ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
208805

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และการผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FLUORESCENT *Pseudomonas* AND ANTISERUM PRODUCTION FOR DISEASE DIAGNOSIS

พงษาวินชา ขันธาสา

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554

b0025743

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
208805

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และการผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FLUORESCENT *Pseudomonas* AND ANTISERUM PRODUCTION FOR DISEASE DIAGNOSIS

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

นางสาววิยะดา ขันอาสา

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2554

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และการผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

นางสาววิยะดา ขันอาสา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554

IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FLUORESCENT *Pseudomonas* AND ANTISERUM PRODUCTION FOR DISEASE DIAGNOSIS

MISS VIYADA KANASA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN PLANT PATHOLOGY

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

2011

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

ชื่อวิทยานิพนธ์: การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และการผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาววิยะดา ขันอาสา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภลักษณ์ สิงหบุตร ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิเดช แสงดี กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล .....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล)

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมาตย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พลธานี)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิยะดา ขันอาสา. 2554. **การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และการผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล

บทคัดย่อ

208805

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากอาการใบจุด ใบไหม้บนใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงกวา เมล่อน สควอซ ข้าวโพด พริกและมะเขือเทศที่ตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยเทคนิค botter test และแยกได้จากอาการใบจุด ใบไหม้จากตัวอย่างใบแตงโม, น้ำเต้า, พริก, มะเขือเทศ คื่นช่าย ผักชี กล้วยไม้ และจากดินรอบรากพืช, ดินผสมวัสดุเพาะ จำนวน 89 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติแบบดั้งเดิม และเทคนิคทางชีวโมเลกุล ตามระบบ polyphasic taxonomy ประกอบด้วย คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค, คุณสมบัติทางชีวเคมี, รูปแบบโปรตีน, ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อที่จำแนกเบื้องต้นเป็น *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003 ด้วยเทคนิค indirect ELISA และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR รวมถึงข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rRNA gene ของเชื้อที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่ม สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียออกเป็นแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1) *P. aeruginosa* กลุ่มใหญ่ที่สุด จำนวน 70 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้ต้นกล้า เมล่อน, ต้นกล้าสควอซ, ผลและใบของแตงโม, ต้นกล้าแตงกวา, ผลน้ำเต้า, ยอด ใบ และต้นกล้าพริก, ต้นกล้ามะเขือเทศ, ผลมะเขือเทศ และ ต้นกล้าข้าวโพด โดยส่วนที่เป็นโรคแสดงอาการเป็นจุด, ใบไหม้ 2) แบคทีเรียที่ใกล้ชิดกับ *P. asplenii* จำนวน 1 ไอโซเลต แยกได้จากต้นกล้าสควอซที่แสดงอาการเป็นโรคใบจุด 3) แบคทีเรีย fluorescent *Pseudomonas* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rRNA gene ใกล้ชิดกับ *Burkholderia cepacia* จำนวน 1 ไอโซเลต แยกได้จากต้นกล้าพริกแสดงอาการเป็นโรคใบจุด 4) แบคทีเรียที่ใกล้ชิดกับ *P. cichorii* จำนวน 1 ไอโซเลต แยกได้จากใบคื่นฉ่ายแสดงอาการใบจุด 5) กลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จำนวน 16 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากต้นกล้าเมลอน, ต้นกล้าพริก, ต้นกล้ามะเขือเทศ, ลำต้นผักชี, ใบกล้วยไม้ แสดงอาการเป็นโรคใบจุด ใบไหม้ และจากดินบริเวณรอบรากพืช, ดินผสมวัสดุเพาะ

