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TBS pH 7.4, 1x TBST pH 7.4, 1x PBS pH 7.4, 1x PBST pH 7.4, 10 mM phosphate buffer pH 7.4 และ 10 mM phosphate buffer + 0.05% Tween 20 pH 7.4 เมื่อนำไปทดสอบด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* และบดใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาล พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบวกบน test line เกิดปฏิกิริยาเฉพาะบน control line เท่านั้น จึงไม่สามารถนำสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว มาใช้กับชุดตรวจอิมมูโนสตริปได้ ในขณะที่สารละลายบัฟเฟอร์ DOA Extraction buffer pH 5.6 เมื่อนำไปทดสอบด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* และบดใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาล พบว่าแสดงการเกิดปฏิกิริยาบวกบน test line และ control line ให้สีม่วงชัดเจน เมื่อนำไปบดกับใบกล้วยไม้ปกติ เกิดปฏิกิริยาเฉพาะบน control line ไม่เกิดปฏิกิริยา false positive ดังนั้นสารละลายบัฟเฟอร์ DOA Extraction buffer pH 5.6 จึงเหมาะสมสำหรับการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริป เพื่อตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างไบกัลวีย์ไม้ปกติใน Sample buffer 10 ชนิด คือ 1) น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ, 2) 1x TBS pH 7.4, 3) 1x TBST pH 7.4, 4) 1x PBS pH 7.4, 5) 1x PBST pH 7.4, 6) 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 7) 10 mM phosphate buffer + 0.05% Tween 20 pH 7.4, 8) DOA Extraction buffer pH 5.6, 9) DOA Extraction buffer pH 7.5, 10) DOA Extraction buffer2 pH 8.6 และ 11) BIOREBA general extraction buffer pH 7.4



ภาพที่ 11 การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างไบคด้วยไม้ที่มีอาการใบจุดสีน้ำตาล 1) น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ, 2) 1x TBS pH 7.4, 3) 1x TBST pH 7.4, 4) 1x PBS pH 7.4, 5) 1x PBST pH 7.4, 6) 10 phosphate buffer pH 7.4, 7) 10 mM phosphate buffer + 0.05% Tween 20 pH 7.4, 8) DOA Extraction buffer pH 5.6, 9) DOA Extraction buffer pH 7.5, 10) DOA Extraction buffer2 pH 8.6 และ 11) BIOREBA general extraction buffer pH 7.4

9. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

9.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวกกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง แต่ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะ โคลโรซีดแตกต่างกัน จำนวน 7 ลักษณะ ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบความจำเพาะเจาะจง ด้วยเทคนิค indirect ELISA แสดงว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพที่ 11)

ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างกล้วยไม้

เมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีลักษณะอาการต่างๆ มาทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป พบว่ามีเฉพาะอาการใบจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* เท่านั้นที่ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเกิดปฏิกิริยาเป็นผลบวก เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากการหยดน้ำคั้นใบกล้วยไม้จากลักษณะอาการต่างๆ และน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติ และเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นใบกล้วยไม้ นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร พบว่าหลุม ELISA ที่เคลือบด้วยน้ำคั้นใบกล้วยไม้ที่อาการใบจุดสีน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 3.092 ใกล้เคียงกับหลุมที่เคลือบด้วยเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์ คือ 3.113 สำหรับหลุม ELISA ที่เคลือบด้วยน้ำคั้นใบกล้วยไม้อาการต่างๆ ให้ผลเป็นลบเมื่อเปรียบเทียบกับหลุม control

จากการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ และการทดสอบกับตัวอย่างกล้วยไม้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบกับเทคนิค

ELISA พบว่า ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน (ตารางที่ 9) ซึ่งจะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงระหว่างชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น กับเทคนิค ELISA เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้



ภาพที่ 12 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

- ก) *A. avenae* subsp. *cattleyae*, ข) *A. avenae* subsp. *citrulli*, ค) *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, ง) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, จ) *Erwinia chrysanthemi*
 ฉ) *Pantoea* sp., ช) *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, ซ) *Ralstonia solanacearum*, ฅ-ค) เชื้อแบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะ โคลิโคนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ลักษณะ, ต) น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA

