



วิทยานิพนธ์

การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย

**STUDY OF BACTERIAL WILT DISEASE OF CORN IN
THAILAND**

นางสาวจุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
.....
ปริญญา

.....
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
.....
สาขา

.....
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
.....
ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย

Study of Bacterial Wilt Disease of Corn in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวจุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โสมสิตรัตน, Ph.D.)

กรรมการ
(รองศาสตราจารย์นิพนธ์ ทวีชัย, Ph.D.)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา
(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย

Study of Bacterial Wilt Disease of Corn in Thailand

โดย

นางสาวจุฑาทิพย์ วัชรไชยกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

จุฬาเทพ วัชรไชยกุลปต์ 2550: การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการ
สหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย ไชลิตรัตน,
Ph.D. 105 หน้า

การเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย โดยเป็นเชื้อที่ทำให้
ผลบวกล้มเมื่อทำปฏิกิริยากับชุดตรวจสำเร็จรูปที่จำเพาะต่อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Agdia®, USA) แต่
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 สายพันธุ์
มาตรฐาน และเชื้อ *P. agglomerans* 4633 4045 และ 20569 *Erwinia chrysanthemi* *E. carotovora* subsp.
carotovora *Escherichia coli* ด้วยวิธีการอ้างอิงตามมาตรฐาน ได้แก่ การคิดสีแกรม การเคลื่อนที่ การเจริญบน
อาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium การทนเกลือ การเกิดปฏิกิริยา Hypersensitive response การเกิดโรค
ในต้นกล้าข้าวโพด ELISA ด้วย Agdia® kit การทำปฏิกิริยาด้วย PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16s-23s
rRNA/ITS *cpsD* และ *hrpS* และจากการจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP การใช้แหล่ง
คาร์บอน 95 ชนิด รูปแบบของ soluble protein และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่
แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยทั้ง 13 สายพันธุ์ไม่ใช่เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* และจากข้อมูล
ที่ศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ยกเว้นสายพันธุ์ XE 7 และสายพันธุ์ W เป็นเชื้อ
Pantoea agglomerans และการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ของยีน *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
ใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hrpS* ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มี
ความน่าเชื่อถือ และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่าวิธีอื่นๆ มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนใน
ตัวอย่างพืชสด ที่มีปริมาณแบคทีเรียต่ำสุดอยู่ในช่วง 10^2 - 10^3 colony forming unit (cfu) ต่อปฏิกิริยา และมีความ
ไวในการตรวจสอบการติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเมล็ดในระดับต่ำถึง 0.02 – 0.007% ได้
มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อเพิ่มจาก 33 เป็น 83% ได้ด้วยวิธีแบ่งกองตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ (sub-sample) วิธีการที่
พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นวิธีการตรวจเชื้อที่เป็นมาตรฐานสำหรับตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii*
subsp. *stewartii* ได้

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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิชัย โสสิตรัตน ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.นิพนธ์ ทวีชัย และผศ.ดร. รัชนี สงประยูร กรรมการที่ปรึกษา อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวคล ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสมอมา และขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.พงศ์เทพ อัครชนกุล ที่ให้โอกาส และคำแนะนำในด้านต่างๆ ในการเรียนระดับปรัชญาคุษย์บัณฑิตนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน รวมทั้งครู อาจารย์ ทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้จนสำเร็จการศึกษา และขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการให้แรงงาน ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อีกทั้งเป็นกำลังใจให้เสมอมา และขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนานักศึกษาศึกษาและการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

ขอขอบคุณสำนักงานสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตร และอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยภายใต้โครงการ การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวในข้าวโพด

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และกรมวิชาการเกษตรในการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* คุณณัฏฐิมา ไชยิตเจริญกุล และคุณณัฏฐพร อุทัยมงคล ในการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ XE และ *Erwinia* spp. รวมถึงสถานที่ทำการทดลองห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรีย กลุ่มวิจัยการอารักขาพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ พี่ ๆ ทุกคน ที่ให้ความรัก และเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

จุฑาทาเทพ วัชรไชยคุปต์

ตุลาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(10)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	18
การพิสูจน์เทคนิคในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย	18
วิธีการตรวจสอบเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	27
การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในพืช	36
การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อ	37
ผล	41
วิจารณ์	79
สรุปและเสนอแนะ	92
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	94
ภาคผนวก	103
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	105

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดข้าวโพดคั่วเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ประมาณจากการตรวจ 4 8 12 และ 16 ของกองเมล็ดพันธุ์ กองละ 100 เมล็ด ด้วยวิธีการ ELISA 14
2	ชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 19
3	การทดสอบเชื้อแบคทีเรีย คุณสมบัติการทนเกลือ การเกิดโรค การเกิดปฏิกิริยา Hypersensitive response การทำปฏิกิริยา ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PathoScreen® สำหรับ <i>Pantoea stewartii</i> และการตรวจสอบด้วย PCR โดยผู้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16s-23s rRNA/ITS <i>hrpS</i> และ <i>cpsD</i> 45
4	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เมื่อทดสอบด้วย Biolog® system 51
5	ความจำเพาะของ IgG anti-MPC IgG anti-fixed cell IgY anti-MPC และ IgY anti-life cell ต่อเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยาโดยชุดตรวจสอบ ELISA สำเร็จรูป PathoScreen® 64
6	ความไวของแอนติบอดี IgG anti-MPC IgG anti-fixed cell IgY anti-MPC และ IgY anti-life cell ต่อเชื้อ <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ด้วยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ELISA สำเร็จรูป PathoScreen® 66
7	เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> จากสารแขวนลอยเซลล์ที่มีปริมาณเชื้อระดับต่างๆ ด้วยวิธีการ PCR Magnetic bead-PCR Real-time PCR Ampli-disk PCR และ ELISA 68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเมล็ดที่ติดเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T ที่ระดับต่างๆ ด้วยวิธีการ PCR แบบไม่แบ่งกองเมล็ดพันธุ์และแบบแบ่งกองเมล็ดพันธุ์	78
9	เปรียบเทียบลักษณะเด่นและแตกต่างของเชื้อ <i>Pantoea agglomerans</i> และเชื้อ <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย	86
10	เปรียบเทียบข้อเด่นข้อด้อยในด้านต่างๆ ของวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> จากตัวอย่างพืชหรือเมล็ดข้าวโพด	89

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลำดับดีเอ็นเอของยีน <i>hrpS</i> และส่วนที่นำมาใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 123 คู่เบส ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้และมีลูกศรอยู่ด้านบนเป็นส่วน Forward primer และส่วนที่มีลูกศรอยู่ด้านล่างเป็นส่วน Reverse primer ลำดับเบสที่เป็นอักษรตัวหนาเป็นส่วนดีเอ็นเอของผลผลิต Real-time PCR	35
2	แผนผังแสดงการตรวจเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดด้วยวิธีการ Direct-PCR (1) Magnetic bead-PCR (2) Ampli-disk PCR (3) และ ELISA (4)	39
3	โคโลนีของเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โคโลนีบนอาหาร NA อายุ 2 วัน (ก-จ) อายุ 4 วัน (ฉ) อาหาร CPG (ช) อาหาร Nigrosine medium อายุ 5 วัน (ซ) ภาพขยายของโคโลนีแสดงลักษณะตาขอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แต่ละระหว่างช่องขีดสีแดง มีขนาด 1 มิลลิเมตร (ณ) โคโลนีบนอาหาร Nigrosin medium อายุ 2 วัน เชื้อ <i>P. agglomerans</i> 4633 (ญ) XE1 (ฎ) XE2 (ฏ) XE3 (ฐ) XE4 (ฑ) XE5 (ฒ) XE6 (ด) XE7 (ค) XE8 (ถ) XE9 (ท) XE11 (ธ) Y001 (น) และ W001 (บ)	44
4	อาการบนใบข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ปลูกเชื้อด้วย PBS (ก) ปลูกเชื้อด้วย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T (ข-จ) ปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ XE1 2 3 4 5 6 8 9 11 และ Y001 ตามลำดับ (ฉ-ฒ)	46
5	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์จากตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดและเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> การสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์จำเพาะยีน <i>cpsD</i> (ก) <i>hrpS</i> (ข) และ 16s-23s rRNA/ITS (ค) ตำแหน่งที่ลูกศรสีขาวชี้เป็นแถบดีเอ็นเอของแต่ละยีน และลูกศรสีดำเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน 16s rDNA เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบชี้วัดการเกิดปฏิกิริยา PCR (internal control) NTC หมายถึง non template control	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s- 23s rRNA/ITS (ก) และ <i>cpsD</i> (ข) ในตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด สายพันธุ์ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 เทียบกับเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> โดยใช้โปรแกรม GeneDoc Version 2.6.001 (Nicholas and Nicholas, 1997)	48
7	เดนโดแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด สายพันธุ์ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 เทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล Genbank ด้วยวิธี Neighbour joining by percentage identity เส้นด้านล่างภาพหมายถึงระยะทาง 0.1 (distance) เชื้อที่มีตัวอักษรนำหน้า Pdis หมายถึง <i>Pantoea dispersa</i> Pstw หมายถึง <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> Panan หมายถึง <i>P. ananatis</i> Ewhe หมายถึง <i>Erwinia herbicola</i> Ech หมายถึง <i>E. chrysanthemi</i> Ecc หมายถึง <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ตัวอักษรและตัวเลขที่ต่อท้ายชื่อหมายถึง accession no. ของเชื้อจากฐานข้อมูล Genbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	49
8	ภาพสามมิติแสดงการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด เปรียบเทียบด้วยวิธีการ Principal component analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยได้แก่สายพันธุ์ XE1-XE6 XE8 -XE9 XE11 และ Y001 รวม 10 สายพันธุ์ Ag หมายถึง <i>Pantoea agglomerans</i> จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 4045 4633 และ 20596 LMG หมายถึง <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> สายพันธุ์ LMG2715 ^T	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9	เดนโดแกรมแสดงการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด วิเคราะห์ด้วย Simple matching coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method of averages) ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ได้แก่ สายพันธุ์ XE1-XE6 XE8 –XE9 XE11 และ Y001 รวม 10 สายพันธุ์ Pag หมายถึง <i>Pantoea agglomerans</i> Pd หมายถึง <i>P. dispersa</i> Pss และ LMG2715^T หมายถึง <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> สายพันธุ์ที่มีเครื่องหมาย * เป็นข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล Biolog®
10	เดนโดแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) วิเคราะห์ด้วย Dice' Coefficient และจัดกลุ่มด้วย UPGMA (Unweighted pair group method of average) ตัวเลขเหนือเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Winboot ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002 Ech1 และ 2 หมายถึง <i>Erwinia chrysanthemi</i> แยกได้จาก ข้าวโพด และกล้วยไม้ LMG2715^T หมายถึง <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715^T
11	รูปแบบของแถบ Soluble protein ของแบคทีเรีย วิเคราะห์ด้วย 15 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002 Ech หมายถึง <i>Erwinia chrysanthemi</i> LMG หมายถึง <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715^T Ecc หมายถึง <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 4633 และ 4045 หมายถึงเชื้อ <i>P. agglomerans</i> สายพันธุ์ 4633 และ 4045 ตามลำดับ

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|---|----|
| 12 | <p>เดนโดรแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้รูปแบบ soluble protein วิเคราะห์ด้วย Dice' Coefficient และจัดกลุ่มด้วย UPGMA (Unweighted pair group method of averages) ด้วยโปรแกรม GeneTools® (Syngene, Cambridge, UK) ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002 Ech หมายถึง <i>Erwinia chrysanthemi</i> LMG หมายถึง <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715^T Ecc หมายถึง <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 4633 และ 4045 หมายถึงเชื้อ <i>P. agglomerans</i> สายพันธุ์ 4633 และ 4045 ตามลำดับ</p> | 61 |
| 13 | <p>เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715^T เมื่อมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียระดับต่างกันด้วยเทคนิค PCR โดยมี <i>hrpS</i> เป็นยีนเป้าหมาย ก. วิธี direct-PCR ข. วิธี Magnetic bead -PCR ค. วิธี Ampli-disk PCR M หมายถึง DNA Ladder ช่องที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ช่องที่ 2-7 หมายถึง แบคทีเรียในปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการทดลองในแต่ละวิธี จำนวน 1 10 10² 10³ 10⁴ และ 10⁵ (cfu) ตามลำดับ</p> | 69 |
| 14 | <p>ความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ต่อยีน <i>hrpS</i> ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยทดสอบปฏิกิริยาต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715^T <i>P. agglomerans</i> 4633 และ 4045 <i>Erwinia chrysanthemi</i> <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> <i>Escherichia coli</i> เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากข้าวโพดสายพันธุ์ XE1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 และ Y001</p> | 70 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ความไวของการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยมียีน <i>hrpS</i> เป็นยีนเป้าหมาย ก. กราฟแสดงความเข้มของสัญญาณแสงและจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาตรวจสอบเซลล์ ปริมาณ 10^5 ถึง 1 cfu และ NTC (non template control) ข. กราฟมาตรฐานระหว่างรอบการทำปฏิกิริยาและปริมาณเซลล์ ค. กราฟแสดงค่า T_m ของผลผลิตของ real-time PCR คอยีน <i>hrpS</i>	71
16	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงความไวของการตรวจสอบเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ที่ผสมกับน้ำแช่ไขว้โพด เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อจากเซลล์โดยตรง ด้วยเทคนิค PCR โดยมียีน <i>hrpS</i> เป็นยีนเป้าหมาย	72
17	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงการตรวจสอบไขว้โพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อด้วย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T (ด้านซ้าย) และไขว้โพดที่ปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ XE (ด้านขวา) ด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบยีน <i>hrpS</i> เป็นยีนเป้าหมาย	73
18	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงผลการทดสอบเมล็ดไขว้โพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T ด้วยวิธีการใช้สุญญากาศและตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์จำเพาะคอยีน <i>hrpS</i> (900 bp) ช่องที่ 1- 24 ในแถว ก และ ข เป็นเมล็ดที่ปลูกเชื้อ และ ช่องที่ 1-24 ในแถว ค เป็นเมล็ดที่แช่ PBS เป็นตัวเปรียบเทียบ M เป็น DNA ladder	74
19	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> ที่มีปริมาณเชื้อที่แน่นอน ผสมร่วมกับน้ำบัลเมล็ด (ด้านซ้าย) หรือน้ำแช่เมล็ด (ด้านขวา) ด้วยเทคนิค PCR ตรวจยีน <i>hrpS</i> (900 bp) ด้วยวิธีการ (ก) direct-PCR (ข) Magnetic-PCR และ (ค) Ampli-disk PCR N	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	หมายถึง น้ำบดหรือน้ำแช่เมล็ดที่ไม่มีแบคทีเรีย M หมายถึง DNA ladder ตัวเลขด้านบนแสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (cfu)	75
20	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงการตรวจสอบเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG2715 ^T ด้วยเทคนิค PCR ที่เชื้อในปริมาณต่างๆ (10^3 - 10^5 cfu) ผสมรวมกับน้ำแช่เมล็ดข้าวโพดปริมาณต่างกัน (10-200 มิลลิลิตร) โดยตรวจยีน <i>hrpS</i> เป็นยีนเป้าหมาย ช่อง M หมายถึง DNA Ladder ช่อง N หมายถึง ตัวอย่างเปรียบเทียบ ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย	77
21	แผนผังการตรวจสอบเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> สำหรับประเทศไทย	91
ภาพผนวกที่		
1	ชนิดของแหล่งคาร์บอนในงานหุ้มน GN2	104

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
μl	micro-liter
μM	micro-Mole
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
AWCD	Average well color development
BSA	Bovine serum albumin
cfu	colony forming unit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPS	Exopolysaccharide
<i>g</i>	Relative centrifuge force
kb	kilobase
LPS	Lipopolysaccharide
mM	millimolar
MPC	Membrane protein complex
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient broth
nm	nanometre
nM	nanomolar
O.D.	optical density
°C	องศาเซลเซียส
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
TBE	Tris borate – EDTA
UPGMA	Unweighted pair group method of averanges

การศึกษาโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของข้าวโพดในประเทศไทย

Study of Bacterial Wilt Disease of Corn in Thailand

คำนำ

เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของข้าวโพด ทำให้ข้าวโพดเหี่ยวตายได้ จากรายงานใน Crop Protection Compendium, 2005 Edition พบเชื้อโรคนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นและพบในประเทศหรือกลุ่มประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ ได้แก่ ประเทศแคนาดา ในมลรัฐแอลเบอร์ตา และเม็กซิโก ออนแทรีโอ และประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบในหลายมลรัฐ ได้แก่ แอลาบามา อาร์คันซอ แคลิฟอร์เนีย คอนเนตทิคัต เดลาแวร์ ฟลอริดา จอร์เจีย ไอดาโฮ อิลลินอยส์ อินดีแอนา ไอโอวา แคนซัส เคนทักกี ลุยเซียนา แมริแลนด์ แมสซาชูเซตส์ มิชิแกน มิสซิสซิปปี มิสซูรี เนแบรสกา นิวแฮมป์เชียร์ นิวเจอร์ซีย์ นิวเม็กซิโก นิวยอร์ก นอร์ทดาโคตา โอไฮโอ โอคลาโฮมา เพนซิลเวเนีย โรดไอแลนด์ เซาท์แคโรไลนา เซาท์ดาโคตา เทนเนสซี เท็กซัส เวอร์มอนต์ เวอร์จิเนีย วอชิงตัน เวสต์เวอร์จิเนีย และ วิสคอนซิน ในทวีปอเมริกากลางและแคริบเบียน ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐคอสตาริกา และ เปอร์โตริโก ในทวีปอเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐบราซิล สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล สาธารณรัฐเปรู และ สาธารณรัฐสหกรณ์กายอานา ในทวีปยุโรปและเมดิเตอร์เรเนียน ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐออสเตรีย และในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย เชื้อโรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตข้าวโพด ทั้ง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดฝักอ่อน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าวโพดหวาน เนื่องจากเชื้อโรคนี้มีการแพร่กระจายโดยผ่านทางแมลงด้วงหมัดข้าวโพด (corn flea beetles) โดยเฉพาะ *Chaetocnema pulicaria* เนื่องจากเชื้อโรคนี้มีโอกาสติดเมล็ดจากพืชที่เป็นโรคสู่เมล็ดในอัตราต่ำในระดับ 0.03 - 0.013% ในพืชสายพันธุ์ด้านทานปานกลางถึงสายพันธุ์ด้านทาน และหากนำเมล็ดที่ได้จากต้นที่เป็นโรคไปปลูกจะมีโอกาสติดเชื้อจากเมล็ดไปสู่ต้นกล้าเพียงในอัตราเพียง 0.8 % ในกรณีที่เมล็ดมีการปนเปื้อนน้อยกว่า 10% การแพร่กระจายโรคในแปลงปลูกนั้นจึงพบมากในแหล่งที่พบแมลงพาหะและระบาดตามถิ่นอาศัยของด้วงหมัดข้าวโพด (Pataky and Ikin, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าจะมีการติดเชื้อจากเมล็ดแต่ปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดการแพร่ระบาดมีปัจจัยสำคัญอยู่ที่แมลงพาหะ ดังนั้นในเขตที่ไม่ใช่แหล่งของเชื้อโรคและไม่พบด้วงหมัดข้าวโพดจึงมีความเป็นไปได้ต่ำที่จะเกิดการแพร่ระบาดของโรคนี้ อย่างไรก็ตามถึงแม้เชื้อโรคนี้จะมีโอกาส

ติดไปกับเมล็ดได้ต่ำ แหล่งที่มีการปลูกข้าวโพดแต่ไม่ใช่พื้นที่ที่รายงานระบาดของโรคหรือแมลงพาหะยังคงต้องมีมาตรการสำรวจตรวจสอบ ป้องกัน กักกัน เชื้อโรคนี้ไม่ให้แพร่กระจายไปยังแหล่งปลูกใหม่ โดยการใช้มาตรการกักกันพืช

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี 2547 มีพื้นที่ผลิตข้าวโพดรวมทั้งประเทศประมาณ 6,864,102 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547) มีปริมาณผลผลิต 910,730 ตัน มีมูลค่าการส่งออกของข้าวโพดไร่ 4,651.50 ล้านบาทและข้าวโพดฝักอ่อนบรรจุกระป๋อง 1,675.03 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) โดยมีการส่งออกข้าวโพดทั้งในรูปข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง ข้าวโพดหวานแช่แข็ง ข้าวโพดอ่อนบรรจุกระป๋อง ครีมน้ำข้าวโพด และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ตลาดส่งออกข้าวโพดของไทย ได้แก่ เกาหลีใต้ มาเลเซีย ไต้หวัน อินโดนีเซีย สหราชอาณาจักร สิงคโปร์ พม่า ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย บังกลาเทศ จีน ศรีลังกา และสหรัฐอเมริกา โดยปัจจุบันการปลูกข้าวโพดทั้งข้าวโพดหวานบริโภคฝักสด ข้าวโพดไร่สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ นิยมใช้สายพันธุ์ที่เป็นลูกผสม เนื่องจากให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพของผลผลิตสม่ำเสมอ ในการพัฒนาและผลิตพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสมนั้นบางส่วนมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ในการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดระหว่างประเทศคู่ค้านั้นมิมีข้อกำหนดเกี่ยวกับโรคและแมลง โดยเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าหรือส่งออกต้องมีสภาพปลอดต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 กำหนดให้ข้าวโพดเป็นพืชกักกัด ต้องมีใบปลอดโรคก่อนที่จะส่งออกหรือนำเข้าจากต่างประเทศ (พระราชบัญญัติกักพืช, 2507)

เนื่องจากประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานถึงการพบโรคเหี่ยวข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เพื่อเป็นการป้องกัน ควบคุมเชื้อโรคดังกล่าวไม่ให้เข้ามาในประเทศ ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก และเพื่อป้องกันการกีดกันทางการค้า จึงต้องหามาตรการวิธีการตรวจสอบเชื้อโรคดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว แม่นยำ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถใช้อ้างอิงได้ ในการตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ปัจจุบันนั้นใช้เทคนิค ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปทางการค้า (Agdia®, Inc., USA) ร่วมกับการปลูกพืชสังเกตอาการของโรค แต่ชุดตรวจดังกล่าวมีประสิทธิภาพต่ำ และไม่แม่นยำ เมื่อใช้กับการตรวจเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดของประเทศไทย (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2550) ประกอบกับชุดตรวจมีราคาแพง

ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาสาเหตุเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายโรคเหี่ยวข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จากตัวอย่างพืชและเมล็ดข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพสูง รวดเร็ว แม่นยำ เพื่อใช้ประโยชน์ในระบบงานกักพืชและการตรวจรับรองสำหรับประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. พิสูจน์สาเหตุเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาการคล้ายโรคเหี่ยวข้าวโพดที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย
2. พัฒนารูปแบบการตรวจเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ในต้นและเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพ ในการตรวจรับรองการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสำหรับประเทศไทย

การตรวจเอกสาร

ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Mergaet *et al.*, 1993), *Erwinia stewartii* (E.F. Smith) มีการจัดอนุกรมวิธานดังนี้

Domain	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Enterobacteriales
Family	Enterobacteriaceae

มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญได้ (facultative anaerobe) ไม่มีหาง (flagella) ไม่เคลื่อนที่โดยไม่สร้างสปอร์ รูปร่างท่อนขนาดประมาณ $0.4-0.8 \times 0.9-2.22 \mu\text{m}$ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง $27-30^\circ\text{C}$ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ต่ำสุด $8-9^\circ\text{C}$ อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์นี้ตายหมด (Thermal death point) ที่ 53°C (Pepper, 1967) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร yeast extract dextrose calcium carbonate เป็นสีเหลืองและกลมมนมันวาว ส่วนบนอาหาร nutrient-glucose agar มีลักษณะกลมผิวหน้าแบบเรียบ หรือ ผิวหน้าเป็นหลุมเหมือนปล่องภูเขาไฟ เป็นสีครีมออกเหลือง จนถึงเหลืองส้ม ขนาดโคโลนีประมาณ 1.8-11 มิลลิเมตร มีช่วงการแบ่งเซลล์ประมาณ 1.8-3.2 ชั่วโมงต่อรอบ แบคทีเรียสร้าง polysaccharide พวก stewartan โดยเฉพาะเมื่อเจริญบนอาหารที่มี yeast extract เป็นองค์ประกอบ (Pataky and Ikin, 2003) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความทนทานต่อเกลือได้สูงถึง 5-7% ดังนั้นสามารถใช้ 0.8% NaCl หรือ 0.01 M potassium phosphate, pH 7.0 ในการแยกหรือเจือจางเชื้อแบคทีเรียได้ คุณสมบัติทางชีวเคมีได้แก่สามารถเกิดปฏิกิริยา hypersensitive ในยาสูบได้ แต่ต้องเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่ไม่ใช่อาหารที่อุดมสมบูรณ์ เช่นอาหาร IM $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM KH_2PO_4 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM MES 0.1% casamino acids 1% sucrose, pH 5.5) สามารถสร้างเม็ดสีเหลืองได้ ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37°C ไม่เกิดปฏิกิริยา oxidase เกิดปฏิกิริยา catalase ไม่สามารถสร้างกรดจากการใช้ cysteine สามารถสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สจากการใช้ arabinose fructose galactose glycerol D-glucose lactose β -methylglucoside mannitol mannose sucrose และ

xylose บางสายพันธุ์สามารถสร้างกรดได้เมื่อใช้ sorbitol สามารถใช้ acetate fumarate gluconate malate และ succinate ไม่สามารถใช้ benzoate citrate malonate oxalate propionate และ tartrate ไม่สร้าง indole ไม่เกิดปฏิกิริยา nitrate reduction เจริญได้ซ้ำบนอาหารที่มี gelatin ไม่สามารถทำให้เกิดสภาพเหลว (liquefaction) ไม่สร้าง 2,5 di-keto-D-gluconate ไม่สามารถผลิต hydrogen sulphide และไม่เคลื่อนที่ (Coplin and Kado, 2000; Pepper, 1967)

อาการและการพัฒนาการของโรคในข้าวโพด

เชื้อแบคทีเรียนี้ทำให้เกิดอาการในข้าวโพดได้ 2 ระยะ คือ ระยะต้นกล้า ทำให้เกิดอาการเหี่ยว เมื่อต้นกล้ามีการติดเชื้อมากขึ้นทั่วต้น โดยกระจายผ่านทางท่อน้ำ และระยะใบไหม้ เกิดเมื่อพืชติดเชื้อมากขึ้นหลังจากพ้นระยะต้นกล้า โดยพืชเกิดบาดแผลจากการกัดกินของแมลง ทำให้ใบมีลักษณะเริ่มจากเกิดแผลจุดน้ำตาลที่รอยแผลกัด เชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในท่อน้ำโดยเฉพาะเมื่อเกิดในพืชสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ใบข้าวโพดเป็นขีดสีเหลืองหรือขาวตามแนวเส้นใบ ขอบแผลเป็นคลื่นหยัก ต่อมาพัฒนาเป็นจุดตายและขยายจนทั่วใบ เมื่อพืชมีการติดเชื้อมากขึ้นทั่วต้นใบอ่อนที่เกิดใหม่และที่กรวยใบจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม บริเวณใบที่มีอาการน้ำท่วมเมื่อตัดแผลและตรวจสอบภายในได้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นการไหลของแบคทีเรีย (ooze) ออกจากแผล อาการเหี่ยวสามารถเกิดได้แม้ในระยะที่ต้นข้าวโพดสูงมากกว่า 24 เซนติเมตร แต่ช่วงที่ข้าวโพดติดฝักมักแสดงอาการใบไหม้ขีดเหลืองขนานกับเส้นใบ อาการของโรคพัฒนาได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 32°C เชื้อแบคทีเรียจะสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ทุกชนิด แต่สามารถเข้าทำลายได้ดีในข้าวโพดหวานและข้าวโพดคั่ว (popcorn) มากกว่าในข้าวโพดไร่ (Hershman *et al.*, 2003; Anonymous, 1997)