208805

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช fluorescent *Pseudomonas* AR-TS003 ที่แยกได้จากต้นกล้ามะเขือเทศที่แสดงอาการใบจุดสีดำบนใบเลี้ยงเมื่อตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดย Blotter test นำมาจำแนกเบื้องต้นโดยคุณสมบัติทางชีววิทยา และ Biolog™ ระบุชื่อคือ *Pseudomonas aeruginosa* จึงนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมโดยเตรียมแอนติเจนในรูปของ sonicated whole cell ผสมกับ Frend's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของกระต่ายพันธุ์ New Zealand White จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 7 วัน และฉีด sonicated whole cell AR-TS003 เข้าเส้นเลือดใบหูกระต่าย จำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 7 วัน หลังครบโปรแกรมฉีดกระตุ้นไปแล้ว 10 วัน จึงเก็บเลือดทุกสัปดาห์ นำแอนติซีรัมมาตรวจหาค่า titer ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1-3 มีค่า titer 1:256,000 โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียมาทดสอบในความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 ค่า titer ลดลงเป็น 1:64,000 แต่กลับเพิ่มขึ้นเป็น 1:256,000 ในสัปดาห์ที่ 5 จากนั้นในสัปดาห์ที่ 6-12 ค่า titer มีแนวโน้มลดลงไม่แน่นอน แอนติซีรัมนี้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย AR-TS003 ที่มีปริมาณโปรตีน 0.313 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความจำเพาะเจาะจงสูงมากต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003 โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นๆ ได้แก่ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Xanthomonas axonopodis* pv. *citri, Xanthomonas campestris* pv.*campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และ *Serratia marcescens* เกิดปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาได้เล็กน้อยกับเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรีย unknown ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีมสร้างสารเรืองแสงได้ซึ่งแยกได้จากต้นกล้าพืชเป็นโรคบนใบเลี้ยง จำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อ AR-TS003 อย่างชัดเจน แอนติซีรัมที่ผลิตได้มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003 และสามารถใช้ประเมินความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003 กับ fluorescent *Pseudomonas* สาเหตุโรคพืชอื่นๆ โดยเทคนิค indirect ELISA เพื่อประโยชน์ในวินิจฉัยโรคโรคสำคัญในพืชผักได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องเชื่อถือได้ต่อไป

Viyada Kanasa. 2011. **Identification of Phytopathogenic Fluorescent *Pseudomonas* and Antiserum Production for Disease Diagnosis**. Master of Science Thesis in Plant Pathology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Petcharat Thummabenjapone

ABSTRACT

208805

Total 89 isolates plant pathogenic fluorescent *Pseudomonas* were isolated from infected cotyledon of seedling obtained from blotter test and leaf spot / leaf blight symptoms of watermelon, gourd, pepper, tomato, coriander, celery, orchid and agricultural soils. All isolates produced disease on particular tested plants. Based on polyphasic taxonomy including information on their morphology, pathogenicity, biochemical properties, whole cell protein profile, rep-PCR DNA-fingerprint, carbon source utilization by Biolog™ and nucleotide sequence of 16S rRNA gene were used of bacterial taxonomy. Resulting 5 groups of fluorescent *Pseudomonas* pathogenic bacteria were identified including : 1) *P. aeruginosa* which major group consisted of 70 isolates from melon, squash, watermelon, cucumber, guard, pepper, tomato and corn with spot/blight symptom, 2) tentative *P. asplenii* 1 isolate from squash leaf spot symptom, 3) fluorescent Pseudomonas which 16S rDNA sequence be closely to *Burkhloderia cepacia* 1 isolate from pepper leaf spot symptom, 4) tentative *P. cichorii* 1 isolate from celery leaf spot symptom, 5) fluorescent *Pseudomonas* 16 isolates from melon, pepper, tomato, coriander, orchid spot/blight symptom and agricultural soils.

