บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่มีรายงานแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่สามารถไฮโดรไลส์ arginine ได้ (arginine dihydrolase absent) จัดเป็นกลุ่มที่เป็นสาเหตุโรคพืช (phytopathogenic) ได้แก่ *P. syringae* และ *P. cichorii* กลุ่มที่ 2 สามารถไฮโดรไลส์ arginine ได้ (arginine dihydrolase present) จัดเป็นพวก saprophytic ได้แก่ *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* และ *P. aureofaciens* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มยังสร้างสารเรืองแสง (fluorescent pigments) ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B (KB) ซึ่งเป็นอาหารคัดเลือกกึ่งจำเพาะ เมื่อนำมาส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 365 นาโนเมตร สามารถตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แบ่งกลุ่มเชื้อที่ต้องการศึกษาออกจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non-fluorescent *Pseudomonas*

1. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas syringae*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pathovars มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB ที่เป็นสาเหตุโรคพืชมีรายงานความหลากหลายมากกว่า 50 pathovars (Goszczynska et al., 2000) เนื่องจากมีพืชอาศัยที่หลากหลายต่างกันไปในแต่ละ pathovar ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ, *Pseudomonas sygingae* pv. *lachrymans* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมแตง, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* สาเหตุโรคใบไหม้ถั่วแขก, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* เป็นสาเหตุโรคที่เข้าทำลายพืชไร่เศรษฐกิจหรือมีพืชอาศัยที่กว้างมาก ได้แก่ ข้าวฟ่าง, ข้าวสาลี, ถั่ว, ส้ม, lilac, stone fruit รวมไปถึง ธัญพืชอีกหลายชนิด

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.7-1.2 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 1.5-3 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB มีหลายสายพันธุ์ (strain) ที่สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อบน 2-4% sucrose medium, ไม่มีความสามารถในการย่อย gelatin ในบาง species หรือ strain, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 25-30 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 ^{0}ซ บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ , ทุกสายพันธุ์สามารถสร้าง hypersensitive reaction บนใบยาสูบ, มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 59-61 โมลเปอร์เซ็นต์, original strain แยกเชื้อได้จากต้น lilac (*Syringa vulgaris*)

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* เข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางมาก จึงทำให้พืชแสดงอาการของโรคที่หลากหลายตามชนิดและส่วนของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย เช่น อาการ cankers, diebacks, blossom, twig, leaf or kernel blights, leaf spots ตัวอย่างเช่น โรคใบจุดเหลี่ยมของแตงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ทำให้เกิดอาการของโรคบนส่วนของใบก่อน แล้วเข้าทำลายในส่วนผล

2. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas cichorii*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cichorii* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas cichorii*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cichorii*

คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.8 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 0.2-3.5 μm, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB ไม่สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อบน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 30 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 ^{0}ซ มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 59 โมลเปอร์เซ็นต์, original strain แยกเชื้อได้จาก *Cichorium intybus* และ *C. endivia*

3. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas aeruginosa*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 1.5-3.0 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella เพียง 1 เส้น, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เช่น สารในกลุ่มฟีนาซีน (soluble phenazine pigment), สร้างรงควัตถุไพโอไซยานิน (pyocyanin) ไม่สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อบน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตประมาณ 37 ^{0}ซ, สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่ 4 ^{0}ซ มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 67 โมลเปอร์เซ็นต์, ดำรงชีวิตอย่างอิสระอยู่ในที่ชื้น บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคกับพืช แมลง สัตว์ มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ก่อโรคกับคน *P. aeruginosa* มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunist) ที่ทำให้เกิดโรคในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันผิดปกติ และเกิดอาการรุนแรงกับคนไข้ที่มีแผลไฟไหม้ และคนไข้ที่สวนท่อปัสสาวะ สามารถแยกได้จากทั้งดินและน้ำ

4. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas putida*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas putida*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.7-1.1 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 2.0-4.0 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB ไม่สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ บน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตประมาณ 25-30 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 ^{0}ซ, บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ 4 ^{0}ซ หรือต่ำกว่า มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 60-63 โมลเปอร์เซ็นต์

5. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas fluorescens*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas fluorescens*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.7-0.8 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 2.3-2.8 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB, biotypes 1, 2 และ 4 สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ

บน 2-4% sucrose medium, ส่วน biotypes 3 ไม่สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ บน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตประมาณ 25-30 ^{0}ซ, สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่ 41 ^{0}ซ หรือต่ำกว่า มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 59.4-61.3 โมลเปอร์เซ็นต์

6. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas chlororaphis*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas chlororaphis* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas chlororaphis*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas chlororaphis* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.7-0.8 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 1.5-3.6 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB, สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เช่น สารในกลุ่มฟีนาซีน (soluble phenazine pigment), สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ บน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตประมาณ 30 ^{0}ซ, ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ, มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 63.5 โมลเปอร์เซ็นต์, แยกได้จากน้ำ

7. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aureofaciens*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aureofaciens* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Prokaryotae

Division Gracillicutes

Class Proteobacteria

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas aureofaciens*

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางเคมีในการระบุถึงระดับชนิดและสายพันธุ์ ตามหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Eighth edition) สำหรับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aureofaciens* คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, รูปร่างท่อน ขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.7-0.8 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 1.9-2.8 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีจำนวนมากกว่า 1 เส้นขึ้นไป, สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร KB, สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เช่น สารในกลุ่มฟีนาซีน (soluble phenazine pigment), สร้างเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ บน 2-4% sucrose medium, จัดเป็นพวก obligately aerobic, อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตประมาณ 30 ^{0}ซ, ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ, ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 ^{0}ซ, มีค่า G+C content ของ DNA อยู่ที่ประมาณ 63.6 โมลเปอร์เซ็นต์, แยกได้จากดินและน้ำ

8. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั่วไป

8.1 วิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม (Conventional identification methods)

8.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรีย (Morphology of bacteria colony)

ศึกษาลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญรวมกันเป็นกลุ่มจะมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ตั้งแต่ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง รูปแบบ (form) ส่วนเว้าส่วนโค้งของผิวหน้า (elevation) ขอบ (margin) ตลอดจนรงควัตถุ (pigment) สี และ กลิ่น (Janse, 2005)

8.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย (Morphology of bacterial cells)

แบ่งแบคทีเรียตามโครงสร้างของผนังเซลล์ ซึ่งสังเกตได้แตกต่างกันเมื่อผ่านการย้อมสี โดยลักษณะของการติดสี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ติดสีม่วงของ crystal violet เรียกว่า แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และกลุ่มที่ติดสีแดงของ safanin เรียกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-postive bacteria) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชส่วนมากมีรูปร่างแบบท่อน (rod) นอกจากนี้ ยังมีโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์แบคทีเรีย ที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย เช่น flagella, capsule และ endospore (Janse, 2005)

8.1.3 คุณสมบัติทางด้านกายภาพ (Physiological characteristics)

สภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ อากาศ แสง ความเป็นกรด-ด่าง ความต้องการแก๊สบางชนิด เป็นต้น สภาพทางกายภาพเหล่านี้ สามารถใช้จัดหมวดหมู่เชื้อแบคทีเรียได้ เช่น เชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเรียกว่า aerobic bacteria ถ้าไม่สามารถเจริญในสภาพที่มีออกซิเจน เรียกว่า anaerobic bacteria หรือถ้าเจริญ

ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน เรียกว่า facultative anaerobic bacteria หรือ ถ้าเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย เรียกว่า microaerobicphillic bacteria หรือถ้าดูจากอุณหภูมิสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ เจริญได้ดีในสภาพอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermopillic bacteria ถ้าเจริญได้ดีในสภาพอุณหภูมิปานกลาง เรียกว่า mesophillic bacteria และถ้าเจริญได้ดีในสภาพอุณหภูมิต่ำ เรียกว่า psychrophillic bacteria (Janse, 2005)