การถ่ายทอดโรคและการแพร่ระบาด

เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ด โดยเชื้ออาศัยอยู่ในส่วน chalazal ในชั้น aleurone และระหว่างเซลล์ endosperm ของเมล็ด แต่ไม่พบในส่วน embryo หรือ seed coat ในสหรัฐอเมริกาพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถอาศัยและถ่ายทอดผ่านทางด้วงหมัดข้าวโพด (*Chaetocnema pulicaria*) เท่านั้น โดยเชื้อแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ในตัวแมลงในฤดูหนาว เมื่อมีการปลูกข้าวโพดแมลงจะกัดกินใบและถ่ายทอดสู่ข้าวโพด ในการแพร่กระจายนั้นลมเป็นปัจจัยหนึ่งในการช่วยในการแพร่กระจาย โดยแมลงจะเพิ่มปริมาณในช่วงอากาศอบอุ่น และถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 32°C แมลงจะเจริญได้ดีทำให้มีโอกาสดำเนินการเกิดการแพร่กระจายและระบาดของโรคนี้ได้

โดยแมลงสามารถถ่ายทอดโรคจากฤดูปลูกหนึ่งไปยังอีกฤดูปลูกหนึ่งได้ถึง 20% และในระหว่างฤดูปลูก แมลงด้วงหมัดร่นต่อมาจะเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายโรคต่อไป (Anonymous, 2000; Pataky and Ikin, 2003)

การควบคุมโรค

การควบคุมโรคสามารถทำได้โดยใช้พันธุ์ต้านทาน และระบบการพยากรณ์อากาศเพื่อใช้ในการประเมินการอยู่รอดของแมลงพาหะ และพยากรณ์การระบาดในฤดูปลูกต่อไปได้ การควบคุมแมลงด้วยสารเคมี แต่ใช้ไม่ได้ผลในกรณีที่ปลูกข้าวโพดสายพันธุ์อ่อนแอ (Anonymous, 2000)

ความสำคัญของโรคเหี่ยวข้าวโพดในด้านกักกันพืช

ในการผลิตข้าวโพดพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งอาจเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้มักมีโอกาที่เชื้อจะกระจายทั่วต้นและติดผ่านเข้าไปในเมล็ดได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดโรคทำความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตข้าวโพด พบว่าอัตราและโอกาสการถ่ายทอดเชื้อจากพืชสู่เมล็ด และจากเมล็ดสู่ต้นกล้าในพืชสายพันธุ์อ่อนแอมีโอกาสถึง 10% สายพันธุ์อ่อนแอปานกลาง มีโอกาสติดต่อจากพืชสู่เมล็ดน้อยกว่า 0.3% ในขณะที่ในพืชสายพันธุ์ต้านทานมีโอกาสน้อยกว่า 0.03% ดังนั้นในกองเมล็ดข้าวโพดที่เป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคจึงมีโอกาสนในการปนเปื้อนของเมล็ดติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์สูง แต่ในกองเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่เป็นสายพันธุ์อ่อนแอปานกลางหรือต้านทานมีโอกาที่จะติดเชื้อในสัดส่วนที่ต่ำ หากแก่การตรวจสอบ และเชื้อแบคทีเรียมีโอกาสถ่ายทอดโรคจากเมล็ดสู่ต้นกล้าในอัตราเพียง 0.8% ในกรณีที่เมล็ดมีการปนเปื้อนน้อยกว่า 10% (Pataky and Ikin, 2003) ดังนั้นโรคนี้จึงถือว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญในระบบกักกันพืช โดยเฉพาะในประเทศที่ไม่ใช่แหล่งหรือพบโรคมามาก่อน ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์นั้นอาจมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เพื่อจุดประสงค์อื่นทำให้อาจจะละเลยต่อการตรวจสอบเชื้อโรคนี้ และเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดต่อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ แม้ในอัตราต่ำ แต่ก็จัดเป็นเชื้อโรคที่บรรจุอยู่ในรายชื่อสิ่งต้องห้ามในหลายๆ ประเทศผู้นำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (Pataky and Ikin, 2003) รวมถึงประเทศไทยตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 กำหนดให้ข้าวโพดเป็นสิ่งกักกัก ต้องมีใบปลอดโรคก่อนที่จะส่งออกหรือนำเข้าจากต่างประเทศ

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

Type III protein secretion system (TTSS) เป็นระบบที่ขนส่งหรือเป็นช่องทางผ่านของโปรตีนของแบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่มีเกี่ยวข้องกับการก่อโรค และความสัมพันธ์กับพืชในการเกิดโรค TTSS สังเคราะห์ด้วยกลุ่มของยีนหลายๆ ชนิด เรียกว่า *hrp/hrc* (hypersensitive response and pathogenicity/ conserved) การแสดงออกของกลุ่มยีนนี้ขึ้นกับปัจจัยได้แก่ สิ่งแวดล้อม พืช สารที่พืชสังเคราะห์ขึ้น รวมทั้งสามารถกระตุ้นด้วยการชักนำได้ แต่ยังไม่ทราบถึงกลไกการทำงานที่แน่นอน กลุ่มของยีน *hrp* ในเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. นั้นเดิมมีชื่อว่า *wts* เนื่องจากเดิมมีการศึกษาเรื่องนี้ว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดจุดน้ำ (water soaking) (Coplin *et al.*, 1992) *hrp* ยีน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ใน *P. stewartii* subsp. *stewartii*. พบว่ากลุ่มแรกควบคุมด้วยโปรตีน HrpS และอีกกลุ่มควบคุมด้วยโปรตีน HrpL การทำงานของยีน *hrp* มีการควบคุมเป็นลำดับขั้น (Merighi *et al.*, 2003) พบว่ายีนที่ควบคุมการทำงานของยีน *hrp* 4 ยีน ได้แก่ *hrpX* *hrpY* ซึ่งจะสังเคราะห์โปรตีนที่เป็น sensor kinase และ response regulator ตามลำดับ *hrpS* สังเคราะห์ NtrC-like transcriptional factor และ *hrpL* สังเคราะห์ sigma factor จากการทดสอบใน *E. coli* พบว่าโปรตีน HrpY กระตุ้นการทำงานของยีน *hrpS* และควบคุมการทำงานของ *hrpX* operon โดยอัตโนมัติ ในทางกลับกันโปรตีน HrpS ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการทำงานของ promotor ของ σ^{45} ซึ่งจำเป็นในการทำงานของ *hrpL* และท้ายที่สุดโปรตีน HrpL จะไปควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีน *hrp* ในสภาพหลอดทดลองการทำงานของ *hrpS* และยีนอื่นๆ ที่เป็นลำดับขั้นไป ขึ้นกับความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของเกลือ การกลายพันธุ์ในส่วนยีน *hrpX* ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียยังสามารถทำให้เกิดโรคได้ แต่ไม่รุนแรงเท่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติ และเชื้อจะสูญเสียความสามารถในการตอบสนองต่อสารเคมีที่กระตุ้นการทำงานของยีน *hrp* และเมื่อกลายพันธุ์ยีนในส่วน *hrpY* ในตำแหน่งอนุรักษของยีนนี้คือ aspartate57 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดการ phosphorylation ของยีนนี้ ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเข้าทำลายข้าวโพดหรือกระตุ้นการทำงานของกลุ่มยีน *hrp* ได้ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการทำงานของกลุ่มยีน *hrp* มีการควบคุมเป็นลำดับขั้นดังนี้ $hrpY \rightarrow hrpS \rightarrow hrpL \rightarrow$ promotor ของกลุ่มยีน *hrp* (Merighi *et al.*, 2003)

สาร exopolysaccharide (EPS) ในเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เรียกว่า stewartan ซึ่งไปอุดตันท่อลำเลียงน้ำ สร้างจากกลุ่มยีน *cps* หากมีการกลายพันธุ์ของยีนนี้จะทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการเกิดโรคไป การแสดงออกของยีนชุดนี้ควบคุมแบบ Quorum-Sensing คือจะแสดงออกเมื่อแบคทีเรียมีปริมาณมากกว่า 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และควบคุมด้วยโปรตีน

จากยีน *esaI* และ *esaR* ซึ่งช่วยในการชะลอการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้างสาร stewartan มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดความรุนแรงของโรคในช่วงปลายของการเข้าทำลายพืช โดยในช่วงแรกของการเข้าทำลายเมื่อพืชเกิดจุดน้ำสาร stewartan จะช่วยรักษาน้ำและธาตุอาหารบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์พืช และช่วยรักษาแรงดันน้ำไม่ให้เกิดการอุดตันในท่อลำเลียงน้ำ และยังมีบทบาทในการแยกเซลล์ parenchyma เพื่อช่วยให้แบคทีเรียแพร่กระจายไปได้ทั่วต้น และเมื่อมีปริมาณแบคทีเรียในลำต้นมากจะมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนนี้อย่างมากจนท้ายสุดอาการเหี่ยวจะเกิดขึ้นเมื่อ EPS อุดตันระบบท่อลำเลียงน้ำบริเวณเนื้อเยื่อ pit ซึ่งเมื่อมีการกลายพันธุ์ยีนกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียสร้าง EPS มากขึ้น พบว่าทำให้เชื้อแบคทีเรียลดความรุนแรงในการก่อโรคลง และยังทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนไปในท่อลำเลียงน้ำด้วย อย่างไรก็ตามในการปลูกเชื้อด้วยเซลล์ตั้งต้น 10^7 เซลล์ต่อต้น ด้วยวิธีการหยอดกรวยยอดต้นข้าวโพดสามารถทำให้พืชเกิดอาการจุดน้ำน้ำได้ (von Bodman *et al.*, 1998)

ในการสร้างสาร polysaccharide ของแบคทีเรียประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักคือ 1. การสร้างอนุพันธ์ของ nucleotide sugar diphosphate ใน cytoplasm 2. การต่อหน่วยย่อยของแต่ละอนุพันธ์เป็นสายยาวด้วยการย้าย monosaccharide จากอนุพันธ์ของ nucleotide ไปยัง lipid carrier ที่เยื่อหุ้มเซลล์ 3. การเติมหมู่ side chain เช่น pyruvate acetate succinate หรือ hydroxybutyrate และ 4. การย้าย polysaccharide จาก lipid carrier ไปยังหน่วยใหม่ (Whitfield and Valvano, 1993) ในเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* มีการสร้าง stewartan ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ glucose 2 หน่วย และ galactose 2 หน่วยเป็นแกนหลัก และมี side chain เป็น galactose การสร้าง stewartan มียีนที่เกี่ยวข้องคือ กลุ่มยีน *cps* ประกอบด้วย 13 ORF เรียงตามลำดับดังนี้ *cpsA B I C D E F G H J K L* และ *M* มีการถอดรหัสในทิศทางเดียวกัน จากการศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มของยีน *ams* ที่สร้าง polysaccharide ในเชื้อ *Erwinia amylovora* พบว่ามีความเหมือน (similarity) ของลำดับกรดอะมิโนมากกว่า 80% เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า *cpsM* คล้ายกับ *galV* ของ *E. coli* ซึ่งทำหน้าที่ UDP-glucose pyrophosphorylase ประกอบกับการทำงานของ *galE* ทำให้มีหน้าที่ในการสร้างสารเริ่มต้นของ polysaccharide ได้แก่ UDP-glucose และ UDP-galactose *CpsA* คล้ายกับโปรตีน Rfbp ของ *Salmonella enterica* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง LPS โดยเป็นแอนไซม์ undecaprenyl-phosphate galactose phosphatransferase ซึ่งทำหน้าที่เติม galactose ให้กับ lipid carrier ส่วน *CpsD E G* และ *K* คล้ายคลึงกับโปรตีน glucosyl-transferase ในการสร้าง LPS EPS และ EPS group II *CpsE* และ *CpsF* คล้ายกับ glucosyl-transferase *CpsG* และ *CpsK* คล้ายกับส่วนด้าน C-terminus ของ galactosyl transferase *CpsH* มีส่วน signal peptide ของกรดอะมิโน 28 ตัว

แรก ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่อยู่ใน periplasm ทำหน้าที่เชื่อมต่อแต่ละหน่วยย่อยของ polysaccharide CpsC คล้ายกับ BexC CpsB คล้ายกับ CtrA ซึ่งโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอด capsular polysaccharides group II ผ่าน inner และ outer membrane ตามลำดับ และ CpsB และ CpsC มีส่วนของ membrane spanning domain โดย CpsB ประกอบด้วยส่วน lipoprotein attachment site และ CpsC มีส่วนของ putative ATP-binding domain CpsL ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง polysaccharide และ CpsI ให้โปรตีนทำหน้าที่เป็น acid phosphatase โดยการนำหมู่ phosphate จาก undecaprenol diphosphate หลังจากปลดปล่อยหน่วยย่อยของ polysaccharide จาก lipid carrier ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มยีน *cps* กับกลุ่มยีน *ams* พบว่ามีการเรียงตัวของกลุ่มยีนคล้ายกันและให้โปรตีนขนาดใกล้เคียงกันยกเว้น *cpsD E F* และ *G* (Dolph *et al.*, 1988; Coplin *et al.*, 1996; Bernhard *et al.*, 1996)

การตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

ในการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* นั้นมีการใช้หลายๆ วิธีเริ่มต้นจากการตรวจสอบเชื้อในระดับแปลงปลูกโดยดูอาการและตรวจสอบการไหลของเชื้อแบคทีเรีย (ooze) จากรอยแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหาร casamino acids-peptone-glucose (CPG) agar (Coplin and Kado, 2000) ให้ลักษณะโคโลนีลักษณะเป็นเมือกเข้ม เป็นสีเหลืองอ่อน หรืออาหาร nigrosine medium ประกอบด้วย yeast extract 1 กรัม glycerol 30 มิลลิลิตร Nystatin 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร sodium taurocholate 3 กรัม NaCl 15 กรัม. 1% aqueous nigrosine solution 20 มิลลิลิตร และ agar 17 กรัม โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารนี้ประมาณ 5-7 วันที่อุณหภูมิ 30 °C เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จะมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ฐานเล็กน้อย มันวาว ตรงกลางเป็นจุดสีดำ ขอบโคโลนีโปร่งแสง (Guo *et al.*, 1982) วิธีการที่เป็นที่นิยมและยอมรับได้แก่ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia Inc. ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ตามระบบของ National Seed Health System ซึ่งพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดข้าวโพดโดย Iowa State University Seed Science Center (Pataky and Ikin, 2003) แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้เมื่อมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^5 cell/ml และในการอ่านผลปฏิกิริยาที่ค่าที่เป็นบวกนั้นต้องอ่านค่าได้มากกว่า 3 เท่าของค่าของตัวควบคุมลบ (negative control) แต่ในบางตัวอย่างที่พบว่าผลอยู่ในช่วงที่มากกว่าตัวควบคุมลบแต่ไม่ถึง 3 เท่าจะถือว่าเป็นค่าที่คลุมเครือ (elevated) ต้องมีการตรวจสอบซ้ำ (Sutula *et al.*, 1986) อย่างไรก็ตามวิธีการ ELISA ยังสามารถนำไปตรวจสอบเชื้อได้ทั้งเชื้อ

แบคทีเรียในเมล็ดข้าวโพด ต้นข้าวโพด และแมลงด้วย การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในแมลงร่วมกับจำนวนประชากรของแมลงพาหะ เพื่อใช้ในการประเมินจำนวนของระดับของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในฤดูปลูกหนึ่งไปยังอีกฤดูปลูกหนึ่งในการพยากรณ์การระบาดของโรคนี้ (Nutter-Jr. and Esker, 2003) ถึงแม้วิธีการ ELISA จะเป็นที่ยอมรับแต่ก็เป็นวิธีการที่มีข้อจำกัด ได้แก่ ใช้เวลานาน มีความไวต่ำ และมีค่าใช้จ่ายในการซื้อชุดตรวจการค่าสูง จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อด้วยพื้นฐานของเทคนิค PCR (polymerase-chain reaction) และในปัจจุบัน PCR ถือว่าเป็นเทคนิคพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ได้มีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ด้วย PCR ในหลายๆ งานทดลอง จากส่วนต่างๆ ของดีเอ็นเอของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เช่น 16S-23S rRNA/ITS (intergenic transcribed spacer) region (Coplin and Kado, 2000) จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค เช่น ยีน *cps* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง polysaccharide โดยใช้ primer CPL1 และ CPSR2S ให้ผลผลิตขนาด 1.1 kb ซึ่งออกแบบมาจากยีนในส่วนกลางของ *cpsE* และส่วนปลายของยีน *cpsD* (Coplin, et al., 2001) ซึ่งยีน *cpsD* เป็นยีนที่มีเฉพาะใน *P. stewartii* subsp. *stewartii* เท่านั้น (Coplin, et al., 1996) และยีน *hrpS* โดยใช้คู่ primer HRP1d และ HRP3C ให้ผลผลิตขนาด 0.9 kb โดย primer จากทั้งสองยีนสามารถตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* บริสุทธิ์ได้ 20 เซลล์ และตรวจสอบจากชิ้นพืชได้ 200 เซลล์ต่อปฏิกิริยา และมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เท่านั้น แต่พบว่าไม่สามารถตรวจเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* strain DC116 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง สันนิษฐานว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีความผิดปกติหรือสูญเสียยีนไปตั้งแต่แยกเชื้อได้ในปี 1976 (Coplin et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการที่ใช้ PCR ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ ได้แก่ ใช้ PCR ควบคู่กับ ligase chain reaction ซึ่งสามารถตรวจสอบบ่งชี้เชื้อ *Erwinia* ได้ถึงระดับ species โดยมีหลักการคือและใช้ primer 2 คู่ซึ่งออกแบบจาก DNA ของ 16S rDNA โดยใช้ส่วนที่มีความแตกต่างเพียง 1 base ที่จำเพาะต่อ species นี้ primer ทั้งสองคู่อยู่ติดกันและส่วนปลายด้าน 3' ของ forward primer ติดฉลากด้วย isotope ทั้งนี้ หากดีเอ็นเอต้นแบบไม่สามารถเข้าคู่กับ primer ได้ก็จะไม่เกิดการเชื่อมต่อ (ligation) ของ primer ดังนั้นจึงไม่มีดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำ PCR ต่อไป โดยวิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีความไวสูง (1.9×10^3 cfu/g) และความจำเพาะระดับ species สูง (Wilson et al., 1994) แต่วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ต้องใช้การติดฉลากด้วยสารรังสี ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป เทคนิคอื่นที่นำมาใช้ร่วมกับ PCR ได้แก่ การใช้ DNA probe ซึ่งพัฒนามาจากการทำ PCR ที่ได้จาก arbitrary primer (Blakemore et al., 1992)

การถ่ายทอดเชื้อจากต้นสู่เมล็ด จากเมล็ดสู่ต้นกล้า การตรวจสอบและการยอมรับการติดเชื้อในเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐานด้วยวิธีการ ELISA

จากการทดลองของ (Michener *et al.*, 2002a, 2002b) ในการถ่ายทอดเชื้อ *Erwinia stewartii* จากพืชสู่เมล็ด โดยทดลองกับข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม 124 สายพันธุ์ประกอบด้วยข้าวโพดเมล็ดสีขาว ข้าวโพดสำหรับคั่ว และข้าวโพดหวาน ที่ปลูกในช่วงปี 1998 ถึง ปี 2000 โดยสำรวจระดับอาการของต้น ซึ่งเฉลี่ยจากความรุนแรงของโรคพบว่าข้าวโพดที่ปลูกในช่วงสามปีนั้นเป็นข้าวโพดที่มีระดับความต้านทานปานกลางจนถึงอ่อนแอ และจากการตรวจด้วยวิธีการ ELISA พบว่าสายพันธุ์ต้านทานมีเมล็ดติดเชื้อ 0.024 และ 0.0007% ในปี 1998 และ 1999 ตามลำดับ ในสายพันธุ์ต้านทานปานกลางมีเมล็ดติดเชื้อ 0.19 และ 0.07% ในปี 1998 และ 1999 ตามลำดับ และสายพันธุ์อ่อนแอมีเมล็ดติดเชื้อ 11.6 และ 7.8% ในปี 1998 และ 1999 ตามลำดับ และพบว่าเมล็ดที่ได้จากข้าวโพดสายพันธุ์อ่อนแอที่ปลูกเชื้อในช่วงปี 1998 ถึง ปี 2000 พบว่ามีโอกาสที่เมล็ดจะติดเชื้อ 15.6 49.6 และ 12.5 ตามลำดับ และจากการปลูกเมล็ดที่ได้จากต้นที่ติดเชื้อ พบว่าต้นกล้าที่ได้เมื่อตรวจสอบเชื้อ *E. stewartii* ด้วยวิธีการ ELISA และการตรวจสอบ ooze พบว่ามีต้นกล้าเป็นโรค 59 ใน 58,300 ต้น ซึ่งคาดว่า 22 ต้นเป็นการติดเชื้อจากการถ่ายทอดเชื้อจากเมล็ดสู่ต้นกล้า แต่อีก 37 ต้น เป็นการติดเชื้อตามธรรมชาติ เนื่องจากพบแมลงด้วงหมัดข้าวโพดในแปลงปลูก ซึ่ง 22 ต้นใน 58,300 คิดเป็น 0.038% และจากการสำรวจแปลงข้าวโพดที่เป็นโรค และนำเมล็ดมาตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีการ ELISA พบว่าแปลงปลูกที่เป็นโรคมากกว่า 25% จึงสามารถตรวจพบเมล็ดที่ติดเชื้อจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดจำนวน 300 โดยการตรวจเมล็ดครั้งละเมล็ด หรือจำนวน 500 เมล็ดการตรวจแบบแบ่งกองเมล็ดกองละ 50 เมล็ด และสามารถตรวจสอบเมล็ดที่ติดเชื้อตั้งแต่ 5% เท่านั้นจากแปลงที่เป็นโรค 50% ดังนั้นโอกาสที่เมล็ดจะติดเชื้อจึงมีน้อย (Block *et al.*, 1999)

การคำนวณโอกาสในการสุ่มเมล็ดที่ติดเชื้อและประมาณความน่าจะเป็นของเมล็ดที่ติดเชื้อสามารถคำนวณได้ดังในสมการที่ 1 และ 2 ดังนี้ (Pataky and Ikin, 2003)

$$P_{(S=0)} = 1 - q^n \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดย S หมายถึงจำนวนทั้งหมดของตัวอย่างเมล็ดที่ติดเชื้อ q หมายถึงความน่าจะเป็นของเมล็ดไม่ติดเชื้อ n หมายถึงจำนวนเมล็ดที่ทดสอบ และ $P_{(S=0)}$ หมายถึงความน่าจะเป็นที่จะสุ่ม

ไม่ได้เมล็ดที่ติดเชื้อ โดยอยู่ภายใต้สมมุติฐานว่าวิธีการตรวจสอบจะตรวจสอบเมล็ดทั้งหมดและเมล็ดที่นำมาตรวจได้มาแบบสุ่ม

โดยวิธีการตรวจแบบสุ่ม 100 เมล็ด 4 กอง ซึ่งถ้าเมล็ดมีการติดเชื้อ 1% ($p = 0.01$ และ $q = 0.99$) ดังนั้นมีโอกาสหิบบัวอย่างเมล็ดที่ติดเชื้อได้ ดังแสดง

$$P_{(S=0)} = 1 - 0.99^{400} = 0.982$$

และการหาความน่าจะเป็นของเมล็ดติดเชื้อจากการตรวจแบบรวมตัวอย่างได้ดังสมการ

$$p = 1 - [(1-Q)^{(1/n)}] \quad \text{สมการที่ 2}$$

โดย p หมายถึงประมาณการความน่าจะเป็นของเมล็ดที่ติดเชื้อ Q หมายถึงความน่าจะเป็นของตัวอย่างที่เป็นบวก และ n หมายถึง จำนวนเมล็ดต่อตัวอย่าง เช่นถ้าตรวจเมล็ด 4 กอง กองละ 100 เมล็ด พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกหนึ่งตัวอย่าง จะประมาณเมล็ดที่ติดเชื้อได้ 0.29% ดังแสดง

$$p = 1 - [(1-0.25)^{(1/100)}] = 0.00287 \approx 0.029\%$$

รายงานของ Pataky and Ikin (2003) นั้นอธิบายถึงข้อมูลการสุ่มตัวอย่างเมล็ดสำหรับการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* ด้วยวิธี ELISA โดย Iowa State University นั้น ใช้การตรวจสอบเมล็ดที่มีการติดเชื้อ 0.5% เป็นพื้นฐาน ซึ่งได้จากการประมาณถึงโอกาสการเสี่ยงต่อการได้รับและแพร่กระจายเชื้อโรคจากการได้รับเมล็ดติดเชื้อจากกองเมล็ดพันธุ์โดยทั่วไปที่จะยอมรับได้ต้องมี การติดเชื้อต่ำกว่า 1% บนพื้นฐานข้อมูลอัตราการถ่ายทอดเชื้อจากเมล็ดสู่ต้นกล้าและเขตพื้นที่ที่ไม่มีแมลงพาหะ โดยไม่พบการถ่ายทอดโรคจากเมล็ดสู่ต้นกล้าถ้าเมล็ดติดเชื้อต่ำกว่า 10% และอัตราการถ่ายทอดจากเมล็ดสู่ต้นกล้าในเขตพื้นที่ที่พบโรคเป็น 0.02% ดังนั้นระดับเมล็ดติดเชื้อที่ยอมรับได้ 0.5% จะมีการติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์น้อยกว่าหนึ่งในล้านเมล็ด และจากการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ใช้ความน่าจะเป็นที่จะหิบบัวเมล็ดติดเชื้อจากการคำนวณด้วยสมการที่ 1 เป็น 98.2% ในกรณีที่มีการติดเชื้อ 1 % จากการตรวจเมล็ด 4 กอง กองละ 100 เมล็ด ถ้าตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกศูนย์ หรือหนึ่งตัวอย่างจะสรุปได้ว่าเมล็ดมีการติดเชื้อต่ำกว่า 1% และสามารถยอมรับเมล็ดพันธุ์ในกองนี้ได้ สรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของเมลิคข้าวโพดติดเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ประมาณจาก
การตรวจ 4 8 12 และ 16 ของกองเมลิคพันธุ์ กองละ 100 เมล็ด ด้วยวิธีการ ELISA

จำนวนตัวอย่าง กองละ 100 เมล็ด	จำนวนตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความน่าจะเป็น ของการติดเชื้อ	ประมาณ เปอร์เซ็นต์การ ติดเชื้อ	คำแนะนำ
4	0	0	< 0.29	ยอมรับ
4	1	0.25	0.29	ยอมรับ
4	2	0.50	0.69	ทดสอบใหม่* หรือ ไม่ ยอมรับ
4	3	0.75	1.38	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
4	4	1	>1.38	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
8	0	0	<0.13	ยอมรับ
8	1	0.125	0.13	ยอมรับ
8	2	0.5	0.29	ยอมรับ
8	3	0.375	0.47	ยอมรับ
8	4	0.5	0.69	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
8	5	0.625	0.98	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
8	6	0.75	1.38	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
8	7	0.875	2.06	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
8	8	1	>2.06	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
12	0	0	<0.09	ยอมรับ
12	1	0.083	0.09	ยอมรับ
12	2	0.167	0.18	ยอมรับ
12	3	0.25	0.29	ยอมรับ
12	4	0.333	0.4	ยอมรับ
12	5	0.417	0.54	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
12	6	0.5	0.69	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
12	7	0.583	0.87	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จำนวนตัวอย่าง กองละ 100 เมล็ด	จำนวนตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความน่าจะเป็น ของการติดเชื้อ	ประมาณ% การติดเชื้อ	คำแนะนำ
12	8	0.667	1.09	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
12	11	0.917	2.46	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
12	12	1	>2.46	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	0	0	<0.06	ยอมรับ
16	1	0.0625	0.06	ยอมรับ
16	2	0.125	0.13	ยอมรับ
16	3	0.1875	0.21	ยอมรับ
16	4	0.25	0.29	ยอมรับ
16	5	0.3125	0.37	ยอมรับ
16	6	0.375	0.47	ยอมรับ
16	7	0.4375	0.57	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	8	0.5	0.69	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	9	0.5625	0.82	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	10	0.625	0.98	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	11	0.6875	1.16	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	12	0.75	1.38	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	13	0.8125	1.66	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	14	0.875	2.06	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	15	0.9375	2.73	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ
16	16	1	>2.73	ทดสอบใหม่ หรือ ไม่ยอมรับ

* การทดสอบใหม่สามารถทดสอบตัวอย่างกองเมล็ด 100 เมล็ดได้ไม่จำกัดจำนวน โดยให้มี
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่ำกว่า 0.5% จึงจะยอมรับได้

ที่มา: Pataky and Ikin, 2003.