The *P. aeruginosa* AR-TS003 with isolated from infected cotyledon of tomato seedlings obtained from blotter testing was used for polyclonal antiserum production. The suspension of AR-TS003 sonicated cells was mixed with Freund's incomplete adjuvant 1:1 (v/v) for intramuscular immunization of New Zealand White female rabbit for 3 times, weekly interval. Then, the sonicated suspension was intraveinous immunized for 2 times by weekly interval. Bleeding was done at 10 days after final immunization. The obtained AR-TS003 antiserum from rabbit showed higher titer value when detected by indirect ELISA. Titer of antiserum at week 1-3 was 1:256,000, then increased to titer 1:64,000 at week 4, maximum titer was obtained as 1:256,000 at week 5 and then fluctuation at week 6-12. The sensitivity of AR-TS003 antiserum

208805

for detection AR-TS003 protein was 0.313 µg protein/ml. The specificity of AR-TS003 antiserum was highly specific against strains of *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003 and other *P. aeruginosa* isolates obtained from pepper, tomato and cucurbit samples. No cross reaction occurred with other phytopathogenic bacteria including, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Xanthomonas axonopodis* pv. *citri, Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Serratia marcescens*. However, the AR-TS003 antiserum showed slightly serological related to *Ralstonia solanacearum* and moderately serological relationship to other unknown fluorescent *Pseudomonas* 7 isolates from infected seedling/ part of disease plant. This study indicated that, the AR-TS003 could be used for routine detection and diagnosis of *P. aeruginosa* and study on serological relationship with other fluorescent *Pseudomonas* by indirect ELISA. This will be enhanced rapidly and more reliable diagnosis for bacterial diseases of economic vegetable crops.

งานวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบส่วนดีให้บุพการีและคณาจารย์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์เป็นอย่างดีได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำในการศึกษารายวิชา การออกแบบและวางแผนการทดลอง เพื่อให้ได้คำตอบที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ สนับสนุนให้ได้รับทุนในการศึกษาวิจัย และเปิดโอกาสในการนำเสนอผลงานวิจัย ตลอดจนกรุณาให้คำแนะนำในการเขียนรายงานทางวิชาการ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภลักษณ์ สิงหบุตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิเดช แสงดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยเหลือแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการไวรัสทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุกเรื่อง

ขอขอบคุณ บุคลากรในสาขาโรคพืชวิทยาทุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องเตรียมการเรียนการสอน ที่อำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุญทัน-คุณแม่หนวน ขันอาสา ที่อบรมเลี้ยงดูเป็นผู้ประพฤติปฏิบัติเป็นแบบอย่างที่ดีในการดำรงชีวิต อีกทั้งคุณรชยา ขันอาสา และญาติพี่น้องทุกคนเป็นแรงใจอันสำคัญยิ่งที่ผลักดันให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในทุกๆ ด้าน

วิยะดา ขันอาสา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
คำอุทิศ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	3
3. ขอบเขตของการวิจัย	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
1. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas syringae*	5
2. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas cichorii*	6
3. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa*	7
4. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas putida*	8
5. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas fluorescens*	8
6. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas chlororaphis*	9
7. ความสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aureofaciens*	9
8. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั่วไป	10
9. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* โดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน (polyphasic taxonomy)	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas*	16
2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	17
3. การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA	17
4. การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	18
5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
6. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอาหารโดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™)	21
7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene	21
8. การศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ของ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค rep-PCR	24
9. การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ตามระบบ polyphasic taxonomy	25
10. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม flurescent *Pseudomonas*	31
2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	34
3. การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA	37
4. การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	42
5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	47
6. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอาหารโดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Biolog™)	54
7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene	57
8. การศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ของ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค rep-PCR	68
11. การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ตามระบบ polyphasic taxonomy	71
12. คุณภาพของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003	75
บทที่ 5 อภิปรายผล	78
บทที่ 6 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	82
เอกสารอ้างอิง	86

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA	93
ภาคผนวก ข สูตรอาหารสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	96
ภาคผนวก ค สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE)	99
ภาคผนวก ง การเตรียม competent cell	104
ภาคผนวก จ การแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี alkaline lysis	106
ภาคผนวก ฉ อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis	108
ภาคผนวก ช สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว โดยใช้ Biolog Identification System (Biolog™)	113
ประวัติผู้เขียน	115