8.1.4 คุณสมบัติทางด้านชีวเคมี (Biochemical characteristics)

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีมีความจำเป็นในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย เพราะแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสารอาหารแตกต่างกัน การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด การเกิดแก๊ส และการเกิดสารบางชนิด เป็นต้น การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่มีความจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น การทดสอบ anaerobic growth (Oxidative/Fermentative test) สามารถแยกความแตกต่างระดับสกุลได้อย่างชัดเจน, การทดสอบการสร้างรงควัตถุสีเหลืองบนอาหาร YDC สามารถแยกความแตกต่างระดับสกุลระหว่างกลุ่ม anaerobic bacteria ที่สร้างรงควัตถุสีเหลือง เช่น *Pantoea* ซึ่งแยกออกจากกลุ่ม anaerobic bacteria ที่ไม่สร้างรงควัตถุสีเหลือง เช่น *Erwinia*, การทดสอบการสร้างสาร xanthomonadin เป็นคุณสมบัติที่พบเฉพาะกลุ่ม *Xanthomonas*, การทดสอบการสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระดับสกุลที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เช่น *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. fluorescens, P. aeruginosa* อีกทั้งการทดสอบ LOPAT เป็นการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ได้แก่ การสร้าง levan เมื่อเลี้ยงบนอาหาร nutrient sucrose agar (L) การทดสอบปฏิกิริยาออซิเดส (O) การทดสอบ pectolytic activity กับหัวมันฝรั่ง (P) การไฮโดรไลส์ arginine ให้เป็นแอมโมเนียในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนได้ (A) และการทดสอบ HR บนใบยาสูบ (T) ดังเช่นการศึกษาของ Gonzalez et al. (2003) ที่ได้อาศัยการทดสอบคุณสมบัติ LOPAT ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *P. viridiflava* ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนบริเวณ 16S rRNA ส่วน Olczak-Woltman et al. (2007) อาศัยคุณสมบัติ LOPAT ในการเปรียบเทียบเชื้อ *P. syringae* pv. *lacrymans* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของแตงที่รวบรวมได้ในประเทศโปแลนด์ ปี 2001-2002 จำนวน 25 ไอโซเลต เพื่อจำแนกร่วมกับการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP, ADSRRS และ PCR-MP

8.1.5 รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกันมีส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์แตกต่างกัน การนำเทคนิค SDS-PAGE มาตรวจสอบรูปแบบทางโมเลกุลโปรตีนที่แยกส่วนโดยอาศัยหลักการ gel electrophoresis ภายใต้สภาพที่ทำให้โมเลกุลโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ โมเลกุลของโปรตีนในสภาวะที่มี SDS เข้าไปจับเกาะจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง มีประจุรวมเป็นลบ และมีความยาวผันแปรตามน้ำหนักโมเลกุล เมื่อนำมาแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในตัวกลางเจล จะทำให้เกิดการแยกขนาดได้ และเคลื่อนที่ตามน้ำหนักโมเลกุล โดยขนาดโมเลกุลขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ เกิดเป็นรูปแบบของแถบโปรตีน หลังจากย้อมเจลด้วยสีที่จับกับโมเลกุลโปรตีน เช่น Coomassie Brillilant Blue R-250 เทคนิคนี้จึงสามารถใช้ศึกษาแบ่งกลุ่มเชื้อที่มีความเหมือนหรือต่างกันของรูปแบบของแถบโปรตีน อีกทั้งยังสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อได้ถึงระดับชนิด และสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ตัวอย่างการศึกษาของ Sazakli et al. (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Pseudomonas* species จำนวน 160 ไอโซเลต ด้วยรูปแบบโปรตีนทั้งหมด ร่วมกับการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD พบว่ารูปแบบโปรตีนและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นที่ได้มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ และผลการศึกษาของ Shanmugam et al. (2008) ได้ศึกษาถึงรูปแบบโปรตีนทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม florescent pseudomonads ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

8.2 วิธีการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุล (Molecular identification method)

