

บทที่ 4

ผลการวิจัย

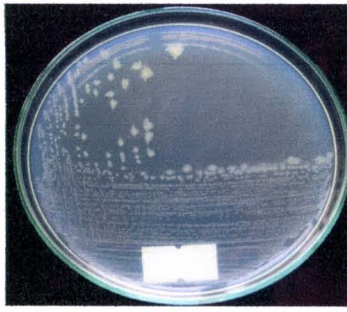
1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas*

1.1 ตัวอย่างจากพืชเป็นโรค

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากพืชเป็นโรค จำนวน 81 ไอโซเลต แบ่งตามสีของ pigments ที่เชื้อสร้างขึ้นได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ไม่สร้าง pigments (ภาพที่ 2) จำนวน 19 ไอโซเลต โดยแยกจากเมลอน คือ MeFS036, MeFS037 จากสควอช คือ SqFS005 จากพริก คือ PeFS008, PeFS009, PeFS010, PeFS011 จากมะเขือเทศ คือ ToFS001 จากถั่วเขียว คือ CeFL001 จากผักชี คือ CorFB001 จากกล้วยไม้ คือ OrFL001 จากดิน คือ SoilF1, SoilF2, SoilF3, SoilF4, SoilF5, SoilF6, SoilF7 และ SoilF8 2) กลุ่มที่สร้าง pigments สีน้ำตาล (ภาพที่ 3 A) จำนวน 66 ไอโซเลต โดยแยกจากเมลอน คือ MeFS001, MeFS002, MeFS003, MeFS004, MeFS005, MeFS006, MeFS007, MeFS008, MeFS009, MeFS010, MeFS011, MeFS012, MeFS013, MeFS014, MeFS015, MeFS016, MeFS017, MeFS018, MeFS019, MeFS020, MeFS021, MeFS022, MeFS023, MeFS024, MeFS025, MeFS026, MeFS027, MeFS028, MeFS029, MeFS033, MeFS034, MeFS035 แยกจากสควอช คือ SqFS001, SqFS002, SqFS003, SqFS004, SqFS006, SqFS007, SqFS008, SqFS009, SqFS010, SqFS011, SqFS012 แยกจากแตงโม คือ WMFB001, WMFL001 แยกจากแตงกวา คือ CuFS001 แยกจากน้ำเต้า GuFF001 แยกจากพริก คือ PeFS001, PeFS002, PeFS003, PeFS004, PeFS005, PeFS006, PeFS007, PeFL001, PeFL002 แยกจากมะเขือเทศ คือ AR-TS001, AR-TS002, AR-TS003, AR-TS004, ToFF001, ToFF002, ToFF003, ToFF004, ToFB001 และแยกจากข้าวโพด คือ ComFS001 3) กลุ่มที่สร้าง pigments สีเขียว (ภาพที่ 3 B) จำนวน 4 ไอโซเลต โดยแยกได้จากเมลอน คือ MeFS030, MeFS031, MeFS032 และจากพริก คือ PeFP001 โดยพบว่าทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB ในระยะแรกโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีม ชุ่ม มีกลิ่นเหม็น เมื่อเชื้อเริ่มแก่ลักษณะโคโลนีมีลักษณะคล้ายรูปดา มักเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นสีน้ำตาลหรือสีเขียว และพบการสร้างสารเรืองแสงสีเหลืองปนเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB (ภาพที่ 4 A) หรือการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร (ภาพที่ 4 B)



unknown # 29 (Pe)

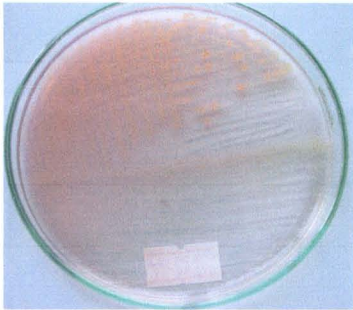


SoilF1

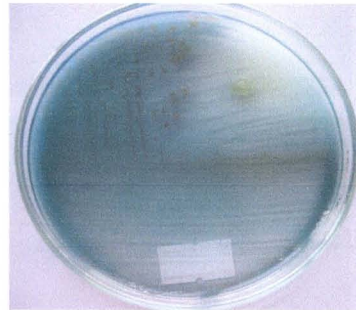


CorFB001

ภาพที่ 2 ลักษณะ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB แต่ไม่สร้าง pigments บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA



ภาพ A



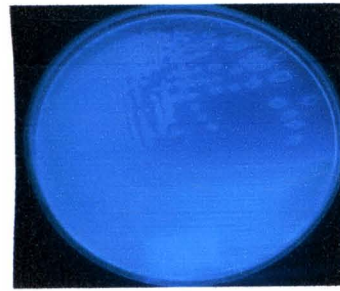
ภาพ B



ภาพที่ 3 การสร้าง pigments เรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่สร้าง pigments สีน้ำตาล (A) และที่สร้าง pigments สีเขียวปนน้ำเงิน (B)



ภาพ A

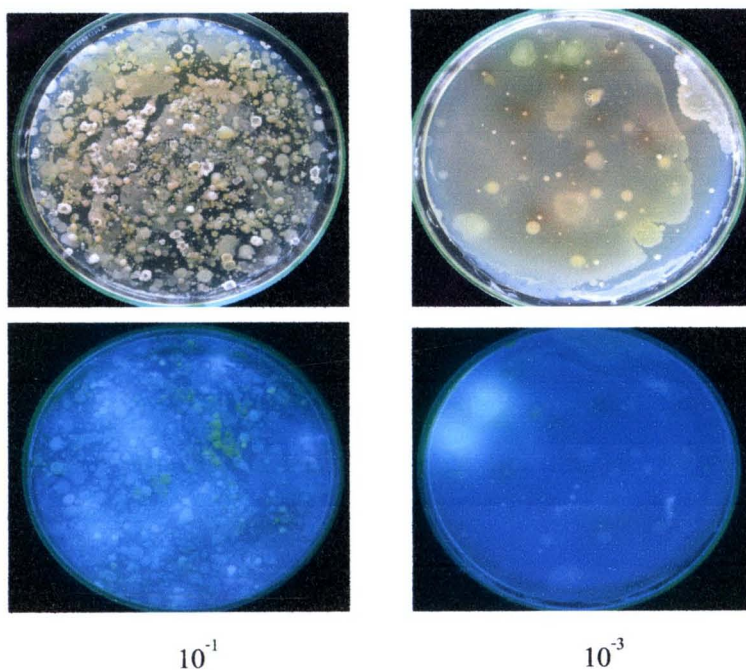


ภาพ B

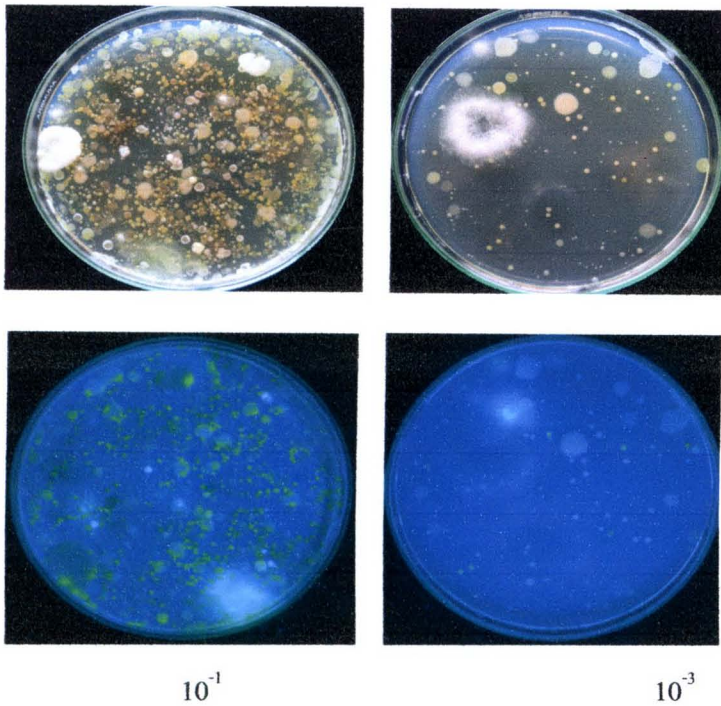
ภาพที่ 4 ลักษณะ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่สร้างสารเรืองแสง สีเหลืองปนเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB (A) และการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจดู ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร (B)

1.2 ตัวอย่างจากดินรอบรากพืชและวัสดุเพาะผสมเกลบดำ

จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินทั้ง 2 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และเป็น fluorescent *Pseudomonas* ที่ไม่สร้าง pigments บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ดังภาพที่ 5 และ ภาพที่ 6



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืช จากการทำ 10- fold serial dilution ที่ 10^{-1} และ 10^{-3} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB


 10^{-1}
 10^{-3}

ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากดินผสม
วัสดุเพาะ จากการทำ 10- fold serial dilution ที่ 10^{-1} และ 10^{-3} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* จำนวน 81 ไอโซเลต กับดินแดงกวาง เมลอน สควอช แดงโม น้ำเต้า ข้าวโพด พริก มะเขือเทศ คื่นช่าย ผักชีและกล้วยไม้ โดย ที่ 2 วัน หลังปลูกเชื้อพบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลต มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ โดยสังเกตได้อาการเนื้อเยื่อตาย มีจุดช้ำน้ำ แต่ไม่เด่นชัดมาก และ ที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อพบว่าทุกไอโซเลตทำให้ใบเลี้ยงแดงกวาง เมลอน สควอช แดงโม และน้ำเต้า แสดงอาการเหลืองซีดและเหี่ยว และอาการเริ่มลุกลามไปใบจริง ซึ่งแตกต่างจากการเกิด Hypersensitive response (HR) พืชจะแสดงอาการเหมือนเป็นโรคในช่วง 2 วันแรก หลังจากนั้นจะไม่ลุกลาม จนในที่สุดพืชทดสอบกลับมาเป็นปกติ และเมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ ดังภาพที่ 7-10 เมื่อทำการแยกเชื้อจากส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคพบว่าได้เชื้อเหมือนเดิม



cucumber



water melon



squash



melon



gourd

ภาพที่ 7 อาการของโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *fluorescent Pseudomonas* บนใบพืช
พืชวงศ์แตง



corn

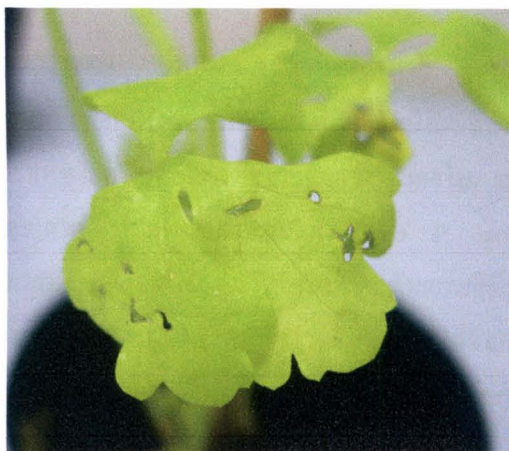


pepper



tomato

ภาพที่ 8 อาการของโรคที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *fluorescent Pseudomonas* บนใบ
ข้าวโพด พริกและมะเขือเทศ



ภาพที่ 9 อาการของโรคที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *fluorescent Pseudomonas* บนใบคื่นฉ่าย และผักชีหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 5 วัน



ภาพที่ 10 อาการของโรคที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *fluorescent Pseudomonas* บนใบกล้วยไม้หลังการปลูกเชื้อไปแล้ว 5 และ 14 วัน ตามลำดับ

3. การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA

แอนติซีรัม AR-TS003 As. ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 ซึ่งเป็นแอนติเจนเป้าหมาย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ที่มีโคโลนีสีเหลือง ส่วนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* สาเหตุโรคพืชที่แยกได้จากแดงกวา, แดงโม, เมลอน, สควอช, น้ำเต้า, พริกและมะเขือเทศ ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีววิทยาใกล้เคียงกับเชื้อ *P. aeruginosa* AR-TS003 จำนวน 70 ไอโซเลต พบความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาใกล้ชิดกับแอนติซีรัมที่ผลิตได้เป็นอย่างมาก ส่วนไอโซเลตเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มโคโลนีสีขาวครีมที่ยังไม่ได้จำแนก พบความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาในระดับปานกลาง (moderately related) จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ SqFS005, ToFS001, CeFL001, PeFS008, PeFS009, PeFS010, PeFS011, SoilF2, SoilF6 และ SoilF8 อย่างไรก็ตาม แอนติซีรัมที่ได้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) เล็กน้อยกับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ MeFS036, MeFS037, CorFB001, OrFL001, SoilF1, SoilF3, SoilF4, SoilF5 และ SoilF7 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า ELISA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 โดยเทคนิค indirect ELISA

No.	Cultures	Gram reaction	ELISA value
1	MeFS001	-	1.858
2	MeFS002	-	1.555
3	MeFS003	-	1.694
4	MeFS004	-	1.861
5	MeFS005	-	1.661
6	MeFS006	-	1.766
7	MeFS007	-	1.626
8	MeFS008	-	1.915
9	MeFS009	-	1.594
10	MeFS010	-	1.813
11	MeFS011	-	1.647
12	MeFS012	-	1.769
13	MeFS013	-	1.708
14	MeFS014	-	1.665
15	MeFS015	-	1.555
16	MeFS016	-	1.810
17	MeFS017	-	1.391
18	MeFS018	-	1.770
19	MeFS019	-	1.723
20	MeFS020	-	1.789
21	MeFS021	-	1.700
22	MeFS022	-	0.847
23	MeFS023	-	1.408
24	MeFS024	-	1.713
25	MeFS025	-	1.589