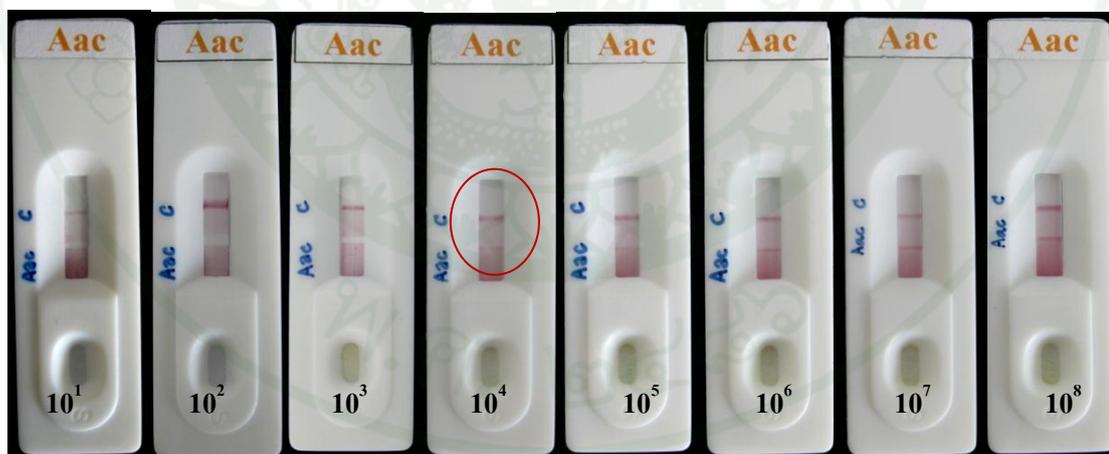
ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ	ตรวจด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเฉลี่ยที่ 405 นาโนเมตร จากเทคนิค ELISA ¹
<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	+	3.197 (+)
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	+	3.168 (+)
<i>Bukhoderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	-	0.151 (-)
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	0.360 (-)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	0.331 (-)
<i>Pantoea</i> sp.	-	0.383 (-)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-	0.316 (-)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	0.282 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 1	-	0.215 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 2	-	0.176 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 3	-	0.203 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 4	-	0.158 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 5	-	0.153 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 6	-	0.156 (-)
แบคทีเรียบนผิวใบกล้วยไม้ 7	-	0.157 (-)
PBS pH 7.4	-	0.164 (-)
DOA Extraction buffer pH 5.6	-	0.327 (-)

¹ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000

9.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยการเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมี extraction buffer และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่าเหมือนข้างต้น พบว่าสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 12) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA สามารถตรวจเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุดที่ 10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่เทคนิค ELISA จะใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนาน ประมาณ 4-6 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ในการตรวจหาเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* โดยเจือจางครั้งละ 10 เท่าในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค

การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ทำการเจือจางน้ำคั้นพืชแบบ 10 เท่า โดยมีน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติและสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการของโรคที่เจือจาง 1: 2,000 (ภาพที่ 13) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA พบว่าหลุม ELISA ที่เคลือบด้วยน้ำคั้นพืชที่มีค่าการเจือจาง 1: 10,000 เป็นค่าการเจือจางสูงสุดที่เกิดปฏิกิริยาเป็นบวก มีค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.381 จากผลการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป พบว่ามีความไวในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคน้อยกว่าวิธีการ indirect ELISA



ภาพที่ 14 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาล โดยการเจือจางน้ำคั้นพืช
 ก) ค่าการเจือจาง 1:10 (ข) ค่าการเจือจาง 1:100 (ค) ค่าการเจือจาง 1:200
 ง) ค่าการเจือจาง 1:500 (จ) ค่าการเจือจาง 1:1,000 (ฉ) ค่าการเจือจาง 1:2,000

จากการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์ และตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA (ตารางที่ 10 และตารางที่ 11) พบว่าการตรวจด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป มีความไวในการตรวจพบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์ และเทคนิค ELISA สามารถตรวจพบเชื้อที่ปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบความไวด้วยตัวอย่างกล้วยไม้ที่