เทคนิค Real-time PCR

เทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิค PCR ที่สามารถรายงานผลได้ทันที โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ได้แก่ dNTPs $MgCl_2$ PCR buffer *Taq* DNA polymerase forward primer และ reverse primer เหมือน PCR ทั่วไป แต่ในการตรวจผลนั้น Real-time PCR ใช้การตรวจสอบความเข้มของสารเรืองแสง (fluorescence) ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นทุกๆ รอบของการทำปฏิกิริยาแล้วได้ผลผลิตสูงขึ้น และสามารถตรวจสอบผลที่เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ทันที โดยไม่ต้องรอให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ (end-point detection) ซึ่งจากการตรวจสอบความเข้มข้นของสารเรืองแสงทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณของผลผลิตที่ได้ด้วย

การติดตามสัญญาณของสารเรืองแสงนั้นมีหลายระบบที่ผลิตขึ้นเป็นการค้า สามารถแบ่งได้คือ การตรวจการเกิดปฏิกิริยาจากดีเอ็นเอสายคู่ โดยการใช้สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติในการเกาะจับดีเอ็นเอสายคู่ ได้แก่ 1. Sybr Green I ® ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย แต่อาจมีการตรวจสอบผิดพลาดเนื่องจากการเกิดสัญญาณจากการจับกันเองของคู่ primer (primer dimer) แต่สามารถใช้การตรวจสอบค่า T_m ของผลผลิตของ PCR เป็นตัวตรวจสอบได้ เนื่องจากผลผลิตของ PCR แต่ละสายคู่มีค่า T_m ที่แตกต่างกัน ข้อจำกัดอีกอย่างสำหรับเทคนิคนี้คือสามารถตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาของผลผลิตจากคู่ primer เพียงแค่คู่เดียวเท่านั้น (singleplex reaction) 2. การตรวจสัญญาณสารเรืองแสงของตัวติดตาม (probe) ซึ่งมีหลายระบบ ได้แก่ ระบบ hydrolysis probe เช่น TaqMan® probe Molecular Beacon และ Scorpions ซึ่ง probe คือสายนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-40 เบส ที่เติมเข้าไปนอกเหนือจากองค์ประกอบปกติของ PCR โดย probe จะติดฉลากที่ปลาย 5' และ 3' ด้วยสารเรืองแสงสองชนิดคือ สารเรืองแสงรายงานผล (reporter dye) และ สารบดบังการเรืองแสง (quencher dye) โดยเมื่อตัดสารเรืองแสงทั้งสองชนิดอิสระจากกัน โดยใช้คุณสมบัติของ 5' exonuclease ของ *Taq* DNA polymerase ทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ระบบ hybridization probe ได้แก่ Lightcycle® probe ซึ่งใช้ probe 2 เส้น โดยที่ปลายด้าน 3' ของเส้น doner ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ปลดปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง และเมื่อมาอยู่ใกล้กับ probe อีกเส้นหนึ่งที่ติดด้วยสารเรืองแสงอีกชนิดหนึ่ง เมื่อ probe ทั้งสองอยู่ใกล้กันจะมีการส่งถ่ายพลังงานจาก doner ไปยังอีกเส้นหนึ่งไปกระตุ้นให้สารเรืองแสงที่อยู่อีกเส้นหนึ่งเกิดการปลดปล่อยพลังงานเป็นความยาวคลื่นอีกคลื่นหนึ่งที่สามารถตรวจจับด้วยเครื่อง RT-PCR เกิดเป็นสัญญาณในทุกๆ รอบที่เกิดปฏิกิริยาขึ้น 3. ระบบที่ติดสารเรืองแสงที่ Primer ได้แก่ LUX® Primer ซึ่งสัญญาณการเรืองแสงจะเกิดขึ้นเมื่อ primer มีการเปลี่ยนรูปร่าง ซึ่งเดิมจะอยู่ในสภาพที่ไม่เรืองแสงเนื่องจากสาย

primer มีโครงสร้างเป็น hairpin ที่ส่วนปลาย 3' แต่เมื่อให้ความร้อนเพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ primer จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นตรงก็จะเกิดการเรืองแสงมากขึ้น และเมื่อเกิดการเกาะจับกับดีเอ็นเอ ต้นแบบ primer จะทวีการเรืองแสงมากขึ้นอีก ในการตรวจสอบด้วยระบบ probe นั้นสามารถ ตรวจสอบผลผลิตของ PCR ที่เกิดจาก Primer หลายคู่ได้ (multiplex PCR) โดยการใช้สารเรืองแสง ที่ติดฉลากต่างชนิดกัน (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2003; Dorak, 2004)

ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยานั้น เมื่อเกิดการสะสมปริมาณของสารเรืองแสงจนกระทั่ง ถึงระดับ threshold line เรียกจุดนี้ว่า threshold cycle (C_T) ใช้บอกจำนวนรอบในการสังเคราะห์ นิวคลีโอไทด์ได้ โดยถ้ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นมากจำนวนรอบที่ใช้ในการสร้างจนได้เท่ากับ ค่า C_T ก็จะน้อย ในทางตรงกันข้ามถ้าจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นน้อยก็ต้องใช้จำนวนรอบในการ สร้างสายนิวคลีโอไทด์มากเพื่อให้ได้เท่ากับค่า C_T และสามารถคำนวณกลับไปหาจำนวนสาย นิวคลีโอไทด์ต้นแบบได้ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟที่ได้จากสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ที่รู้ จำนวนสายนิวคลีโอไทด์ต้นแบบแล้ว (Pfaffl, 2003; Dorak, 2004; Livak and Schmittgen, 2001)

อุปกรณ์และวิธีการ

การพิสูจน์เทคนิคในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

ชนิดและสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียและการเก็บรักษา

นำเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Accession no. LMG2715; จาก Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Belgium) ไปอนุญาตนำเข้าสิ่งต้องห้าม ตาม พรบ. 2507 เลขที่ 017/2548) ละลายด้วยอาหาร LB (Pepton 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม NaCl 10 กรัม น้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำหนึ่งลูปไปเจือลงบนอาหารแข็ง NA แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และส่วนที่เหลือนำไปแช่ที่ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปละลายในน้ำนิ่งมาเชื้อ และเจือบนอาหารแข็ง NA อีกครั้ง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวในครั้งที่สอง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเพิ่มปริมาณบนอาหาร NA เพื่อนำไปใช้ต่อไป

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด ได้แก่ XE1 XE2 XE3 XE4 XE5 XE6 XE7 XE8 XE9 XE11 (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณณัฐพร อุทัยมงคล กรมวิชาการเกษตร) Y001 W001 W002 แยกได้จากข้าวโพดที่แสดงอาการใบขีดมีรอยหยักคลื่นที่ขอบแผลและใบคล้ายอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และ *Erwinia chrysanthemi* ที่แยกได้จากข้าวโพด (Ech1) และกล้วยไม้ (Ech2) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ณัฐธิมา โหมะจิตเจริญกุล กรมวิชาการเกษตร) *Pantoea agglomerans* DMST4633 DMST4045 และ DMST20659 (ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ดังแสดงในตารางที่ 2

การเก็บเชื้อแบคทีเรียเพื่อเป็นแหล่งต้นตอของเชื้อ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อปริมาณ 1-2 ลูปละลายในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อเก็บที่ 4 °C และละลายเชื้อปริมาณ 1-2 ลูปในสารละลาย glycerol 20% เก็บเชื้อแบคทีเรียที่ -20 และ -80 °C

การเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ชนิด/สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG 2715 ^T	ข้าวโพด	Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Belgium
<i>P. agglomerans</i> DMST 4633	คน	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
<i>P. agglomerans</i> DMST 4045	คน	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
<i>P. agglomerans</i> DMST 4045	คน	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ข้าวโพด	กรมวิชาการเกษตร
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	กล้วยไม้	กรมวิชาการเกษตร
XE1	ข้าวโพด	จ. แพร่
XE2	ข้าวโพด	จ. ตาก
XE3	ข้าวโพด	จ. แพร่
XE4	ข้าวโพด	จ. แพร่
XE5	ข้าวโพด	จ. ตาก
XE6	ข้าวโพด	จ. แพร่
XE7	ข้าวโพด	จ. แพร่
XE8	ข้าวโพด	จ. นครสวรรค์
XE9	ข้าวโพด	จ. พิษณุโลก
XE11	ข้าวโพด	จ. แพร่
Y001	ข้าวโพด	จ. นครราชสีมา
W001	ข้าวโพด	จ. นครราชสีมา
W002	ข้าวโพด	จ. นครราชสีมา

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ตามวิธีการอ้างอิง

การตรวจสอบคุณสมบัติและการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร

การตรวจสอบการเจริญและลักษณะโคโลนีบนอาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium (Guo *et al.*, 1982) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 1 กรัม glycerol 30 มิลลิลิตร sodium taurocholate 3 กรัม 1% nigrosine solution 20 มิลลิลิตร วุ้นผง 15 กรัม ต่อลิตร pH 6.7 อาหาร NA (beef 3 กรัม yeast extract 5 กรัม วุ้นผง 15 กรัม ต่อลิตร) และ CPG (Casamino acids 1 กรัม peptone 10 กรัม glucose 10 กรัม วุ้นผง 15 กรัมต่อลิตร) และตรวจสอบคุณสมบัติในการทนเกลือด้วยการเลี้ยงบนอาหาร LB ที่เติมเกลือ 5% โดยนำแบคทีเรียเลี้ยงบนอาหารดังกล่าว และบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 1- 5 วัน และตรวจสอบการเจริญและลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย

การตรวจสอบขนาดและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียไปย้อมสีแกรม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA มาแขวงลงในหลอดที่มีอาหารสำหรับตรวจสอบการเคลื่อนที่ (Motility test agar) ประกอบด้วย Beef extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม Glucose 2.5 กรัม และวุ้น 4 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ตรวจสอบการเคลื่อนที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-2 วัน (Schaad *et al.*, 2001)

การทดสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) และ Hypersensitive reaction

โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว IM (2 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM KH_2PO_4 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mM MES 0.1% casamino acids และ 1% sucrose ปรับ pH 5.5 ด้วย 1 N NaOH โดย sucrose และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต้องนึ่งฆ่าเชื้อแยก) (Klement, 1963) เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำไปฉีดเข้าหลังใบ (infiltration method) และวิธีหยอดกรวยยอด (whorl inoculation) ของต้นอ่อนข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการเกิดโรคและยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยา Hypersensitive reaction คลุมถุงเพื่อควบคุมความชื้น

เป็นเวลา 3 วันสำหรับข้าวโพดและ 24-48 ชั่วโมงสำหรับยาสูบ ตรวจสอบอาการบนใบของพืชทั้งสอง โดยใช้ต้นที่ฉีดอาหารเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ

ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PathoScreen® สำหรับ *Erwinia stewartii* (Agdia®, Inc., USA)

นำสารแขวนลอยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่วัดค่าดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค ELISA ตามคำแนะนำของบริษัท โดยนำสารแขวนลอยเซลล์เคลือบลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในกล่องขึ้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST (PBS ที่เติม Tween 20 อัตรา 0.05%) ปริมาตรเต็มหลุมจำนวน 5 ครั้ง เติม monoclonal alkaline phosphatase enzyme conjugated ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในกล่องขึ้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง เติม p-nitrophenyl phosphate substrate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Labsystem รุ่น Multiscan EX)

การตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งฆ่าเชื้อและที่ผิวโคโลนีของเชื้อ ย้ายไปเจือลงในสารที่ทำปฏิกิริยาเทคนิคพีซีอาร์โดยตรง ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer 0.2 μ m dNTPs 0.25 mM MgCl₂ 200 nm ของคู่ไพรเมอร์ และ Taq DNA polymerase 0.3 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 15 μ l โดยใช้คู่ไพรเมอร์ในการตรวจยืนยันเป้าหมาย 3 ชนิดในการทดลองตามวิธีการของ (Coplín *et al.*, 2002) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ ESIG2c (5' GCGCTTGCGTGT-TATGAG 3') และ ES16 (5' GCGAACTTGGCAGAGAT 3') สำหรับส่วน 16S-23S rRNA/ITS CPSL1 (5' CCTGTCAGTCTCGAACC 3') และ CPSR2c (5' ATCTCGAACCGGTAACC 3') สำหรับยีน *cpsD* และคู่ไพรเมอร์ HRP1d (5' GCACTCATTCCGACCAC 3') และ HRP3c (5' GCGGCATACCTAACTCC 3') สำหรับยีน *hrpS* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ต่อ 16S rDNA ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterics bacteria ไพรเมอร์ fd2 (5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') และ rp1 (5' CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Weisburg *et al.*, 1991) ชนิดละ

200 nm เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยใช้รอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ 1 รอบ ของ 94 °C 2 นาที ตามด้วย 30 รอบของ 94 °C 20 วินาที 54 °C 15 วินาที 72 °C 90 วินาที และ 1 รอบของ 72 °C 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตของพีซีอาร์ โดยแยกด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟริซิส ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรท 95 ชนิด

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ย้อมสีแกรม เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบปฏิกิริยา oxidase ด้วยแผ่นตรวจสอบสำเร็จรูป Bactident® Oxidase (Merck, Germany) และตรวจสอบการเจริญบนอาหาร Triple sugar iron ที่เตรียมในหลอดทดลองและมีส่วนหน้าอาหารเอียงอยู่ เพื่อตรวจสอบการใช้น้ำตาลสามชนิดได้แก่ กลูโคส แลคโตส และซูโครส การสร้างแก๊สจากการใช้น้ำตาล และการสร้าง Hydrogen sulfide จากการใช้ ferrous sulfate โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเอียง และแทงเข็มลงในหลอดอาหาร ประมาณสามส่วนสี่ของความลึกของอาหาร ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะและสีของอาหารในส่วนอาหารเอียง (slant) และส่วนอาหารที่ต่ำกว่าส่วนเอียง (butt) ในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง

การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร NA แล้วนำมาทดสอบตามคำแนะนำของบริษัท ดังรายละเอียดโดยย่อดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร BUG™ Agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียในสารละลาย Inoculation fluid (0.4% NaCl 0.03% Pluronic F-68 0.02% gellan gum) ที่มี 5 mM Sodium thioglycolate และวัดค่าแสงส่องผ่าน (transmittance, T) 63% ด้วยเครื่อง Biolog® turbidimeter นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเติมลงใน Biolog® GN Microplate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microlog™ System เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลในโปรแกรม Microlog version 4.2 แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เปรียบเทียบและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย

โดยใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด (ภาพผนวกที่ 1) โดยใช้ถาดอาหารสำเร็จรูป GN2 microplate (Biolog Inc., USA)

วิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนด้วยวิธีการสถิติแบบ Principal component Analysis นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาปรับค่ามาตรฐาน ด้วยวิธีการ Average well color development (AWCD) ตามสูตร

$$AWCD = (C - R) / [\sum (C-R) / n]$$

โดยค่า C หมายถึงค่าดูดกลืนแสงในแต่ละหลุม ค่า R หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่มีสารอาหารอยู่ n หมายถึงจำนวนสารอาหารที่ทดสอบ ในที่นี้คือ 95 ชนิด เปรียบเทียบด้วยวิธีการทางสถิติการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปรแบบ Principal component Analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d (Applied Biostatistics, Inc.) และวิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรท 95 ชนิด ด้วยค่า simple matching coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม Unweighted pair-group method of averages (UPGMA) (Wilson *et al.*, 1999) ในการสร้างเดนโดรแกรม โดยใช้ข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสับสเตรทของเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *P. dispersa* และ *P. agglomerans* จากฐานข้อมูล Biolog® ในการเปรียบเทียบ

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism)

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยวิธีการ CTAB (Jaufeerally-Fakim and Dookun, 2000) โดยให้นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มาตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1,385 g ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ละลายตะกอนสุดท้ายด้วยสารละลาย TE 570 ไมโครลิตร เติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K อัตรา 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เติม 5 N NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 10% CTAB ในสารละลาย 0.7 M NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

กลับหลอดไปมา บ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าสารในหลอดจะใส เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ ดูดสารส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 0.8 เท่า กลับหลอดไปมาให้สารผสมเข้ากัน บ่มไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE นำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกด้วย 0.8 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตโฟริซิส ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอตามวิธีการของ (Avrova *et al.*, 2002) ทำการตัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter ปฏิกริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม เอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* อย่างละ 5 ยูนิต one-phor-all buffer PLUS 1X ในปฏิกริยาทั้งหมด 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารสำหรับเชื่อมต่อกับ adapter ประกอบด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter อย่างละ 100 นาโนโมล T4 DNA ligase 1 ยูนิต ATP 5 มิลลิโมล one-phor-all buffer PLUS 1X ในปฏิกริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกริยา PCR แบบ preselective ในสารประกอบได้แก่ ดีเอ็นเอที่ตัด และต่อกับ adapter แล้วเจือจาง 10 เท่า จำนวน 2.5 ไมโครลิตร primer *EcoRI*-O (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') และ primer *MseI*-O (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') อย่างละ 0.2 ไมโครโมล dNTPs 0.2 มิลลิโมล 1X PCR buffer และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ในปฏิกริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยาด้วยรอบการทำปฏิกริยา 20 รอบของ 94 °C 30 วินาที 56 °C 60 วินาที และ 72 °C 60 วินาที นำผลผลิตของ PCR ที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า และนำทำปฏิกริยาแบบ selective โดยประกอบด้วยสารประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว 5 ไมโครลิตร primer *EcoRI*-GA (5'-GACTGCGTACCAATTCGA-3') และ *MseI*-O อย่างละ 0.25 ไมโครโมล dNTPs 0.2 มิลลิโมล 1X PCR buffer และ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต ในปฏิกริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยาด้วยรอบการทำปฏิกริยา ของ 94 °C 30 วินาที 65 °C 30 วินาที และ 72 °C 60 วินาที โดยให้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลดลงรอบละ 0.7 °C เป็นจำนวน 12 รอบ และตามด้วย 35 รอบการทำปฏิกริยาของ 94 °C 30 วินาที 56 °C 30 วินาที และ 72 °C 60 วินาที ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบน denature acrylamide gel electrophoresis 6 % (30% acrylamide: bisacrylamide (19:1) 8 มิลลิลิตร 5X TBE 8 มิลลิลิตร urea 18 กรัม น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร 10% APS 400 ไมโครลิตร TEMED (N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine) 20 ไมโครลิตร)

โดยใช้ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสขนาด 33 x 40 เซนติเมตร (Life Technologies/Gibco BRL ModelS2) ทำการ pre-run เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่มีตัวอย่างในสารละลาย 1X TBE ใช้ความต่างศักย์คั้งที่ 1500 โวลต์ เตรียมตัวอย่างโดยผสมดีเอ็นเอต่อ Loading buffer (formamide 10 มิลลิลิตร Xylene cyanol 10 มิลลิกรัม bromophenol blue 10 มิลลิกรัม 0.5 M EDTA pH 8.0 200 ไมโครลิตร) ในอัตรา 5.5 ไมโครลิตรต่อ 1.5 ไมโครลิตร นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปดีมเป็นเวลา 5 นาทีและแช่น้ำแข็งทันทีก่อนนำไปดีมลงในช่องหัว ใช้ความต่างศักย์คั้งที่ 1500 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีของ Xylene cyanol เคลื่อนที่ได้ 2 ใน 3 ของเจล นำเจลออกมาด้วยวิธีการ Silver staining โดยนำกระจกด้านที่มีเจลแช่ด้วยสารละลาย acetic acid 10% เป็นเวลา 20 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ล้างด้วยน้ำ deionized water จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ย้อมเจลในสารละลาย Silver nitrate 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที และล้างสารละลายส่วนเกินออกด้วยน้ำ แช่แผ่นเจลในสารละลาย developer (Sodium carbonate 2.5% formaldehyde 0.02% Sodium thodulfate 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่ เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 5- 10 นาทีจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอหยุดปฏิกิริยาในสารละลาย acetic acid 10% เป็นเวลา 3-5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionized water ฟิ้งให้แห้ง เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยสายตาร่วมกับและสร้างเดนโดแกรมด้วยโปรแกรม GeneTools® (Syngene, Cambridge, UK) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ แบบ Mathing type เป็น match all tracks to all tracks Percentage tolerance เลือก 1% สร้างเดนโดแกรมด้วยค่า Dice's coefficient (Dice, 1945) และจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (Sokal and Michener, 1985) วิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) จำนวน 1000 ซ้ำ

การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของผลผลิต PCR

นำผลผลิตจาก PCR จากยีน *cpsD* 16S-23S rRNA/ITS และ *hrpS* โคลนเข้าในพาหะ pGEM-T® easy vector (Promega, Inc., Madison, USA) โดยในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ ประกอบด้วยสารดังนี้ ดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T 25 นาโนกรัม 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร DNA ligase 3 ยูนิต ผลผลิตจาก PCR 1 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน นำดีเอ็นเอถ่ายฝากเข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock เริ่มจากการนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอ (completent cell) แช่ในน้ำแข็ง จนกระทั่งละลายจนหมด เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วจำนวน 2.5 ul ผสมลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหาร LB 900 ไมโครลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C นำสารแขวนลอยแบคทีเรียปั่นตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนใส 500 μ l ละลายเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกลับมาไปเกลี่ยบนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร IPTG และ X-gal ปริมาตร 100 และ 150 ไมโครลิตร ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C 16-20 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารตรวจสอบโคโลนีที่มีขึ้นยืนอยู่โดยการ สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., USA) ตามคำแนะนำของ บริษัท และตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่โดยแยกด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟริซิส ความ ต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วยเอทิลเบรอมไนด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้ แสงอุลตราไวโอเลต นำโคโลนีที่มีขึ้นยืนส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอ (Macrogen, Inc. Korea) โดยแต่ละยีนส่งโคลน 3 โคลน นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc Version 2.6.001 (Nicholas and Nicholas, 1997) สำหรับลำดับดีเอ็นเอของ ส่วน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ fd2 และ rp1 ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterics bacteria นั้น นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ด้วย โปรแกรม BLAST (Basic Alignment Search Tool) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> และ จัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม clustalW และสร้างเป็นเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม Jalview โดยใช้ วิธี Neighbour joining by % identity (Clamp *et al.*, 2004)

รูปแบบลายพิมพ์โปรตีนของแบคทีเรีย (Soluble protein fingerprinting)

นำแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร NA เขี่ยลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g ทิ้งส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ 50 ไมโครลิตร และนำมา สกัดโปรตีนที่ละลายน้ำโดยมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้ เติม 2X loading sample (1% SDS 125 mM Tris (pH 6.8) 15% Sucrose 10% 2-Mercaptoethanol 1 mM EDTA (pH 7.0) 0.05% Bromphenol blue) ปริมาตร 1 เท่าตัว ปั่นเหวี่ยงให้เข้ากัน นำไปต้ม 10 นาที ปั่นตกตะกอนที่ ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Bradford' assay (Bradford, 1976) และนำไปตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดยการแยกในเจล Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970) ที่ความเข้มข้นเจล 5 และ 15% ของ ชั้น stacking gel และ separating gel ตามลำดับ ในเจลทั้งหมดขนาด 14 x 16 เซนติเมตร ความหนาเจล 1.5 มิลลิเมตร ด้วยความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ในชั้นของ stacking gel และ 250 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในชั้นของ separating gel ย้อมเจลด้วย Coomassie blue solution (0.25% Coomassie R250 75% Methanol 10% Acetic acid) เป็นเวลา 15 นาที

พร้อมกับเขย่าเบาๆ และล้างเจดด้วย destaining solution (75% Methanol 10% Acetic acid) พร้อมกับเขย่าเบาๆ จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ตรวจสอบแถบโปรตีนด้วยสายตา ร่วมกับโปรแกรม GeneTools® (Syngene, Cambridge, UK) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ แบบ Mathing type เป็น match all tracks to all tracks Percentage tolerance เลือก 1% สร้างเดนโดแกรมด้วยค่า Dice's coefficient (Dice, 1945) และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Sokal and Michener, 1985)

วิธีการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

เทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 ผลิตแอนติบอดี โดยการเตรียมแอนติเจน ดังนี้

การเตรียมแอนติเจนจากทั้งเซลล์ (Fixed cell) โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร 523 (Casein hydrolysate 8 กรัม Sucrose 10 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.035 กรัม K_2HPO_4 2 กรัม น้ำ 1 ลิตร ปรับ pH 6.9) (Schaad *et al.*, 2001) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 28 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วย้ายเชื้อแบคทีเรียอัตรา 1 ต่อ 100 ลงในอาหาร 523 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสขนาด 1 ลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 28 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ย้อมแกรมแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS (NaCl 8 กรัม $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 กรัม K_2HPO_4 0.2 กรัม KCl 0.2 กรัม น้ำ 1 ลิตร ปรับ pH 7.4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยการดูดเชื้อแบคทีเรียขึ้นลงเบาๆ แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างตะกอนแบคทีเรียรวม 3 ครั้ง และละลายแบคทีเรียในปริมาตรสุดท้ายด้วย PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และย้ายเชื้อแบคทีเรียลงในถุง dialysis (cellulose dialysis membrane MW cut off 12-14000 Da.) และนำไปทำให้เซลล์คงสภาพ (fixed cells) โดยแช่ใน 2% glutaraldehyde (ในน้ำ) ด้วยปริมาตร 20 เท่าของปริมาตรสารแขวนลอยแบคทีเรีย เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นสารละลายเบาๆ ตลอดเวลา ย้ายถุง dialysis ลงในสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ลิตร ปั่นสารละลายเบาๆ ตลอดเวลา บ่มไว้ที่ 4 °C และเปลี่ยนสารละลาย PBS 3 ครั้งภายในเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียปริมาตร 30 ไมโครลิตรเลี้ยงในอาหารเหลว NGB (Beef extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม Glucose 5 กรัม น้ำ 1

ลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ หากพบว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ต้องนำเซลล์แบคทีเรียไปแช่ใน 2% glutaraldehyde อีกครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 5×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS ก่อนที่จะนำไปฉีดกระด้าย (Schaad *et al.*, 1990)

การเตรียม Membrane protein complex (MPC) จากเซลล์แบคทีเรีย โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการข้างต้น นำตะกอนเซลล์ล้างด้วย 0.15 M NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ละลายเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.2 M LiCl อัตรา 200 มิลลิลิตร ต่อเซลล์ 10 กรัม เติม glass bead ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 มิลลิเมตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อวินาที ที่ 45 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองเอา glass bead ออก นำสารแขวนลอยไปปั่นที่ความเร็วรอบ 30,937 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนใสไปปั่นที่ความเร็วรอบ 108,763 g เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำตะกอนมาละลายเบาๆ ด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 71,669 g เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำตะกอนที่ได้ละลายด้วย น้ำอัตรา 1.5 มิลลิลิตรต่อเซลล์เริ่มต้น 1.8 ลิตร (Yakrus and Schaad, 1979) วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีการ Bradford (Bradford, 1976) และปรับความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปฉีดกระด้ายต่อไป

การเตรียมแอนติเจนแบบเซลล์มีชีวิต (Life cell) เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงลงในอาหารเหลว NMC ประกอบด้วย Na_2PO_4 60 กรัม KH_2PO_4 30 กรัม NH_4Cl 10 กรัม L-glutamine 1 กรัม nicotinic acid 1 มิลลิกรัม thiamine 0.1 มิลลิกรัม biotin 0.01 มิลลิกรัม D-methionine 0.2 กรัม MgSO_4 0.25 กรัม glucose 10 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร นำอาหารมาฆ่าเชื้อโดยกรองผ่านเมนเบรน cellulose acetate ขนาด 0.2 ไมครอน เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยการเขย่าเชื้อแบคทีเรียในอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเชื้อแบคทีเรียออกจากอาหารโดยการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง และละลายเชื้อแบคทีเรียในสารละลาย PBS (Lamka *et al.*, 1991) วัดความเข้มข้นแบคทีเรียก่อนนำไปฉีดสัตว์ทดลองด้วยการปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2

การผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง โดยทำการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง ดังนี้ นำกระด้ายพันธุ์ White New Zealand ขนาดน้ำหนักประมาณ 2-3 การผลิตแอนติบอดีในกระด้ายพันธุ์ White New Zealand ขนาดน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัมจะเลือดจากไขกระดูกก่อนทำการฉีดกระตุ้น