ตารางที่ 1 ค่า ELISA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 โดยเทคนิค indirect ELISA (ต่อ)

No.	Cultures	Gram reaction	ELISA value
26	MeFS026	-	1.559
27	MeFS027	-	1.747
28	MeFS028	-	1.560
29	MeFS029	-	0.983
30	MeFS030	-	1.784
31	MeFS031	-	1.107
32	MeFS032	-	1.120
33	MeFS033	-	1.945
34	MeFS034	-	1.523
35	MeFS035	-	0.812
36	SqFS001	-	1.821
37	SqFS002	-	1.808
38	SqFS003	-	1.851
39	SqFS004	-	1.151
40	SqFS006	-	1.773
41	SqFS007	-	1.739
42	SqFS008	-	1.478
43	SqFS009	-	1.776
44	SqFS010	-	1.815
45	SqFS011	-	1.935
46	SqFS012	-	1.447
47	WMFB001	-	1.551
48	WMFL001	-	1.455
49	CuFS001	-	1.803
50	GuFF001	-	1.830

ตารางที่ 1 ค่า ELISA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 โดยเทคนิค indirect ELISA (ต่อ)

No.	Cultures	Gram reaction	ELISA value
51	PeFS001	-	0.426
52	PeFS002	-	1.380
53	PeFS003	-	1.441
54	PeFS004	-	1.380
55	PeFS005	-	1.512
56	PeFS006	-	1.498
57	PeFS007	-	1.458
58	PeFP001	-	0.501
59	PeFL001	-	0.545
60	PeFL002	-	1.402
61	AR-TS001	-	1.815
62	AR-TS002	-	1.496
63	AR-TS003	-	1.711
64	AR-TS004	-	1.776
65	ToFF001	-	1.450
66	ToFF002	-	1.427
67	ToFF003	-	1.411
68	ToFF004	-	1.437
69	ToFB001	-	0.645
70	CornFS001	-	1.682
71	SqFS005	-	1.500
72	ToFS001	-	1.102
73	PeFS011	-	1.018
74	PeFS009	-	0.925
75	PeFS008	-	0.895

ตารางที่ 1 ค่า ELISA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรั่ม *P. aeruginosa* AR-TS003 โดยเทคนิค indirect ELISA (ต่อ)

No.	Cultures	Gram reaction	ELISA value
76	PeFS010	-	0.525
77	MeFS036	-	0.115
78	MeFS037	-	0.113
79	CorFB001	-	0.255
80	CeFL001	-	0.413
81	OrFL001	-	0.214
82	SoilF1	-	0.395
83	SoilF2	-	0.745
84	SoilF3	-	0.220
85	SoilF4	-	0.279
86	SoilF5	-	0.299
87	SoilF6	-	0.507
88	SoilF7	-	0.217
89	SoilF8	-	1.224
90	Negative control	-	-0.003
91	Positive control	-	1.469

หมายเหตุ : ระดับความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา

1. มีความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาสูงกับแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ (closely serological relationship)
ELISA value อยู่ระหว่าง 0.745-1.945
2. มีความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยานกลางกับแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ (moderately serological relationship) ELISA value อยู่ระหว่าง 0.413-0.645
3. มีความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาน้อยกับแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ (weakly serological relationship)
ELISA value อยู่ระหว่าง 0.113-0.395

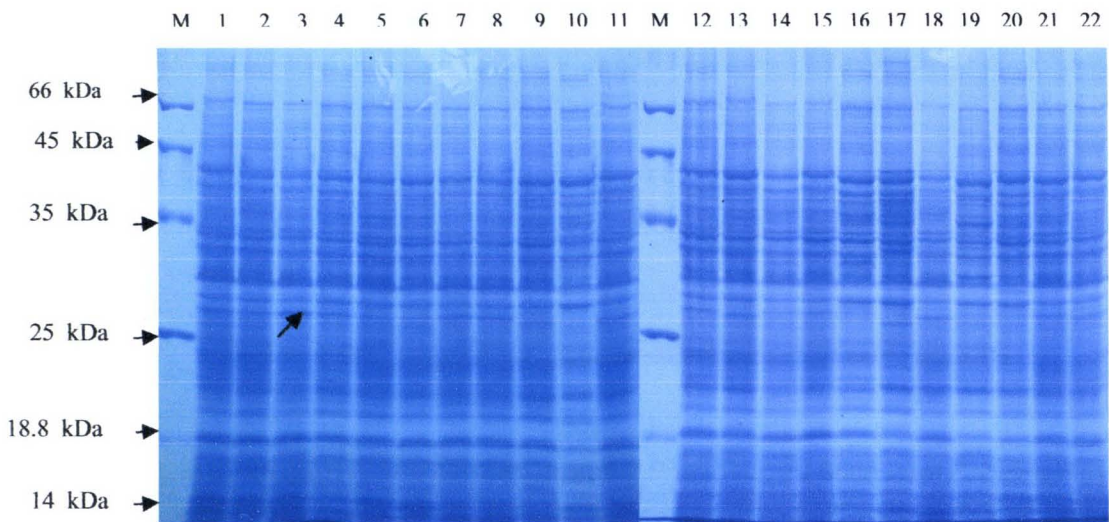
4. การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

รูปแบบของแถบโปรตีนจากเซลล์ เมื่อตรวจด้วยเทคนิค SDS-PAGE สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการจัดแบ่งกลุ่มโดยใช้ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา กับ AR-TS003 As. สีและความเข้มของ fluorescent pigment โดยกลุ่มที่ 1 มีรูปแบบของแถบโปรตีนเหมือนเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ทั้งที่สร้าง fluorescent pigments สีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มี 26 ไอโซเลต ได้แก่ SqFS001, SqFS011, MeFS001, MeFS022, MeFS034, MeFS035, WMFB001, WMFL001, CuFS001, CuFS002, GuFS001, AR-TS001, ToFB001, ToFF001, PeFL001, PeFS001, PeFS002, PeFL002, PeFP002, CornFS001, MeFS024, MeFS025, MeFS027, SqFS005, MeFS017, MeFS019 ที่มีความเข้มของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 27 kDa และอีก 4 ไอโซเลต ที่สร้าง fluorescent pigments สีเขียวปนน้ำเงินบนอาหาร NA ได้แก่ PeFP001, MeFS030, MeFS031, MeFS032 ที่ไม่พบความเข้มของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 27 kDa (ภาพที่ 11-12) ส่วนกลุ่มที่ 2 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม unknown ที่ไม่สร้าง fluorescent pigments บนอาหาร NA จำนวน 20 ไอโซเลต พบว่ามีรูปแบบแถบของโปรตีนที่แตกต่างออกไปจากเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ในระดับที่น่าจะเป็นเชื้อต่างชนิดกัน ดังภาพที่ 13

เมื่อนำแถบโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียข้างต้นทั้ง 2 กลุ่ม จำนวน 50 ไอโซเลต มาวิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 Dendrogram ที่ได้จากรูปแบบของแถบโปรตีน สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 (ภาพที่ 14) ออกจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่มีความสัมพันธ์แตกต่างออกไปได้อย่างชัดเจน สามารถจัดแบ่งเชื้อแบคทีเรียได้ดังนี้

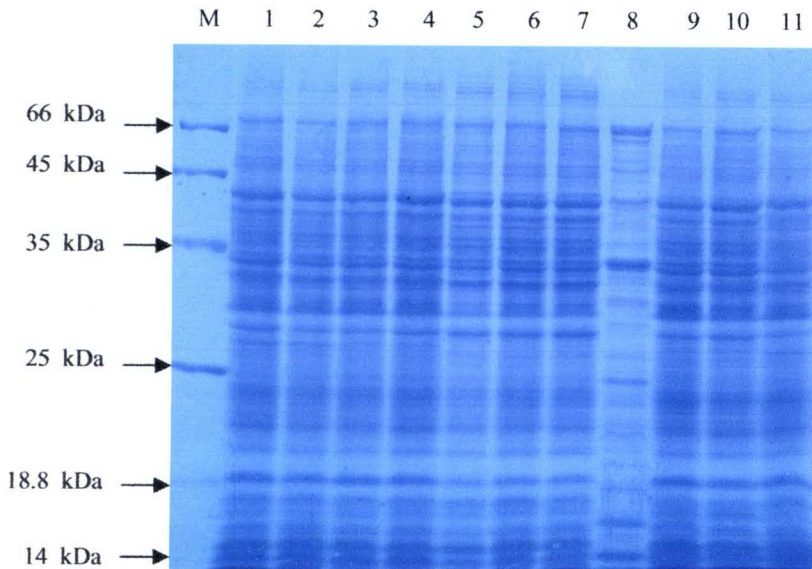
1) จัดแบ่งเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จำนวน 4 กลุ่มย่อย ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 1.00 โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย SqFS001, SqFS011, MeFS011, MeFS001, MeFS022, MeFS034, MeFS035, WMFB001, WMFL001, CuFS001, GuFS001, AR-TS001, MeFS019, ToFB001, ToFF001, MeFS017, PeFL001, PeFS002, PeFP002 กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย PeFS001, PeFP001, PeFL002 กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย CornFS001, MeFS024, MeFS025, MeFS027 กลุ่มย่อยที่ 4 ประกอบด้วย MeFS031, MeFS031, MeFS032

2) จัดแบ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่มีความสัมพันธ์แตกต่างออกไปอย่างชัดเจนกับเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 2 กลุ่มย่อย ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.28 โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย ToFS001, MeFS037, SoilF6, SoilF7, SoilF8, SoilF8, SoilF1, SoilF5, SoilF2, SoilF3, SoilF4, CorFB001, CeFL001, PeFS008, PeFS011, MeFS036, PeFS010, PeFS009, PeFS008, SqFS005 กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย OrFL001



ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 (lane 11 และ lane 22) เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์
lane M : protein size markers แสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ไว้ด้านซ้าย

lane 1 : SqFS001 lane 2 : SqFS011 lane 3 : MeFS001 lane 4 : MeFS022
lane 5 : MeFS034 lane 6 : MeFS035 lane 7 : WMFB001 lane 8 : WMFL001
lane 9 : CuFS001 lane 10 : CuFS002 lane 12 : GuFF001 lane 13 : AR-TS001
lane 14 : ToFB001 lane 15 : ToFF001 lane 16 : PeFL001 lane 17 : PeFS001
lane 18 : PeFS002 lane 19 : PeFP001 lane 20 : PeFL002 lane 21 : PeFP002



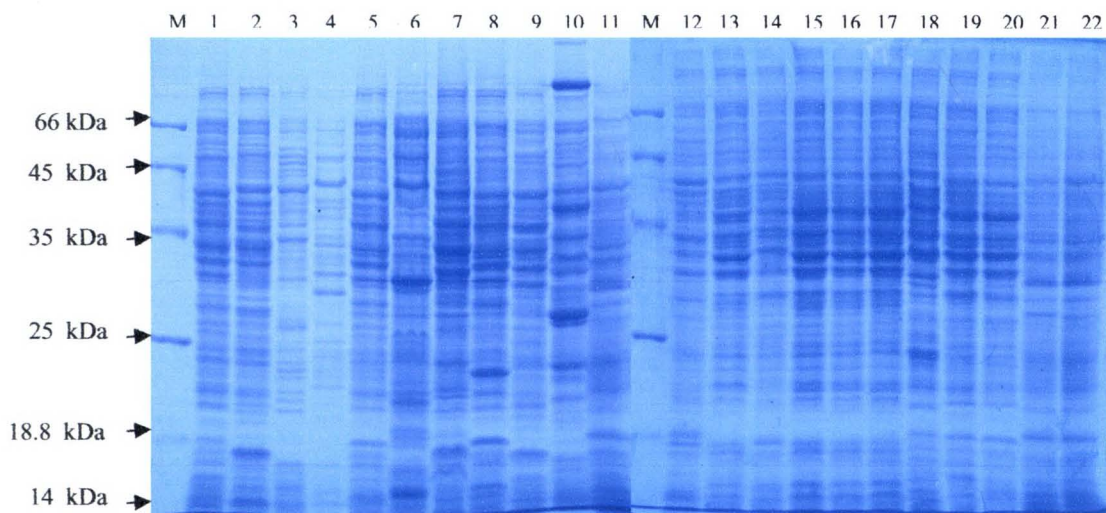
ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 (lane 11) เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์

lane M : protein size markers แสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ไว้ด้านซ้าย

lane 1 : CornFS001 lane 2 : MeFS024 lane 3 : MeFS025 lane 4 : MeFS027

lane 5 : MeFS030 lane 6 : MeFS031 lane 7 : MeFS032 lane 8 : SqFS005

lane 9 : MeFS017 lane 10 : MeFS019



ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-T 003 (lane 11 และ lane 22) เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์
lane M : protein size markers แสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ไว้ด้านซ้าย