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่า ELISA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 โดยเทคนิค indirect ELISA	38
ตารางที่ 2	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม	50
ตารางที่ 3	รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank (ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA)	61
ตารางที่ 4	ค่า ELISA ในการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อเป้าหมาย เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003	77

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงขั้นตอนการเก็บ Normal serum	27
ภาพที่ 2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB แต่ไม่สร้าง pigments บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA	32
ภาพที่ 3	การสร้าง pigments เรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas*	32
ภาพที่ 4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่สร้างสารเรืองแสงสีเหลืองปนเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB และการเรืองแสงเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร	32
ภาพที่ 5	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืช จากการทำ 10-fold serial dilution บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB	33
ภาพที่ 6	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินผสมวัสดุเพาะ จากการทำ 10-fold serial dilution บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB	34
ภาพที่ 7	อาการของโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* บนใบพืชวงศ์แตง	35
ภาพที่ 8	อาการของโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* บนใบข้าวโพด พริกและมะเขือเทศ	35
ภาพที่ 9	อาการของโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* บนใบคื่นฉ่ายและผักชี	36
ภาพที่ 10	อาการของโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* บนใบกล้วยไม้	36
ภาพที่ 11	รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* AR-TS003 เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12%	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 12	รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* AR-TS003 เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12%	44
ภาพที่ 13	รูปแบบของแถบโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* AR-TS003 เมื่อแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ resolving gel ที่ระดับความเข้มข้น 12%	45
ภาพที่ 14	Dendrogram ที่ได้จากรูปแบบโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่จัดกลุ่มความสัมพันธ์กับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ที่วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0	46
ภาพที่ 15	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง levan ซึ่งมีลักษณะโคโลนีนูนและเมือกเยิ้ม เปรียบเทียบกับ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) ที่ไม่สร้าง levan บนอาหาร NSA	48
ภาพที่ 16	แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส	48
ภาพที่ 17	แสดงการทดสอบการเน่ากับชิ้นมันฝรั่ง	48
ภาพที่ 18	แสดงการทดสอบการไฮโดรไลส์ arginine	49
ภาพที่ 19	แสดงการทดสอบ HR กับใบยาสูบ	49
ภาพที่ 20	การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS001	54
ภาพที่ 21	การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CuFS015	55
ภาพที่ 22	การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005	55
ภาพที่ 23	การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตMeFS036	56
ภาพที่ 24	การจำแนกเชื้ออย่างรวดเร็วจากการใช้ substrate 95 ชนิด บนอาหาร Biolog GN2 Microplate ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SoilF4	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 25	16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชไอโซเลตตัวแทนกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* มีขนาดประมาณ 1,500 bp หลังการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primers rD1 และ fD1	58
ภาพที่ 26	recombinant clone ที่มีส่วน 16S rDNA ของเชื้ออยู่ใน pGEM-T easy แยกขนาดบน 1% agarose gel electrophoresis	59
ภาพที่ 27	recombinant clone ที่มีส่วน 16S rDNA ของเชื้ออยู่ใน pGEM-T easy แยกขนาดบน 1% agarose gel electrophoresis	59
ภาพที่ 28	Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ทั้ง 4 กลุ่ม ในส่วนบริเวณ 16S rRNA gene เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกลุ่มอื่นๆ วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5	60
ภาพที่ 29	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,485 bp จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต MeFS001	63
ภาพที่ 30	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,415 bp จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PeFS009	64
ภาพที่ 31	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,489 bp จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SqFS005	65
ภาพที่ 32	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,490 bp จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CeFL001	66
ภาพที่ 33	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA จำนวน 1,489 bp จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AR-TS003	67
ภาพที่ 34	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ BOXAIR ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่นำมาแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 60 นาที	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 35	Dendrogram การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (BOXAIR) วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2	70
ภาพที่ 36	ค่า titer ของแอนติซีรัม *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 ที่เก็บได้หลังการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1-12 สัปดาห์ เมื่อตรวจด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร	76