บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพืชมีบทบาทสำคัญโดยตรงอย่างหนึ่งต่อการผลิตทางการเกษตรทั้งที่ผลิตเพื่อการค้าและผลิตเพื่อบริโภคในครัวเรือน การผลิตพืชมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ เช่น โรคผลเน่าแบคทีเรีย (bacterial fruit blotch) ที่เกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, โรคใบจุดเหลี่ยม (angular leaf spot) ของพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) ที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเพาะปลูกพืช ทำให้ผลผลิตลดลงหรือมีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน จนบางครั้งไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ อีกทั้งการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกมีแนวโน้มต้องการใบรับรองการปลอดโรคพืชชนิดต่างๆ มากยิ่งขึ้นตามมาตรการการค้าระหว่างประเทศ ที่นำเอาส่วนของสุขภาพพืชและผลิตภัณฑ์เกษตรมาเป็นเงื่อนไขทดแทนมาตรการด้านภาษี ปัจจุบันประเทศไทยผลิตพืชตระกูลพริกและมะเขือเทศ (Solanaceae) และพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) ทั้งที่ใช้บริโภคในประเทศและการส่งออกต่างประเทศ ซึ่งการผลิตเพื่อการส่งออกสามารถทำรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นมูลค่าหลายร้อยล้านบาทต่อปี (เศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนตรงค่อนข้างยาว เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีมากกว่าหนึ่งเส้น ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต บางสปีชีส์สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B (Kwon et al., 2005) เรียกกลุ่มนี้ว่า fluorescent *Pseudomonas* เช่น *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. fluorescens, P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. agarici*, *P. talaasii*, *P. asplenii* และที่ไม่สามารถสร้างสารเรืองบนอาหาร KB ได้ เรียกว่า non-fluorescent *Pseudomonas* เช่น *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*, *P. avenae*, *P. cepacia*, *P. corrugata* (Todar, 2004) กลุ่มที่เป็นสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจที่หลากหลายต่างกันไปในแต่ละ pathovar ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *Pseudomonas sygingae* pv. *lachrymans* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมแตง, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* สาเหตุโรคใบไหม้ถั่ว, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ที่เข้าทำลายพืชไร่เศรษฐกิจหรือมีพืชอาศัยที่กว้างมาก ได้แก่ ข้าวฟ่าง, ข้าวสาลี, ถั่ว, ส้ม, lilac, stone fruit รวมไปถึง ธัญพืชอีกหลายชนิด (Grgurina et al., 2002) เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สาเหตุโรค brown rot ของหอมหัวใหญ่ในประเทศญี่ปุ่น (Hao and Xie, 2006) และจากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากพริกเป็นโรคในเมือง Yucatan ประเทศเม็กซิโก เมื่อทำการทดสอบความสามารถในทำให้เกิดโรค,

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ, การจัดจำแนกเพื่อระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rRNA gene พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* (Moguel-Salazar et al., 2007) และมีรายงานพบเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จากต้นกล้ายาสูบที่แสดงอาการใบจุดในประเทศจีน (Yu et al., 2008)

การตรวจวินิจฉัยสาเหตุโรคพืชที่ถูกต้องเป็นความจำเป็นเบื้องต้นสำหรับการควบคุมโรค การควบคุมโรคที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากขึ้นก็สามารถกำหนดโดยทันทีได้อย่างเป็นระบบ ในการจัดการโรคในแปลงปลูกเพื่อการส่งเสริมการผลิตแตงพริกและมะเขือเทศสำหรับบริโภคสดและผลิตเมล็ดพันธุ์ แต่ข้อมูลการศึกษาแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ในประเทศไทยยังมีจำกัด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคพืชในกลุ่มดังกล่าวจากตัวอย่างแตงพริกและมะเขือเทศเป็นโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และจากเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ซึ่งนำมาตรวจสอบสุขอนามัยโดยเทคนิค blotter test และนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆ เพื่อระบุชื่อชนิด (species) และนำไปใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคที่แม่นยำและรวดเร็ว