เป็นโรค พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1: 2,000 ในขณะที่การตรวจด้วยเทคนิค ELISA สามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:10,000 แต่ด้วยข้อจำกัดหลายประการของเทคนิค ELISA ซึ่งใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนาน (4-6 ชั่วโมง) ต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างพร้อมในการทำงาน และผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญเฉพาะด้าน ดังนั้นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น จะมีความสะดวกในการใช้งาน มีความรวดเร็ว และผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีทักษะเฉพาะด้านในการใช้งาน จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในภาคสนามได้ดีกว่าเทคนิค ELISA

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บริสุทธิ์ ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA

เชื้อ <i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> (หน่วยโคโลนีต่อมิลลิเมตร)	ตรวจด้วยชุดตรวจสอบ อิมมูโนสตริป	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเฉลี่ย ที่ 405 นาโนเมตร จากเทคนิค ELISA ^{1/}
10 ⁸	+	3.269 (+)
10 ⁷	+	2.646 (+)
10 ⁶	+	1.800 (+)
10 ⁵	+	0.978 (+)
10 ⁴	+	0.531 (+)
10 ³	-	0.324 (-)
10 ²	-	0.213 (-)
10 ¹	-	0.194 (-)
PBS pH 7.4	-	0.164 (-)

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค ด้วยชุด
ตรวจสอบอิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA

ค่าการเจือจางน้ำคั้นพืช	ตรวจด้วยชุดตรวจสอบ อิมมูโนสตริป	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเฉลี่ย ที่ 405 นาโนเมตร จากเทคนิค ELISA ¹
1:10	+	3.257 (+)
1:100	+	2.871 (+)
1:200	+	2.483 (+)
1:500	+	2.045 (+)
1:1,000	+	1.627 (+)
1:2,000	+	1.174 (+)
1:4,000	-	0.989 (+)
1:8,000	-	0.643 (+)
1:10,000	-	0.426 (+)
1:16,000	-	0.289 (-)
PBS pH 7.4	-	0.177 (-)

¹ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb
ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000

สรุปและข้อเสนอแนะ

แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะคล้ายโรคใบจุดสีน้ำตาล จากแปลงปลูกกล้วยไม้ อ.สามพราน และอ. กำแพงแสน จ.นครปฐม อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร ได้ทั้งหมดจำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง สัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสับสเตรท 95 ชนิด ด้วยเทคนิค BiologTM และทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนกล้วย 2 สกุล คือ แวนดาและฟาแลนนอปซิส พืชตระกูลแตงและข้าว เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *A. avenae* subsp. *citrulli* และ *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* ผลการทดสอบพบว่าเชื้อที่แยกได้จากโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ทั้ง 10 ไอโซเลทมีคุณสมบัติสอดคล้องกับ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

คุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ โดยใช้ membrane protein complex เป็นสิ่งกระตุ้น (antigen) ในการผลิตแอนติบอดีนั้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด คือ 128,000 เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง (Bacterial fruit blotch disease) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ใน genus และ species เดียวกันมีความใกล้เคียงกันมาก โดยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* พบเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น ไม่พบในกล้วยไม้ แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เมื่อทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

การพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปของเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* โดยนำ IgG ต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ในการทดลองนี้ ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (สารละลาย colloidal gold) ได้สารละลาย Gold conjugated IgG ปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ซึ่งพบว่าจะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีม่วงชัดเจนบน test line และ control line การใช้ IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น test line และใช้ Goat anti-