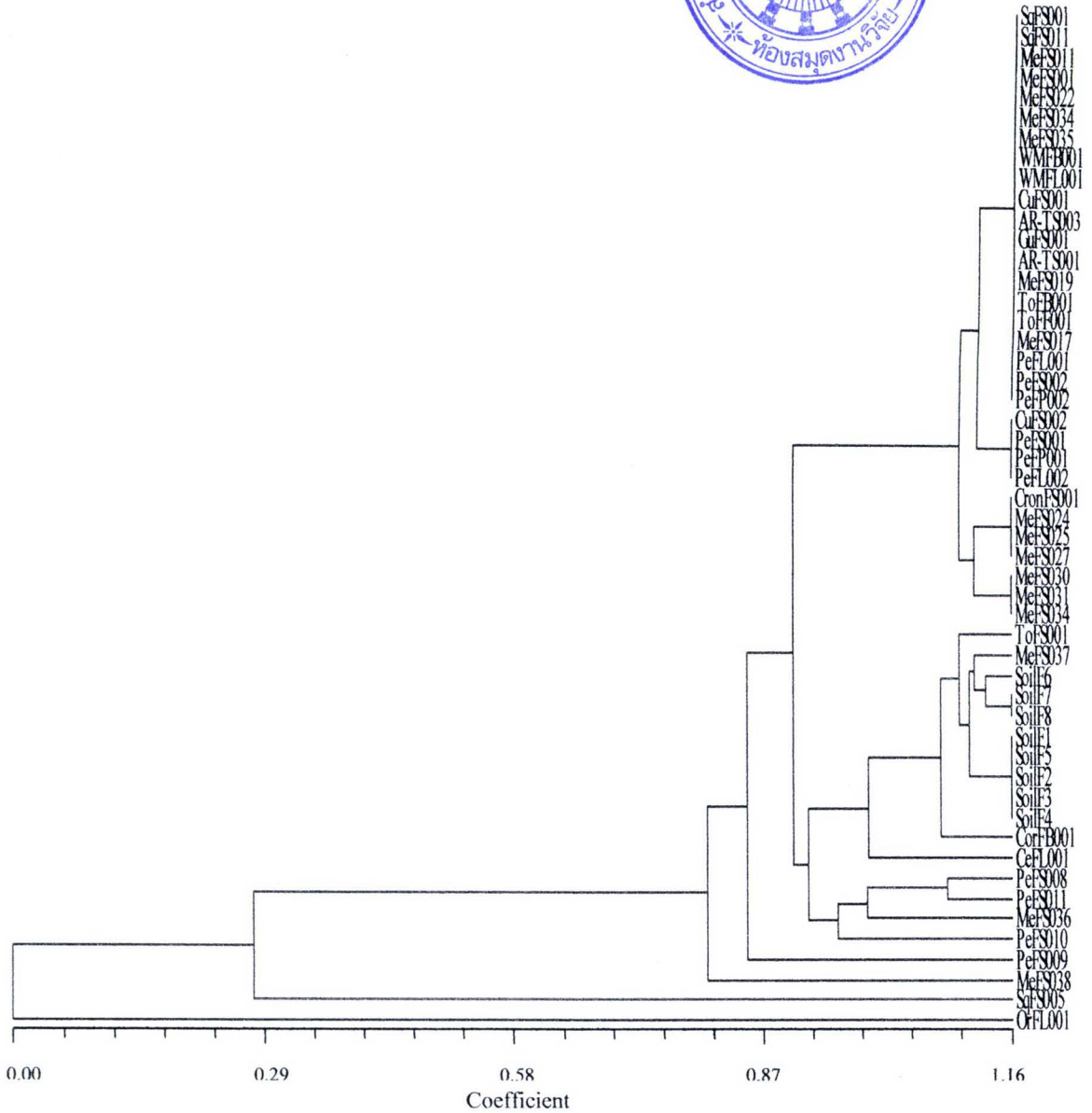
lane 1 : ToFS001 lane 2 : CorFB001 lane 3 : CeFL001 lane 4 : OrFL001

lane 5 : PeFS008 lane 6 : PeFS009 lane 7 : PeFS010 lane 8 : PeFS011

lane 9 : MeFS036 lane 10 : MeFS038 lane 12 : MeFS037 lane 13 : SoilF1

lane 14 : SoilF2 lane 15 : SoilF3 lane 16 : SoilF4 lane 17 : SoilF5

lane 18 : SoilF6 lane 19 : SoilF7 lane 20 : SoilF8 lane 21 : MeFS001



ภาพที่ 14 Dendrogram ที่ได้จากรูปแบบโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่จัดกลุ่มความสัมพันธ์กับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ที่วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0

5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

LOPAT test เป็นการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ได้แก่ การสร้าง levan เมื่อเลี้ยงบนอาหาร nutrient sucrose agar (L) ภาพที่ 15 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (O) ภาพที่ 16 การทดสอบ pectolytic activity กับหัวมันฝรั่ง (P) ภาพที่ 17 การไฮโดรไลส์ arginine ให้เป็นแอมโมเนียในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนได้ (A) ภาพที่ 18 การทดสอบ HR บนใบยาสูบ (T) ภาพที่ 19 จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ทั้ง 89 ไอโซเลต ออกเป็น 6 กลุ่ม (ตารางที่ 2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 73 ไอโซเลต ที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *P. aeruginosa* (LOPAT -++++)

กลุ่มที่ 2 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005, PeFS009 และ CeFL001 (LOPAT +----)

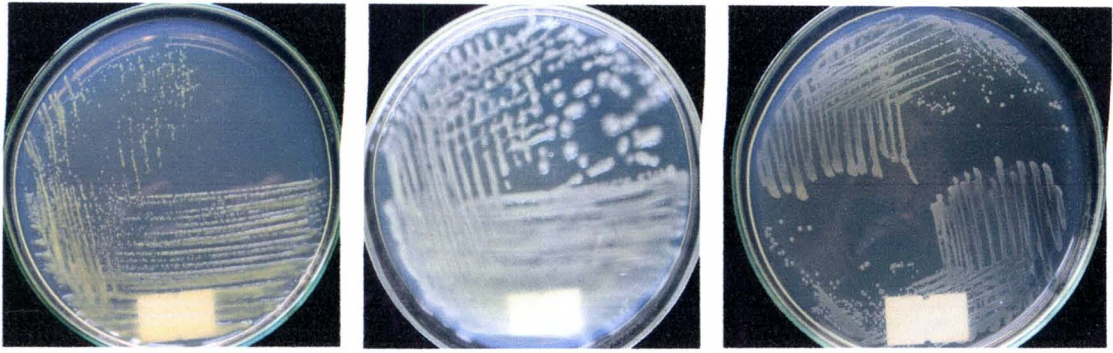
กลุ่มที่ 3 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CorFB001, ToFS001, PeFS008, SoilF1, SoilF2,

SoilF3, SoilF4, SoilF5, SoilF7 และ SoilF8 (LOPAT -++-)

กลุ่มที่ 4 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SoilF6 (LOPAT ---+-)

กลุ่มที่ 5 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PeFS010 (LOPAT +++++)

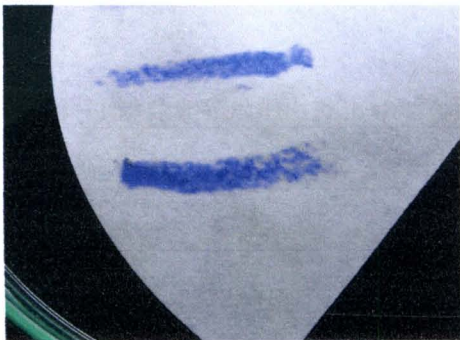
กลุ่มที่ 6 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต OrFL001 (LOPAT +----)



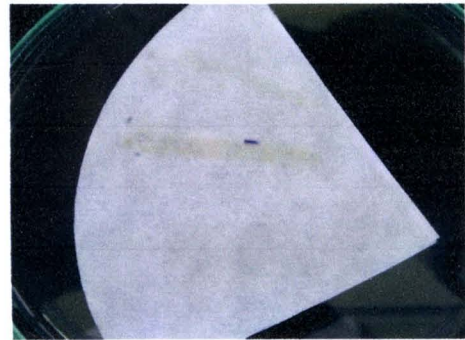
Aac – negative control

Xcv and Ecc - levan positive

ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง levan ซึ่งมีลักษณะโคโลนีหนูน และเมื่อเคี้ยวเปรียบเทียบกับ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) ที่ไม่สร้าง levan บนอาหาร NSA

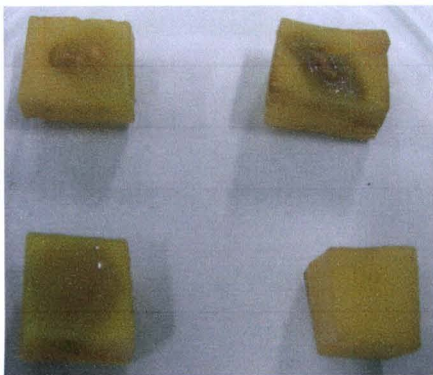


oxidase +

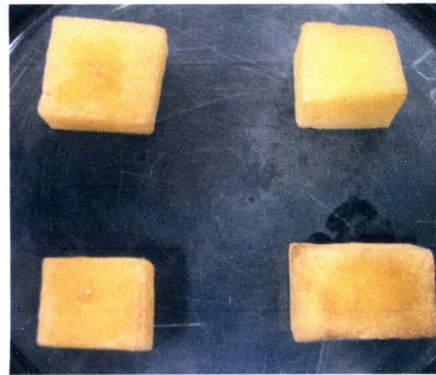


oxidase -

ภาพที่ 16 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส



pectolytic activity +

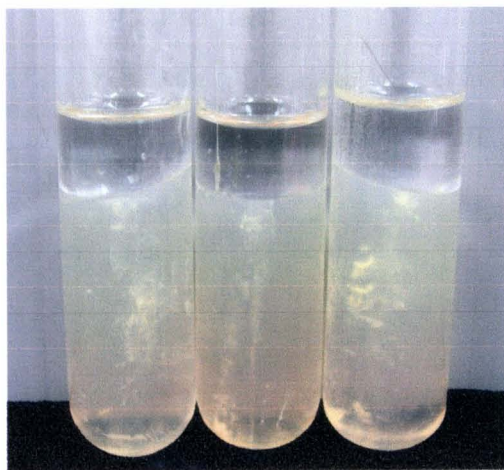


pectolytic activity -

ภาพที่ 17 แสดงการทดสอบการเน่ากับไขมันฝรั่ง



arginine hydrolase activity +



arginine hydrolase activity -

ภาพที่ 18 แสดงการทดสอบการไฮโดรไลส arginine



no tobacco HR



tobacco HR



disease

ภาพที่ 19 แสดงการทดสอบ HR กับใบยาสูบ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas*

No.	code	Catalase	LOPAT test				
			Levan	Oxidase	Pectolytic	Arginine	Tobacco
					Activity	dihydrolase	HR
1	MeFS001	+	-	+	+	+	-
2	MeFS002	+	-	+	+	+	-
3	MeFS003	+	-	+	+	+	-
4	MeFS004	+	-	+	+	+	-
5	MeFS005	+	-	+	+	+	-
6	MeFS006	+	-	+	+	+	-
7	MeFS007	+	-	+	+	+	-
8	MeFS008	+	-	+	+	+	-
9	MeFS009	+	-	+	+	+	-
10	MeFS010	+	-	+	+	+	-
11	MeFS011	+	-	+	+	+	-
12	MeFS012	+	-	+	+	+	-
13	MeFS013	+	-	+	+	+	-
14	MeFS014	+	-	+	+	+	-
15	MeFS015	+	-	+	+	+	-
16	MeFS016	+	-	+	+	+	-
17	MeFS017	+	-	+	+	+	-
18	MeFS018	+	-	+	+	+	-
19	MeFS019	+	-	+	+	+	-
20	MeFS020	+	-	+	+	+	-
21	MeFS021	+	-	+	+	+	-
22	MeFS022	+	-	+	+	+	-
23	MeFS023	+	-	+	+	+	-
24	MeFS024	+	-	+	+	+	-
25	MeFS025	+	-	+	+	+	-

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* (ต่อ)

No.	code	Catalase	LOPAT test				
			Levan	Oxidase	Pectolytic	Arginine	Tobacco
					Activity	dihydrolase	HR
26	MeFS026	+	-	+	+	+	-
27	MeFS027	+	-	+	+	+	-
28	MeFS028	+	-	+	+	+	-
29	MeFS029	+	-	+	+	+	-
30	MeFS030	+	-	+	+	+	-
31	MeFS031	+	-	+	+	+	-
32	MeFS032	+	-	+	+	+	-
33	MeFS033	+	-	+	+	+	-
34	MeFS034	+	-	+	+	+	-
35	MeFS035	+	-	+	+	+	-
36	SqFS001	+	-	+	+	+	-
37	SqFS002	+	-	+	+	+	-
38	SqFS003	+	-	+	+	+	-
39	SqFS004	+	-	+	+	+	-
40	SqFS006	+	-	+	+	+	-
41	SqFS007	+	-	+	+	+	-
42	SqFS008	+	-	+	+	+	-
43	SqFS009	+	-	+	+	+	-
44	SqFS010	+	-	+	+	+	-
45	SqFS011	+	-	+	+	+	-
46	SqFS012	+	-	+	+	+	-
47	WMFB001	+	-	+	+	+	-
48	WMFL001	+	-	+	+	+	-
49	CuFS001	+	-	+	+	+	-
50	GuFF001	+	-	+	+	+	-

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* (ต่อ)

