199946

จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์ 2550: การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โฆสิตรัตน, Ph.D. 105 หน้า

การเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย โดยเป็นเชื้อที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับชุดตรวจสำเร็จรูปที่จำเพาะต่อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Agdia®, USA) แต่เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 สายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อ *P. agglomerans* 4633 4045 และ 20569 *Erwinia chrysanthemi E.carotovora* subsp. *carotovora* *Escherichia coli* ด้วยวิธีการอ้างอิงตามมาตรฐาน ได้แก่ การติดสีแกรม การเคลื่อนที่ การเจริญบนอาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium การทนเกลือ การเกิดปฏิกิริยา Hypersensitive response การเกิดโรคในต้นกล้าข้าวโพด ELISA ด้วย Agdia® kit การทำปฏิกิริยาด้วย PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16s-23s rRNA/ITS *cpsD* และ *hrpS* และจากการจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด รูปแบบของ soluble protein และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยทั้ง 13 สายพันธุ์ไม่ใช่เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* และจากข้อมูลที่ศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ยกเว้นสายพันธุ์ XE 7 และสายพันธุ์ W เป็นเชื้อ *Pantoea agglomerans* และการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ของยีน *hrpS* เท่านั้นที่ตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จากตัวอย่างพืชและเมล็ด ด้วย direct-PCR Magnetic bead-PCR Ampli-disk PCR Real-time PCR และ ELISA พบว่าวิธีการ direct-PCR ใช้คู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hrpS* ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความน่าเชื่อถือ และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่าวิธีอื่นๆ มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวอย่างพืชสด ที่มีปริมาณแบคทีเรียต่ำสุดอยู่ในช่วง 10^2-10^3 colony forming unit (cfu) ต่อปฏิกิริยา และมีความไวในตรวจสอบการติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเมล็ดในระดับต่ำถึง 0.02 – 0.007%ได้ประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อเพิ่มจาก 33 เป็น 83%ได้ด้วยวิธีแบ่งกองตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ (sub-sample) วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นวิธีการตรวจเชื้อที่เป็นมาตรฐานสำหรับตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ได้

199946

Jutatape Watcharachaiyakup 2007: Study of Bacterial Wilt Disease of Corn in Thailand. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 105 pages.

Thirteen strains of bacteria which positive reaction with ELISA Agdia® kit specific for *Pantoea stewartii* were tested by standard detection method and compared with *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715; the type strain, *P. agglomerans* 4633, 4045, 20569 *Erwinia chrysanthemi* *E.carotovora* subsp. *carotovora* and *Escherichia coli* . The standard methods compose of gram staining, motility test, growth on nigrosine selective medium and salt tolerance. PCR detection by using specific primer to 16s-23s rRNA/ITS, *cpsD* and *hrpS* gene of *P. stewartii* subsp. *stewartii* were also tested. The bacteria were clustered by AFLP DNA fingerprint, carbon source utilization, soluble protein SDS-PAGE profile and 16s rDNA sequences were also compared. From the results indicated that these 13 bacterial strains were not *P. stewartii* subsp. *stewartii*. However, all strain except XE7 and W strains were identified as *P. agglomerans*. The result revealed that only PCR detection of *hrpS* gene was a specific detection method for *P. stewartii* subsp. *stewartii*.

PCR based detection techniques of *hrpS* gene as a target gene for detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* from infected plant and seed sample namely direct-PCR, magnetic bead-PCR, ampli-disk PCR and real-time PCR were compared with ELISA for detection efficiency. The result indicated that direct-PCR is the best method based on fast, easy, sensitivity, reliability and low cost. The detection sensitivity of direct-PCR was in the range of 10^2- 10^3 colony forming unit (cfu) per reaction in plant sample. For seed lot sample, sensitivity of detection was in the range of 0.02 – 0.007% of seed contamination and detection efficiency was increased from 33 to 83% by sub-sample seed detection. Furthermore, this detection efficiency was covered the rate of seed to seedling transmission and should be used as a standard detection method of this pathogen in Thailand.