Rabbit (GAR) ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 สำหรับ control line พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบน test line และ control line ให้เส้นปฏิกิริยาสีม่วงคมชัด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป พบว่าชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ DOA Extraction buffer pH 5.6 มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการבודตัวอย่างใบกล้วยไม้เพื่อตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเนื่องจากแสดงการเกิดปฏิกิริยาให้สีม่วงชัดเจนบน test line และ control line เมื่อทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับเทคนิค indirect ELISA เมื่อทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการโรคต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกกล้วยไม้ พบว่ามีเฉพาะลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เท่านั้น ที่เกิดปฏิกิริยาบวกบน test line ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค indirect ELISA ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน ดังนั้นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ จากผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยทดสอบกับสารแขวนลอยเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อได้ปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA เมื่อทำการทดสอบด้วยน้ำคั้นใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรคพบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:2,000 เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค indirect ELISA พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อในน้ำคั้นพืชที่มีค่าการเจือจาง 1: 10,000 จากผลการทดสอบความไว และความจำเพาะในการตรวจโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาได้ในการทดลองนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ณ จุดตรวจโรค (point of care) ในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร, สุรภี กิริติยะอังกูร และเขาวภา ดันติวานิช. 2549. GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง. วารสารวิชาการเกษตร 2 (24): 168-177.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2533. นิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโรคพีช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิมรัฐ ไตรศรี. 2543. ปัญหาโรคกล้วยไม้ในการส่งออก. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (3): 29-41.
- _____. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ศรีสุข พูนผลกุล และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย, น. 2413-2437. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี เล่ม 4 2553. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- _____. และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาสาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุล แวนดา. น. 481-489. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประพันธ์ ภาณุภาค, สดใส เวชชาชีวะ, ไหม รัตนวรารักษ์, ฤทัย สกุลแรมรุ่ง และปรียาจิต เจริญวงศ์. 2527. วิทยานิพนธ์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- รัชณี องประยูร. 2549. บทปฏิบัติการเขรั่มวิทยาทางด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- วิชัย โฆสิตรัตน์. 2549. โรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย: บทปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 161 น.

ศรีหรรษา มลิจารย์. 2551. การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแดง โดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรประไพ คชนันท์, สุรภี กิรติยะอังกูร, อรวรรณ หิমানันโต และมัลลิกา คำภูศิริ. 2551. การพัฒนาชุดตรวจแบบ immunochromatographic strip test สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ครั้งที่ 1. 25 น.

สุรภี กิรติยะอังกูร, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ณัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล และเขาวภา ตันติวานิช. 2551. การผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์. วารสารวิชาการเกษตร 2: 168-177.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2556. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_web/download/journal/trends2556.pdf, 16 กุมภาพันธ์ 2557.

Abdullah, H. and S. Kadzamin. 1993. Etiology of Bacterial Soft Rot of Orchids. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science** 16: 1-4.

Anonymous. 2008. **Rapid lateral flow test strips considerations for product development**. Available Source: <http://www.millipore.com>, August 20, 2011.

———. 2009. **Product information *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Aacat)**. Available Source: <http://www.bioreba.com>, June 20, 2011.

Ark, A.P. 1951. **California orchids resistant to some diseases in habitat become susceptible in greenhouse**. Available Source: <http://ucce.ucdavis.edu/files/repositoryfiles/ca502p7-71583.pdf>, August 13, 2011

- Borque, L., V. Oliven and F. Iguaz. 1995. Development and validation of an automated particle enhanced nephelometric immunoassay method for the measurement of human plasma C1Q. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 9: 302-307.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Byzova, N.A., I.V. Safenkova, S.N. Chirkov, A.V. Zherdev, A.N. Blintsov, B.B. Dzantiev, and I.G. Atabekov. 2008. Development of Immunochromatographic Test Systems for Express Detection of Plant Viruses. **Applied Biochemistry and Microbiology** 45: 204-209.
- Chuenchitt, S., W.Y. Dhirabhava, S. Karnjanarat, D. Buangsuwon and T. Uematsu. 1983. A new bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. **Kasetsart Journal** 17: 26-36.
- Divinagracia, G.G., B.L. Candole and E.T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. **Summary in Philippine Phytopathology** 20: 3-4.
- Garland, D.L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophylline with the abbott TDX and high pressure liquid chromatography methods. **Clinical Chemistry** 32: 1104.
- Goto, M. 1992. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. Academic Press, INC.