สัตว์ทดลอง เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบลบ (negative control) ฉีดกระตุ้นด้วย fixed cell หรือ MPC ผสมกับ Complete Freund's Adjuvant อัตรา 1:1 ในสัปดาห์แรก และในสัปดาห์อื่นๆ ผสมด้วย Incomplete Freund's Adjuvant แทน ด้วยวิธีการฉีดที่ชั้นใต้ผิวหนังที่ต้นคอ (subcutaneous injection) 2 – 3 ตำแหน่ง สำหรับ fixed cell จะฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตรต่อครั้ง ส่วน MPC ฉีดทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาตร 100 200 400 และ 400 ไมโครกรัม เก็บเลือดกระด่ำที่ใบหูในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป และแยกเก็บซีรัมจากเลือดและตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติบอดี

โดยจะเลือดกระด่ำจากใบหูลงในบีกเกอร์ที่สะอาด นำเลือดกระด่ำที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเลือดแข็งตัวใช้เข็มเจาะมาเชื่อมเย็บขอบบีกเกอร์ให้เลือดหลุดจากขอบบีกเกอร์นำไปไว้ในตู้เย็นข้ามคืน คัดส่วนน้ำใส และปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่เหลือทิ้งด้วยความเร็วรอบ 1,086 g เป็นเวลา 10 นาที นำซีรัมที่ได้แบ่งเก็บใส่หลอด เดิม NaN_3 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (Schaad *et al.*, 1990)

การผลิตแอนติบอดีในไก่

โดยใช้ไก่ไข่พันธุ์ Hisex โดยเก็บไข่ก่อนฉีดแอนติเจนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบลบ (negative control) ฉีด life cell และ MPC โดยเตรียมแอนติเจนเหมือนดังกล่าวข้างต้น ฉีดแอนติเจน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ชั้นใต้ผิวหนังที่ต้นคอ (subcutaneous injection) โดยการฉีดแอนติเจนที่ผสม Complete Freund's Adjuvant ในสัปดาห์แรก และ Incomplete Freund's Adjuvant ในสัปดาห์ที่ 2 3 5 และ 6 เก็บไข่และนำมาแยกสกัด IgY จากไข่ โดยนำไข่ไก่ที่เก็บในสัปดาห์ที่ 3 ถึง 7 หลังจากฉีดแอนติเจนเพื่อใช้ทดสอบในเบื้องต้น เริ่มจากการแยกไข่แดงออกจากไข่ขาว และล้างไข่แดงด้วยน้ำเพื่อกำจัดไข่ขาวและล้างไข่แดงอีกครั้งบนกระดาษทิชชูเพื่อกำจัดไข่ขาว นำส่วนไข่แดงที่ปราศจากเยื่อหุ้มเปลือกไข่แดง วัดปริมาตรไข่แดงและจดบันทึก ผสมไข่แดงกับน้ำ pH 4.0 อัตรา 1 ต่อ 9 ส่วน ปรับ pH ของไข่แดงให้เป็น 5.0 ด้วย 0.1 N HCl แชน้ำไข่แดงไว้ที่ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง นำน้ำไข่แดงตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 °C นำน้ำส่วนใสเรียกว่า water soluble fraction (WSF) กรองผ่านกระดาษ Whatman® No. 1 สองชั้น แล้วตกตะกอนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตอัตรา 390 กรัมต่อลิตร และกวนที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนอีกครั้งด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนสีขาวขุ่นที่ได้

ด้วยสารละลาย 0.5X PBS pH 7.4 ในอัตรา 0.2 เท่าของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้น และเติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02% เก็บ IgY ที่ได้ที่ 4 หรือ -20°C (สรรชัย และคณะ, 2548)

ตรวจสอบความไวของแอนติซีรัมด้วยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรียเจือจางใน PBS ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุมเคลือบลงในจานทดสอบ ELISA (Costar®, USA) บ่มที่ 37°C ข้ามคืน หรือจนกว่าจะแห้ง ล้างด้วย PBST (PBS เติม 0.05% Tween 20) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร โดยล้างทันที 1 ครั้ง และบ่ม 5 นาที อีก 3 ครั้ง เจือจางแอนติซีรัมที่ได้ในแต่ละสัปดาห์ใน 5% skim milk ที่ละลายด้วย PBS และเจือจาง แบบ 2 เท่าเป็นลำดับขั้น (two fold serial dilution) เคลือบลงในจานทดสอบ ELISA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย PBST ดังได้กล่าวมาแล้ว เติม Goat-anti Rabbit IgG alkaline phosphatase (A3687, Sigma, USA) อัตรา 1:10,000 สำหรับการทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่าย และ Goat-anti Chicken IgY alkaline phosphatase (A1043, Sigma, USA) อัตรา 1:7,500 สำหรับการทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากไก่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย PBST เติมซับสเตรท p-nitrophenyl phosphate 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบลบ ได้แก่ หลุมที่เคลือบด้วยแบคทีเรียและทำปฏิกิริยากับ normal serum อัตราเจือจางที่ 1 ต่อ 200 และหลุมที่เคลือบด้วย PBS และทำปฏิกิริยากับซีรัมอัตราเจือจางที่ 1 ต่อ 200 โดยค่าที่ให้ผลเป็นบวกต้องมากกว่าค่าที่ได้จากตัวเปรียบเทียบลบอย่างน้อย 3 เท่า แต่ละตัวอย่าง ทำ 2 ซ้ำ คัดแปลงจาก Sutula *et.al.* (1986)

ในการทดสอบใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PathoScreen® สำหรับ *Erwinia stewartii* (Agdia®, Inc., USA) เพื่อตรวจสอบเปรียบเทียบความไวของการทำปฏิกิริยาควบคู่ไปด้วย โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การลดการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี โดยวิธีการ Cross absorption

นำเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* *Escherichia coli* และ *Pantoea agglomerans* ที่เจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และ ขูดเซลล์จากผิวหน้าอาหารชนิดละ loop ผสมลงในแอนติซีรั่มแต่ละชนิดอัตราหนึ่งloop ต่อ แอนติบอดี 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ แอนติซีรั่มทำปฏิกิริยากับเชื้อที่ใส่ลงไป นำแอนติซีรั่มไปปั่นตกตะกอนที่ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใตไ้ใส่หลอดใหม่ และเติม NaN₃ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02% และเก็บเพื่อใช้ทดสอบต่อไป (Hampton *et al.*, 1989)

ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* *Escherichia coli* *Pantoea agglomerans* *P. dispersa* *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 XE1 XE2 XE3 XE4 XE5 XE6 XE7 XE8 XE9 XE11 Y001 และ W001 ที่เพาะเชื้อบนอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางด้วยน้ำ ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.2 นำเชื้อไปทดสอบในงาน ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ บ่มที่ 37 °C จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียแห้ง และใช้วิธีการขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจสอบความไวของแอนติซีรั่ม ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ใช้ ได้จากการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่ม ตัวควบคุมเปรียบเทียบ (control) ดังนี้

ตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (negative control)

- หลุมที่เคลือบด้วยแบคทีเรียและทำปฏิกิริยากับ normal serum (ตัวเปรียบเทียบลบ) อัตราเจือจางที่ 1 ต่อ 200

- หลุมที่เคลือบด้วย PBS และทำปฏิกิริยากับซีรั่มอัตราเจือจางที่ 1 ต่อ 200

ตัวควบคุมการทดลอง ได้แก่

- หลุมที่เคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ทำปฏิกิริยากับ แอนติซีรัมต่อเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* อัตราเจือจางที่ 1 ต่อ 500

- หลุมที่เคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ทำปฏิกิริยากับ normal serum ของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรัมต่อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* อัตรา 1 ต่อ 200

โดยค่าที่ให้ผลเป็นบวกต้องมากกว่าค่าที่ได้จากตัวเปรียบเทียบลบ (negative control) อย่างน้อย 3 เท่า (Sutula *et.al.*, 1986)

เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

วิธี Direct-PCR

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่ค่า O.D. ที่ 600 nm ประมาณ 0.01 แล้วทำการเจือจางสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย 10 เท่าแบบเป็นลำดับขั้น นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยบนอาหาร NA บ่มที่ 30 °C เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น และนำสารแขวนลอยแบคทีเรียตกตะกอนเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 5 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยา PCR กับคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *hrpS* ตามการทดลองของ (Coplin *et al.*, 2002) เหมือนกับการทดสอบเชื้อตามวิธีอ้างอิง

วิธี Magnetic bead-PCR

นำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตรผสมร่วมกับ Rabbit anti-MPC ของ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 ในอัตรา 1:500 ในสารละลาย PBS นำสารผสมเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS ที่เติม 0.1% BSA เติม Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (DynaL,

Norway) จำนวน 6 ไมโครลิตร มีปริมาณ beads ประมาณ 4×10^6 beads ที่ล้างด้วยสารละลาย PBS ที่เติม 0.1% BSA มาก่อน 2 ครั้ง นำเซลล์และ bead ไปเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ล้าง bead ด้วยสารละลาย PBS ที่เติม 0.1% BSA บน magnetic Dynal®MPC-S (Dynal, Norway) ละลาย beads ด้วยน้ำปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดัดแปลงจาก Enrothe and Engstrand (1995) นำ 5 ไมโครลิตรไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้วิธีการและขั้นตอนเช่นเดียวกับวิธีการ direct-PCR ดังข้างต้น

วิธี Ampli-disk PCR

วิธีการตรวจสอบโดยนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบน agar-disk ขนาดประมาณ 0.6×0.6 ตารางเซนติเมตร ซึ่งเตรียมโดยนำอาหารรูนที่มีส่วนประกอบ 0.125 เท่าของ NB และรูน 0.5% นึ่งฆ่าเชื้อ เทลงในกระดาษเพาะเมล็ด อย่างหนาที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิตรต่อกระดาษขนาด 2.5×2.5 ตารางเซนติเมตร ปล่อยให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ปุ่ม agar-disk ที่หยดสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียข้ามคืนที่อุณหภูมิ 30°C นำมาเติมน้ำปริมาตร 1 มิลลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ลูดยาสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียมาทำปฏิกิริยา direct-PCR จำนวน 5 ไมโครลิตรดังวิธีที่กล่าวข้างต้น ดัดแปลงจาก Schaad and Randhawa (2003)

เทคนิค Real-time PCR

วิธีการเริ่มต้นจากนำสารแขวนลอยจำนวน 3 ไมโครลิตรในแต่ละความเข้มข้นทำปฏิกิริยาด้วยส่วนประกอบเหล่านี้ไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 200 nM ซึ่งออกแบบจากยีน *hspS* (AF282857) ด้วยโปรแกรม FastPCR version 4.0.13 (Kalender, R., Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland) ร่วมกับการคัดเลือกด้วยสายตา HrpS688RTF (5' CCT GATT TCA CGA CTG CCT GGT CC 3') และ HrpSNTR688 (5' ATG CGT TGC GTT GTC ACG TTG AGT) ให้ขนาดของผลผลิตเป็น 123 คู่เบส ซึ่งแสดงลำดับดีเอ็นเอของส่วนที่ไพรเมอร์ และผลผลิตของ Real-time PCR ได้ดังในภาพที่ 1 นำไพรเมอร์ผสมร่วมกับ 1X Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen™, USA) ในปริมาตรรวมทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาดังรอบดังนี้

รอบที่ 1	95°C	2	นาที
รอบที่ 2	95°C	8	วินาที
รอบที่ 3	68°C	15	วินาที

ซ้ำรอบที่ 2 และ 3 ทั้งหมดจำนวน 40 รอบ

ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Master cyclerTM ep realplex, Eppendorf

ทำแต่ละความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ซ้ำ นำค่า cT มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์ (cfu) และค่า cT และหาค่า melting curve เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลผลิต PCR ที่ได้

ภาพที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของยีน *hrpS* และส่วนที่นำมาใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 123 คู่เบส ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้และมีลูกศรอยู่ด้านบนเป็นส่วน Forward primer และส่วนที่มีลูกศรอยู่ด้านล่างเป็นส่วน Reverse primer ลำดับเบสที่เป็นอักษรตัวหนาเป็นส่วนดีเอ็นเอของผลผลิต Real-time PCR

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในพืช

การทดสอบการปลูกเชื้อในต้นกล้าข้าวโพด

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 Y001 และ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง เตรียมเป็นสารแขวนลอยในสารบัฟเฟอร์ PBS ค่าดูดกลืนแสง 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^9 cfu/ml เติมสาร TritonX-100 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02% นำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวประมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงในกรวยของใบยอคกล้าข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน เก็บต้นข้าวโพดในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100% ในสภาพที่ให้แสง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 28 °C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบอาการของต้นข้าวโพด โดยใช้ต้นข้าวโพดที่หยอดกรวยยอด้วย PBS เป็นตัวเปรียบเทียบ (von Bodman *et al.*, 1998)

ความไวของการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างพืชสดด้วยเทคนิค PCR

นำใบข้าวโพดต้นไม่เป็นโรคตัดเป็นชิ้นประมาณ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 15 ชิ้นแช่ในน้ำ 1.5 มิลลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำแช่พืช 3 ไมโครลิตรมาผสมกับตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับขั้น ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และปั่นตกตะกอน นำสารแขวนลอยพืชในน้ำแช่พืชไปทำปฏิกิริยา PCR ทั้ง 3 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา PCR นั้นใช้คู่ไพรเมอร์ต่อ 16S rDNA ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterics bacteria ไพรเมอร์ fd2 (5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') และ rp1 (5' CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT 3') ขนาดละ 200 nm (Weisburg *et al.*, 1991) เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบส และใช้น้ำแช่ใบพืชที่ไม่ได้ผสมเชื้อแบคทีเรียเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ

การทดสอบตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชสดจากต้นกล้าข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ

ปลูกเชื้อแบคทีเรียในต้นพืชเหมือนกับการทดสอบการปลูกเชื้อลงในต้นกล้าข้าวโพด และนำตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบไหม้ ใบจุด ใบด่าง แล้วนำใบพืชทั้งส่วนที่มีอาการแผลสีน้ำตาลและสีเขียว ตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 2 – 3 ชิ้น แช่ในน้ำ 100 ไมโครลิตร ประมาณ

5 นาที บนสไลด์ และตรวจสอบการไหลของ bacterial ooze ได้กล้องจุลทรรศน์ และดูดส่วนน้ำใส 3 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการทดสอบความไวของการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างพืช และตรวจสอบผลขนาดดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ให้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 15 นาที ย้อมแผ่นเจลในสารละลาย ethidium bromide และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อ

การปลูกเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดข้าวโพด

ปลูกเชื้อลงในเมล็ดข้าวโพด โดยนำเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 เลี้ยงในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียละลายในสารละลาย PBS ปรับค่าการดูดกลืนแสง ประมาณ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แช่เมล็ดข้าวโพดในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียในเครื่องทำสุญญากาศเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ค่อยๆ ปลดปล่อยให้อากาศเข้าไปในเครื่อง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ คัดแปลงจาก Poussier *et.al.* (2002) ใช้เมล็ดข้าวโพดที่แช่ในสารละลาย PBS เป็นตัวเปรียบเทียบ

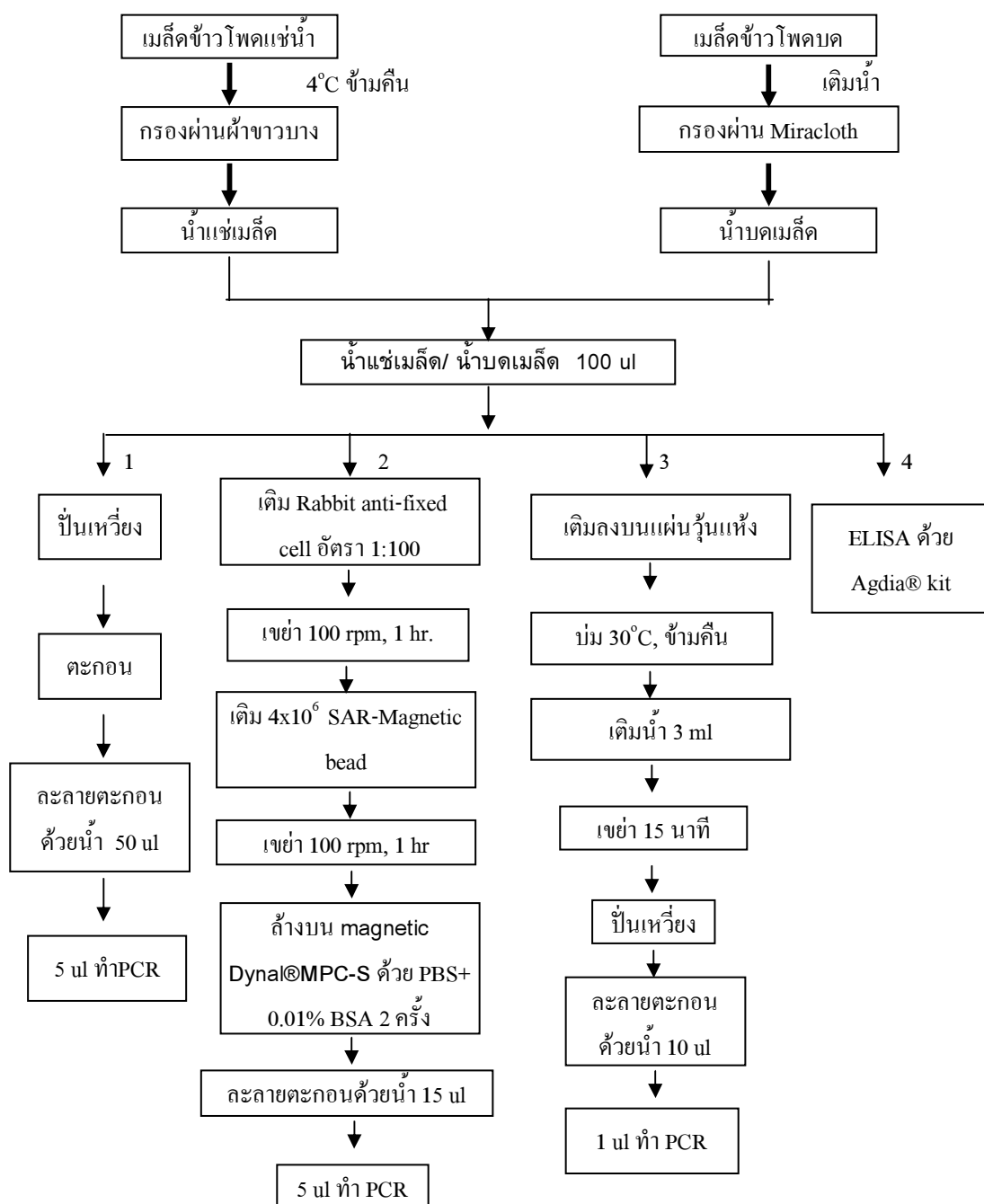
ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ความมีชีวิตและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในข้าวโพดแต่ละเมล็ด โดยนำเมล็ดข้าวโพดแต่ละเมล็ดแช่ในสารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคั้น นำส่วนน้ำใส แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งจำนวน 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจาง 10 เท่า เป็นลำดับขั้นเกลี่ยบนอาหาร NA ตรวจสอบแบคทีเรีย ส่วนที่สองนำน้ำใสที่เหลือทั้งหมดไปตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใส และละลายตะกอนด้วยน้ำ 5 ไมโครลิตร นำ 2 ไมโครลิตรไปทำการตรวจหาเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* โดยใช้เทคนิค PCR เหมือนกับการตรวจเชื้อแบคทีเรียในพืช

ตรวจสอบความไวของวิธี direct PCR Magnetic bead PCR Ampli-disk PCR และ ELISA ในเมล็ดที่ติดเชื้อ โดยนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ค่า O.D. ประมาณ 0.01 เจือจาง 10 เท่าด้วย PBS เป็นแบคทีเรียเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับขั้นด้วยน้ำแช่เมล็ด หรือน้ำบัลคมเมล็ด และนำไปเกลี่ยบนอาหาร NA เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

การเตรียมน้ำแช่เมล็ดด้วยการนำเมล็ดข้าวโพด 200 เมล็ดแช่ในสารละลาย PBS ปริมาตร 200 มิลลิลิตรข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C กรองเมล็ดออกด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำส่วนใสที่ได้ทำการทดสอบต่อไป

การเตรียมน้ำบดเมล็ดด้วยการนำเมล็ดข้าวโพด 200 เมล็ดบดด้วยเครื่องบด (Rongtong iron works รุ่น RT-02A) ความเร็วรอบ 30,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที (ผสมกับสารละลาย PBS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันประมาณหนึ่งนาที กรองผ่านแผ่น miracloth (Calbiochem®, USA.) สองชั้น นำน้ำบดเมล็ดที่ได้ไปทดสอบต่อไป

นำน้ำแช่เมล็ดหรือน้ำบดเมล็ดที่ผสมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทดสอบด้วยวิธีการ direct-PCR Magnetic bead –PCR Ampli-disk PCR และวิธีการ ELISA เช่นเดียวกับการที่ได้อธิบายมาแล้ว ดังสรุปในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนผังแสดงการตรวจเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดด้วยวิธีการ Direct-PCR (1) Magnetic bead-PCR (2) Ampli-disk PCR (3) และ ELISA (4)

การตรวจสอบหาปริมาณสารแชนเมล็ดที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ

นำเมล็ดข้าวโพดแช่น้ำในอัตรา 100 เมล็ดต่อน้ำ 30 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกและปิดผนึกปากถุง แช่เมล็ดเป็นเวลาข้ามคืน ที่ 4 °C นำส่วนไฮปริมาตร 10 20 40 80 160 และ 200 มิลลิลิตร ผสมกับสารแขวนลอยเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 ในน้ำที่มีปริมาณเซลล์ต่างๆ กัน ตรวจสอบปริมาณเซลล์โดยการนำไปเจือจางแบบ 10 เท่าเป็นลำดับขั้น เกลี่ยบนอาหาร NA บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบปริมาณโคโลนี

นำน้ำแช่ข้าวโพดที่ผสมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียส่วนกรองผ่านกระดาษ Whatman® No. 1 จำนวนสองครั้ง และกรองผ่าน Mixed Cellulose ester membrane ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน นำแผ่นเมมเบรน แช่น้ำปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อแผ่นในจานเลี้ยงเชื้อ เขย่าที่ความเร็วรอบ 70 รอบ ต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำน้ำแช่เมมเบรนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ 10 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR เหมือนการทดลองตรวจสอบเชื้อด้วย Direct-PCR

ความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนของเมล็ดติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดที่ปลูกเชื้อและตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเมล็ดมาผสมกับกองเมล็ดพันธุ์ในอัตราต่างๆ ได้แก่ 1/5,000 (0.02%) 1/8,000 (0.0125%) 1/10,000 (0.010%) และ 1/13,000 (0.007%) เมล็ด โดยทำการตรวจแบบไม่แบ่งกองเมล็ดพันธุ์ และแบ่งกองเมล็ดพันธุ์เป็นกอง (sub-sample) กองละ 500 เมล็ด แช่เมล็ดข้าวโพดในน้ำและตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองปริมาณการตรวจสอบหาปริมาณสารแชนเมล็ดที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ

ผลและวิจารณ์

ผล

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ตามวิธีการอ้างอิง

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ NA LB และ CPG พบว่าเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 มีการเจริญได้ช้ากว่าเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยจะพบโคโลนีเชื้อขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร NA โคโลนีมีสีเหลืองนวล ขอบเรียบ ผิวมันวาว แต่ไม่เยิ้ม ทึบแสง ฐานต่ำเป็นรูปโดม (ภาพที่ 3 ก) นอกจากนี้ลักษณะโคโลนีที่พบบนอาหาร NA ยังมีลักษณะหลายแบบ ดังแสดงในภาพที่ 3 (ข - จ) ได้แก่ แบบลักษณะขอบหยัก ตรงกลางฐานต่ำ แบบที่สองขอบหยักตรงกลางฐานสีเหลืองเข้มคล้ายไข่ดาว แบบที่สามเป็นโคโลนีขอบหยัก โคโลนีค่อนข้างแบน ผิวหน้าโคโลนีเป็นรอยหยักคลื่น และแบบที่สี่เป็นโคโลนีขอบเรียบ โคโลนีฐานต่ำ ผิวหน้าค่อนข้างแบนและเยิ้มมันวาว โดยลักษณะที่พบบ่อยจะเป็นลักษณะแบบแรก ภาพที่ 3 (ก) เมื่อโคโลนีอายุ 3-4 วันจะมีลักษณะยุบตัวลงตรงกลาง ขอบนูนขึ้น คล้ายภูเขาไฟ (ภาพที่ 3 ฉ) ซึ่งเกิดลักษณะเช่นเดียวกันเมื่อเลี้ยงบนอาหาร LB และ CPG แต่ในอาหาร CPG ขอบโคโลนีจะหยัก และโคโลนีมีสีขาวครีม โคโลนีไม่เยิ้ม ภาพที่ 3 (ข) ในอาหารคัดเลือก Nigrosine medium พบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 จะเจริญช้ากว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ โดยจะพบโคโลนีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตรเมื่ออายุ 5 วัน และมีลักษณะโคโลนีเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปดาบ (ภาพที่ 3 ช และ ฉ) อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ได้อย่างรวดเร็ว โดยพบโคโลนีขนาดใหญ่ผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 – 0.7 มิลลิเมตรเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน (ภาพที่ 3 ญ - บ)

การตรวจสอบคุณสมบัติในการติดสีพบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และสามารถเคลื่อนที่ได้ ยกเว้นเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715

เมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการ Hypersensitive response พบว่าเชื้อที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว แต่เมื่อทดสอบการเกิดโรคพบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดจุดน้ำกับต้นกล้าข้าวโพดเมื่อใช้วิธีการปลูกเชื้อแบบฉีดเชื้อผ่าน

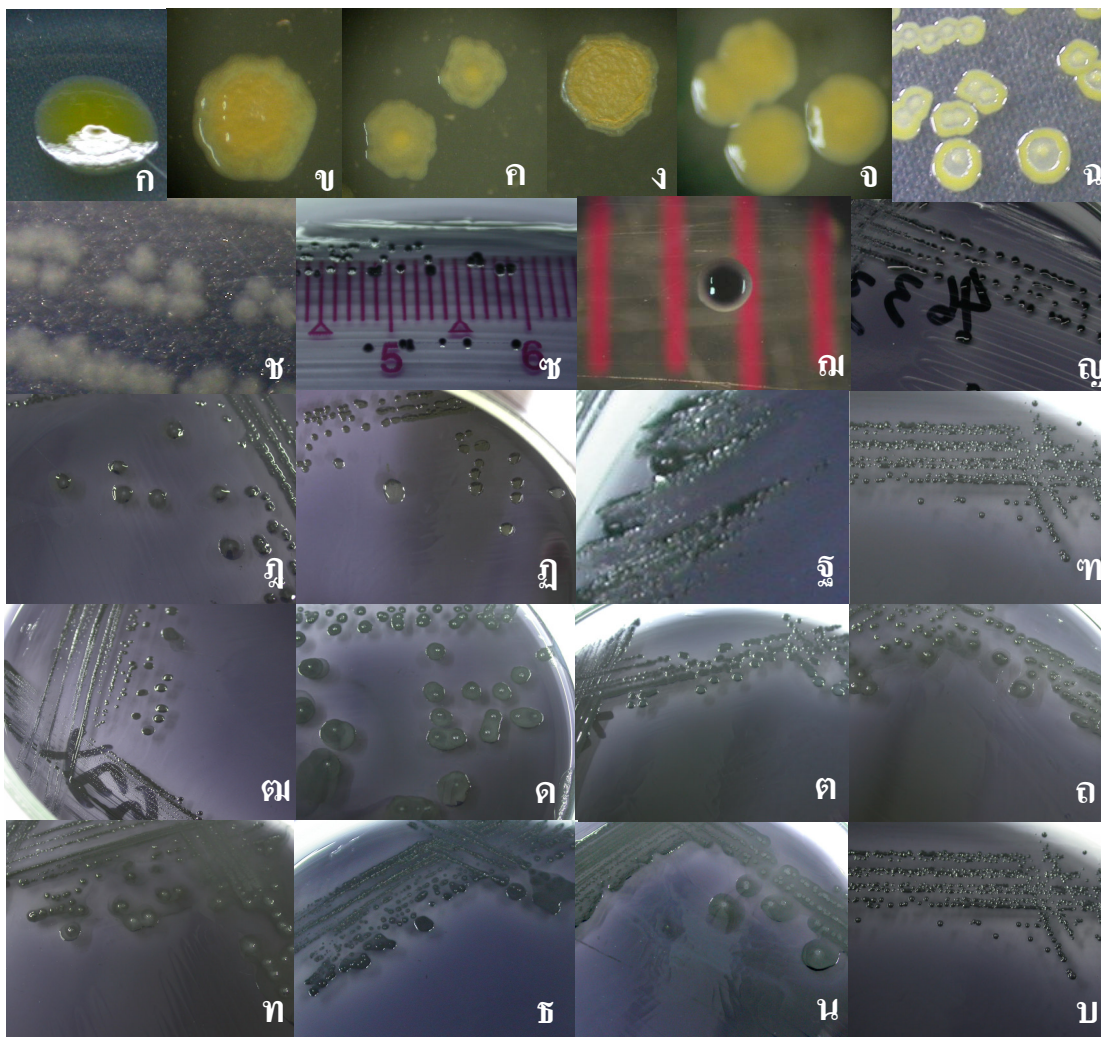
ทางใบ และเมื่อทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการหยอดกรวยยอด และเก็บต้นข้าวโพดไว้ในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง 3 วัน ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อด้วย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 มีอาการเริ่มเป็นจุดน้ำเล็กๆ และลามไปตามเส้นใบ ขอบแผลขรุขระ โดยแผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 4 (ง-ฉ) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ก็สามารถทำให้เกิดอาการเน่าจากขอบใบ รวมทั้งเน่าที่ใบยอด คล้ายกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T ดังในภาพ 4 (ฉ – ฉ) ซึ่งสังเกตว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถจะเข้าทางรูคายน้ำ (Hydathode) ที่ขอบใบซึ่งทำให้เห็นเป็นแผลไหม้และเน่าตามขอบใบได้ และเมื่อนำแผลเหล่านี้ไปตรวจสอบการไหลของ ooze ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ ก็พบว่าการไหลของ ooze เช่นเดียวกับต้นข้าวโพดที่ปลูกเชื้อด้วย *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T

