บทที่ 6
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัย สามารถสรุปเป็นประเด็นได้ดังนี้

1. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากต้นกล้าแตงกวา, เมลอน, สควอซ พริกและมะเขือเทศ ที่แสดงอาการเป็นโรคในส่วนของใบเลี้ยง และจากอาการใบจุด ใบไหม้จากแตงโม, น้ำเต้า, คื่นฉ่าย, ผักชี และกล้วยไม้ จำนวน 81 ไอโซเลต และที่แยกได้จากตัวอย่างดิน จำนวน 8 ไอโซเลต ตามระบบการจำแนกแบบผสมผสาน (polyphasic taxonomy) โดยอาศัยคุณสมบัติการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม และเทคนิคทางชีวโมเลกุล ประกอบด้วย คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค, คุณสมบัติทางชีวเคมี, รูปแบบของแถบโปรตีน และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR เข้าร่วมในการพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และอาศัยข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน 16S rRNA gene เพื่อใช้เทียบเคียงชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา สามารถจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *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 ซึ่งแยกได้ต้นกล้า เมล่อน, ต้นกล้าสควอซ, ผลและใบของแตงโม, ต้นกล้าแตงกวา, ผลน้ำเต้า, ยอด ใบ และต้นกล้าพริก, ต้นกล้ามะเขือเทศ, ผลมะเขือเทศ และต้นกล้าข้าวโพด โดยส่วนที่เป็นโรคแสดงอาการเป็นจุด, ใบไหม้

กลุ่มที่ 2 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. asplenii* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SqFS005 ซึ่งแยกได้ต้นกล้าสควอซที่แสดงอาการเป็นโรคใบจุด

กลุ่มที่ 3 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ PeFS009 ซึ่งแยกได้จากต้นกล้าพริกที่แสดงอาการเป็นโรคใบจุด

กลุ่มที่ 4 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. cichorii* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ CeFL001 ซึ่งแยกได้จากใบคื่นฉ่ายแสดงอาการใบจุด

กลุ่มที่ 5 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียในสกุล fluorescent *Pseudomonas* จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ MeFS036, MeFS037, PeFS008, PeFS010, PeFS011, ToFS001, CorFB001, OrFL001, SoilF1, SoilF2, SoilF3, SoilF4, SoilF5, SoilF6, SoilF7 และ SoilF8 ซึ่งแยกได้จากต้นกล้าเมลอน, ต้นกล้าพริก, ต้นกล้ามะเขือเทศ, ลำต้นผักชี, ใบกล้วยไม้ แสดงอาการเป็นโรคใบจุด ใบไหม้ และจากดินบริเวณรอบรากพืช, ดินผสมวัสดุเพาะ

2. การผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

แอนติซีรัม AR-TS003 As ที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* มีค่า titer ต่ำสุด 1:64,000 และสูงสุด 1:256,000 มีความจำเพาะเจาะจงสูงเพียงพอสำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายโดยวิธี indirect ELISA และมีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 และแยกกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน แต่เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* อื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อเป้าหมาย หากพิจารณาจากค่า ELISA เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดเชื้อได้ ยังต้องทำการใช้คุณสมบัติอื่นๆ เช่น การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี การตรวจดูรูปแบบของแถบโปรตีนของเชื้อเพิ่มเติม เป็นต้น ทั้งนี้ควรเลือกเทคนิคที่เหมาะสมกับลักษณะงานที่ปฏิบัติเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด เพราะการเตรียมแอนติเจนจาก whole cell นั้น ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงในระดับสายพันธุ์เชื้อ เช่น อาจเตรียมแอนติเจนได้จากส่วนอื่นๆ ของเซลล์แบคทีเรียมาใช้แทนโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ที่ผ่านการทำ ultrasonication เช่น ในทางการแพทย์จะใช้ส่วนของผนังเซลล์ (O-antigen) ของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* มาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ O antigen และเพื่อประโยชน์ในการจัดกลุ่มเชื้อ *P. aeruginosa* (Duncan et al., 1976) และยังมีการพัฒนาการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ O antigen ของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่แยกเชื้อและรวบรวมได้จากโรงพยาบาล สำหรับใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อใน pyocine type (Al-Dujailli and Harris, 1974)

ข้อเสนอแนะในการทดลอง

1. เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากส่วนที่เป็นโรคของพืชชนิดต่างๆ แล้ว ควรเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ทั้งในรูปแบบ glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ และ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค การปลูกเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบควรคำนึงถึงความสะอาดบริเวณพื้นที่ปฏิบัติงาน จัดชุดพืชทดสอบให้พร้อม ปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง เพื่อมิให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น อีกทั้งพืชทดสอบควรมีสภาพที่สมบูรณ์ อายุของพืชทดสอบอยู่ในระยะที่เหมาะสม เพราะหากพืชทดสอบมีอายุมากเกินไป อาจทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้นทำให้พืชไม่แสดงอาการของโรค ข้อคำนึงในการสร้างสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการทำให้เกิดโรค โดยทำการเก็บต้นพืชที่ทำการทดสอบไว้ในกล่องชื้น เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณและระยะเวลาในการให้น้ำขึ้นอยู่กับสภาพอากาศภายนอกด้วย สังเกตและบันทึกอาการพืชทดสอบกับพืชควบคุมทุกวัน

3. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ควรมีการศึกษาคุณสมบัติตามข้อแนะนำหรือการศึกษาที่มีการรายงานไว้ก่อนแล้ว โดยการตรวจสอบเอกสารและทำความเข้าใจในขั้นตอนการทดลอง การเตรียมสารเคมี และการบันทึกผลการทดลองทั้งข้อมูลตัวเลขและภาพถ่าย เป็นสิ่งสำคัญมาก อีกทั้งระยะเวลาการในการเก็บข้อมูลผลการทดสอบควรอยู่ในระยะเวลาที่เหมาะสมของแต่ละการทดสอบ เพราะหากเก็บข้อมูลเร็วหรือช้าเกินไป อาจทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนไปได้

4. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้ระยะเวลาสั้น มีความน่าเชื่อถือสูง แต่ในทางโรคพืชวิทยายังมีข้อจำกัดอยู่มากในเรื่องฐานข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ไม่ครอบคลุมมากนัก

5. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA gene และใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (BOXAIR) ควรที่จะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่ 120 รอบต่อนาที ไม่ควรเลี้ยงนานเกิน 16-18 ชั่วโมง เพราะจะทำให้เชื้อแบคทีเรียสร้างเมือกมาก ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแล้วทำให้มีโปรตีนปนเปื้อนมาก ซึ่งจะทำให้คุณภาพดีเอ็นเอไม่ดีเท่าที่ควร และควรสกัดโปรตีนด้วย phenol chloroform 2 รอบ เพื่อกำจัดโปรตีน

6. สภาพที่เหมาะสมในการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 คือ อุณหภูมิ 42 ^{0}ซ นาน 45 วินาที (heat shock)

7. การคัดเลือกสัตว์ทดลองที่จะนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัม ควรเลือกกระต่ายที่แข็งแรงสมบูรณ์ อายุประมาณ 3-4 เดือน น้ำหนักตัวประมาณ 3-4 กิโลกรัม และไม่เคยได้รับการฉีดกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติซีรัมมาก่อน อีกทั้งการจัดการและดูแลสัตว์ทดลองก็เป็นสิ่งสำคัญมาก ควรคำนึงถึงสภาพอากาศ ความสะอาดของโรงเรือน อาหาร และน้ำ เพื่อไม่ให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดหรือเจ็บป่วย ซึ่งอาจทำให้ส่งผลต่อคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้