การผลิตแอนติซีรัมหรือแอนติบอดีแบบ polyclonal เป็นการผลิตที่จำเพาะต่ออิพิโทบ (epitope) ต่างๆ ของแอนติเจน (antigen) ที่สามารถใช้ได้กับ immunoassay ส่วนใหญ่ได้เกือบทุกรูปแบบ ซึ่งเป็นที่นิยมสำหรับการผลิตเพื่อการวิจัยหรือใช้สำหรับการเรียนการสอน เพราะสามารถทำได้ง่ายที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนที่บริสุทธิ์เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัม เพราะหากแอนติเจนมีการปนเปื้อนอาจก่อให้เกิดปัญหาในแง่ความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากนั้นก็จะเข้าสู่โปรแกรมการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง เมื่อครบโปรแกรมการฉีดกระตุ้นแล้วทำการเก็บเลือดมาตรวจสอบคุณภาพตามวิธีการมาตรฐาน ได้แก่ การหาค่า titer, การหาค่าความไว (sensitivity) และการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย จากรายงานกรณีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (ยุทธ และเพชรรัตน์, 2549) และการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคลำต้นเน่าข้าวโพด (อนุวัฒน์ และเพชรรัตน์, 2550) พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อเป้าหมายสูงและคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เพชรรัตน์และคณะ (2545) ได้นำเอาแอนติซีรัม Psy117 As. ที่จำเพาะกับเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* มาตรวจสอบตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผลสควอช ต้นกล้าแตงโม สควอช เมลอนและน้ำเต้า ที่เป็นโรคในสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิค indirect ELISA ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ซึ่งยืนยันผลการตรวจสอบด้วยรูปแบบแถบโปรตีนจาก whole cells โดยวิธี SDS-PAGE เนื่องจากในภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่สำคัญ มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่จากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งยังไม่ได้มีการศึกษาข้อมูลอย่างจริงจังถึงชนิดเชื้อ fluorescent *Pseudomonas* ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาปลูก และการตรวจสอบสถานการณ์ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในแปลงผลิตหรือในเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ ตลอดจนในพืชผักหรือไม้ดอกเศรษฐกิจอื่นๆ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคือรวบรวมไอโซเลตของเชื้อ fluorescent *Pseudomonas* และจำแนกระบุชนิดของเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปใช้จัดการโรคและการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่แม่นยำและรวดเร็วต่อไป

2. วัตถุประสงค์

จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ของพืชวงศ์แตง พริกและมะเขือเทศ และการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค

3. ขอบเขตของการวิจัย

1) สำรวจแปลงผลิตพันธุ์พืชวงศ์แตง พริกและมะเขือเทศ จากแปลงปรับปรุงพันธุ์เพื่อเกษตรยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและเก็บตัวอย่างต้นกล้าที่ได้ระหว่างการตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ที่ส่งมาตรวจหาเชื้อจากเมล็ดพันธุ์ ที่สาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเทคนิค blotter test หรือ grow out นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

2) ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชวงศ์แตง พริกและมะเขือเทศ ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่แยกบริสุทธิ์ได้ โดยวิธีการปลูกเชื้อลงบนต้นพืชทดสอบ แล้วเก็บไว้ในสภาพที่เหมาะสมกับการเกิดโรค สังเกตอาการของโรคและแยกเชื้อบริสุทธิ์กลับตามวิธีของ Koch's postulate

3) การจำแนกระบุชื่อจีนัส และสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในพืชวงศ์แตง พริกและมะเขือเทศ โดยการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยเน้นส่วน 16S rRNA gene

4) ผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมาย และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อเป้าหมาย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดหรือสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2) ได้ culture collection เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในพืชวงศ์แตง พริกและมะเขือเทศที่ผ่านการจำแนกอย่างเป็นระบบ จัดเก็บเป็น type strain สำหรับใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วด้วยเทคโนโลยีด้านดีเอ็นเอ หรือการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูป (detection kit) และ การนำไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค

3) ได้แอนติซีรัมที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชของแตง พริกและมะเขือเทศที่ยังไม่มีในสาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เช่น แอนติซีรัมต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* และแอนติซีรัมสำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแตง พริกและมะเขือเทศที่พบใหม่ เพื่อรองรับการให้บริการตรวจวินิจฉัยโรคพืช และตรวจรับรองสุขภาพเมล็ดพันธุ์ของสาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น