เมื่อทดสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PathoScreen® สำหรับ *Erwinia stewartii* (Agdia®, Inc., USA) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Y001 และ XE ทั้งหมดยกเว้น XE 7 และ W001 สามารถทำปฏิกิริยากับชุดตรวจสอบดังกล่าว โดยมีการทำปฏิกิริยาที่ชัดเจนมากกว่าการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T โดยเปรียบเทียบจากการดูกลิ่นแสงที่อ่านได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

จากการทดสอบการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อ 16s-23s rRNA/ITS ยีน *cpsD* และ *hrpS* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อคู่ไพรเมอร์ 16s-23s rRNA/ITS และ *cpsD* ได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.1 กิโลเบส พร้อมกับแถบดีเอ็นเอของ 16s rDNA ขนาด 1.5 กิโลเบสที่ใช้เป็น internal control ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบสเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 5 ก และ 3ค เฉพาะคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *hrpS* ที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T ดังในตารางที่ 3 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่ได้จากทั้งสองยีนนั้น เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 พบว่าจากจำนวนนิวคลีโอไทด์ 903 และ 1106 นิวคลีโอไทด์ มีลำดับเบสที่แตกต่างกันของ 16s-23s rRNA/ITS และ *cpsD* จำนวน 12 และ 10 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6 สำหรับยีน *hrpS* นั้นเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T กับข้อมูล

ได้จากฐานข้อมูล Genbank นั้น พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (identity) 100% จากทั้งหมด 807 นิวคลีโอไทด์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16s rDNA มาสร้างเป็นเดนโดรแกรมเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank พบว่าแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* *P. dispersa* *P. ananas* *P. stewartii* subsp. *stewartii* *Erwinia chrysanthemi* *E. herbicola* *E. carotovora* subsp. *carotovora* มีความห่าง (distance) ทางวิวัฒนาการไม่เกิน 0.3 และมีการจับกลุ่มผสมกันโดยเฉพาะเชื้อในจีนัส *Pantoea* spp. เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อในการทดลองนี้ได้แก่เชื้อที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยสายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์จับกลุ่มกระจายออกไป โดยสายพันธุ์ XE 11 แยกกลุ่มออกไป สายพันธุ์ Y001 และ XE9 จับกลุ่มร่วมกับ *P. agglomerans* แต่มีสายวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ LMG2715^T สายพันธุ์ XE1 XE6 และ XE8 จับกลุ่มร่วมกับ *P. agglomerans* เช่นกันแต่แยกสายวิวัฒนาการออกไปอีกสาย (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 3 โคโลนีของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โคโลนีบนอาหาร NA อายุ 2 วัน (ก-จ) อายุ 4 วัน (ฉ) อาหาร CPG (ช) อาหาร Nigrosine medium อายุ 5 วัน (ซ) ภาพขยายของโคโลนีแสดงลักษณะตาขอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แต่ละระหว่างช่องขีดสีแดงมีขนาด 1 มิลลิเมตร (ฌ) โคโลนีบนอาหาร Nigrosin medium อายุ 2 วัน เชื้อ *P. agglomerans* 4633 (ญ) XE1 (ฎ) XE2 (ฏ) XE3 (ฐ) XE4 (ฑ) XE5 (ฒ) XE6 (ด) XE7 (ต) XE8 (ถ) XE9 (ท) XE11 (ธ) Y001 (น) และ W001 (บ)

ตารางที่ 3 การทดสอบเชื้อแบคทีเรีย คุณสมบัติการทนเกลือ การเกิดโรค การเกิดปฏิกิริยา

Hypersensitive response การทำปฏิกิริยา ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

PathoScreen® สำหรับ *Pantoea stewartii* และการตรวจสอบด้วย PCR โดยคู่ไพรเมอร์ที่

จำเพาะต่อ 16s-23s rRNA/ITS *hrpS* และ *cpsD*

สายพันธุ์	การเจริญบน อาหาร LB เต็ม เกลือ 5%	แสดง อาการจุด น้ำ	HR	ELISA	PCR		
				PathoScreen® (O.D. 405 nm) ¹	16s -23S rRNA/ITS	<i>hrpS</i>	<i>cpsD</i>
XE1	+	+	-	+ (2.25) ± 0.06 ¹	+	-	+
XE2	+	+	-	+ (1.91) ± 0.04	-	-	-
XE3	+	+	-	+ (1.64) ± 0.01	-	-	-
XE4	+	+	-	+ (2.00) ± 0.07	-	-	-
XE5	+	+	-	+ (1.22) ± 0.10	-	-	-
XE6	+	+	-	+ (1.08) ± 0.05	+	-	+
XE7	+	+	-	- (0.11) ± 0.00	-	-	-
XE8	+	+	-	+ (1.05) ± 0.13	+	-	+
XE9	+	+	-	+ (1.56) ± 0.14	+	-	+
XE11	+	+	-	+ (1.23) ± 0.11	+	-	+
Y001	+	+	-	+ (0.98) ± 0.06	+	-	+
W001	+	+	-	- (0.12) ± 0.00	-	-	-
W002	+	Nd	Nd	- (0.12) ± 0.00	-	-	-
Pss	+	+	-		+	+	+
LMG2751 ^T				+ (1.34) ± 0.01			
Pag 4633	+	+	-	- (0.12) ± 0.00	-	-	-
Pag 4045	+	+	-	- (0.12) ± 0.00	-	-	-

สัญลักษณ์ + หรือ - หมายถึงให้เป็นผลการทดลองเป็นบวกหรือลบ

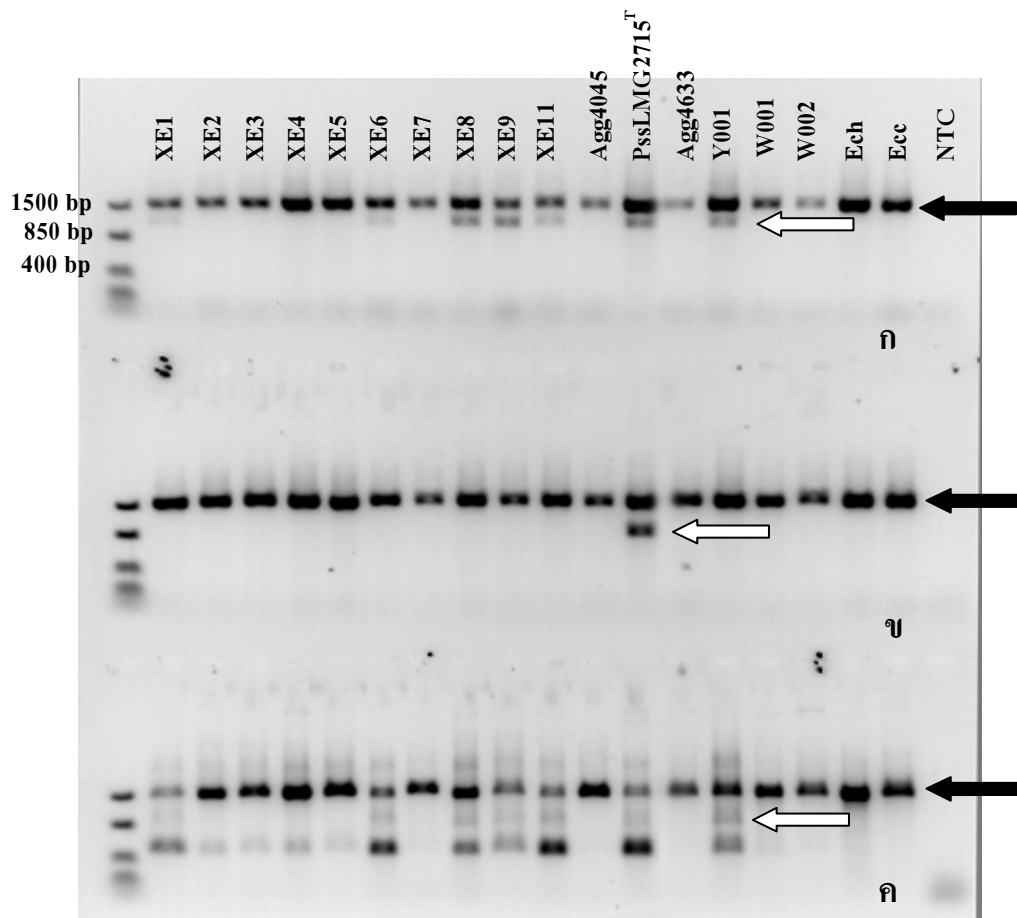
¹ แสดงผลปฏิกิริยาเป็นบวก “+” หรือลบ “-” (ค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าที่เป็นผลบวกได้จากค่าที่มากกว่า 3 เท่าของค่าตัวเปรียบเทียบลบ (0.12) ± 0.00

HR หมายถึง Hypersensitive reaction Pag หมายถึง *Pantoea agglomerans*

Pss หมายถึง *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T สายพันธุ์ Type strain



ภาพที่ 4 อาการบนใบข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ปลูกเชื้อด้วย PBS (ก) ปลูกเชื้อด้วย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T (ข-จ) ปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ XE1 2 3 4 5 6 8 9 11 และ Y001 ตามลำดับ (ฉ - ด)



ภาพที่ 5 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์จากการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดและเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์จำเพาะยีน *cpsD* (ก) *hrpS* (ข) และ 16s-23s rRNA/ITS (ค) ตำแหน่งที่ถูกครีซขาวขึ้นเป็นแถบดีเอ็นเอของแต่ละยีน และถูกครีสีดำเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน 16s rDNA เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบชี้วัดการเกิดปฏิกิริยา PCR (internal control) NTC หมายถึง non template control

```

      1020      1040      1440      *      1620
XE1      : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
XE6      : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
XE11     : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
XE8      : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
XE9      : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
Y001     : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GTCGAGACACA
LMG2715  : GTGCCT---GAG-ACAG---TTAACCCTCG---GCCGAGACACA
AJ311838 : GTG-CT---GAGAACAG---TTAACCCTCG---GCCGAGACACA
          GTGcCT***GAG ACAG***TTAACCctCG***GtcgaGACACA

```

```

      1820      *      1860
XE1      : ACGCACATGGTG-TT---CATGATGC
XE6      : ACGCACATGGTG-TT---CATGATGC
XE11     : ACGCACATGGTG-TT---CATGATGC
XE8      : ACGCACGTCTGTG-TT---CACGATGC
XE9      : ACGCACGTCTGTG-TT---CACGATGC
Y001     : ACGCACGTCTGTG-TT---CACGATGC
LMG2715  : ACGCACGTCTGTG-TT---CACGATGC
AJ311838 : ACGCACGTCTGTG-TT---CACGATGC
          ACGCAC T GTG TT CA GATGC

```

ก

```

      40      *      160      *      280      320
XE1      : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATTTCCA
XE6      : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATTTCCA
XE11     : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATTTCCA
XE8      : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATCTCCA
XE9      : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATCTCCA
Y001     : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATCTCCA
LMG2715  : TTATCTTCTTCT---GTACAAATTC---TTTGGCATGCTGGTT---ATCTCCA
          TTATCTTCTTCT***GTACAAATTC***TTtGGCATGcTGGTT***AT TCCA

```

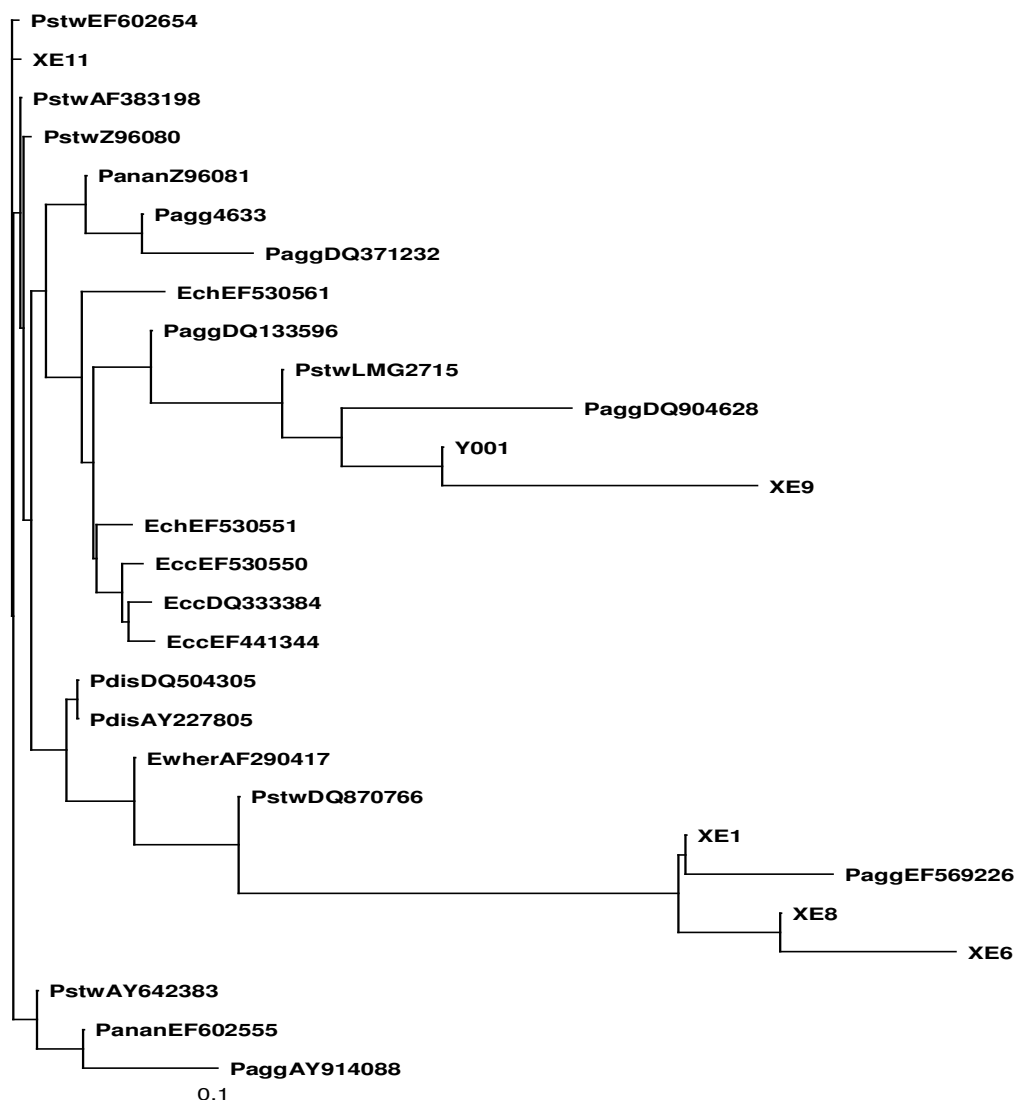
```

      400      *      480      780      820      920      *
XE1      : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
XE6      : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
XE11     : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
XE8      : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
XE9      : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
Y001     : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
LMG2715  : CGTCAAAGGCGTC---TTGAACAT---AGTTTC---CTGCTGC---AGTCATGCCAATGC
          CGT AAAGGcGTC***TTGAAC AT***AG TTC***CTgCTGC***AGTCATGCCAAtGC

```

ข

ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s- 23s rRNA/ITS (ก) และ *cpsD* (ข) ในตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด สายพันธุ์ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 เทียบกับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* โดยใช้โปรแกรม GeneDoc Version 2.6.001 (Nicholas and Nicholas, 1997)



ภาพที่ 7 เคนโดแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด สายพันธุ์ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 เทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล Genbank ด้วยวิธี Neighbour joining by percentage identity เส้นด้านล่างภาพหมายถึงระยะทาง 0.1 (distance) เชื้อที่มีตัวอักษรนำหน้า Pdis หมายถึง *Pantoea dispersa* Pstw หมายถึง *P. stewartii* subsp. *stewartii* Panan หมายถึง *P. ananatis* Ewher หมายถึง *Erwinia herbicola* Ech หมายถึง *E. chrysanthemi* Ecc หมายถึง *E. carotovora* subsp. *carotovora* ตัวอักษรและตัวเลขที่ต่อท้ายชื่อหมายถึง accession no. ของเชื้อจากฐานข้อมูล Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรท 95 ชนิด

จากการตรวจสอบการติดสีของผนังเซลล์แบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ติดสีแกรมลบ สร้างเอนไซม์ catalase ไม่เกิดปฏิกิริยา oxidase ไม่สร้างแก๊สจากการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส และไม่สร้าง H_2S และการใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียว ได้แก่สายพันธุ์ XE3 XE8 XE9 และ XE11 กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและแลคโตส หรือ กลูโคสและซูโครส ได้แก่ XE1 XE5 XE6 Y001 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T XE2 และ XE4 โดยสายพันธุ์ XE2 และ XE4 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจากส่วนอาหารทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่เมื่อเวลา 48 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลหมดจึงต้องใช้กรดอะมิโน ได้แก่ peptone เป็นแหล่งอาหารแทนทำให้เกิดสีแดงในส่วนของอาหารเอียง (slant) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีอากาศ

จากการทดสอบคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG 2715^T และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยด้วย Biolog® System ดังแสดงรายละเอียดดังในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG 2715^T และข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล Biolog® พบว่าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้คล้ายกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบอื่นๆ แต่สามารถใช้ได้น้อยชนิดกว่า โดยสารที่สามารถใช้ได้เหมือนกันแบ่งเป็นกลุ่มสารได้ดังนี้ สารในกลุ่ม polymer ได้แก่ dextrin สารกลุ่ม sugar และอนุพันธ์ ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine L-arabinose D-arabitol D-cellobiose D-fructose D-galactose α -D-glucose D-mannitol D-mannose β -methyl-D-glucoside D-psicose sucrose และ D-trehalose กลุ่ม Methyl esters ได้แก่ pyruvic-acid-methyl-ester กลุ่ม amino acids peptides และสารใกล้เคียง ได้แก่ L-asparagine L-aspartic-acid กลุ่ม alcohols ได้แก่ glycerol และกลุ่ม sugar phosphates ได้แก่ α -D-glucose-1-phosphate D-glucose-6-phosphate แหล่งคาร์บอนที่ใช้แตกต่างกันโดยเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในการทดลองนี้สามารถใช้ได้แต่เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ไม่สามารถใช้ได้ ในกลุ่ม sugar และอนุพันธ์ ได้แก่ D-arabitol D-cellobiose maltose L-rhamnose สารในกลุ่ม Carboxylic acids ได้แก่ acetic-acid cis-aconitic-acid citric-acid formic-acid และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T และ ข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล Biolog® พบว่ามีคาร์บอนหลายชนิดที่ใช้แตกต่างกัน ได้แก่ dextrin m-inositol α -D-lactose pyruvic-acid-methyl-ester

D-gluconic-acid succinic-acid bromosuccinic-acid L-alanine L-glutamic-acid inosine uridine
และ thymidine

ตารางที่ 4 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เมื่อทดสอบด้วย Biolog® system

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์														LMG2715 ^T	Pss ^D
	XE1	XE2	XE3	XE4	XE5	XE6	XE8	XE9	XE11	Y001	Pag4045	Pag20569	Pag4633	Pag ^D	Pad ^D	
Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alfa-cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-
Tween-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Tween-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	b
N-acetyl-D-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D-cellobiose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	b	+	+	+	+	-
L-erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	b	-	b	+	b
α-D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
α-D-lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Lactulose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์													LMG2715 ^T	P ^D _{ss}		
	XE1	XE2	XE3	XE4	XE5	XE6	XE8	XE9	XE11	Y001	Pag4045	Pag20569	Pag4633			Pag ^D	Pad ^D
Urocanic-acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-
Inosine	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Uridine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Thymidine	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Phenylethyl-amine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-aminocethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-3-butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L- α -glycerol-phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
α -D-glucose-1-phosphate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-glucose-6-phosphate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Pag: *Pantoea agglomerans*, Pad: *P. dispersa*, Pss: *P. stewartii* subsp. *stewartii*, LMG2715^T: *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T, + : สามารถใช้คาร์บอนได้, - : ไม่สามารถใช้คาร์บอนได้, b: ค่าการอ่านผลเป็นค่ากำลังระหว่างบวกและลบ, D: เป็นผลที่ได้จากฐานข้อมูล Biolog®

เปรียบเทียบและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย

โดยใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด

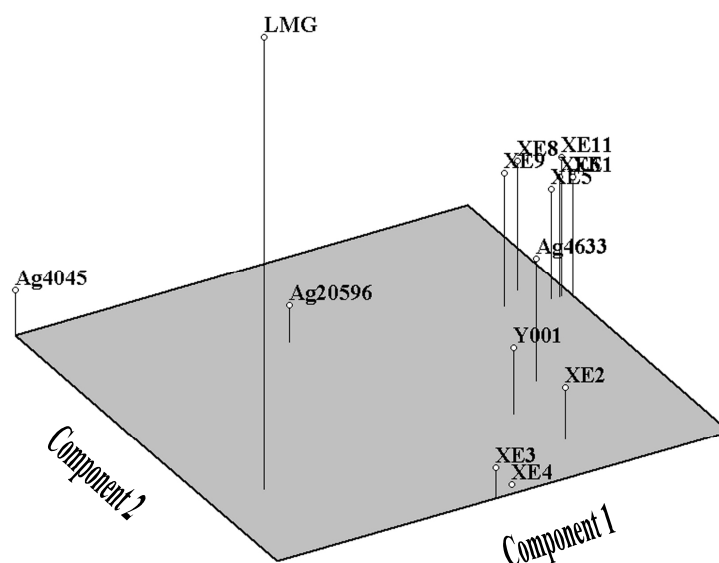
จากการเปรียบเทียบรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด แล้วนำมาหาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ด้วยวิธีทางสถิติแบบการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร Principal Component Analysis ดังแสดงภาพสามมิติในภาพที่ 8 โดยแต่ละมิติแสดงถึงความแปรปรวนของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมากที่สุดในมิติที่หนึ่งและแปรปรวนรองลงมาในมิติที่สองและสามซึ่ง

กราฟแสดงถึงการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T มีการจัดกลุ่มต่างออกไปจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ และเมื่อจัดกลุ่มด้วยการสร้างเป็นแผนโคโรแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย Simple matching coefficient และจัดกลุ่มด้วย Unweighted pair-group method of averages (UPGMA) ดังแสดงในภาพที่ 9 จากภาพที่ 9 สามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 5 กลุ่ม ที่ความเหมือน (similarity) 81% ซึ่งแบคทีเรียที่แยกจากข้าวโพดในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *P. agglomerans* 4633 ในขณะที่เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T และข้อมูลจากฐานข้อมูล Biolog ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งการจัดกลุ่มทั้งสองวิธีให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน

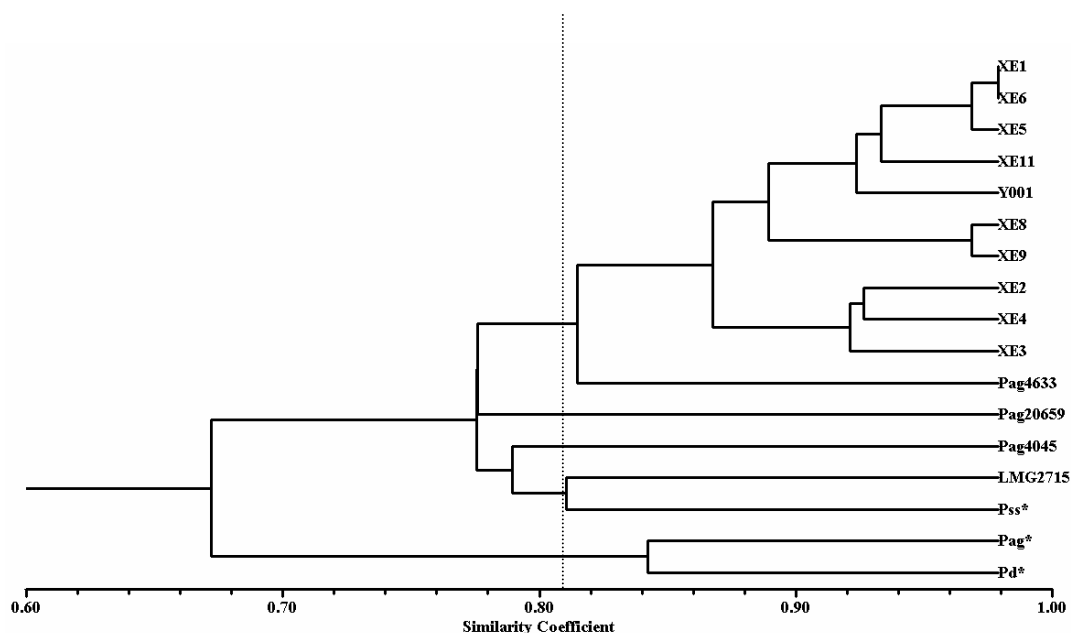
จากการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ภาพที่ 10 พบว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรียได้ 2 กลุ่ม ที่ค่า similarity 55% และสามารถแบ่งกลุ่มได้ 6 กลุ่ม ที่ค่า similarity 65% โดย LMG 2715^T ซึ่งเป็น type strain ของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* แยกออกไปเป็นอีกกลุ่มที่แตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย

จากการเปรียบเทียบรูปแบบแถบ soluble protein วิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE (ภาพที่ 11) พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบแถบโปรตีนออกเป็นกลุ่มด้วยสายตาได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เชื้อสายพันธุ์ W001 W002 และ XE7 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ XE1 และ 6 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ XE3 2 4 และ 5 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ XE8 และ 9 โดยเชื้อสายพันธุ์ XE1 Y001 *Pantoea agglomerans* 4633 4045 *Erwinia chrysanthemi* *E. carotovora* subsp. *carotovora* และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T มีรูปแบบแถบโปรตีนที่แตกต่างกันออกไปอย่างเด่นชัด เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Genetools (Syngene, Cambridge, UK) ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย Dice' coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA นั้น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับการจัดกลุ่มด้วยสายตา โดยที่ค่าความเหมือน 63% นั้น เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ W001 W002 XE7 *P. agglomerans* 4633 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เชื้อสายพันธุ์ XE11 8 9 4 6 3 2 และ 5 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 *Erwinia chrysanthemi* *E. carotovora* subsp. *carotovora* *P. agglomerans* 4045 Y001 และ XE1 จัดแยกกลุ่มกันออกไป

ซึ่งจากการเปรียบเทียบด้วยการใช้เทคนิคที่ต่างกัน ได้แก่ การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด
 ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค AFLP รูปแบบของ soluble protein นั้นพบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้อง
 กัน โดยเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และในการจัดกลุ่มโดยใช้
 แหล่งคาร์บอน และรูปแบบแถบโปรตีน มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P.agglomerans* มากกว่า โดย
 แตกต่างจากเชื้อ *Erwinia* spp. ทั้งสองสปีชีส์ และเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จัดกลุ่ม
 แยกออกไป