No.	code	Catalase	LOPAT test				
			Levan	Oxidase	Pectolytic	Arginine	Tobacco
					Activity	dihydrolase	HR
51	PeFP001	+	-	+	+	+	-
52	PeFS001	+	-	+	+	+	-
53	PeFS002	+	-	+	+	+	-
54	PeFS003	+	-	+	+	+	-
55	PeFS004	+	-	+	+	+	-
56	PeFS005	+	-	+	+	+	-
57	PeFS006	+	-	+	+	+	-
58	PeFS007	+	-	+	+	+	-
59	Pe FL001	+	-	+	+	+	-
60	PeFL002	+	-	+	+	+	-
61	AR-TS001	+	-	+	+	+	-
62	AR-TS002	+	-	+	+	+	-
63	AR-TS003	+	-	+	+	+	-
64	AR-TS004	+	-	+	+	+	-
65	ToFF001	+	-	+	+	+	-
66	ToFF002	+	-	+	+	+	-
67	ToFF003	+	-	+	+	+	-
68	ToFF004	+	-	+	+	+	-
69	ToFB001	+	-	+	+	+	-
70	CornFS001	+	-	+	+	+	-
71	MeFS036	+	-	+	+	+	-
72	MeFS037	+	-	+	+	+	-
73	PeFS011	+	-	+	+	+	-
74	SqFS005	+	-	+	-	-	-
75	PeFS009	+	-	+	-	-	-

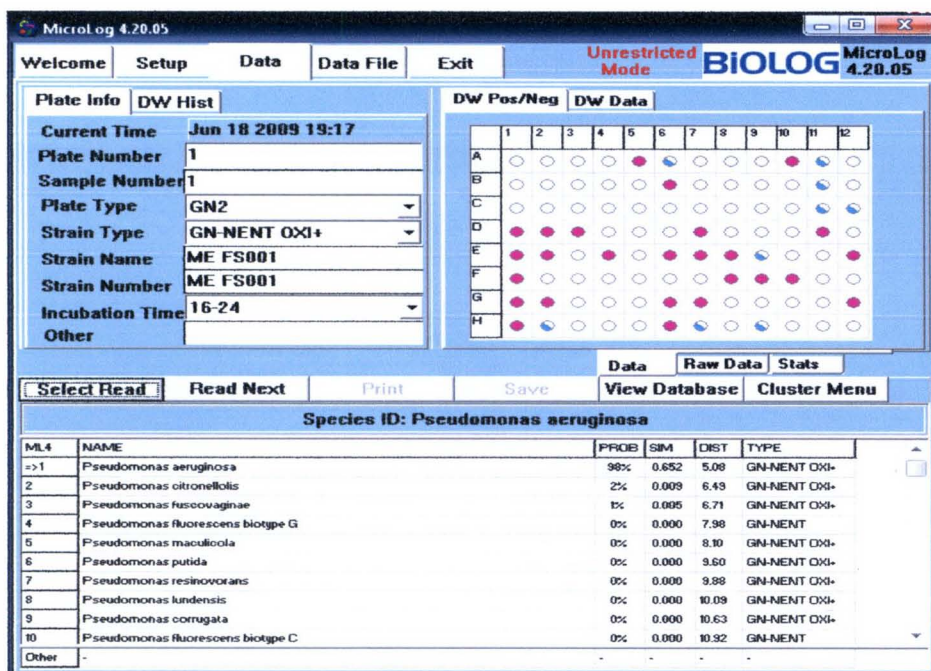
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* (ต่อ)

No.	code	Catalase	LOPAT test				
			Levan	Oxidase	Pectolytic	Arginine	Tobacco
					Activity	dihydrolase	HR
76	CeFL001	+	-	+	-	-	-
77	CorFB001	+	-	+	-	+	-
78	ToFS001	+	-	+	-	+	-
79	PeFS008	+	-	+	-	+	-
80	soilF1	+	-	+	-	+	-
81	soilF2	+	-	+	-	+	-
82	soilF3	+	-	+	-	+	-
83	soilF4	+	-	+	-	+	-
84	soilF5	+	-	+	-	+	-
85	soilF7	+	-	+	-	+	-
86	soilF8	+	-	+	-	+	-
87	soilF6	+	-	-	-	+	-
88	PeFS010	+	+	+	+	+	-
89	OrFL001	+	+	-	-	-	-



6. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอาหารโดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™)

เมื่อนำแบคทีเรียที่เป็นไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่จำแนกโดยใช้คุณสมบัติทั้งด้านวิทยา, คุณสมบัติทางชีวเคมี, LOPAT และ SDS-PAGE มาตรวจสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต ทั้ง 95 ชนิด บน Biolog GN2 Microplate พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS001 และ CuFS015 (MeFS009) ซึ่งเป็นไอโซเลตตัวแทนกลุ่มที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถระบุ ID ได้เป็น *Pseudomonas aeruginosa* (Prob 99 และ 98%) ดังภาพที่ 20-21 ส่วนไอโซเลตที่เป็นตัวแทนในกลุ่ม unknown ได้แก่ ไอโซเลต SqFS005 ระบุ ID ได้เป็น *Pseudomonas nitroreducens/azelaica* (Prob 99%) ดังภาพที่ 22, ไอโซเลต MeFS036 ระบุ ID ได้เป็น *Pseudomonas putida* (Prob 98%) ดังภาพที่ 23, PeFS009, PeFS010, PeFS011, MeFS037 รวมถึงเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* ได้แก่ ไอโซเลต CorFB001, CeFL001 และ OrFL001 ที่ไม่สามารถระบุ ID ได้ และไอโซเลตที่เป็นตัวแทนกลุ่มที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *P. fluorescens* คือ ไอโซเลต SoilF4 ระบุ ID ได้เป็น *Pseudomonas fulva* (Prob 97%) ดังภาพที่ 24



หมายเหตุ ; PROB = ความน่าจะเป็น, SIM = ความเหมือนกัน, DIST = ระยะห่าง, TYPE = ประเภทของแบคทีเรีย

ภาพที่ 20 การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS001

MicroLog 4.20.05

Welcome Setup Data Data File Exit Unrestricted Mode BIOLOG MicroLog 4.20.05

Plate Info DW Hist

Current Time Jun 15 2009 20:58

Plate Number 3

Sample Number Cu FS015

Plate Type GN2

Strain Type GN-NENT OXI+

Strain Name fluorescent Pseudomonas

Strain Number Cu FS015

Incubation Time 16-24

Other

DW Pos/Neg DW Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Select Read Read Next Print Save Data Raw Data Stats View Database Cluster Menu

Species ID: Pseudomonas aeruginosa

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
>1	Pseudomonas aeruginosa	100%	0.769	3.48	GN-NENT OXI+
2	Pseudomonas citronellolis	0%	0.000	9.15	GN-NENT OXI+
3	Pseudomonas putida	0%	0.000	9.61	GN-NENT OXI+
4	Pseudomonas fluorescens biotype C	0%	0.000	9.78	GN-NENT OXI+
5	Pseudomonas fluorescens biotype G	0%	0.000	9.93	GN-NENT
6	Pseudomonas maculicola	0%	0.000	9.44	GN-NENT OXI+
7	Pseudomonas chlororaphis (fluor. biotype D)	0%	0.000	9.72	GN-NENT OXI+
8	Burkholderia vietnamiensis	0%	0.000	9.77	GN-NENT OXI+
9	Pseudomonas fulva	0%	0.000	9.91	GN-NENT OXI+
10	Pseudomonas fluorescens biotype G	0%	0.000	10.03	GN-NENT
Other	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ; PROB = ความน่าจะเป็น, SIM = ความเหมือนกัน, DIST = ระยะห่าง, TYPE = ประเภทของแบคทีเรีย

ภาพที่ 21 การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CuFS015

MicroLog 4.20.05

Welcome Setup Data Data File Exit Unrestricted Mode BIOLOG MicroLog 4.20.05

Plate Info DW Hist

Current Time Jun 15 2009 21:09

Plate Number 1

Sample Number SQFS005

Plate Type GN2

Strain Type GN-NENT OXI+

Strain Name SQFS005

Strain Number SQFS005

Incubation Time 16-24

Other

DW Pos/Neg DW Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Select Read Read Next Print Save Data Raw Data Stats View Database Cluster Menu

Species ID: Pseudomonas nitroreducens/azelaica

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
>1	Pseudomonas nitroreducens/azelaica	99%	0.683	4.76	GN-NENT OXI+
2	Pseudomonas putida biotype A	0%	0.003	6.57	GN-NENT OXI+
3	Brevundimonas diminuta	0%	0.002	6.74	GN-NENT OXI+
4	Pseudomonas alcaligenes	0%	0.000	7.83	GN-NENT
5	Aquasplillum dispar	0%	0.000	8.17	GN-NENT OXI+
6	Bordetella bronchiseptica	0%	0.000	8.39	GN-NENT OXI+
7	Pseudomonas fulva	0%	0.000	8.53	GN-NENT OXI+
8	Pseudomonas fluorescens biotype G	0%	0.000	9.65	GN-NENT
9	Pseudomonas putida	0%	0.000	8.78	GN-NENT OXI+
10	Achromobacter xylosoxidans ss xylosoxidans	0%	0.000	9.07	GN-NENT OXI+
Other	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ; PROB = ความน่าจะเป็น, SIM = ความเหมือนกัน, DIST = ระยะห่าง, TYPE = ประเภทของแบคทีเรีย

ภาพที่ 22 การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005

MicroLog 4.20.05

Welcome Setup Data Data File Exit Unrestricted Mode BIOLOG MicroLog 4.20.05

Plate Info DW Hist

Current Time Jun 15 2009 21:15

Plate Number 7

Sample Number 7

Plate Type GN2

Strain Type GN-NENT OXI+

Strain Name #19 (Me)

Strain Number #19 (Me)

Incubation Time 16-24

Other

DW Pos/Neg DW Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Select Read Read Next Print Save Data Raw Data Stats View Database Cluster Menu

Species ID: *Pseudomonas putida*

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	0.559	6.70	GN-NENT OXI+
2	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	1%	0.007	8.14	GN-NENT OXI+
3	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A	0%	0.004	8.31	GN-NENT OXI+
4	<i>Pseudomonas maculicola</i>	0%	0.000	9.56	GN-NENT OXI+
5	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B	0%	0.000	12.32	GN-NENT OXI+
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0%	0.000	13.49	GN-NENT OXI+
7	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ss <i>pseudoalcaligenes</i>	0%	0.000	13.50	GN-NENT OXI+
8	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0%	0.000	15.43	GN-NENT OXI+
9	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	0%	0.000	15.86	GN-NENT OXI+
10	<i>Pseudomonas asplenii</i>	0%	0.000	15.92	GN-NENT OXI+
Other	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ; PROB = ความน่าจะเป็น, SIM = ความเหมือนกัน, DIST = ระยะห่าง, TYPE = ประเภทของแบคทีเรีย

ภาพที่ 23 การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2
Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS036

MicroLog 4.20.05

Welcome Setup Data Data File Exit Unrestricted Mode BIOLOG MicroLog 4.20.05

Plate Info DW Hist

Current Time Jun 15 2009 21:33

Plate Number 4

Sample Number 4

Plate Type GN2

Strain Type GN-NENT OXI+

Strain Name soil (flu)4

Strain Number soil (flu)4

Incubation Time 16-24

Other

DW Pos/Neg DW Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Select Read Read Next Print Save Data Raw Data Stats View Database Cluster Menu

Species ID: *Pseudomonas fulva*

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1	<i>Pseudomonas fulva</i>	97%	0.595	6.03	GN-NENT OXI+
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3%	0.014	7.27	GN-NENT OXI+
3	<i>Pseudomonas lundensis</i>	0%	0.000	8.49	GN-NENT OXI+
4	<i>Pseudomonas nitroreducens/azelaica</i>	0%	0.000	9.34	GN-NENT OXI+
5	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ss <i>pseudoalcaligenes</i>	0%	0.000	9.85	GN-NENT OXI+
6	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	0%	0.000	10.00	GN-NENT OXI+
7	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A	0%	0.000	10.10	GN-NENT OXI+
8	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B	0%	0.000	10.73	GN-NENT OXI+
9	<i>Pseudomonas putida</i>	0%	0.000	10.82	GN-NENT OXI+
10	<i>Pseudomonas fragi</i>	0%	0.000	11.99	GN-NENT OXI+
Other	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ; PROB = ความน่าจะเป็น, SIM = ความเหมือนกัน, DIST = ระยะห่าง, TYPE = ประเภทของแบคทีเรีย