- Hu, F.P., J.M. Young, C.M. Trigs, D.C. Park and D.J. Saul. 2001. Relationships within the Proteobacteria of plant pathogenic *Acidovorax* species and subspecies, *Burkholderia* species and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* by sequence analysis of 16S rDNA, numerical analysis and determinative tests. **Antonie van Leeuwenhoek** 80: 201-213.
- Huang, T. 2008. **The occurrence and control of fungal and bacterial orchid diseases.** Available Source: <http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:VRxRH1N24ZUJ:www.orchidsocietynsw>, March 13, 2011.
- Keith, L.M., K.T. Sewake and F.T. Zee. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. **Plant Disease** 89: 1273-1278.
- Miller, J.W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. **Plant Pathology Circular**. 330.
- Nader, M.M.E. 2005. **Development and validation of lateral flow device (LDF) field test kit for diagnosis of potato ring rot.** M.S. Thesis, Newcastle upon Tyne University.
- Opina, N.L. and S.A. Miller. 2005. Evaluation of immunoassays for detection of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of tomato and eggplant in the Philippines. **Acta Horticulturae** 695: 353-356.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** APS Press, Minnesota, USA.
- , E. Postnikova, A. Sechler, L.E. Claflin, A.K. Vidaver, J.B. Jones, I. Agarkova, A. Ignatov, E. Dickstein and B.A. Ramundo. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** 31: 434-446.

- Singer, J.M. and C.M. Plotz. 1956. The latex fixation test application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **American Journal of Medicine** 21: 888-892.
- Song, W.Y., H.M. Kim and N.W. Schaad. 2002. PCR primers for detection and identification of plant pathogenic species, subspecies and strains of *Acidovorax*. The United States of America, as represented by the Secretary of Agriculture. **Patent No: US 6,423,499 B1**. Available Source: www.Patentstorm.Us/patents/6423499/fulltext.html, March 22, 2011.
- Stovold, G.E., J. Bradley and P.C. Fahy. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*Pseudomonas cattleyae*) causing leaf spot and death of Phalananopsis orchids in New South Wales. **Australasian Plant Pathology** 30: 73-74.
- Trujillo, G. and Y. Hernandez. 1999. Bacterial spot in orchid. **Fitopatol Venezol** 12: 5-8.
- Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters and J.D. Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal Systemic Bacteriol** 42: 107-119.
- Wong, R.C. and H.Y. Tse. 2009. **Lateral Flow Immunoassay**. Humana Press, New York, USA.
- Yakrus, M. and N.W. Schaad. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology** 69: 225-552.
- Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature** 184: 1648-1649.



ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวเคมี

1.1 Wakimoto's medium

Peptone	5.0	กรัม
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.5	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม
Potato	300	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 King's medium B agar

Proteose peptone No.3 (Difco)	20.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	กรัม
Glycerol	15.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Tween 80 agar (Lipolytic activity test)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารให้ได้ pH 7.4 เติมน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สาร Tween-80 แยกนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับอาหารข้างต้นในอัตรา 10 มิลลิลิตร ของ Tween-80 ต่ออาหาร 1.0 ลิตร แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ

1.4 Nutrient sucrose agar (Levan formation test)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Sucrose	50.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Nutrient glucose agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 Thornley's medium (Arginine dihydrolase test)

Peptone	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Na ₃ HPO ₄	0.3	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
L-Arginine HCl	10.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH อาหารให้เป็น 7.2 อาหารจะมีสีชมพูม่วง แบ่งนำมาใส่หลอดทดสอบชนิดมีฝาเกลียว หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.7 Nitrate semi-solid medium (Nitrate reduction test)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO ₃	2.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH อาหารให้เป็น 7.2 อาหารจะมีสีชมพูม่วง แบ่งนำมาใส่หลอดทดสอบชนิดมีฝาเกลียว หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.8 Christensen's Urea agar (Urease test)

Peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0	กรัม
Phenol red	0.006	กรัม
Agar	20.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ให้ได้ 6.8-6.9 ต้มจนวุ้นหลอมแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำมาอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย urea 20% ในน้ำที่ฆ่าเชื้อโดยการกรอง (filter sterilized) ให้มีความเข้มข้นจึง urea เท่ากับ 2% ผสมให้เข้ากัน (เติม 100 มล. ต่ออาหาร 900 มล.) แบ่งใส่ในหลอดที่นึ่งฆ่าเชื้อหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อ