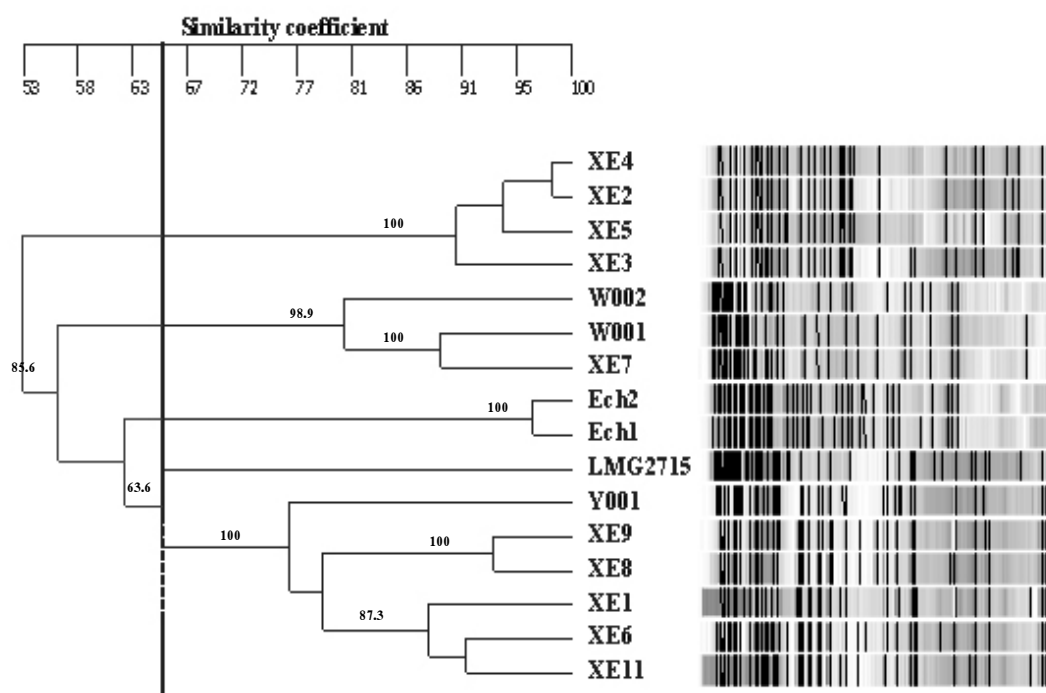


ภาพที่ 8 ภาพสามมิติแสดงการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด เปรียบเทียบด้วยวิธีการ Principal component analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยได้แก่สายพันธุ์ XE1-XE6 XE8-XE9 XE11 และ Y001 รวม 10 สายพันธุ์ Ag หมายถึง *Pantoea agglomerans* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 4045 4633 และ 20596 LMG หมายถึง *P. stewartii* subsp. *stewartii* สายพันธุ์ LMG2715^T



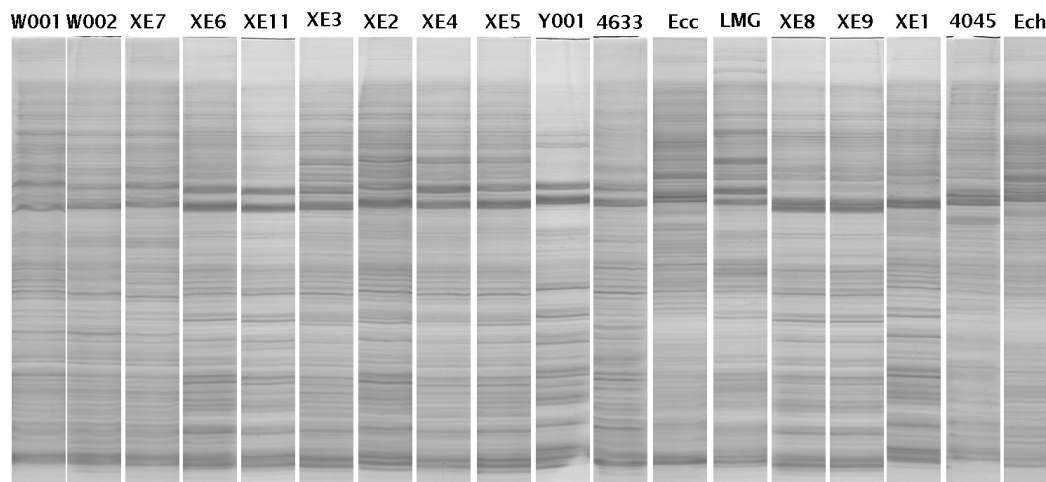
ภาพที่ 9 เคนโดแกรมการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด

วิเคราะห์ด้วย Simple matching coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method of averages) ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.01d ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ได้แก่ สายพันธุ์ XE1-XE6 XE8-XE9 XE11 และ Y001 รวม 10 สายพันธุ์ Pag หมายถึง *Pantoea agglomerans* Pd หมายถึง *P. dispersa* Pss และ LMG2715^T หมายถึง *P. stewartii* subsp. *stewartii* สายพันธุ์ที่มีเครื่องหมาย * เป็นข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล Biolog®

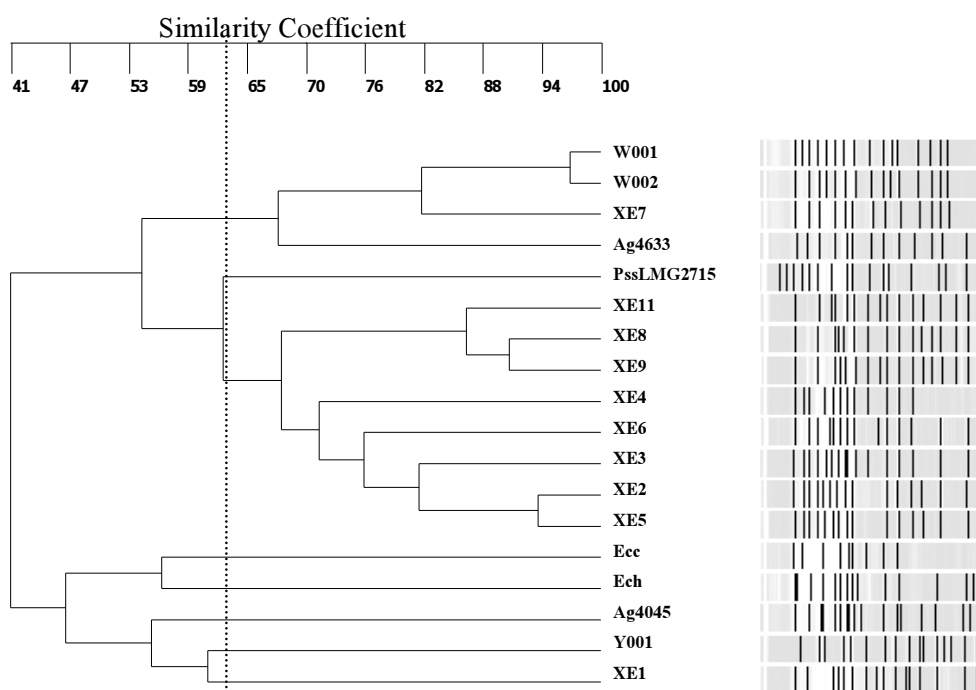


ภาพที่ 10 เคนไดรแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP

(Amplification Fragment Length Polymorphism) วิเคราะห์ด้วย Dice' Coefficient และจัดกลุ่มด้วย UPGMA (Unweighted pair group method of averages) ตัวเลขเหนือเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Winboot ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002 Ech1 และ 2 หมายถึง *Erwinia chrysanthemi* แยกได้จาก ข้าวโพด และกล้วยไม้ LMG2715^T หมายถึง *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T



ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบ Soluble protein ของแบคทีเรีย วิเคราะห์ด้วย 15 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002 Ech หมายถึง *Erwinia chrysanthemi* LMG หมายถึง *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T Ecc หมายถึง *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 4633 และ 4045 หมายถึงเชื้อ *P. agglomerans* สายพันธุ์ 4633 และ 4045 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 เคนโดแกรมการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้รูปแบบ soluble protein วิเคราะห์ด้วย Dice'

Coefficient และจัดกลุ่มด้วย UPGMA (Unweighted pair group method of averages)

ด้วยโปรแกรม GeneTools® (Syngene, Cambridge, UK) ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย สายพันธุ์ XE1-XE9 XE11 Y001 W001 และ W002

Ech หมายถึง *Erwinia chrysanthemi* LMG หมายถึง *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

LMG2715^T Ecc หมายถึง *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 4633 และ 4045

หมายถึงเชื้อ *P. agglomerans* สายพันธุ์ 4633 และ 4045 ตามลำดับ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

เทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

จากการตรวจสอบค่าความเจือจางสุดที่แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้ พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายทั้งการฉีดกระตุ้นด้วย fixed cell และ MPC มีความเจือจางสุดที่ทำปฏิกิริยาได้ในอัตราเจือจาง 1 ต่อ 800 ในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 3 ของการเก็บซีรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 1 ต่อ 1600 และ 1 ต่อ 2000 ในสัปดาห์ที่ 8 ของการเก็บซีรัม และเมื่อนำมาแยกสกัด IgG ต่อ MPC ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเก็บซีรัม พบว่ามีความเจือจางสุดที่ทำปฏิกิริยา 1 ต่อ 2000

IgY ที่แยกสกัดได้จากไข่ที่ฉีดกระตุ้นด้วย life cell และ MPC ที่สัปดาห์ที่ 4 และ 5 หลังจากฉีดกระตุ้นมีค่าความเจือจางต่ำสุดที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อัตรา 1:6,400 และ 1:12,800 ตามลำดับ ในสองสัปดาห์เท่ากัน

เมื่อทำการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมในเบื้องต้น พบว่าซีรัมที่ผลิตได้ทั้งจาก fixed cell และ MPC ที่ได้จากการผลิตในกระต่ายและไก่มีการทำปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบจึงทำการลดการทำปฏิกิริยาข้ามโดยวิธีการ cross adsorption และนำแอนติซีรัมมาทดสอบความจำเพาะใหม่ ดังแสดงค่าในตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าภายหลังจากการทำการลดการทำปฏิกิริยาข้ามแล้ว IgG anti-fixed cell ที่ได้จากกระต่ายยังคงมีความจำเพาะเจาะจงต่ำและทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* *Escherichia coli* และ *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ 4633 แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสายพันธุ์ 4045 แอนติซีรัมทุกชนิดจากการทดลองนี้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่แยกเก็บได้จากข้าวโพดในประเทศไทย โดยแอนติซีรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นในไก่ด้วย life cell นั้นมีความจำเพาะเทียบกับชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของบริษัท Agdia โดยพบว่าแอนติบอดีต่อ life cell และชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* (Agdia, Inc., USA) นั้นสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยได้ ยกเว้นเชื้อสายพันธุ์ XE7 และ W001 อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดไก่ด้วย MPC สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ W001 ด้วยค่าดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตรเฉลี่ย 0.557 ± 0.006 ซึ่งมีค่ามากกว่า 3 เท่าของค่าของตัวเปรียบเทียบ 0.453 เพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกันแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นในกระต่ายด้วย fixed cell ซึ่งทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ

Erwinia chrysanthemi *Escherichia coli* *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ 4633 และ XE7 ด้วยค่า ดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรเป็น 0.526 ± 0.006 0.481 ± 0.018 0.606 ± 0.046 และ 0.464 ± 0.002 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อสายพันธุ์ XE และ Y ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมากกว่า 0.8 – 2.1 ในขณะที่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ด้วยแอนติบอดีต่อ MPC fixed cell จากการฉีดกระตุ้นในกระต่าย แอนติบอดีต่อ MPC และ life cell จากการฉีดกระตุ้นในไก่ เป็น 0.879 ± 0.013 0.969 ± 0.005 1.461 ± 0.054 และ 0.769 ± 0.020 ตามลำดับ

เมื่อทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าแอนติซีรัมที่ได้จาก กระต่ายมีความไวในการตรวจสอบจากการตรวจสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมเมื่อ เซลล์มีปริมาณต่ำสุด 10^5 cfu ต่อ 50 ไมโครลิตร ที่ค่าดูดกลืนแสง 0.911 ± 0.058 และ 0.884 ± 0.023 จากการทำปฏิกิริยาดูด้วยแอนติบอดีจากการฉีดกระตุ้นด้วย MPC และ fixed cell ตามลำดับ ในขณะที่ แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากไก่ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อสูงสามารถตรวจเซลล์แบคทีเรียเมื่อมีเซลล์ ปริมาณต่ำสุด 10^6 cfu ต่อ 50 ไมโครลิตร ที่ใช้ในการเคลือบหลุม โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 0.838 ± 0.011 และ 0.793 ± 0.039 เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย MPC และ life cell ตามลำดับ โดยมีความไวต่ำกว่าชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PathoScreen® 10 เท่า โดย PathoScreen® สามารถตรวจสอบได้เมื่อเซลล์มีปริมาณต่ำสุด 10^5 cfu ต่อ 50 ไมโครลิตร มีค่าการ ดูดกลืนแสง 0.289 ± 0.013

ตารางที่ 5 ความจำเพาะของ IgG anti-MPC IgG anti-fixed cell IgY anti-MPC และ IgY anti-life cell ต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยาโดยชุดตรวจสอบ ELISA สำเร็จรูป PathoScreen®

เชื้อแบคทีเรีย	(ผลปฏิกิริยาต่อแอนติบอดี) ค่าเฉลี่ย O.D. 405 nm ¹ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
	IgG anti- MPC	IgG Anti-fixed cell	IgY anti- MPC	IgY anti- life cell	PathoScreen®
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	(+) 0.414 ± 0.006	(+) 0.526 ± 0.006	(-) 0.339 ± 0.003	(-) 0.262 ± 0.001	(-) 0.140 ± 0.009
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	(-) 0.313 ± 0.011	(-) 0.452 ± 0.018	(-) 0.370 ± 0.013	(-) 0.247 ± 0.011	(-) 0.140 ± 0.007
<i>Escherichia coli</i>	(-) 0.371 ± 0.003	(+) 0.481 ± 0.018	(-) 0.372 ± 0.006	(-) 0.302 ± 0.007	Nd
<i>Pantoea agglomerans</i> 4633	(-) 0.260 ± 0.002	(+) 0.606 ± 0.046	(-) 0.267 ± 0.001	(-) 0.176 ± 0.006	(-) 0.123 ± 0.004
<i>P. agglomerans</i> 4045	(-) 0.261 ± 0.006	(-) 0.266 ± 0.006	(-) 0.157 ± 0.004	(-) 0.131 ± 0.001	(-) 0.146 ± 0.003
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG 2715 ^T	(+) 0.879 ± 0.013	(+) 0.969 ± 0.005	(+) 1.461 ± 0.054	(+) 0.796 ± 0.020	(+) 1.319 ± 0.010
XE1	(+) 0.979 ± 0.003	(+) 1.120 ± 0.083	(+) 1.958 ± 0.022	(+) 1.271 ± 0.042	(+) 2.248 ± 0.060
XE2	(+) 0.691 ± 0.032	(+) 0.838 ± 0.021	(+) 1.346 ± 0.065	(+) 0.756 ± 0.059	(+) 1.912 ± 0.040
XE3	(+) 0.782 ± 0.035	(+) 0.859 ± 0.011	(+) 1.581 ± 0.189	(+) 0.927 ± 0.020	(+) 0.638 ± 0.010
XE4	(+) 1.010 ± 0.090	(+) 0.999 ± 0.040	(+) 2.004 ± 0.054	(+) 1.200 ± 0.103	(+) 2.003 ± 0.070
XE5	(+) 0.728 ± 0.003	(+) 0.867 ± 0.041	(+) 1.438 ± 0.004	(+) 0.798 ± 0.010	(+) 1.221 ± 0.010

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	(ผลปฏิกิริยาต่อแอนติบอดี) ค่าเฉลี่ย O.D. 405 nm ¹ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
	IgG anti- MPC	IgG Anti-fixed cell	IgY anti- MPC	IgY anti- life cell	PathoScreen®
XE6	(+) 0.980 ± 0.043	(+) 1.049 ± 0.041	(+) 2.039 ± 0.100	(+) 1.271 ± 0.136	(+) 1.083 ± 0.050
XE7	(-) 0.224 ± 0.000	(+) 0.464 ± 0.002	(-) 0.343 ± 0.100	(-) 0.188 ± 0.004	(-) 0.115 ± 0.004
XE8	(+) 0.903 ± 0.040	(+) 1.022 ± 0.037	(+) 1.775 ± 0.071	(+) 0.900 ± 0.013	(+) 1.047 ± 0.130
XE9	(+) 1.067 ± 0.055	(+) 1.155 ± 0.029	(+) 2.1195 ± 0.023	(+) 1.286 ± 0.035	(+) 1.561 ± 0.140
XE11	(+) 0.095 ± 0.062	(+) 0.954 ± 0.031	(+) 2.106 ± 0.024	(+) 1.159 ± 0.018	(+) 1.225 ± 0.110
Y001	(+) 0.797 ± 0.019	(+) 0.870 ± 0.002	(+) 1.535 ± 0.049	(+) 0.935 ± 0.098	(+) 0.976 ± 0.060
W001	(-) 0.176 ± 0.001	(-) 0.435 ± 0.006	(+) 0.557 ± 0.006	(-) 0.137 ± 0.005	(-) 0.115 ± 0.004
ตัวเปรียบเทียบลบที่ 1 ²	0.134 ± 0.005	0.151 ± 0.004	0.151 ± 0.004	0.109 ± 0.004	Nd
ตัวเปรียบเทียบลบที่ 2 ³	0.113 ± 0.009	0.133 ± 0.001	0.098 ± 0.001	0.103 ± 0.020	0.119 ± 0.003 ³

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ

² เป็นค่าที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* กับ Normal serum อัตราเจือจาง 1 ต่อ 200

³ เป็นค่าที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของบัพเฟอร์กับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. stewartii*

Nd ไม่ได้ทดสอบ, เครื่องหมาย + หรือ - หมายถึงผลปฏิกิริยาเป็นบวกหรือลบ โดยผลปฏิกิริยาบวกมีค่ามากกว่าผลของตัวเปรียบเทียบอย่างน้อย 3 เท่า

ตารางที่ 6 ความไวของแอนติบอดี IgG anti-MPC IgG anti-fixed cell IgY anti-MPC และ IgY anti-life cell ต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ด้วยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ELISA สำเร็จรูป PathoScreen®

ปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่อ 50 ไมโครลิตร	(ผลปฏิกิริยาต่อแอนติบอดี) ค่าเฉลี่ย O.D. 405 nm ¹ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
	IgG anti- MPC	IgG Anti-fixed cell	IgY anti-MPC	IgY anti-life cell	PathoScreen® Agdia kit
10 ⁷	(+) 0.982 ± 0.063	(+) 1.030 ± 0.013	(+) 0.967 ± 0.027	(+) 1.001 ± 0.032	Nd
10 ⁶	(+) 0.911 ± 0.058	(+) 0.884 ± 0.023	(+) 0.838 ± 0.011	(+) 0.793 ± 0.039	Nd
10 ⁵	(+) 0.354 ± 0.015	(+) 0.726 ± 0.024	(-) 0.281 ± 0.013	(-) 0.301 ± 0.020	(+) 0.289 ± 0.013
10 ⁴	(-) 0.127 ± 0.005	(-) 0.305 ± 0.009	(-) 0.115 ± 0.002	(-) 0.111 ± 0.005	(-) 0.124 ± 0.009
ตัวเปรียบเทียบลบ ²	0.113 ± 0.098	0.081 ± 0.001	0.108 ± 0.004	0.107 ± 0.002	0.087 ³ ± 0.004

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ,

² เป็นค่าที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* กับ Normal serum อัตราเจือจาง 1 ต่อ 200

³ เป็นค่าที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของบัพเฟอร์กับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. stewartii*

เครื่องหมาย + หรือ - หมายถึงผลปฏิกิริยาเป็นบวกหรือลบ โดยผลปฏิกิริยาบวกมีค่ามากกว่าผลของตัวเปรียบเทียบลบอย่างน้อย 3 เท่า

การเปรียบเทียบการตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ Direct-PCR วิธี Magnetic bead-PCR วิธี Ampli-disk PCR วิธี Real-time PCR และวิธีการ ELISA

จากการตรวจสอบพบว่าการใช้วิธี Ampli-disk PCR และวิธีการ Direct-PCR เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยการใส่เชื้อแบคทีเรียที่รู้ปริมาณที่แน่นอนได้ที่มีปริมาณเซลล์ต่ำสุดเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำได้ ในระดับ 1 cfu (ภาพที่ 13 ก และ ค) โดยวิธีการ Direct-PCR เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอบางๆ ในปฏิกิริยาที่ 1 cfu ในขณะที่วิธีการ Ampli-disk PCR เห็นแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ส่วนวิธีการเทคนิค magnetic bead-PCR ตรวจสอบได้ใน 100 cfu (ภาพที่ 13 ข) และวิธีการ ELISA ด้วย PathoScreen® สำหรับเชื้อ *Pantoea stewartii* ได้ 1.0×10^5 cfu ดังสรุปในตารางที่ 7

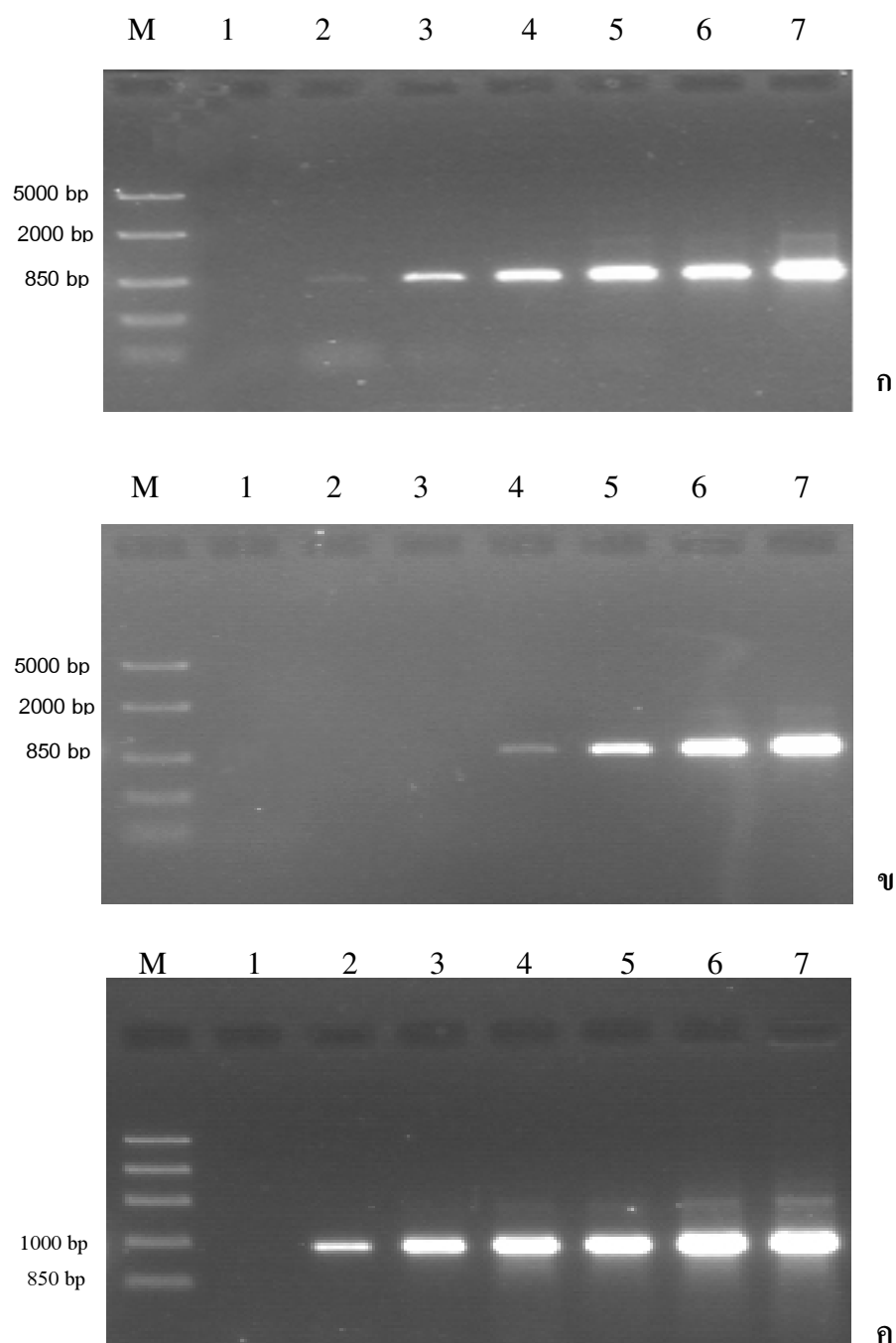
วิธีการ Real-time PCR ทำปฏิกิริยาคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T เท่านั้น (ภาพที่ 14) จากการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในจินตใกล้เคียง *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* และ *Escherichia coli* แบคทีเรียต่างสปีชีส์ *Pantoea agglomerans* สามสายพันธุ์ 4633 และ 4045 รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยสายพันธุ์ XE และ Y โดยไม่พบปฏิกิริยาของสารเรืองแสงจากการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียดังกล่าว พบเฉพาะปฏิกิริยาจากการทดสอบด้วยเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715 และจากการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาพบว่าสามารถตรวจสอบเซลล์ได้ต่ำสุดประมาณ 10 เซลล์ (ภาพที่ 15 ก และตารางที่ 7) โดยเกิดปฏิกิริยาของสารเรืองแสงตัดกับ threshold line ในรอบที่ 34 ของการทำปฏิกิริยา โดยการทำปฏิกิริยาของเซลล์จำนวน 1 เซลล์นั้นเกิดปฏิกิริยาดำกว่าค่าของปฏิกิริยาที่ได้จากตัวควบคุมลบ (NTC) เมื่อนำจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยามาสร้างกราฟร่วมกับจำนวนแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟเส้นตรงที่ได้มีค่าความชัน (R^2) 0.993 (ภาพที่ 15 ข) และเมื่อตรวจสอบผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยค่า melting temperature โดยพบเพียงเส้นกราฟที่เกิดขยอมาเพียงยอดเดียว มีค่า 84.2 °C (ภาพที่ 15 ค)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จากสารแขวนลอยเซลล์ที่มีปริมาณเชื้อระดับต่างๆ ด้วยวิธีการ direct-PCR Magnetic bead-PCR Real-time PCR Ampli-disk PCR โดยมียีน *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย และการตรวจด้วยเทคนิค ELISA จากชุดตรวจสำเร็จรูป PathoScreen®

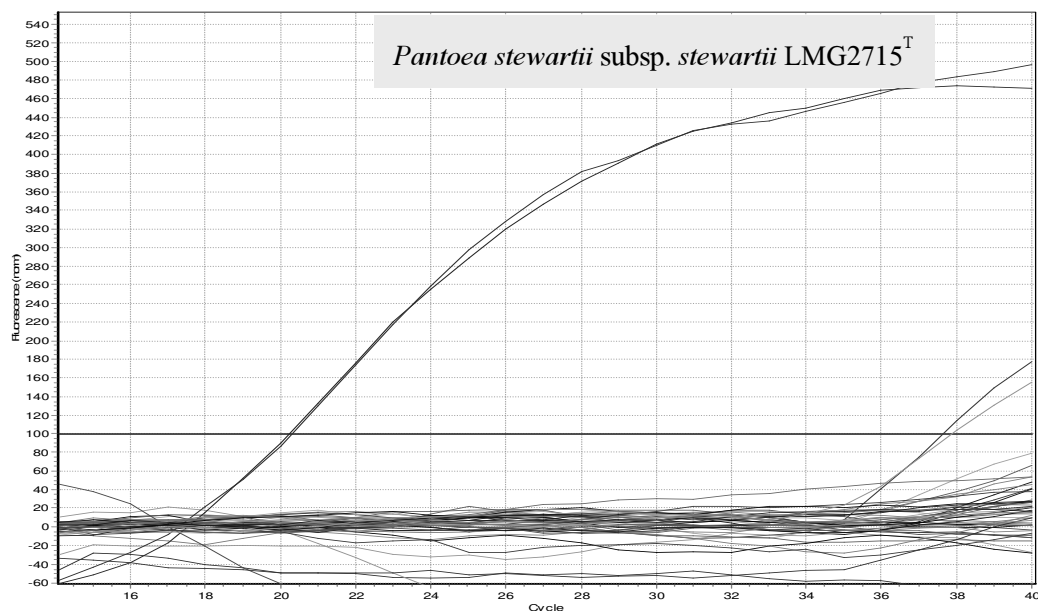
ปริมาณเซลล์ (1.3 cfu)	Direct-PCR	Magnetic bead -PCR	Real-time PCR	Ampli-disk PCR	PathoScreen® ELISA ¹
10 ⁵	+	+	+	+	+ (0.289 ± 0.013)
10 ⁴	+	+	+	+	- (0.124 ± 0.009)
10 ³	+	+	+	+	- (0.083 ± 0.004)
10 ²	+	+	+	+	- (0.094 ± 0.007)
10	+	-	+	+	Nd
1	+	-	-	+	Nd