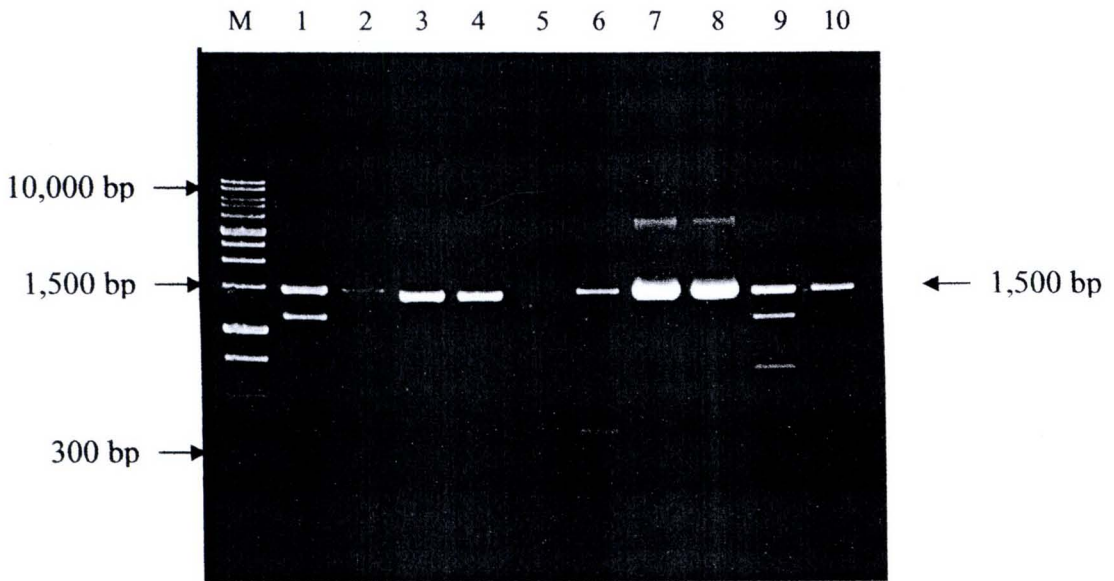
ภาพที่ 24 การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2
Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SoilF4

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทน โดยอาศัยรูปร่างลักษณะ สีของโคโลนี คุณสมบัติทางชีวเคมี รูปแบบของแถบโปรตีน และการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ ได้แก่ไอโซเลต AR-TS003, PeFS009, MeFS001, SqFS005 และ CeFL001 มาแยกสกัด genomic DNA แล้วใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene โดยใช้ specific primer fD1 และ rD1 ในปฏิกิริยา PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลตดังกล่าวได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ขนาดบน 1% agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 1,500 bp ดังภาพที่ 25

จากการตัดแถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003, PeFS009, MeFS001, SqFS005 และ CeFL001 ที่มีขนาดประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ โคลนเข้าไปในพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy ตาม TA cloning system แล้วทำการ transform เข้าสู่ *E. coli* strain JM109 โดยวิธีการ heat shock พบว่า สามารถคัดเลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ppm จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003, PeFS009, MeFS001, SqFS005 และ CeFL001 ได้ เมื่อนำมาแยกสกัดพลาสมิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่ามี insert 16S rDNA อยู่ ดังภาพที่ 26-27

เมื่อนำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของ 16S rDNA ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี automated DNA sequencing ตามระบบ dideoxy chain determination โดยใช้บริการจากสถาบันจีโนม แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA ที่ได้รับมาวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide collection (nr/nt)) ของส่วน 16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย ในข้อมูลทางอินเตอร์เน็ต (GenBank : NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม CLC Main Workbench5 (Nucleotide Blast) (ภาพที่ 28) พบว่า AR-TS003 และ MeFS001 มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,489 และ 1,485 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (ภาพที่ 29, 30) มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* GQ179979 โดยมีความเหมือนกันเท่ากับ 99 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, PeFS009 มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,415 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 31) มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* EF114403 โดยมีความเหมือนกันเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์, SqFS005 มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,489 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 32) มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. asplenii* Z76655 โดยมีความเหมือนกันเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ CeFL001 มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,490 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 33) มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. cichorii* NR_026532 โดยมีความเหมือนกันเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 25 16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชไอโซเลตตัวแทนกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* มีขนาดประมาณ 1,500 bp หลังการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primers rD1 และ fD1, M : 1 kb ladder marker

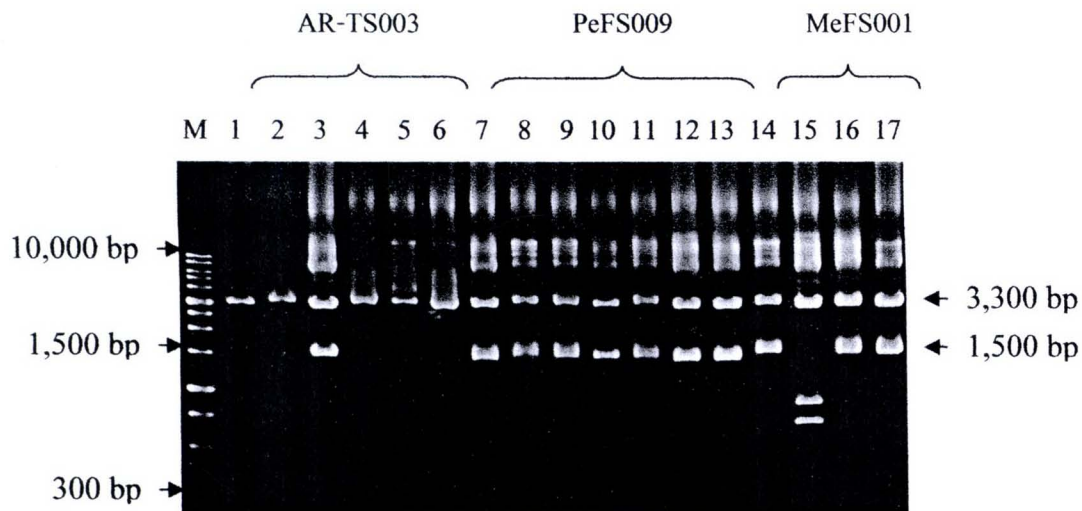
lane 1-2 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003

lane 3-4 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PeFS009

lane 5-6 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS001

lane 7-8 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005

lane 9-10 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CeFL001



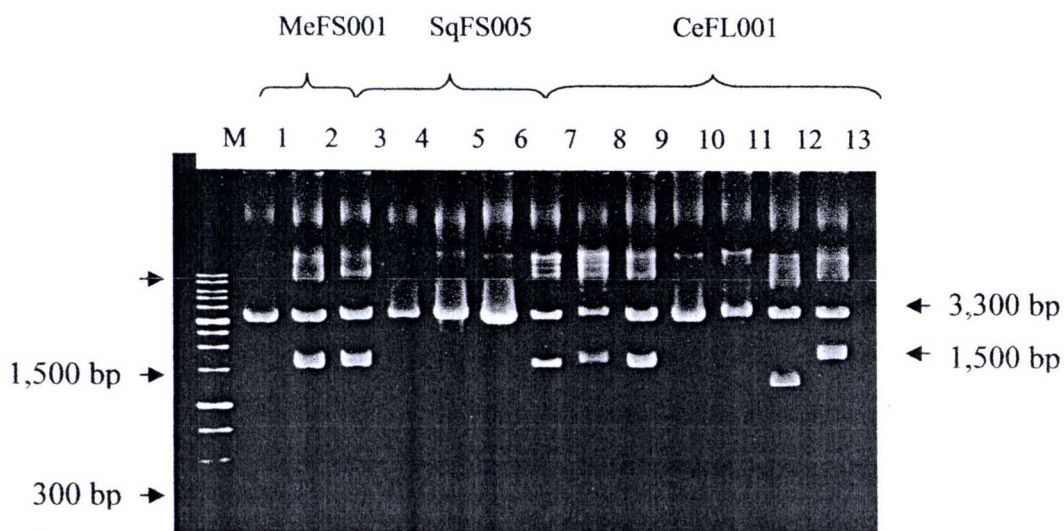
ภาพที่ 26 recombinant clone ที่มีส่วน 16S rDNA ของเชื้อที่อยู่ใน pGEM-T easy แยกขนาดบน

1% agarose gel electrophoresis, M : 1 kb ladder marker

lane 1-6 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต AR-TS003

lane 7-13 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต PeFS009

lane 14-17 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต MeFS001



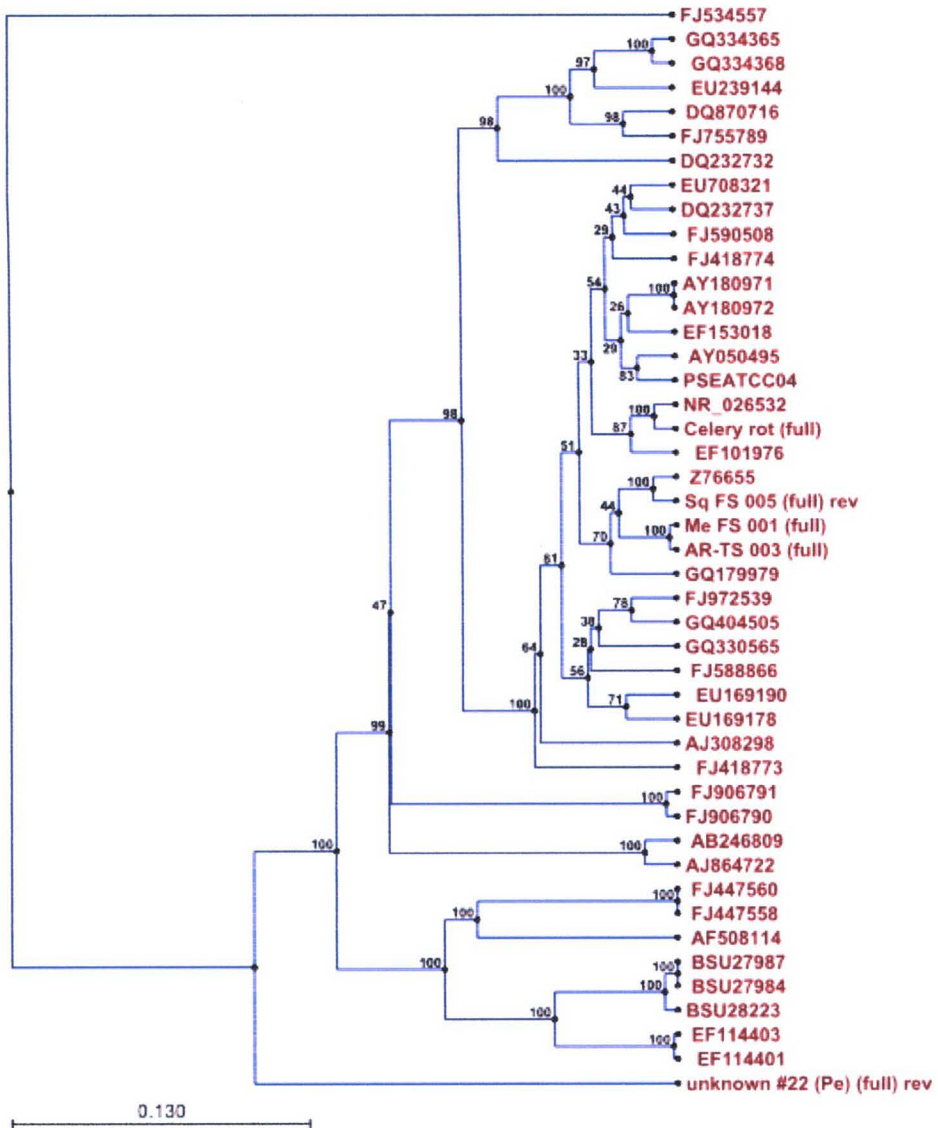
ภาพที่ 27 recombinant clone ที่มีส่วน 16S rDNA ของเชื้อที่อยู่ใน pGEM-T easy แยกขนาดบน

1% agarose gel electrophoresis, M : 1 kb ladder marker

lane 1-2 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต MeFS001

lane 3-6 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต SqFS005

lane 7-13 = recombinant clone ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลต CeFL001



ภาพที่ 28 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ทั้ง 4 กลุ่ม ใน ส่วนบริเวณ 16S rRNA gene เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มอื่นๆ วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5

หมายเหตุ :

Celery rot (full)	คือ ไอโซเลต CeFL001
SqFS005 (full) rev	คือ ไอโซเลต SqFS005
MeFS001	คือ ไอโซเลต MeFS001
AR-TS003	คือ ไอโซเลต AR-TS003
Unknown #22 (Pe) (full) rev	คือ ไอโซเลต PeFS009

ตารางที่ 3 รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank (ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ส่วน 16S rDNA)

No.	GenBank accession No.	Closet species using 16S rDNA sequences
1	FJ534557	<i>Pseudomonas cichorii</i>
2	GQ334365	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
3	GQ334368	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4	EU239144	<i>Pseudomonas fulva</i>
5	DQ870716	<i>Pseudomonas syringae</i>
6	FJ755789	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
7	DQ232732	<i>Pseudomonas marginalis</i>
8	EU708321	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
9	DQ232737	<i>Pseudomonas marginalis</i>
10	FJ590508	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
11	FJ418774	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
12	AY180971	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
13	AY180972	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
14	EF153018	<i>Pseudomonas corrugata</i>
15	AY050495	<i>Pseudomonas corrugata</i>
16	PSEATCCO4	<i>Pseudomonas agarici</i>
17	NR_026532	<i>Pseudomonas cichorii</i>
18	EF101976	<i>Pseudomonas cichorii</i>
19	Z76655	<i>Pseudomonas asplenii</i>
20	GQ179979	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
21	FJ972539	<i>Pseudomonas fulva</i>
22	GQ404505	<i>Pseudomonas putida</i>
23	GQ330565	<i>Pseudomonas putida</i>
24	FJ588866	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
25	EU169190	<i>Pseudomonas tolaassii</i>
26	EU169178	<i>Pseudomonas tolaassii</i>

ตารางที่ 3 รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank (ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA) (ต่อ)