1.9 Starch agar (Starch hydrolysis test)

Soluble starch (potato starch)	2.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ของอาหารให้เป็น 6.8 ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.11 Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารและสารละลายสำหรับการเตรียมแอนติเจนจาก Membrane protein complex (MPC)

2.1 523 medium

Casein hydrolysate	8.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0358	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.0	กรัม
Sucrose (glucose)	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 0.85% NaCl

NaCl	0.85	กรัม
------	------	------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยวิธี indirect ELISA

3.1 Carbonate coating buffer, pH 9.6

NaHCO ₃	2.93	กรัม
Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.3 Washing buffer (PBST)

PBS	1,000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

3.4 Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่บดแสง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบประสิทธิภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

4.1 TBS (Tris-saline buffer)

50mM	Tris
150mM	NaCl
0.01%	NaN ₃

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 หรือ 9.6

4.2 Washing buffer (TBST)

TBS (pH 7.4)	100.0	มิลลิลิตร
Tween-20	0.05	มิลลิลิตร

4.3 Blocking buffer

TBST	100.0	มิลลิลิตร
Skim milk	1.0	กรัม

4.4 Nitro Blue Tetrazolium (NBT) solution

ละลาย NBT 10 มิลลิกรัม ใน แอลกอฮอล์ 95% 1 มิลลิกรัม จนหมดแล้วจึงเติม TBS (pH 9.6) จนครบ 10 มิลลิกรัม

4.5 5-Bromo-4-chloroindoyl phosphate (BCIP) solution

ละลาย BCIP 50 มิลลิกรัม ใน N,N-dimethyl formamide 10 มิลลิกรัม

4.6 2M MgCl₂ solution

MgCl ₂	4.07	กรัม
dH ₂ O	10.0	มิลลิกรัม

4.7 Reaction mixture

BCIP solution	0.1	มิลลิกรัม
NBT solution	1.0	มิลลิกรัม
TBS (pH 9.6)	9.0	มิลลิกรัม
2M MgCl ₂ solution	20.0	ไมโครลิตร

*เตรียมใหม่ก่อนใช้

5. การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

5.1 TBS (Tris-saline buffer)

50mM	Tris
150mM	NaCl

0.01% NaN₃

ปรับ pH ให้ได้ 7.4

5.2 TBST

TBS (pH 7.4)	100.0	มิลลิลิตร
Tween-20	0.05	มิลลิลิตร

5.3 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

5.4 Washing buffer (PBST)

PBS	1,000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

5.5 Phosphate buffer

1M K ₂ HPO ₄	80.2	มิลลิลิตร
1M KH ₂ PO ₄	19.8	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4

5.6 General extraction buffer (BIOREBA)

Tris base	0.24	กรัม
NaCl	0.8	กรัม
PVP	2.0	กรัม
Tween 20	0.05	กรัม
KCl	0.02	กรัม
NaN ₃	0.02	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4

5.7 DOA extraction buffer, pH 8.5

PVP	10.0	กรัม
SDS	3.0	กรัม
Triton X-100	5.0	มิลลิลิตร
Na ₂ SO ₄	4.0	กรัม
Na ₂ B ₄ O ₇	38.1	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 8.5-9.0

5.8 DOA extraction buffer, pH 7.5

0.02M	Tris base
0.2M	NaCl
0.4%	Na ₂ SO ₃

ปรับ pH ให้ได้ 7.5

5.10 Extraction buffer (DOA Extraction buffer, pH 5.6)

0.1M Citric acid

0.1M Sodium citrate

ปรับ pH 5.6



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวรุ่งนภา ทองเครื่อง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	13 มิถุนายน พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	ต. ท่าฉาง อ.ท่าฉาง จ. สุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (เกียรตินิยมอันดับสอง)
ตำแหน่งหน้าที่การงาน ปัจจุบัน	นักวิชาการ โรคพืชปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กลุ่มงานבקเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ผลงาน	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-