8.2.1 เทคนิคกรดนิวคลีอิกไฮบริไดเซชั่น (nucleic acid hybridization)

อาศัยหลักการการเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ชนิดหนึ่งที่เป็นคู่สมกัน (complementary) กับดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายอีกชนิดหนึ่งที่นำมาผสมอยู่ในหลอดทดลองเดียวกัน โดยดีเอ็นเอถ้าเป็นชนิดเดียวกัน สายที่เข้าคู่กันได้ (hybridization) อย่างสมบูรณ์ เมื่อนำมาทดสอบการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอจากเชื้ออ้างอิงกับเชื้อที่ต้องการจำแนกจะมีกรรมวิธีในการประเมินระดับของการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะสามารถบ่งบอกระดับความเหมือนกันของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดได้อย่างชัดเจน

8.2.2 เทคนิคต่างๆ ที่มีพื้นฐานของหลักการ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และลำดับนิวคลีโอไทด์

หลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิคพื้นฐาน PCR มีขั้นตอนดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1) สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (primer ที่ใช้มีความแตกต่างกันในแต่ละเทคนิค)

3) ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนตัวกลางด้วยเทคนิค gel electrophoresis

4) การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปวิเคราะห์เพิ่มเติม ซึ่งแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์

4.1) การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยปัจจุบันนิยมตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี automated DNA sequencing ตามระบบ didooxy chain determination

4.2) การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีการต่างๆ เช่น เทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), เทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), เทคนิค Repetitive DNA PCR (rep-PCR) แล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม Numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS pc) ซึ่งผลออกมาในรูปแบบของ dendrogram หรือ phylogenetic tree

ก. การศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน ribosomal RNA gene ที่มีการศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียมีหลายส่วน เช่น บริเวณ 16S ribosomal RNA gene และบริเวณ internal transcribed spaces (ITS) ประกอบด้วยส่วนของ transfer RNA (tRNA) gene และ noncoding regions รวมอยู่ด้วย (ประภาษ, 2546) โดยที่ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ribosomal RNA gene สามารถบ่งชนิดของเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่ระดับวงศ์จนถึงระดับสายพันธุ์ ตัวอย่างการศึกษาของ Moguel-Salazar et al. (2007) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene จำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากพริกพันธุ์ Habanero ในเมือง Yucatan ประเทศเม็กซิโก ส่วน Naik et al. (2008) ได้ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent pseudomonads จำนวนทั้งหมด 95 ไอโซเลต พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มใหญ่จำนวน 41 ไอโซเลต มีความเหมือนกันกับ *P. monteilii* รองลงมาจำนวน 22 ไอโซเลต มีความเหมือนกับ *P. aeruginosa*, 19 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *P. plecoglossicida*, 6 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *P. fulva* และ จำนวน 1 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *P. fluorescens* เช่นเดียวกันกับ Kwon et al. (2005) ที่ศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent pseudomonads ที่แยกได้จากดินในประเทศเกาหลี จำนวน 160 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็น 10 กลุ่มใหญ่ๆ ด้วยกัน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 มิ.ย. 2556
เลขทะเบียน 208805
เลขเรียกหนังสือ

ข. การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

1) เทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)

เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งจีโนม เพื่อตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย arbitrary primer ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (oligonucleotide) โดยทั่วไปมีความยาว 8-10 นิวคลีโอไทด์ ต้องมีลำดับเบสแบบสุ่ม มีปริมาณ C+G 50% เป็นอย่างน้อย ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในสภาพที่มีเกลือสูง อุณหภูมิต่ำ (โดยทั่วไป 35-40 ^{0}ซ) วิธีนี้สามารถได้ขนาดดีเอ็นเอ 200-2,000 คู่เบส (Janse, 2005)

2) เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย อาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส (การขาดหาย การทดแทน การเติม และการเปลี่ยนแปลงขนาด) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่จุดตัดบนโมเลกุลของดีเอ็นเอ และทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดทำให้ polymorphism วิธีการตรวจสอบโดยนำดีเอ็นเอ (genomic DNA) มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ ลงบนแผ่นเมมเบรน เช่น nitrocellulose แล้วตรวจสอบด้วยการ hybridization กับ probe ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็นผลมาจากความหลากหลายของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ และความหลากหลายพันธุกรรม (Janssen et al., 1996)

3) เทคนิค Repetitive DNA PCR (rep-PCR)

เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดมีส่วนของ specific conserved repetitive sequence เป็นชุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ มีความคงตัวสูง พบหลายชุด และมีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของแบคทีเรีย บริเวณดังกล่าวไม่ใช่รหัสทางพันธุกรรม (non-coding region) บริเวณที่มีการศึกษามาก 3 regions คือ 1) repetitive extragenic palindromic (REP) พบระหว่างชุดของยีน extragenic มีขนาด 30-40 คู่เบส 2) enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) พบบนส่วน intergenic ภายในชุดยีนมีขนาด 124-127 คู่เบส และ 3) BOX element มีขนาด 154 คู่เบส (Versalovic et al., 1991; de Bruijn et al., 1996) ได้มีการใช้ประโยชน์จากบริเวณดังกล่าว โดยออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับส่วนของ repetitive sequence ทั้ง 3 ส่วน แล้วนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งแต่ละส่วนมีศักยภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ ดังเช่นการศึกษาของ Zhao et al. (2000) ศึกษาความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *maculicola* สาเหตุโรค bacterial leaf spot ของพืชจำพวกผักกาดหัว ด้วยเทคนิค rep-PCR (โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR) สำหรับ Dawson et al. (2002) ใช้เทคนิค rep-PCR (โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR และ ERIC) ใน

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent pseudomonads จำนวน 63 สายพันธุ์ โดยแยกออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่ เมื่อใช้ไพรเมอร์ BOXAIR และแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เมื่อใช้ไพรเมอร์ ERIC ส่วนการศึกษาของ Syrmis et al. (2004) ที่ศึกษาความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วยเทคนิค rep-PCR (โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC และ BOXAIR)

9. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยวิธีการทางซีรัมวิทยา

วิธีการทางซีรัมวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ (detection) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่ตรวจสอบได้เร็ว มีความจำเพาะเจาะจง และมีความแม่นยำน่าเชื่อถือ เหมาะกับงานวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียมีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนหลายชนิด เช่น ส่วน cell wall (O-Ag) ส่วนของ flagella (H-Ag) และส่วนของ capsule (K-Ag) ซึ่งมีหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบติดตาม แต่สำหรับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจะเน้นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) เช่น เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Janse, 2005) โดยหลักการของ ELISA จะอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจน-แอนติซีรัมคอมเพล็กซ์ (antiserum-antigen complex) แล้วตรวจวัดสัญญาณจากปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติซีรัม

10. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* โดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน (polyphasic taxonomy)

ระบบการจัดจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในปัจจุบันเป็นระบบการจัดจำแนกแบบผสมผสาน ที่เรียกว่า polyphasic taxonomy เป็นการอาศัยคุณสมบัติด้าน phenotypic และ genotypic เข้าด้วยกัน เนื่องจากแต่ละคุณสมบัติมีข้อเด่น ข้อจำกัด และประสิทธิภาพการจำแนกในระดับต่างๆ ตั้งแต่วงศ์ถึงระดับต่ำกว่าสายพันธุ์ได้แตกต่างกัน ดังเช่นรายงานของ Cottyn et al. (2000) ได้อาศัยคุณสมบัติ phenotypic, FAME analysis, การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™, รูปแบบโปรตีนทั้งหมด (SDS-PAGE) และ rep-PCR (โดยใช้ BOXAIR primer) ในการจำแนกประชากรเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าว ส่วนการศึกษาของ Zhao et al. (2000) ที่อาศัยการทดสอบคุณสมบัติ LOPAT, การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™, Coronatine production, rep-PCR (โดยใช้ REP primers) ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *maculicola*