No.	GenBank accession No.	Closet species using 16S rDNA sequences
27	AJ308298	<i>Pseudomonas agarici</i>
28	FJ418773	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
29	FJ906791	<i>Petobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
30	FJ906790	<i>Petobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
31	AB246809	<i>Pseudomonas boreopolis</i>
32	AJ864722	<i>Pseudomonas boreopolis</i>
33	FJ447560	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
34	FJ447558	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
35	AF508114	<i>Acidovorax avenae</i>
36	BSU27987	<i>Burkholderia solanacearum</i>
37	BSU27984	<i>Burkholderia solanacearum</i>
38	BSU28223	<i>Burkholderia solanacearum</i>
39	EF114403	<i>Burkholderia cepacia</i>
40	EF14401	<i>Burkholderia cepacia</i>



LOCUS AR-TS003 1489 bp DNA linear UNA 01-*.#.-255
 DEFINITION
 FEATURES Location/Qualifiers
 ORIGIN

```

1 TTGAACGCTG GCGGCAGGCC TAACACATGC AAGTCGAGCG GATGAAGGGA GCTTGCCTCT
61 GGATTCAGCG GCGGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGATAACG
121 TCCGGAACCG GCGGCTAATA CCGCAIACGT CCTGAGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC
181 CTCACGCTAT CAGACGAGCC TAGGTCGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA GGCCCAACAA
241 GCGCAGCATC CGTAACCTGT CTGAGAGGAT GATCAGTCAC ACTGGAAC TGAGACAGGTC
301 CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTGGGAAA TATTGGACAA TGGGCGAAAG CCTGATCCAG
361 CCAATGCCGA TGTGTGAAGA AGGTCTTCGG ATTGTAAAGC ACTTTAAGTT GGGAGGAAGG
421 GCAGTAAGTT AATACCTTGC TGTTTTGACG TTACCAACAG AATAGGCACC GGTAGCTTC
481 GTGCCAGCAG CCGCGGTAAAT ACGAAGGGTG CAACGGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA
541 GCGCGCGTAG GTGGTTCAGC AAGTTGGATG TGAATTCGCC CCGGCTCAAC CTGGGAACTG
601 CATCCAAAAC TACTGAGCTA GAGTACGGTA GAGGGTGGTG GAATTTCTTG TGTAGCGGTG
661 AAATGCGTAG ATATAGGAAG GAACACCAGT GCGGAAGGCG ACCACCTGGA CTGATACTGA
721 CACTGAGGTG CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT
781 AAACGATGTC GACTAGCCGT TGGGATCCTT GAGATCTTAG TGGCGCAGCT AACGCGATAA
841 GTCGACCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG TTAATACTCA AATGAATTGA CGGGGGCCCG
901 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTGG AAGCAACGCG AAGAACCCTTA CCTGGCCTTG
961 ACATGCTGAG AACTTTCCAG AGATGGATTG GTGCCTTCGG GAACCTCAGC ACAGGTGCTG
1021 CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGTAAC GAGCGCAACC
1081 CTTGTCTCTA GTTACCAGCA CCTCGGGTGG GCACTCTAAG GAGACTGCCG GTGACAAACC
1141 GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAGTCATC ATGGCCCTTA CCGCCAGGCG TACACACGTG
1201 CTACAATGGT CGGTACAAAG GGTTGCCAAG CCGCGAGGTG GAGCTAATCC CATAAAACCG
1261 ATCGTAGTCC GGATCGCAGT CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG
1321 TGAATCAGAA TGTACGGTG AATACGTTCC CCGGCCCTGT ACACACCGCC CGTCACACCA
1381 TGGGAGTGGG TTGCTCCAGA AGTAGCTAGT CTAACCGCAA GGGGGAACGG TTACCACGGA
1441 GTGATTCATG ACTGGGGTGA AGTCGTAAAC AGGTAGCCGT AGGGGAACC

```

ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,489 bp จากเชื้อแบคทีเรีย
 ไอโซเลต AR-TS003

LOCUS MeFS001 1485 bp DNA linear UNA 01-*.*. -2552

DEFINITION

FEATURES

Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1  ATTGAACGCT GGCGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGATGAAGGG AGCTTGCTCC
61  TGGATTTCAGC GGCGGACGGG TGAGTAATGC CTAGGAATCT GCCTGGTAGT GGGGGATAAC
121  GTCCGGAAAC GGGCGCTAAT ACCGCATACG TCCGAGGGGA GAAAGTGGGG GATCTTCGGA
181  CCTCACGCTA TCAGATGAGC CTAGGTCCGA TTAGCTAGTT GGTGGGTAA AGGCCTACCA
241  AGCGGACGAT CCGTAACGCG TCTGAGAGGA TGATCAGTCA CACTGGAAC T GAGACACGGT
301  CCAGACTCCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA ATGGGCGAAA GCCTGATCCA
361  GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGTCTTCC GATTGTAAAG CACTTTAAGT TGGGAGGAAG
421  GGCAGTAAGT TAATACCTTG CTGTTTTGAC GTTACCAACA GAATAAGCAC CGGCTAACTT
481  CGTGCCAGCA GCGCGCGTAA TACGAAGGGT GCAAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGCGGTAA
541  AGCGCGCGTA GGTGGTTCAG CAAGTTGGAT GTGAAATCCC CGGGCTCAGC CTGGGAACTG
601  CATCCAAAAC TACTGAGCTA GAGTACGGTA GAGGGTGGTG GAATTTCTG TGTAGCGGTG
661  AAATGCGTAG ATATAGGAAG GAACACCACT GCGGAAGGCG ACCACCTGGA CTGATACTGA
721  CACTGAGGTG CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCACAGCCGT
781  AAACGATGTC GACTAGCCGT TGGGATCCTT GAGATCTTAG TGGCGCAGCT AACGCGATAA
841  GTCGACCGCC TGGGGAGTAC GGC CGCAAGG TTA AA ACTCA AATGAATTGA CGGGGGCCCCG
901  CACAACCGGT GGAGCATGIG GTTTAATTCC AAGCAACGCG AAGAACCCTA CCTGGCCTTG
961  ACATGCTGAG AACTTTCCAG AGATGGATTG GTGCCCTTCG GAATCAGAC ACAGGTGCTG
1021  CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA GTCCCGTAAC GAGCGCAACC
1081  CTTGTCCCTTA GTTACCAGCA CCTCGGGTGG GCACCTCTAG GAGACTGCCG GTGACAAACC
1141  GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAGTCATC ATGGCCCTTA CGGCCAGGGC TACACACGTG
1201  CTACAAATGGT CGGTACAAAG GGTTCGCAAG CCGCGAGGTG GAGCTAAACC CATAAAACCG
1261  ATCGTAGTCC GGATCGCAGT CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG
1321  TGAATCAGAA TGTACAGGTG AATACGTTCC CCGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA
1381  TGGGAGTGGG TTGCTCCAGA AGTAGCTAGT CTAACCGCAA GGGGGACGGT TACCACGGAG
1441  TGATTCATGA CTGGGGTGA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA GGGGA

```

ภาพที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,485 bp จากเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต MeFS001

LOCUS unknown#22 (Pe) (full 1415 bp DNA linear UNA 18-#.1.-2552

DEFINITION

FEATURES

Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 AGCGAACGCT GCGGCGAGGC CTAACACATG CAAGTCGAAC GGACCCCTTC GGGTTAGTGG
61 CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGAACGTGC CTTTAGGTTG GGAATAGGTC CTGGAAACGG
121 GTGGTAATGC CGAATGTGCC CTTGCGGGGA AAGATTTATC GCCTTTAGAG CGGCCCGCGT
181 CTGATTAGCT AGTGGGTGAG GTAACGGGTC ACCAAGGCGA CGATCAGTAG CTGGTCTGAG
241 AGGATGGCCA GGCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
301 GGGAACTCTT CGCAATGGGC GAAAGCCTGA CGCAGCCATG CCGCGTGAAT GATGAAGGTC
361 TTAGGATTGT AAAATTCTTT CACCGGGGAC GATAATGACG GTACCCGGAG AAGAAGCCCC
421 GGCTAACTTC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAI ACGAAGGGGG CTAGCGTTTC TCGGAATTAC
481 TGGGCGTAAA GGGCGCGTAG GCGGATCGTT AAGTCAGAGG TGAAATCCCA GGGCTCAACC
541 CTGGAAGTGC CTTTGATACT GCGGATCTTG AGTATGAGAG AGGTATGTGG AACTCCGAGT
601 GTAGAGGTGA AATTGCTAGA TATTGGAAG AACACCAAGT GCGAAGGCGA CATACTGGGT
661 CATTACTGAC GCTGAGGCGC GAAAGCGTGG GGAGCAAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT
721 CCACGCGGTA AACGATGATT GGTAGTTGTC GGGCTGCATG CAGTTCGGTG ACGCAGCTAA
781 CGCATTAAGC AATCCGCGCT GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA GGAATTGACG
841 GGGGCCCGCA CAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTGAAA GCAACGCGCA GAACCTTACC
901 ACCTTTTGAC ATGCGCTGAC CGCCACGGAG ACGTGGCTTT CCCTTCGGGG ACTAGGACAC
961 AGGTGCTGCA TGGCTGTGCT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCGGCAACGA
1021 GCGCAACCCCT CGCCATTAGT TGCCATCATT TAGTTGGGAA CTCTAATGGG ACTGCCGGTG
1081 CTAGGCCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCTCATG GCCCTTACAG GGTGGGCTAC
1141 ACACGTGCTA CAATGGCGAC TACAGAGGGT TAATCCTTAA AAGTCGTCTC AGTTCGGATT
1201 GTCTCTGCA ACTCGAGGGC ATGAAGTTGG AATCGCTAGT AATCGGGAT CAGCATGCCG
1261 CCGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACG CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTTGGTTCTA
1321 CCGGAAGGCG GTGCGCTAAC CAGCAATGGA GGCAGCCGAC CACGGTAGGG TCAGCGACTG
1381 GGGTGAAGTC GTAACAAGGT AGCCGTAGGG GAACC

```

ภาพที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,415 bp จากเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต PeFS009

LOCUS SqFS005(full)rev 1489 bp DNA linear UNA 18-*.*. -2552

DEFINITION

FEATURES

Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1  ATTGAACGGT  GGCGGCAGGC  CTAACACATG  CAAGTCGAGC  GGATGACGGG  AGCTTGCCTC
61  TTGATTTCAGC  GGCGGCACGGG  TGAGTAATGC  CTAGGAATCT  GCGTGGTAGT  GGGGGACAAAC
121  GTTTCGAAAG  GAACGCTAAT  ACCGCATACG  TCCTACGGGA  GAAAGCAGGG  GACCTTCGGG
181  CTTTGGCGTA  TCAGATGAGC  CTAGGTGGGA  TTAGCTAGTT  GGTGGGGTAA  TGGCTCACCA
241  AGCGGACGAT  CCGTAACTGG  TGTGAGAGGA  TGATCAGTCA  CACTGGAAC  GAGACACGGT
301  CCAGACTCCT  ACCGGAGGCA  GCAGTGGGGA  ATATTGGACA  ATGGGCGAAA  GCCTGATCCA
361  GGCATGCGGC  GTGTGTGAAG  AAGGTCTTCG  GATTGTAAAG  CACTTTAAGT  TGGGAGGAAG
421  GGCAGTAAGT  TAATACCTTG  CTGTTTGGAC  GTTACCGACA  GAATAAGCAC  CGGCTAACCT
481  TGTGCCAGCA  GCGCGGGTAA  TACAGAGGGT  GCAAGCGTTA  ATCGGAATTA  CTGGGCGTAA
541  AGCGCGCGTA  GGTGGTTCTG  TAAGTTGGAT  GTGAAAGCCC  CGGGCTCAAC  CTGGGAACTG
601  CATCCAAAAC  TGGCGAGCTA  GAGTACGGTA  GAGGGTGGTG  GAATTTCTTG  TGTAGCGGTG
661  AAATGCGTAG  ATATAGGAAG  GAACCCCACT  GCGGAGGGCG  ACCACCTGGA  CTGATACTGA
721  CACTGAGGTG  CGAAAGCGTG  GGGAGCAAAC  AGGATTAGAT  ACCCTGGTAG  TCCACGCCGT
781  AAAGCATGTC  AACTAGCCGT  TGGATCCTT  GAGATTTTAG  TGGCGCAGCT  AACGCATTAA
841  GTTGACCGCC  TGGGGAGTAC  GCGCGCAGG  TTAATACTCA  AATGAATTGA  CGGGGGCCCG
901  CACAAGCGGT  GGAGCATGTG  GTTTAATTCT  AAGCAACCGG  AAGAACCTTA  CCAGGCTTGG
961  ACATGCAGAG  AACTTTCCAG  AGATGGATTG  GTGCCTTCGG  GAGCTCTGAC  ACAGGTGCTG
1021  CATGGCTCTC  GTCAGCTCGT  GTCGTGAGAT  GTTGGGTAA  GTCCCGTAA  GAGCGCAACC
1081  CTGCTCCTTA  GTTACCAAGC  CGTTATGGTG  GGCACCTCTA  GGAGACTGCC  GGTGACAAAC
1141  CGGAGGAAGG  TGGGGATGAC  GTCAAGTCAT  CATGGCCCTT  ACGGCTTGGG  CTACACACGT
1201  GCTACAAATG  TCGGTACAGA  GGGTTGCCAA  GCGCGGAGGT  GGAGCTAATC  TCACAAAACC
1261  GATCGTAGTC  CGGATCGCAG  TGTGCAACTC  GACTGCGTGA  AGTCGGAATC  GCTAGTAATC
1321  GCGAATCAGA  ATGTCCGGGT  GAATACGTC  CCGGGCCTTG  TACACACCGC  CCGTCACACC
1381  ATGGGAGTGG  GTTGCATCAG  AAGTAGCTAG  TCTAACCTTC  GGGAGGACGG  TTACCACGGT
1441  GTGATTCATG  ACTGGGGTGA  AGTCGTAAAC  AGGTAGCCGT  AGGGGAACC

```

ภาพที่ 32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,489 bp จากเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต SqFS005

LOCUS Celeryrot(full) 1490 bp DNA linear DNA 18-#.1.-2552
 DEFINITION
 FEATURES Location/Qualifiers
 ORIGIN