¹ ปฏิกริยาที่ให้ผลบวกมีค่ามากกว่าตัวเปรียบเทียบลบอย่างน้อย 3 เท่า (0.087 ± 0.004)

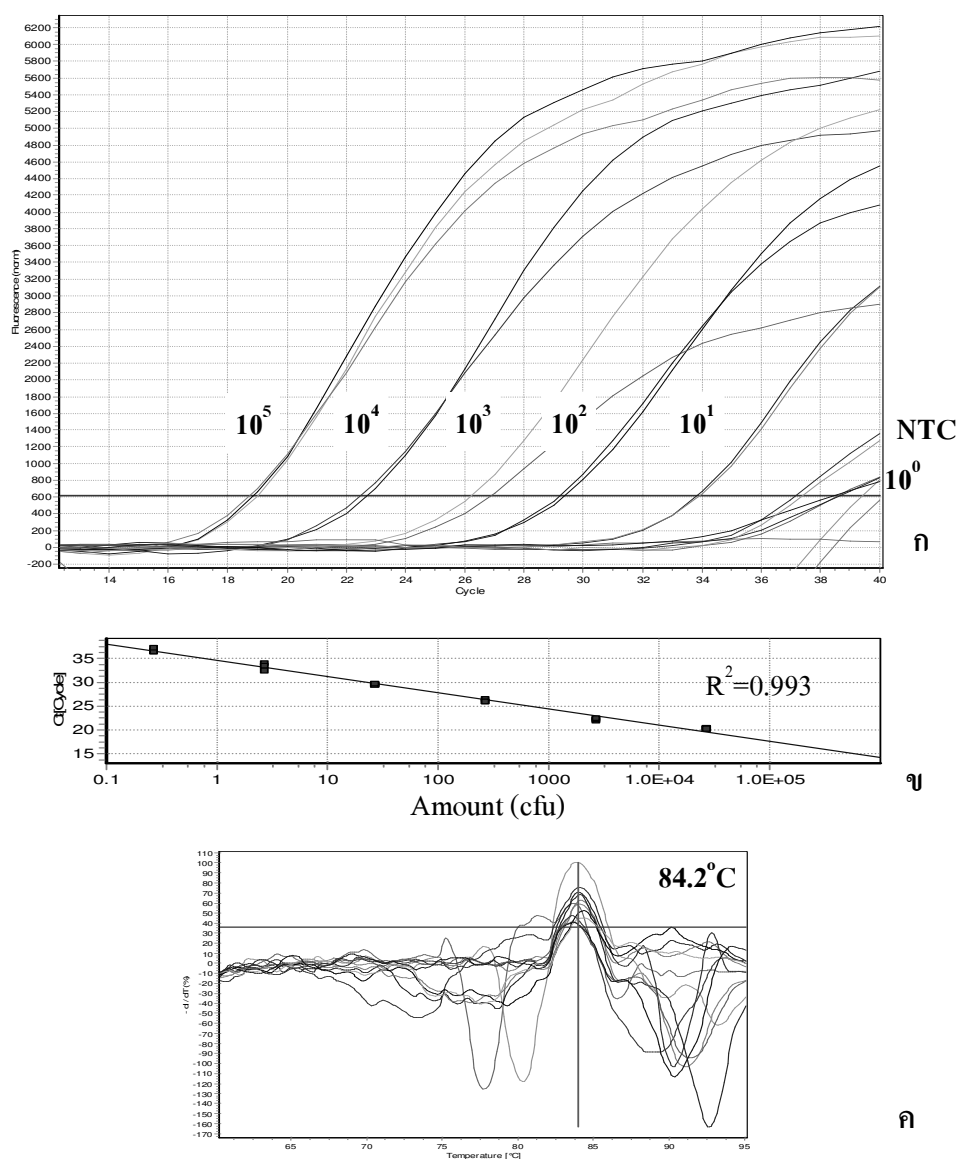
Nd หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ



ภาพที่ 13 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T เมื่อมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียระดับต่างกันด้วยเทคนิค PCR โดยมี *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย ก. วิธี Direct-PCR ข. วิธี Magnetic bead -PCR ค. วิธี Ampli-disk PCR M หมายถึง DNA Ladder ช่องที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ช่องที่ 2-7 หมายถึง แบคทีเรียในปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการทดลองในแต่ละวิธี จำนวน 1×10^1 10^2 10^3 10^4 และ 10^5 (cfu) ตามลำดับ



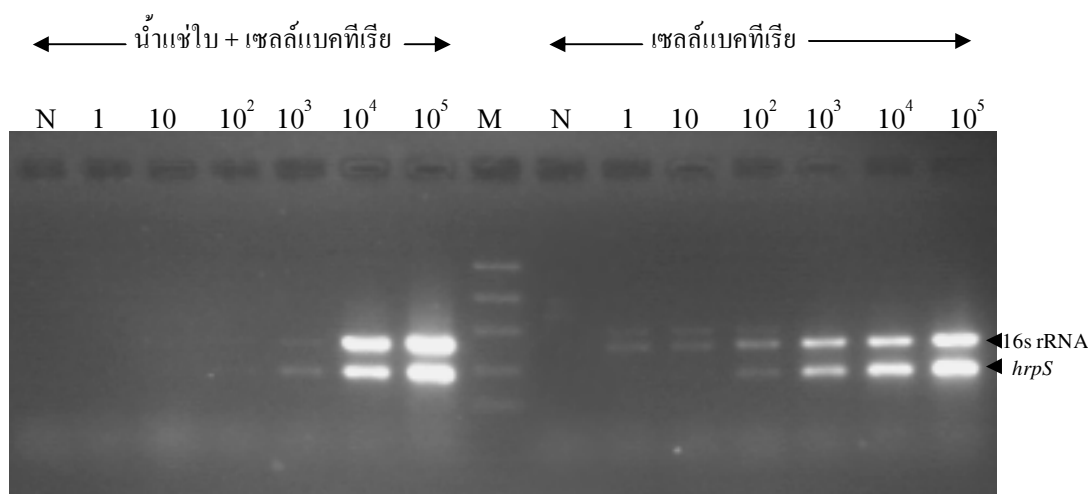
ภาพที่ 14 ความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ต่อยีน *hrpS* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยทดสอบ
 ปฏิกริยาต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T
P. agglomerans 4633 และ 4045 *Erwinia chrysanthemi* *E. carotovora* subsp.
carotovora *Escherichia coli* เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากข้าวโพดสายพันธุ์ XE1 2 3 4 5
 6 7 8 9 11 และ Y001



ภาพที่ 15 ความไวของการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยมียีน *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย ก. กราฟแสดงความเข้มของสัญญาณแสงและจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาตรวจสอบเซลล์ปริมาณ 10^5 ถึง 1 cfu และ NTC (non template control) ข. กราฟมาตรฐานระหว่างรอบการทำปฏิกิริยาและปริมาณเซลล์ ค. กราฟแสดงค่า T_m ของผลผลิตของ real-time PCR ต่อยีน *hrpS*

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในพืช

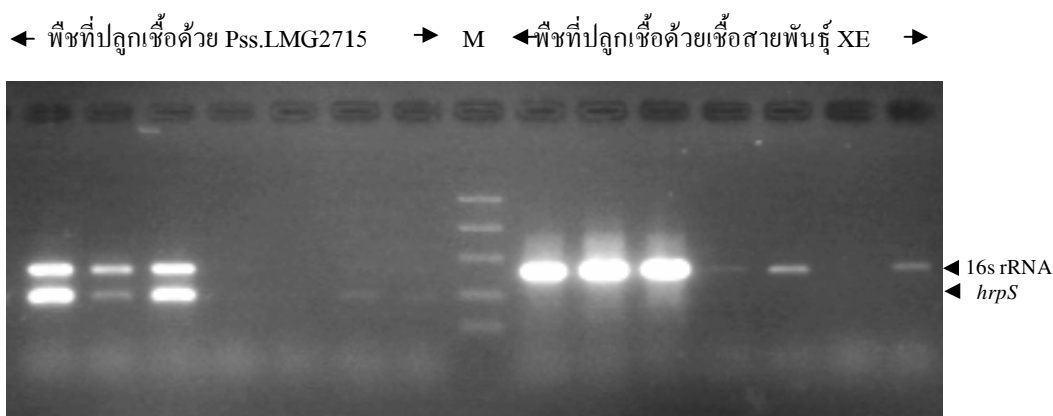
การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผสมกับน้ำแช่ใบข้าวโพดพบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำสุดเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ 6×10^2 (แถบบาง ภาพที่ 16 ด้านซ้าย) ถึง 10^3 cfu/ปฏิกิริยา สามารถตรวจได้ไวเพิ่มขึ้น 10-100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยตรงจากเซลล์ (ภาพที่ 16 ด้านขวา)



ภาพที่ 16 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงความไวของการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ที่ผสมกับน้ำแช่ใบข้าวโพด เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อจากเซลล์โดยตรง ด้วยเทคนิค PCR โดยมียีน *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างใบข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ

จากการตรวจสอบพืชที่ปลูกเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T และเชื้อสายพันธุ์ XE หลายๆ สายพันธุ์ ตรวจเชื้อด้วยวิธีการ PCR พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียได้โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก 6 จาก 7 ตัวอย่าง (ภาพที่ 17 ด้านซ้าย) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบพืชที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ XE ไม่สามารถพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *hrpS* ยีน พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอของ 16s rDNA เท่านั้น (ภาพที่ 17 ด้านขวา) ในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ



ภาพที่ 17 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงการตรวจสอบใบข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อด้วย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T (ด้านซ้าย) และข้าวโพดที่ปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ XE (ด้านขวา) ด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบยีน *hrpS* เป็นยืนยันเป้าหมาย

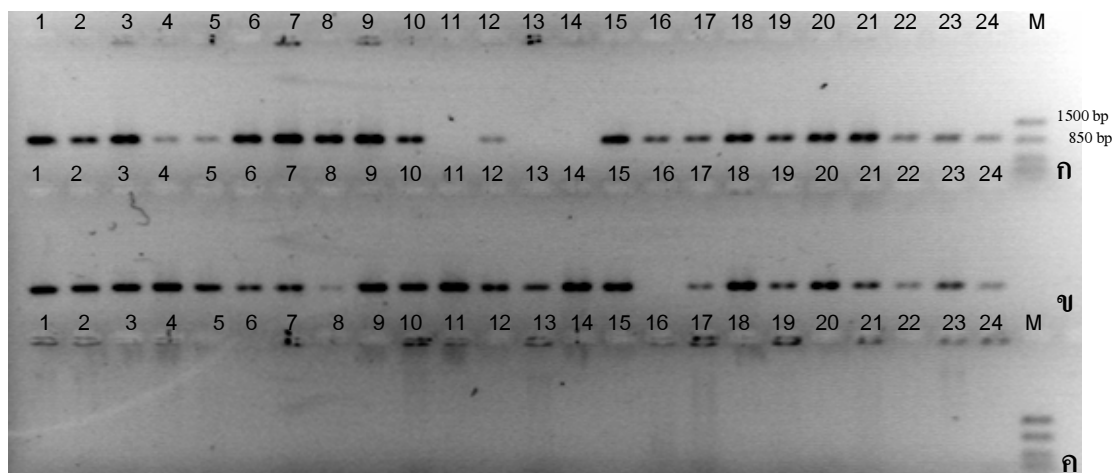
การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดข้าวโพด

วิธีการปลูกเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ในเมล็ดข้าวโพด

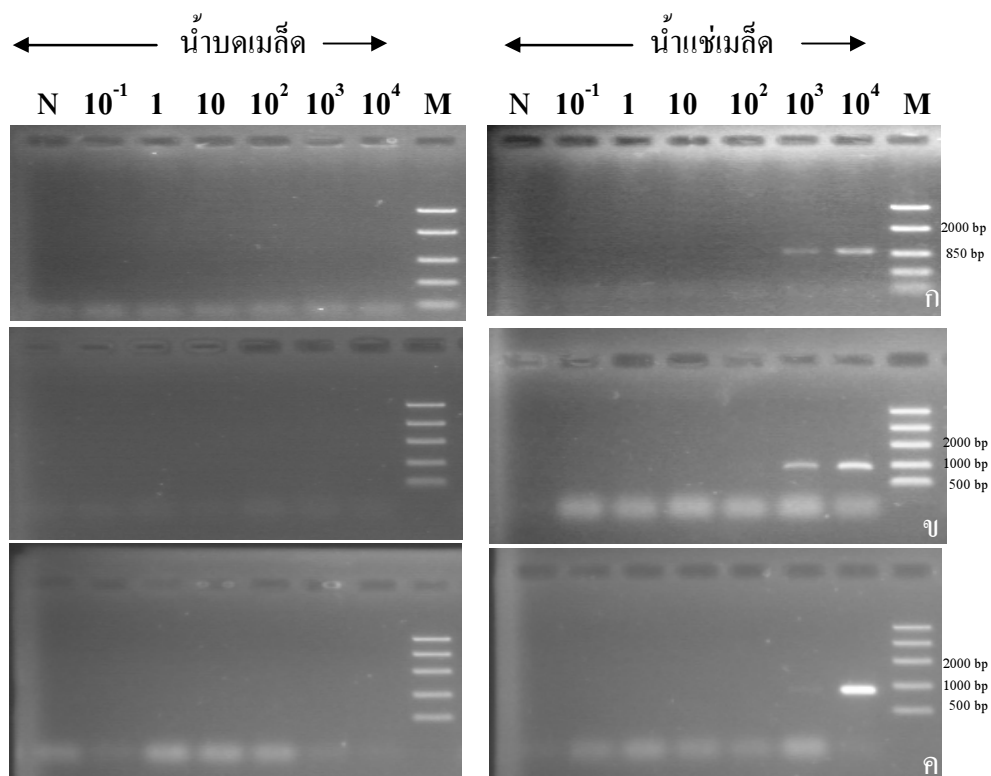
จากการทำการปลูกเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ในเมล็ดข้าวโพด (artificial seed inoculation) พบว่าเมื่อสุมเมล็ดที่ทำการปลูกเชื้อมาทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 3 ซ้ำ ให้ผลการทดสอบ เมล็ดที่ให้ผลบวก/จำนวนเมล็ดทดสอบ เป็น 98/102 101/108 และ 45/46 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การปลูกเชื้อเฉลี่ย 95.8% และการทดสอบเมล็ดที่ใช้น้ำเป็นสารแช่เมล็ดเป็นตัวแทนเปรียบเทียบควบคุมพบว่า เมล็ดที่ให้ผลบวก/จำนวนเมล็ดทดสอบ เป็น 0/102 0/115 0/118 คิดเป็น 0% ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 18

เมื่อทดสอบความไวของวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่รู้ปริมาณที่แน่นอนร่วมกับน้ำบดเมล็ด และน้ำแช่เมล็ดด้วยวิธีการบนพื้นฐานเทคนิค PCR ดังแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งวิธีการ direct-PCR Magnetic bead PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ผสมร่วมกับน้ำแช่เมล็ด เมื่อเซลล์มีปริมาณ 10^3 cfu ต่อปฏิกิริยา และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Ampli-disk PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ผสมร่วมกับน้ำแช่เมล็ด ได้เมื่อเซลล์ปริมาณ 10^4 cfu ต่อปฏิกิริยา แต่พบแถบดีเอ็นเอเป็นแถบบางๆ เมื่อมีปริมาณ

เชื้อ 10^3 cfu ต่อปฏิกิริยา (ภาพที่ 19 ค) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีการเดียวกันแต่ผสมกับน้ำบัคเมลลิตไม่พบแถบดีเอ็นเอใดๆ อย่างไรก็ตามจากการทดลองซ้ำหลายๆครั้งด้วยวิธีการ Ampli disk-PCR พบว่าให้ผลที่ไม่สม่ำเสมอ จึงจัดเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจสอบ



ภาพที่ 18 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงผลการทดสอบเมล็ดข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T ด้วยวิธีการใช้ชุดยูนิทาสและตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *hrpS* (900 bp) ช่องที่ 1- 24 ในแถว ก และ ข เป็นเมล็ดที่ปลูกเชื้อ และ ช่องที่ 1-24 ในแถว ค เป็นเมล็ดที่แช่ PBS เป็นตัวเปรียบเทียบ M เป็น DNA ladder



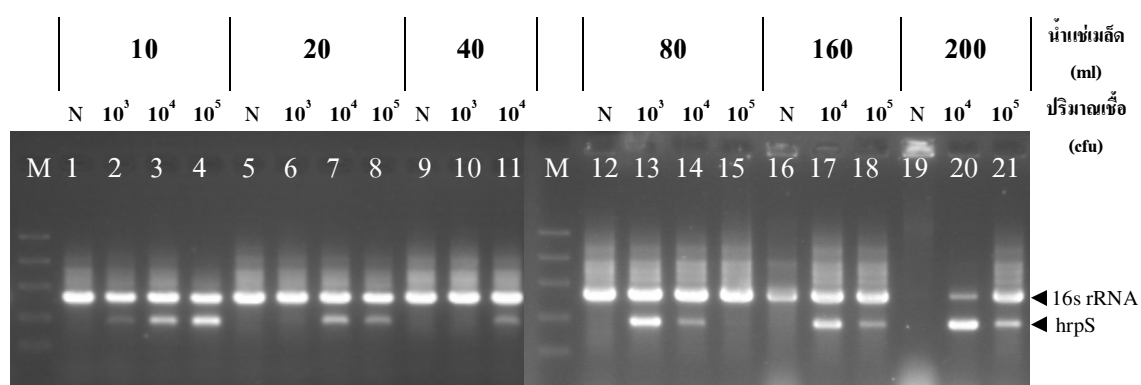
ภาพที่ 19 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ที่มีปริมาณเชื้อที่แน่นอน ผสมร่วมกับน้ำบดเมล็ด (ด้านซ้าย) หรือน้ำแช่เมล็ด (ด้านขวา) ด้วยเทคนิค PCR ตรวจยีน *hrpS* (900 bp) ด้วยวิธีการ (ก) direct-PCR (ข) Magnetic-PCR และ (ค) Ampli-disk PCR N หมายถึง น้ำบดหรือน้ำแช่เมล็ดที่ไม่มีแบคทีเรีย M หมายถึง DNA ladder ตัวเลขด้านบนแสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (cfu)

การตรวจสอบหาปริมาณสารแช่เมล็ดที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่รู้ปริมาณที่แน่นอนผสมรวมกับน้ำแช่เมล็ด ในอัตราปริมาณน้ำแช่เมล็ดต่างๆ กัน ซึ่งจะสื่อไปถึงปริมาณของกองเมล็ดตั้งต้น โดยในการทดลองนี้จะทำการแช่เมล็ดด้วยน้ำอัตราเมล็ด 100 เมล็ดต่อน้ำ 30 มิลลิตร ดังนั้นเพื่อหาปริมาณกองเมล็ด (Sampling size) ที่เหมาะสมและยังสามารถตรวจปฏิกิริยาได้ รวมถึงความไวของการตรวจเมื่อมีขนาดกองเมล็ดที่ต่างกัน โดยพบว่าน้ำแช่เมล็ด 10 ถึง 20 มิลลิตร หรือเทียบเท่ากองเมล็ดขนาดประมาณ 33 ถึง 66 เมล็ด และ 40 80 160 200 มิลลิตร หรือเทียบเท่ากองเมล็ดขนาดประมาณ 133 266 532 และ 666 เมล็ด ดังนั้นหากแช่เมล็ดในอัตราดังกล่าว เริ่มตั้งแต่การตรวจเมล็ดที่ 33 เมล็ด ถึง 66 เมล็ด จะสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้เมื่อมีปริมาณเซลล์ตั้งแต่ 10^3 cfu แต่เมื่อมีกองเมล็ดที่ใหญ่ขึ้นตั้งแต่ 133 266 532 และ 666 เมล็ดสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้เมื่อมีปริมาณเซลล์ตั้งแต่ 10^4 cfu ดังในภาพที่ 20 ดังนั้นหากมีการแบ่งกองเมล็ดเป็นกองเล็กๆ ที่เป็นขนาดที่เหมาะสมในการนำมาตรวจด้วยวิธี direct-PCR สามารถแบ่งขนาดกองได้เป็นกองที่มีเมล็ดประมาณตั้งแต่ 30 ถึง 650 เมล็ด และจากการสังเกตพบว่าการตรวจเมล็ดแบบไม่แบ่งกองตั้งแต่จำนวนเมล็ดมากกว่า 666 เมล็ดขึ้นไปจะมีการปนเปื้อนจากฝุ่นผงแป้งและเศษซากขนาดเล็กจนอาจไปรบกวนปฏิกิริยาการทำ PCR ได้

ความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนของเมล็ดของเมล็ดติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์

เมื่อตรวจสอบเชื้อที่ปนเปื้อนในกองเมล็ดพันธุ์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน พบว่าการตรวจแบบตรวจทั้งกองใหญ่ในกองเมล็ดพันธุ์ที่มีอัตราปนเปื้อนเชื้ออัตรา 0.02% (1 เมล็ดใน 5,000 เมล็ด) สามารถตรวจสอบเชื้อได้ 33% โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 1 ใน 3 ซ้ำ แต่เมล็ดปนเปื้อนอัตรา 0.0125 (1/5,000) 0.01 (1/10,000) และ 0.007 (1/13,000) ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่เมื่อมีการตรวจแบบแบ่งกองเมล็ดพันธุ์เป็นกองย่อย กองละ 500 เมล็ดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจมากขึ้น ที่อัตราการปนเปื้อน 0.02% สามารถตรวจสอบได้ 83% โดยผลการตรวจให้ผลบวก 5 ใน 6 ตัวอย่าง และเมล็ดปนเปื้อนอัตรา 0.0125 0.01 และ 0.007 สามารถตรวจได้ 33% พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 1 ใน 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ได้สูงมาก



ภาพที่ 20 เจลอิเล็กโตรโฟริซิสแสดงการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T ด้วยเทคนิค PCR ที่เชื้อในปริมาณต่างๆ (10³ -10⁵ cfu) ผสมร่วมกับน้ำแช่เมล็ดข้าวโพดปริมาณต่างกัน (10-200 มิลลิลิตร) โดยตรวจยีน *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย ช่อง M หมายถึง DNA Ladder ช่อง N หมายถึง ตัวอย่างเปรียบเทียบลบ ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 8 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเมล็ดที่ติดเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T ที่ระดับต่างๆ ด้วยวิธีการ PCR แบบไม่แบ่งกองเมล็ดพันธุ์และแบบแบ่งกองเมล็ดพันธุ์

เมล็ด ปนเปื้อน (%)	จำนวนเมล็ดปนเปื้อน/ เมล็ดทั้งหมด	ผลการตรวจ (ซ้ำที่ให้ผลบวก/ซ้ำที่ตรวจทั้งหมด)	
		แบบไม่แบ่งกองเมล็ด ¹	แบบแบ่งกองเมล็ด ²
0.02	1/5,000	1/3	5/6
0.0125	1/8,000	0/3	1/3
0.010	1/10,000	0/3	1/3
0.007	1/13,000	0/3	1/3

¹ จำนวนเมล็ดที่ใช้ในการตรวจทั้งหมดต่อซ้ำเป็น 5,000 8,000 10,000 และ 13,000 เมล็ดในเมล็ดปนเปื้อน 0.02 0.0125 0.010 และ 0.007% ตามลำดับ

² จำนวนเมล็ดที่ใช้ในการตรวจทั้งหมดต่อซ้ำเป็น 5,000 8,000 10,000 และ 13,000 เมล็ด ในเมล็ดปนเปื้อน 0.02 0.0125 0.010 และ 0.007% ตามลำดับ โดยแบ่งเมล็ดเป็นกองย่อย กองละ 500 เมล็ด

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีมาตรฐานได้แก่ การเลี้ยงเชื้อบนอาหารทั่วไปเพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนี และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T นั้น เมื่อเลี้ยงในอาหาร NA มีลักษณะโคโลนี และสีเหลืองที่คล้ายกันในช่วงวันแรกแต่เมื่อเชื้อแบคทีเรียมีอายุอย่างน้อย 3 วันจึงจะพบความแตกต่างของรูปร่างโคโลนี ซึ่งจะพบว่าการยุบตัวตรงกลางของโคโลนี อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญบนอาหารพบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* มีอัตราการเจริญช้า ซึ่งจากการแยกเชื้อจากใบข้าวโพดหรือเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วย *P. stewartii* subsp. *stewartii* และน้ำแช่ใบข้าวโพดหรือน้ำแช่เมล็ดมาเลี้ยงด้วยอาหารเหลว หรืออาหารแข็งอีกครั้งจะพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นขึ้นคลุมได้ง่าย และทำให้ยากแก่การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ PCR และจากคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นจัดกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ XE และ Y001 ไว้ร่วมกับเชื้อ *Pantoea agglomerans* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปจากพื้นผิวพืช และเมล็ด (Mergaert *et al.*, 1993) นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อบนอาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium นั้น ผลการทดลองพบว่าเชื้อชนิดอื่นสามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ได้ดีเช่นกัน ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Blakemore *et al.* (1999) ที่พบว่าเชื้อ *Erwinia herbicola* *E. chrysanthemi* *Erwinia* sp. สามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้ดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาหารชนิดนี้ไม่มีคุณสมบัติเป็นอาหารคัดเลือกจำเพาะ และอาหารชนิดนี้ยังมีลักษณะเป็นพื้นสีดำทำให้สังเกตลักษณะโคโลนีได้ยากแล้ว อาหารนี้ยังไม่เป็นอาหารที่ส่งเสริมให้เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เจริญได้ดีอีกด้วยที่ต้องใช้เวลาประมาณห้าวันในการเจริญบนอาหารชนิดนี้ และโคโลนียังมีขนาดเล็กจนยากแก่การสังเกต และลักษณะตาบที่ปรากฏจะคงอยู่ไม่นาน โดยโคโลนีจะดูดสีเข้าไปในตรงกลางโคโลนีเมื่อโคโลนีมีอายุนานขึ้น ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ XE Y และ W จะมีโคโลนีขนาดใหญ่ภายในเวลา 2 วัน และแสดงลักษณะตาบเช่นกัน

การใช้วิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้วยวิธีการทดสอบปฏิกิริยา

Hypersensitive response บนยาสูบนั้น ถึงแม้ว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จะมีรายงานว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียมียีน *hrp* สามารถทำให้เกิดอาการแผลแห้งตายอย่างรวดเร็วบนยาสูบ โดยการเลี้ยงในอาหาร minimal medium ก่อน หรือกระตุ้นให้ยีน *hrpS* มีการแสดงออกของยีนอย่างต่อเนื่องเท่านั้น อย่างไรก็ตามถึงแม้จะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาพที่เหมาะสมก่อนการปลูกเชื้อในยาสูบ (Ahmad *et*

al., 2001) แต่พบว่าการเกิดปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นเพียงประมาณ 80% ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Coplín et al., 2002)

Hrp (type III secretion system) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารออกนอกเซลล์ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายๆ ชนิด โดยมีชุดยีน *hrp* ได้แก่ *hrpJ* *hrpA* และ *hrpC* เป็นยีนทำหน้าที่เป็น functional gene และ *hrpXY* *hrpS* และ *hrpL* ทำหน้าที่เป็น regulatory gene และ *hrpN* ทำหน้าที่กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา hypersensitive response ในพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ของยีนแต่ละยีน โดยพบว่า *hrpS* ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ดังแสดงในผลการทดลองนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนนี้เหมือนกัน 77 และ 79.5% ตามลำดับ โดย *hrpS* สามารถทำให้ *E. herbicola* pv. *gypsophylae* สร้างโปรตีน Harpin ที่ทำปฏิกิริยาได้กับ antiharpin ที่ผลิตจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ได้ (Mor et al., 2001) นอกจากนี้ยังมียีนที่มีตำแหน่งติดกับชุดยีนนี้คือ *wtsE* และ *wtsF* โดยพบว่าถ้ามีการกลายพันธุ์ของยีน *wtsE* จะทำให้เชื้อสูญเสียความสามารถทำให้เกิดโรคแต่ไม่มีผลกับการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา Hypersensitive response และ *wtsF* ทำหน้าที่เป็น chaperone ของยีน *wtsE* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการเกิดอาการจุดดำน้ำในพืช โดยยีนนี้ติดต่อเข้าไปใน *Escherichia coli* ติดต่อกับส่วน Hrp secretion system ของ *Erwinia chrysanthemi* แล้วสามารถทำให้พืชเกิดอาการจุดดำน้ำได้ นอกจากนี้ WtsE และ WtsF ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ AvrE1 และ AvrF ของเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* และ DspA/E และ DspB/F จาก *E. amylovora* โดยพบว่า DspA/E WtsE และ AvrE1 จัดอยู่ใน AvrE family โปรตีนที่เป็นโปรตีนอนุรักษ์ในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Ham et al., 2006) ดังนั้นจึงคาดว่าอาการจุดดำน้ำโดยเชื้อสายพันธุ์ XE และ Y นั้น อาจเพราะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* นั้น และมีกลไกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ดังกล่าว (Ahmad et al., 2001)