```

1  ATTGAACGCT GGGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGAGAGG TGCCTGCACC
61  TCTTGAGAGC GGGGGACGGG TGAGTAATGC CTAGGAATCT GCCTGGTAGT GGGGGATAAC
121 GCTCGGAAAC GGACGCTAAT ACCGCATACG TCTACGGGGA GAAAGCAGGG GACCTTCGGG
181 CCTTGCGCTA TCAGATGAGC CTAGGTCGGA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA TGGCTCACCA
241 AGGCGACGAT CCGTAACCTG TCTGAGAGGA TGATCAGTCG CACTGGAACI GAGACACGGT
301 CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGG ATATTGGACA ATGGGGGAAA GCCTGATCCA
361 GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGTCTTCG GATTGTAAAG CACTTTAAGT TGGGAGGAAG
421 GGTGCTTACC TAATACGTGA CGATTTTGAC GTTACCGACA GAATAAGCAC CGGCTAACTC
481 TGTGCCAGCA GCGCGGGTAA TACAGAGGGT GCGAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA
541 AGCGCGCGTA GGTGGTTCGT TAAGTTGGAT GTGAAATCCC CGGGCTCAAC CTGGGAACTG
601 CATCCAAAAC TGGCGAGCTA GAGTAGGGCA GAGGGTGGTG GAATTTCTTG TGTAGCGGTG
661 AAATGCGTAG ATATAGGAAG GAACCAACAG TGGCGAAGGC GACCACCTGG GCTCATACTG
721 ACACGTGAGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCTGTGTA GTCCACGCCG
781 TAAACGATGT CAACTAGCCG TTGGAATCCT TGAGATTTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA
841 AGTTGACCGC CTGGGGAGTA CCGCCGCAAG GTTAAACTC AAATGAATTG ACGGGGGCCC
901 GCACAAAGCG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT
961 GACATCCAGT GAACTTACCA GAGATGGTTT GTTGCCTTCG GGAACACTGA GACAGGTGCT
1021 GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTGCTGAGA TGTGGGTTA AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC
1081 CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACCTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA
1141 CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCACGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG
1201 TGCTACATG GTCGGTACAG AGGGTTGCCA ACCCGCGAGG TGGAGCTAAT CTCACAAAAC
1261 CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCCGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT
1321 CCGGAATCAG AATGTCGCGG TGAATACGTT CCGGGGCCCT GTACACACCG CCCGTCACAC
1381 CATGGGAGTG GGTTCACCCA GAAGTAGCTA GTCTAACCTT CCGGGGGACG GTTACCACGG
1441 TGTGATTCAT GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TAGGGGAACC

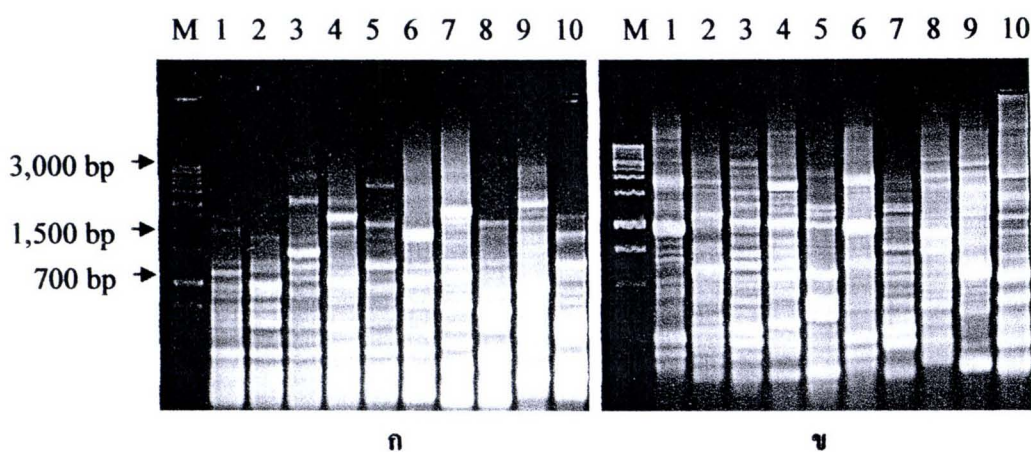
```

ภาพที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,490 bp จากเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต CeFL001

8. การศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ของ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค rep-PCR

Genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* จำนวน 20 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่จัดจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทั้งสัณฐานวิทยา, คุณสมบัติทางชีวเคมี, LOPAT, SDS-PAGE และ เทคนิค Biolog™ ได้แก่ AR-TS003, MeFS001, MeFS017, SqFS012, ToFB002, PeFP001, ToFS002, SqFS005, CeFL001, SoilF4, PeFS008, MeFS036, MeFS037, PeFS011, PeFS009, MeFS038, PeFS010, CorFB001, OrFL001 และ SoilF6 นำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้แตกต่างกัน ดังภาพที่ 34



ภาพที่ 34 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ BOXAIR ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่นำมาแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 60 นาที

- ก. lane M : 1 kb marker ladder, lane 1 = AR-TS003, lane 2 = MeFS001, lane 3 = MeFS017, lane 4 = SqFS012, lane 5 = ToFB002, lane 6 = PeFP001, lane 7 = ToFS002, lane 8 = SqFS 05, lane 9 = CeFL001, lane 10 = SoilF4
- ข. lane M : 1 kb marker ladder, lane 1 = PeFS008, lane 2 = MeFS036, lane 3 = MeFS037, lane 4 = PeFS011, lane 5 = PeFS009, lane 6 = MeFS038, lane 7 = PeFS010, lane 8 = CorFB001, lane 9 = OrFL001, lane 10 = SoilF6

จากการเปรียบเทียบลายพิมพ์ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการศึกษาจำนวน 20 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค rep-PCR (primer BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 พบว่าเชื้อทุกไอโซเลต มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

โดยไอโซเลตที่จำแนกเป็น *P. aeruginosa*, มีความเหมือนกันมากที่สุด มี similarity coefficient เท่ากับ 0.95 สมาชิกในกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกับ *P. aeruginosa* มี similarity coefficient เท่ากับ 0.73 มี 3 ไอโซเลต ได้แก่ MeFS017, SqFS012 และ ToFB002 ซึ่งกลุ่มนี้ให้รูปแบบ LOPAT และ protein profile เหมือนกัน

กลุ่มที่มีความใกล้เคียงกับ *P. asplenii* (ไอโซเลต SqFS005) ได้แก่ SoilF4 มี similarity coefficient เท่ากับ 0.65 แต่ในคุณสมบัตินี้มีความแตกต่างกันทั้งในรูปแบบ LOPAT/protein profile

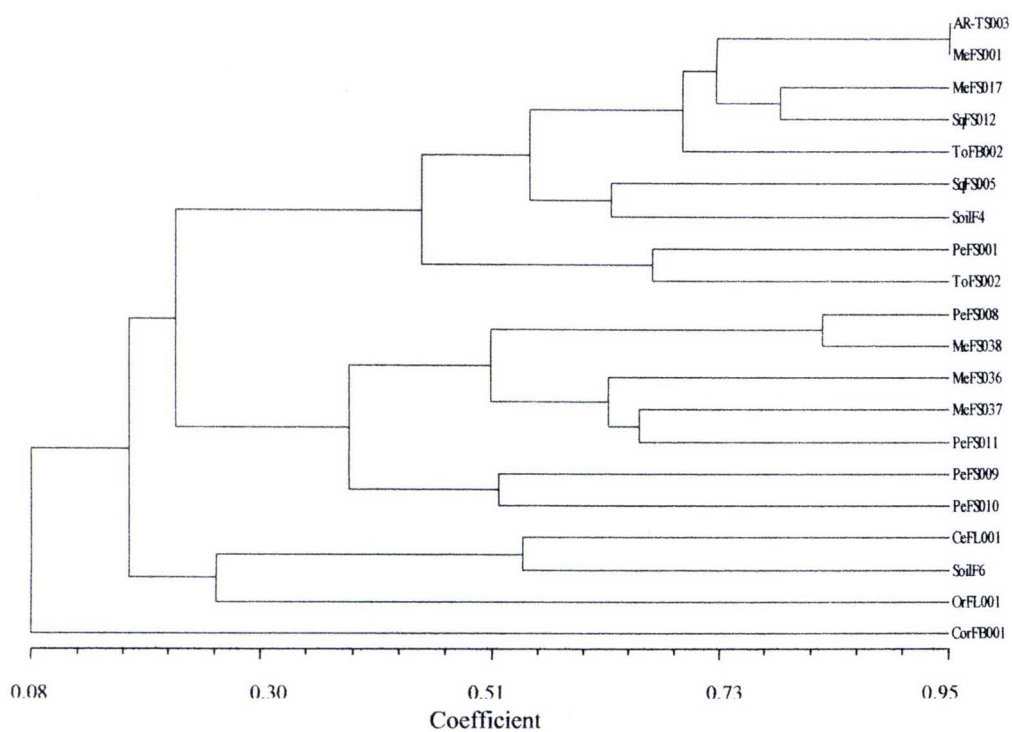
ไอโซเลต PeFS001 มีความใกล้เคียงกับ ToFS002 มากที่สุดที่ similarity coefficient เท่ากับ 0.70 โดยมีรูปแบบ LOPAT และ protein profile ต่างกัน

ไอโซเลต MeFS036 มีความใกล้เคียงกับ MeFS037 และ PeFS011 มากที่สุดที่ similarity coefficient เท่ากับ 0.65 (รูปแบบ LOPAT และ protein profile เหมือนกัน)

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* (ไอโซเลต PeFS009) มีความใกล้ชิดกับไอโซเลต PeFS010 มากที่สุด ที่ similarity coefficient เท่ากับ 0.52

ในทำนองเดียวกันกับ *P. cichorii* (ไอโซเลต CeFL001) แตกต่างไอโซเลตอื่นๆ โดยมีไอโซเลต SoilF6 อยู่ใกล้ชิดมากที่สุด มี similarity coefficient เท่ากับ 0.53

ส่วนไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้ (ไอโซเลต OrFL001) แตกต่างอย่างชัดเจนกับไอโซเลตที่เข้าทำลายผักชี (ไอโซเลต CorFB001) ซึ่งแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 Dendrogram การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0

9. การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ตามระบบ polyphasic taxonomy

เมื่อนำคุณสมบัติการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม และเทคนิคทางชีวโมเลกุล ประกอบด้วย คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค, คุณสมบัติทางชีวเคมี, รูปแบบแถบโปรตีน, ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR รวมทั้งการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA และการจำแนกชนิดอย่างรวดเร็วจากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 95 ชนิด โดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกันทุกลักษณะ พบว่า จำแนกชนิดได้ 4 ชนิด และที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้อีก 16 ไอโซเลต ดังนี้

ก) เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จำนวน 70 ไอโซเลต ได้แก่ MeFS001, MeFS002, MeFS003, MeFS004, MeFS005, MeFS006, MeFS007, MeFS008, MeFS009, MeFS010, MeFS011, MeFS012, MeFS013, MeFS014, MeFS015, MeFS016, MeFS017, MeFS018, MeFS019, MeFS020, MeFS021, MeFS022, MeFS023, MeFS024, MeFS025, MeFS026, MeFS027, MeFS028, MeFS029, MeFS030, MeFS031, MeFS032, MeFS033, MeFS034, MeFS035, SqFS001, SqFS002, SqFS003, SqFS004, SqFS006, SqFS007, SqFS008, SqFS009, SqFS010, SqFS011, SqFS012, WMFB001, WMFL001, CuFS001, GuFF001, PeFP001, PeFS001, PeFS002, PeFS003, PeFS004, PeFS005, PeFS006, PeFS007, PeFL001, PeFL002, AR-TS001, AR-TS001, AR-TS003, AR-TS004, ToFF001, ToFF002, ToFF003, ToFF004, ToFB001 และ CornFS001 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันในทุกคุณสมบัติสูง คือ 1) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB ในระยะแรกโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีม ชุ่ม มีกลิ่นเหม็น เมื่อเชื้อเริ่มแก่ลักษณะโคโลนีมีลักษณะคล้ายรูปดา มักเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นสีน้ำตาลหรือสีเขียว และพบการสร้างสารเรืองแสงสีเหลืองปนเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB และการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร 2) คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค ทำให้พืชทดสอบตายอย่างรวดเร็ว 3) คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ออกจากเชื้อแบคทีเรีย fluorescent *Pseudomonas* อื่นๆ ได้ดี โดยอาศัยการทดสอบ LOPAT โดยที่เชื้อในกลุ่มนี้จะให้ผลการทดสอบ ดังนี้ ให้ผลลบในการทดสอบการสร้าง levan (L) ให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (O) ให้ผลบวกในการทดสอบการเน่ากับหัวมันฝรั่ง (pectolytic activity (P)) ให้ผลบวกในการทดสอบการไฮโดรไลส arginine (arginine hydrolase activity : (A)) และให้ผลลบใน

การทดสอบ Hypersensitivity reaction (HR) กับใบยาสูบ (Tobacco HR : (T)) หรือมีรูปแบบ LOPAT เป็น *P. aeruginosa* (-++++) 4) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับ *P.aeruginosa* AR-TS003 As. สูง โดยมี ELISA value อยู่ระหว่าง 0.426-1.915 เมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 (positive control) ที่มี ELISA value เท่ากับ 1.711 5) มีรูปแบบของแถบโปรตีนเหมือนเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 6) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนกลุ่มจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AR-TS003 และ MeFS001 เมื่อนำมาจัดจำแนกอย่างรวดเร็วจากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 95 ชนิด โดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™) สามารถระบุ ID ได้เป็น *P. aeruginosa* (Prob 99 และ 98%) 7) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเหมือนกันข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม CLC gene work bench ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003 และ MeFS001 (ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,489 และ 1,485 ตามลำดับ) ที่มีลำดับดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* 99 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 8) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการศึกษาสายพหุคูณด้วยเทคนิค rep-PCR (primer BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003 และ MeFS001 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.95 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P.aeruginosa*

ข) เชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกับ *P. asplenii* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SqFS005 คือ 1) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB ในระยะแรกโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ไม่สร้าง fluorescent pigment แต่ตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร 2) คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้ไม่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค ทำให้พืชทดสอบตายอย่างช้าๆ 3) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอาศัยการทดสอบ LOPAT โดยที่เชื้อในกลุ่มนี้ให้ผลการทดสอบ ดังนี้ ให้ผลลบในการทดสอบการสร้าง levan (L) ให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (O) ให้ผลลบในการทดสอบการเน่ากับหัวมันฝรั่ง (pectolytic activity (P)) ให้ผลลบในการทดสอบการไฮโดรไลส arginine (arginine hydrolase activity : (A)) และให้ผลลบในการทดสอบ Hypersensitivity reaction (HR) กับใบยาสูบ (Tobacco HR : (T)) หรือมีรูปแบบ LOPAT (-+---) 4) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาใกล้ชิดกับ *P.aeruginosa* AR-TS003 As. โดยมี ELISA value อยู่ระหว่าง 1.500 เมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 (positive control) ที่มี ELISA value เท่ากับ 1.711 5) มีรูปแบบของแถบโปรตีนต่างออกไปจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 6) คัดเลือกมาเป็นตัวแทน

กลุ่มจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ SqFS005 เมื่อนำมาจัดจำแนกอย่างรวดเร็วจากการใช้แหล่งคาร์บอน ทั้ง 95 ชนิด โดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (BiologTM) สามารถระบุ ID ได้เป็น *P. nitroreducens* (Prob 99%) 7) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเหมือนกันข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม CLC gene work bench ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005 (ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,489) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *P. asplenii* 97 เปอร์เซ็นต์ 8) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการศึกษาสายพหิพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (primer BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.73 ไอโซเลตที่จำแนกเป็น *P. aeruginosa*

ค) เชื้อแบคทีเรีย *P. cichorii* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ CeFL001 คือ 1) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB ในระยะแรกโคโลนีมีลักษณะคล้ายรูปดา ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ไม่สร้าง fluorescent pigment แต่ตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร 2) คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้ไม่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค ทำให้พืชทดสอบตายอย่างช้าๆ 3) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอาศัยการทดสอบ LOPAT โดยที่เชื้อในกลุ่มนี้ให้ผลการทดสอบ ดังนี้ ให้ผลลบในการทดสอบการสร้าง levan (L) ให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (O) ให้ผลลบในการทดสอบการเน่ากับห้วมันฝรั่ง (pectolytic activity (P)) ให้ผลลบในการทดสอบการไฮโดรไลส arginine (arginine hydrolase activity : (A)) และให้ผลลบในการทดสอบ Hypersensitivity reaction (HR) กับใบยาสูบ (Tobacco HR : (T)) หรือมีรูปแบบ LOPAT (-+---) 4) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาใกล้ชิดกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 As. สูง โดยที่มี ELISA value อยู่ระหว่าง 0.413 เมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 (positive control) ที่มี ELISA value เท่ากับ 1.711 5) มีรูปแบบของแถบโปรตีนต่างออกไปจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 6) คัดเลือกมาเป็นตัวแทนกลุ่มจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ CeFL001 เมื่อนำมาจัดจำแนกอย่างรวดเร็วจากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 95 ชนิด โดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (BiologTM) ไม่สามารถระบุ ID ได้ 7) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเหมือนกันข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม CLC gene work bench ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CeFL001 (ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,490) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *P. cichorii* 97 เปอร์เซ็นต์ 8) เชื้อ

แบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการศึกษาสายสัมพันธ์เอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (primer BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CeFL001 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.53 ไอโซเลตที่จำแนกเป็น *P. aeruginosa*

ง) เชื้อแบคทีเรีย fluorescent *Pseudomonas* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับ *Burkholderia cepacia* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ PeFS009 คือ 1) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB ในระยะแรกโคโลณีสีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ไม่สร้าง pigment บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แต่ตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร 2) คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้ไม่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค ทำให้พืชทดสอบตายอย่างช้าๆ 3) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอาศัยการทดสอบ LOPAT โดยที่เชื้อในกลุ่มนี้จะให้ผลการทดสอบ ดังนี้ ให้ผลลบในการทดสอบการสร้าง levan (L) ให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (O) ให้ผลลบในการทดสอบการเน่ากับห้วมันฝรั่ง (pectolytic activity (P)) ให้ผลลบในการทดสอบการไฮโดรไลส arginine (arginine hydrolase activity : (A)) และให้ผลลบในการทดสอบ Hypersensitivity reaction (HR) กับใบยาสูบ (Tobacco HR : (T)) หรือมีรูปแบบ LOPAT (-+---) 4) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา ใกล้เคียงกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 As. สูง โดยที่มี ELISA value อยู่ระหว่าง 0.925 เมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* AR-TS003 (positive control) ที่มี ELISA value เท่ากับ 1.711 5) มีรูปแบบของแถบโปรตีนต่างออกไปจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 6) คัดเลือกมาเป็นตัวแทนกลุ่มจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ PeFS009 เมื่อนำมาจัดจำแนกอย่างรวดเร็วจากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 95 ชนิด โดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™) ไม่สามารถระบุ ID ได้ 7) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเหมือนกันข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม CLC gene work bench พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PeFS009 (ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,415) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* 95 เปอร์เซ็นต์ 8) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวแทนในการศึกษาสายสัมพันธ์เอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (primer BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0 ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PeFS009 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.52 ไอโซเลตที่จำแนกเป็น *P. aeruginosa*

กลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกระบุชนิดได้ จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ MeFS036, MeFS037, PeFS008, PeFS010, PeFS011, ToFS001, CorFB001, OrFL001, SoilF1, SoilF2, SoilF3,

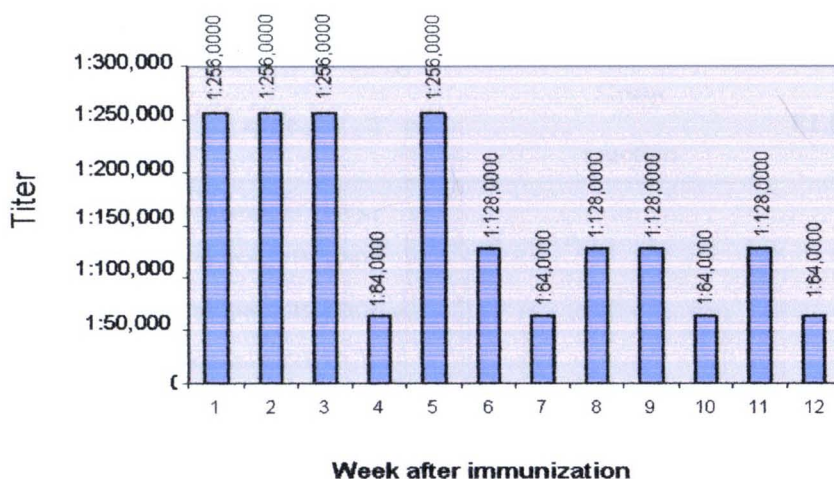
SoilF4, SoilF5, SoilF6, SoilF7 และ SoilF8 มีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเชื้อที่สามารถจำแนกระบุชนิดได้ และทุกไอโซเลตดังกล่าวมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบไม่รุนแรง

10. คุณภาพของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS 003

เมื่อนำสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย protein reagent 5 มิลลิลิตร หลังจากการผสมสารให้เข้ากันและตั้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงสีจากเดิม (สีน้ำตาลแดง) เป็นสีน้ำเงินตามปริมาณความเข้มข้นของสารละลาย เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าที่ได้แปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยที่ค่าเฉลี่ยต่ำสุดของความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 0.034 และค่าเฉลี่ยสูงสุดของความเข้มข้นโปรตีน 5×10^5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 1.043 และจากการนำ sonicated bacterial cell มาผสมกับสารละลาย protein reagent พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีน้ำเงินเข้ม ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร วัดได้เท่ากับ 0.822 จากการคำนวณปริมาณโปรตีนแล้วเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานทำให้ทราบปริมาณโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เตรียมไว้มีค่าเท่ากับ 48.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แอนติซีรัม AR-TS003 As. เมื่อตรวจค่า titer ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า ค่า titer ในสัปดาห์ที่ 1-3 สามารถเจือจางแอนติซีรัมได้ 1:256,000 เท่าโดยปริมาตร เมื่อตรวจสอบโดยใช้ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 titer เริ่มลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้นเป็น 1:256,000 ในสัปดาห์ที่ 5 แล้วลดลงอีกในสัปดาห์ที่ 6-7 คงที่อีกครั้งในสัปดาห์ที่ 8-9 ลดลงที่ 1:64,000 แล้วเพิ่มขึ้นและลดลงไม่แน่นอนในสัปดาห์ที่ 11-12 (ภาพที่ 36)





ภาพที่ 36 ค่า titer ของแอนติซีรั่ม *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ที่เก็บได้หลังการฉีดแอนติเจนกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1-12 สัปดาห์ เมื่อตรวจด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

จากการเจือจางแอนติซีรั่มทั้ง 12 lots ที่แบ่งการเจือจางเป็น 2 ระดับ โดยระดับแรกเป็นการเจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 เท่าโดยปริมาตร พบว่าทั้ง 12 lots สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายได้ด้วยความเข้มข้นของ sonicated bacterial cell 0.0195 ไมโครกรัม ส่วนระดับที่สองเป็นการเจือจางแอนติซีรั่มในอัตราส่วน 1:128,000, 1:64,000, 1:32,000, 16,000, 128,000, 64,000, 64,000, 64,000, 32,000, 32,000 และ 32,000 เท่าโดยปริมาตร ตามลำดับนั้นพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อเป้าหมายได้ด้วยความเข้มข้นของ sonicated bacterial cell 10, 5, 0.625, 0.313, 20, 20, 10, 10, 2.5, 1.25, 2.5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

แอนติซีรั่ม AR-TS003 As. ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 ซึ่งเป็นแอนติเจนเป้าหมาย ในขณะที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ที่มีโคไลนิวและสี่เหลี่ยมที่ยังไม่ได้จัดจำแนก จำนวน 16 ไอโซเลต อย่างไรก็ตาม แอนติซีรั่มที่ได้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) เล็กน้อยกับเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่า ELISA ในการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อเป้าหมาย
เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003

No.	code	Gram reaction	ELISA value
1	Unknown #17 (Pe)	-	0.133
2	Unknown #18 (Pe)	-	-0.043
3	Unknown #19 (Pe)	-	0.006
4	Unknown #21 (Pe)	-	0.266
5	Unknown #23 (Pe)	-	0.051
6	Unknown #24 (Pe)	-	0.151
7	Unknown #26 (Pe)	-	0.171
8	Unknown #27 (Pe)	-	0.159
9	Unknown #28 (Pe)	-	-0.020
10	Unknown #30 (Pe)	-	0.057
11	Unknown #31 (Pe)	-	-0.006
12	Unknown #32 (Pe)	-	0.081
13	Unknown #33 (Pe)	-	-0.095
14	Unknown #34 (Pe)	-	0.098
15	Unknown #35 (Pe)	-	0.260
16	Unknown #36 (Pe)	-	-0.073
17	<i>Ralstonia solanacearum</i> 1	-	0.315
18	<i>R. solanacearum</i> 2	-	0.042
19	<i>R. solanacearum</i> 3	-	-0.036
20	<i>R. solanacearum</i> 4	-	-0.022
21	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> KK9	-	0.068
22	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	-	-0.025
23	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-	-0.027
24	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	-	-0.011
25	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	0.265
26	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> -132	-	-0.074
27	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> -016	-	0.181
28	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> -001	-	0.046
29	Negative control	-	-0.058
30	Positive control	-	1.457