การเกิดจุดดำน้ำบริเวณแผลที่ปลูกเชื้อในข้าวโพดรวมทั้งการตรวจพบยีน *cpsD* ในเชื้อสายพันธุ์ XE และ Y001 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* นั้น อาจอธิบายได้โดยที่ยีน *cpsD* เป็นยีนที่มีบทบาทในการสร้าง polysaccharide ซึ่งเรียกว่า stewartan นั้น อย่างไรก็ตามพบว่ายีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับที่พบในยีนที่ใช้สร้าง amylovoran ใน *Erwinia amylovora* รวมทั้งมีโครงสร้างของโมเลกุล polysaccharide คล้ายกันด้วย (Aldridge et al., 1998) ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ XE และ Y001 ซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อ *P. agglomerans* ที่อยู่ในสปีชีส์

เดียวกันก็อาจมียีนที่ใช้ในการสร้าง exopolysaccharide หรือ EPS เช่นกัน เนื่องจากสร้าง EPS ควบคุมโดยระบบปริมาณเซลล์ (Quorum-Sensing) ซึ่งในการปลูกเชื้อนั้นใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมากกว่า 10^8 ซึ่งปริมาณเซลล์เริ่มต้นมากพอกระตุ้นให้เกิดการสร้าง EPS ขึ้น ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเหตุให้มีการสร้าง EPS ขึ้น จากรายงานของ Wacharotanyankun *et al.* (1993) พบว่า *rcsV* ยีนสามารถควบคุมการสร้าง EPS ในแบคทีเรียใน Enterobacteriaceae ได้

จากการทดลองของ Bourget *et al.* (1996) พบว่าส่วน 16s -23s rRNA/ITS เป็นส่วนที่มีความหลากหลาย สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อระหว่างสปีชีส์ได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของเชื้อ *Bifidobacterium* spp. จำนวน 18 สปีชีส์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *B. asteroides* และ *B. infantis* มีเหมือนกัน (similarity) เพียง 26% ในขณะที่ *Bifidobacterium* spp. อื่นมีความเหมือนกันที่ 88.9% ขึ้นไป โดยในการทดลองนี้อธิบายว่าอาจมีการจัดอนุกรมวิธานผิดพลาด อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS เป็นมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูง มากกว่า 16s rRNA เป็น 10 เท่า โดยพบการกลายพันธุ์ทั้งแบบแทรก (insertion mutation) ตัดออก (deletion mutation) หรือ การแทนที่ (substitutions mutation) ทำให้เดนโดรแกรมจากการเปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ของ ITS ไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ต่างจันส์ แต่สามารถใช้บอกถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันได้ แต่ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS เพื่อหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ต้องการการเปรียบเทียบควบคู่กับดีเอ็นเอส่วนอื่น โดยในการทดลองนี้ใช้การเปรียบเทียบควบคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16s rRNA ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ XE Y001 และ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T มีลำดับดีเอ็นเอของ 16s-23s rRNA/ITS และยีน *cpsD* คล้ายกันมาก ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบนั้นมีความใกล้ชิดกันมาก จึงอาจมีลำดับดีเอ็นเอที่คล้ายกัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของส่วน 16s rDNA ก็พบว่ามีความคล้ายกันมากกว่า 99% อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Fox *et al.* (1992) พบว่า *Bacillus globisporus* W25T และ *B. psychrophilus* มีลำดับ นิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากกว่า 99.5% ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้มีการตรวจสอบดีเอ็นเอของทั้งสองสปีชีส์นี้ด้วยวิธีการ DNA-DNA hybridization และแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองไม่ได้อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นการใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA ไม่สามารถใช้แยกเชื้อในระดับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน

จากการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด และเปรียบเทียบเชื้อ *P. agglomerans* ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 3 สายพันธุ์ และทั้งสามสายพันธุ์มีการจัดอยู่

คนละกลุ่ม โดยมีความเหมือนกันที่ประมาณ 77% อาจเนื่องจากว่าเชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์นี้ยังมีความหลากหลายภายในของสปีชีส์เอง โดยการจัดแบ่งตามวิธี numerical phenotypic analysis สามารถแบ่งกลุ่ม *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans* เป็น 5 กลุ่มใหญ่ และแบ่งเป็น 15 กลุ่มย่อย (subgroup) และมีการจัดแบ่งกลุ่มย่อยด้วยเทคนิค DNA hybridization เป็น *Pantoea agglomerans* และ *P. dispersa* โดยมีลักษณะสำคัญในการใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งทดสอบในการทดลองที่เชื้อในกลุ่มนี้สามารถใช้หรือเจริญได้ด้วย N-Acetyl-D-glucosamine L- arabinose D-Cellobiose D-fructose D-Galactose α -D-Glucose M-Inositol Maltose D-Mannitol D-Mannose D-Trehalose Cis-Aconitic acid และ Citric acid แต่ไม่ใช้ L-Fucose Gentiobiose D-Raffinose D-sorbitol D-turanose Xylitol L-Alanyl-glycine (Gavini *et al.*, 1989) (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะสำคัญบางประการที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนของเชื้อทั้งสามสปีชีส์ โดยเชื้อ *P. agglomerans* และ *P. dispersa* สามารถสร้างกรดจากการใช้ maltose และใช้หรือเจริญบน citric acid cis-aconitic acid แต่เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ไม่สามารถใช้ได้ และให้ผลตรงข้ามกับการใช้ raffinose D-Melibiose (Mergaert *et al.*, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 4 Wilson *et al.* (1999) พบว่าเมื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียตามการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ที่แยกได้จากข้าวโพด และแมลง ทั้งหมด 124 สายพันธุ์ด้วยวิธี UPGMA เชื้อทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีค่าความเหมือนกันของการใช้แหล่งคาร์บอนสูงถึง 93% ซึ่งโดยมาตรฐานของการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อในระดับสปีชีส์จะใช้ความเหมือนของลักษณะที่แสดงออกในระดับ 80% (Sneath, 1984) โดยเชื้อจากข้าวโพดที่นำมาทดสอบแยกกลุ่มออกจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T มีความเหมือนกันเพียง 77% ส่วนเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T และข้อมูลเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลของ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จาก Biolog® มีความเหมือน 81% และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Principal component analysis จะพบว่าเชื้อเหล่านี้แยกกลุ่มห่างจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T และอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. agglomerans* 4633

จากการเปรียบเทียบเชื้อสายพันธุ์หลัก LMG2715^T กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เพื่อดูความแตกต่างหรือจัดกลุ่มแบคทีเรียนั้น พบว่าการใช้เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เพียงสายพันธุ์เดียวอาจยังไม่เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียนั้น ถึงแม้ว่าเชื้อที่นำมาทดสอบจะเป็นเชื้อที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐานก็ตาม เนื่องจากหลายๆ รายงานทั้งจากการศึกษาด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน (Wilson *et al.*, 1999) รูปแบบดีเอ็นเอ (Avrova *et al.*, 2002) รูปแบบ soluble protein (Mergaert *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความหลากหลายในระดับ subspecies เอง อย่างไรก็ตามลักษณะสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* แตกต่างจากเชื้อในจีนัสใกล้เคียง

คือลักษณะการไม่เคลื่อนที่ และไม่มี flagella ซึ่งในการทดลองนี้พบลักษณะการไม่เคลื่อนที่เฉพาะสายพันธุ์ LMG2715^T เท่านั้น

จากผลของการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP นั้น พบว่าเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จัดกลุ่มแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยที่ค่าความเหมือน 65% สอดคล้องกับการทดลองของ Brady (2005) ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ของเชื้อแบคทีเรียในจินัส *Pantoea* spp. ด้วยวิธี Dice' coefficient similarity และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* และ subsp. *indologenes* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ค่าความเหมือน 82% และเชื้อ *P. agglomerans* จัดกลุ่มแยกออกไปอีกกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าวิธีการ AFLP สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อในระดับสปีชีส์ได้

Mergaert, *et al.* (1993) ใช้วิธีการเปรียบเทียบรูปแบบ soluble protein เป็นวิธีการหนึ่งในการแสดงความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* spp. ร่วมกับการใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* มีรูปแบบโปรตีนแตกต่างจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* *P. agglomerans* และ *P. dispersa* และรูปแบบ soluble protein ของเชื้อในแต่ละจินัสมีความจำเพาะในจินัสเอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่รูปแบบ soluble protein เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T มีรูปแบบที่ต่างจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย

ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อ *Pantoea agglomerans* ที่นำมาทดสอบสามสายพันธุ์นั้นมีการจัดกลุ่มแยกกันทั้งการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP การใช้รูปแบบ soluble protein และการใช้แหล่งคาร์บอนนั้น สามารถอธิบายได้ว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปจากดิน น้ำ ชี้นส่วนพืช เมล็ด และจากบาดแผลของสัตว์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีแหล่งอาศัยกว้าง มีความหลากหลายภายในกลุ่มสูงและในการจัดกลุ่มอนุกรมวิธานซึ่งเดิมเชื้อแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในกลุ่ม *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans* complex นั้น ซึ่งมีระดับ DNA-DNA hybridization 27 – 97% และมีการจัดอนุกรมวิธานใหม่ด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization ร่วมกับรูปแบบ soluble protein และลักษณะที่แสดงออก (phenotypical characteristics) ด้วยระบบ API 20E นั้น พบว่าระดับ DNA-DNA hybridization กับเชื้อ *P. agglomerans* ATCC 27155^T อยู่ในช่วงมากกว่า 75% (Gavini *et al.*, 1989) และมีลักษณะทาง phenotype หลากๆ ลักษณะของเชื้อ

ชนิดนี้ที่มีความแปรปรวน เช่น การใช้ D-arabinose D-cellubiose D- arabitol D-sorbitol Citrate Glycerol Lactose Maltose Melibiose Malonate และ Tartate เป็นต้น (Azad *et al.*, 2000)

จากการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และเชื้อ *P. agglomerans* ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP การใช้รูปแบบ soluble protein นั้นพบว่าให้ผลสอดคล้องกันทั้งสามลักษณะ โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย นั้นส่วนใหญ่จับกลุ่มอยู่ด้วยกันและอยู่ร่วมกับ *P. agglomerans* และแยกกลุ่มต่างออกไปจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ซึ่งจากการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จำนวน 124 สายพันธุ์ ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นให้ผลความเหมือนของการใช้แหล่งคาร์บอน 93% แสดงให้เห็นถึงความเสถียรของการใช้แหล่งคาร์บอน และสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อจัดแยกกลุ่มได้ (Wilson *et al.*, 1999) เช่นเดียวกันการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ก็มีความแม่นยำในการจัดแบ่งเชื้อได้ถึงระดับซัปสปีชีส์ (Brady, 2005) ส่วนการใช้รูปแบบ soluble protein นั้น จากการเปรียบเทียบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* 8 สายพันธุ์ มีรูปแบบ soluble protein ที่คล้ายกัน แตกต่างจากรูปแบบของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* แสดงให้เห็นว่ารูปแบบ soluble protein สามารถใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับสปีชีส์ (Gavini *et al.*, 1989) และในการทดลองนี้การแบ่งกลุ่มย่อยของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยก็ให้ผลสอดคล้องกันทั้ง 3 ลักษณะ ได้แก่ XE1 6 8 9 11 และ Y001 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่เชื้อ XE 2 3 4 และ 5 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

จากการทดลองพบว่าการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ *hrpS* เป็นยืนยันเป้าหมายมีความจำเพาะกับเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เท่านั้น ถึงแม้ว่าจะพบยีนนี้แบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ *hrpS* ที่พบใน *Erwinia amylovora* *E. herbicola* pv. *gypsophilae* พบว่า *E. herbicola* pv. *gypsophilae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *hrpS* เหมือนกับ *E. amylovora* เป็น 75.3 และ 83.6% ตามลำดับ และ เหมือนกับ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เป็น 77 และ 79.5 ตามลำดับ (Mor *et.al.*, 2001) แสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีความจำเพาะและสามารถใช้เป็นยีนที่ยืนยันเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ได้

จากการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากข้าวโพดในประเทศไทยด้วยวิธีการต่างๆ คือ การไม่เคลื่อนที่ คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และชีวเคมี ได้แก่ รูปร่างเซลล์

เป็นท่อน การติดสีแกรมลบ (Gram negative) สามารถใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญได้ (Facultative anaerobe) โคโลนีบนอาหาร NA มีสีเหลือง ทนทานต่อเกลือแกล่งได้สูง 5% ปฏิกริยา Esculin hydrolysis เป็นบวก ไม่สร้าง H_2S ไม่ทำปฏิกิริยา Catalase ไม่ผลิตแก๊สจากการใช้น้ำตาล กลูโคส สามารถใช้น้ำตาล D- arabinose D-melibiose D-cellubiose และ Maltose และใช้ citric acid แต่ไม่ใช้น้ำตาล D-raffinose (ตารางที่ 9) ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อ *Pantoea agglomerans* และเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* จากการจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค AFLP รูปแบบ soluble protein ด้วย SDS-PAGE ลำดับดีเอ็นเอส่วน 16s rDNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ XE และ Y ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยมีการจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันและอยู่กับเชื้อ *P. agglomerans* จัดกลุ่มแยกกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* อย่างชัดเจน และไม่ทำปฏิกิริยากับคู่ไพรเมอร์ต่อต้าน *hrpS* ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าเชืวดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. agglomerans* และไม่ใช่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii*

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบลักษณะเด่นและแตกต่างของเชื้อ *Pantoea agglomerans* และเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย

ลักษณะ	XE1	XE2	XE3	XE4	XE5	XE6	XE8	XE9	XE11	Y001	PssLMG2715 ^T	Pss ¹	Pag 4633	Pag 4045	Pag ¹
Gram negative rod	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Facultative anaerobe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yellow colony	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on 5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas production from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilize of															
D- arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
D- melibiose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
D- cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	D
D- raffinose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	D
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Citric acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

¹ ข้อมูลจากรายงานของ (Gavini *et al.*, 1989)

Pss หมายถึง *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* Pag หมายถึง *P. agglomerans* D หมายถึง 26 – 75% ให้ผลบวก เครื่องหมาย + หรือ - หมายถึงเกิดปฏิกิริยาเป็นบวกหรือลบ

การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^T พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียในจินัส หรือ สปีชีส์ที่ใกล้เคียง และมีความไวต่อการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียต่ำคือต้องการเซลล์อย่างน้อยตั้งแต่ 10^4 cfu ต่อปฏิกิริยาขึ้นไป ซึ่งเมื่อเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ซึ่งสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างพืชได้ด้วยวิธี ELISA แม้เซลล์มีปริมาณน้อย 10^3 cfu ต่อมิลลิลิตร (Jones *et al.*, 1997) ในขณะที่แอนติบอดีต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ที่ผลิตได้ในตัวอย่างนี้ ซึ่งได้มาจากการฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์ทั้งเซลล์ และ Membrane protein complex รวมถึงชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่เป็นระบบ monoclonal antibody สามารถตรวจได้ในระดับขั้นต่ำเพียง 10^5 cfu ต่อปฏิกิริยาเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีโครงสร้างของเซลล์ที่มีความเป็น antigenic ต่ำ จากการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ต่างชนิดกัน ได้แก่ กระต่ายและไก่ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันในไก่หรือสัตว์ปีกจะมีข้อด้อยในแง่ความหลากหลายของแอนติบอดีที่ผลิตได้ แต่ในทางกลับกันหากมีความหลากหลายต่ำก็จะส่งผลให้แอนติบอดีที่ได้มีโอกาสในการทำปฏิกิริยาข้ามต่ำกว่า (Kovacs-Nolan and Mine, 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทั้งสองชนิดนั้น แอนติบอดีในเบื้องต้นมีการทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในจินัส และสปีชีส์ที่ใกล้เคียง แต่เมื่อทำปฏิกิริยาลดการข้าม (cross absorption) แล้วพบว่าแอนติบอดีจากไก่มีความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากไก่เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีระบบการจดจำต่อ epitope ที่แตกต่างออกไปส่งผลให้ได้แอนติบอดีที่แตกต่างออกไป (Kovacs-Nolan and Mine, 2004) โดยแอนติบอดีที่ได้ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* ทั้งการฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (Life cell) และ MPC นอกจากนี้แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์มีชีวิตที่เจริญบนอาหาร minimal medium เพื่อให้แบคทีเรียสร้างสาร polysaccharide น้อยลง (Lamka, *et al.*, 1991) ยังมีความจำเพาะเจาะจงเทียบเท่ากับชุดตรวจ ELISA สำเร็จ PathoScreen® ด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบความไวในการตรวจสอบแล้วแอนติบอดีที่ได้จากไก่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าที่ได้จากการฉีดกระตุ้นในกระต่าย และชุดตรวจสำเร็จรูปในช่วง 10- 100 เท่า โดยที่แอนติบอดีทั้งหมดมีการทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่ม XE และ Y ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้แอนติบอดีไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* โดยเฉพาะในประเทศไทย เนื่องจากพบว่าเชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์ใกล้เคียงได้แก่ *P. agglomerans* หรือ *P. dispersa* ซึ่งพบได้ทั่วไปในพื้นที่พืช หรือเมล็ด มีความสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่า โคลนีนีมีลักษณะใกล้เคียงกัน ใช้อาหารได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* แต่ใช้ได้มากกว่า (ตารางที่ 4) มีโอกาสทำให้เกิดการตรวจโดยวิธีการทางเซรุ่มวิทยาได้ผลบวกที่ผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามวิธีการ ELISA เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำ โดยเฉพาะหากผลิต

แอนติบอดีได้เอง ไม่ต้องการเครื่องมือเฉพาะในการตรวจ จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณมากเพื่อคัดกรองในเบื้องต้นได้

วิธีการทดสอบเชื้อด้วยเทคนิค ELISA นั้นในการทดลองนี้ใช้วิธีการ indirect plate trapped antigen ELISA (indirect-PTA ELISA) ในขณะที่ชุดตรวจสอบ PathoScreen® ใช้วิธี double-sandwich ELISA (DAS-ELISA) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวจับตรงเชื้อ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจรายงานผล ซึ่งวิธี indirect PTA-ELISA โดยปกติมีความไวในการตรวจจับต่ำกว่า โดยเฉพาะเมื่อตรวจหาเชื้อในเมล็ด ซึ่งคาดว่าเนื่องจากเนื้อเยื่อจากเมล็ดข้าวโพดแข่งขันในการแย่งจับพื้นที่ในถาดทดสอบ และหรือเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชโดยทางกายภาพไปปิดหรือขัดขวางการจับของเชื้อแบคทีเรียกับถาดทดสอบ (Lamka *et.al*, 1991) และการยึดจับของเซลล์แบคทีเรียกับถาดทดสอบโดยตรงอาจมีประสิทธิภาพต่ำในการจับยึด

วิธีการที่ใช้พื้นฐานของเทคนิค PCR เป็นวิธีการที่สามารถใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากต่อครั้งได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำงานกับแบคทีเรีย ซึ่งลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ มีความไวต่อการตรวจสอบและ มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเทียบกับ ELISA ผลของการทดลองนี้ และในการทดลองอื่นๆ อย่างไรก็ดีตามปัญหาของการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR คือสารปนเปื้อนจากตัวอย่างพืชและเมล็ดในปฏิกิริยาที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (PCR inhibitor) วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนพื้นฐานของเทคนิค PCR มีหลายประเภท ได้แก่ การตรวจด้วยปฏิกิริยา PCR โดยตรง Bio-PCR Ampli-disk PCR การตรวจด้วยปฏิกิริยา PCR ร่วมกับการใช้แอนติบอดี ได้แก่ Magnetic bead-PCR และ immunocapture-PCR นอกจากนี้ยังมีวิธีการ Nested PCR ที่ให้ความจำเพาะเจาะจงและบางครั้งเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น (Llop *et al.*, 2000) และวิธีการ Real-time PCR ทั้งที่ใช้ระบบ probe และ SYBR®

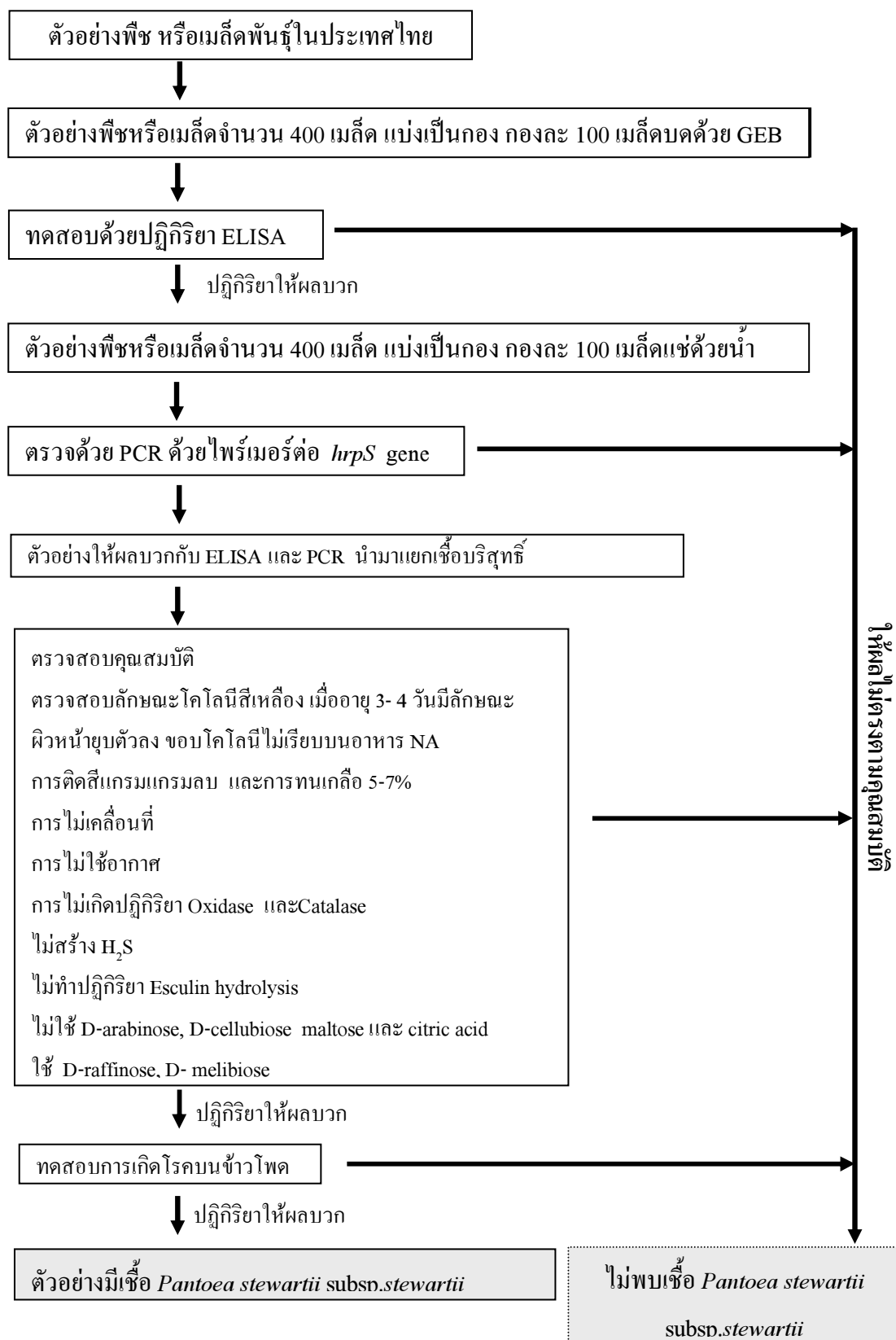
วิธีการตรวจด้วยวิธีที่ใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน ในการทดลองนี้พบว่าเมื่อตรวจตัวอย่างที่เป็นเซลล์แบคทีเรียโดยตรง วิธีการ Ampli-disk PCR สามารถตรวจเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่เมื่อตรวจตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างพืชหรือตัวอย่างที่ผสมร่วมกับเมล็ดส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการตรวจลดลง และในหลายๆการทดลองไม่สามารถให้ผลอย่างสม่ำเสมอได้ เนื่องจากพบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่ปนเปื้อนจะเติบโตได้รวดเร็วกว่า ประกอบกับข้อจำกัดที่ยังไม่มีอาหารคัดเลือกจำเพาะ หรือส่งเสริมการเจริญเฉพาะเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารอาหารจากแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด จากผล

การทดลองนี้ รวมถึงจากเอกสารอ้างอิง (Mergaert *et al.*, 1993; Gavini *et al.*, 1989) พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีการใช้สารอาหารได้น้อยชนิดและคล้ายกับเชื้อ *P. agglomerans* และ *P. dispersa* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มใกล้เคียงที่พบปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะสร้างสูตรอาหารจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียนี้ วิธีการ Magnetic bead-PCR เป็นวิธีที่คัดกรองเชื้อแบคทีเรียจากการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีก่อน ซึ่งมีประโยชน์ในแง่เพิ่มความจำเพาะในกรณีที่มีแอนติบอดีที่มีคุณภาพสูง และลดสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR และเซลล์ที่ได้ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำไปตรวจสอบด้วยการเลี้ยงบนอาหารได้ (van der Wolf *et al.*, 1996) แต่เนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงอาจนำมาใช้ประโยชน์ได้ในการคัดกรองเชื้อในเบื้องต้น และใช้วิธีการ PCR ตรวจสอบเชื้อที่จำเพาะ แม้ว่าวิธีนี้จะช่วยลดสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ และใช้เครื่องมือไม่แตกต่างจากวิธีการ direct-PCR แต่เมื่อเปรียบเทียบข้อดีข้อด้อยอื่นๆ เช่น เวลาที่ต้องใช้มากขึ้น ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นจากการต้องมีแอนติบอดีและ Magnetic bead ที่มีราคาสูง ดังนั้นวิธีการนี้จึงยังไม่เหมาะในการนำมาใช้ตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเมื่อเทียบกับวิธีการ direct PCR ส่วนวิธีการ real-time PCR เป็นวิธีการที่มีจุดเด่นคือสามารถตรวจสอบเชื้อเป้าหมายได้อย่างรวดเร็วไม่ต้องตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Dorak, 2004) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจนอกสถานที่ได้ แต่มีจุดด้อยอยู่ที่ค่าใช้จ่ายในการของอุปกรณ์เครื่องมือวัสดุและสารเคมีในการทำปฏิกิริยามีราคาสูง ซึ่งได้สรุปเปรียบเทียบข้อเด่นข้อด้อยของแต่ละวิธีดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบข้อเด่นข้อด้อยในด้านต่างๆ ของวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จากตัวอย่างพืชหรือเมล็ดข้าวโพด

	Direct-PCR	Magnetic bead PCR	Ampli-disk PCR	Real-time PCR	ELISA
ความจำเพาะ (Specificity)	สูง	สูง	สูง	สูง	ต่ำ
ความไว (Sensitivity)	10^3	10^3	10^2	10^2	10^5
การทำซ้ำ (Repeatability)	ดี	ดี	ไม่ดี	ดี	ดี
ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง (Cost)	ต่ำ	สูง	ต่ำ	สูง	ต่ำ
ราคาเครื่องมือ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	สูง	ต่ำ

จากการทดลองและเลือกใช้เทคนิคในการตรวจสอบเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ด้วย direct PCR นั้น พบว่าวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่สามารถทำได้ ให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างถูกกว่าเทคนิคอื่นๆ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ที่จะให้ผลที่น่าเชื่อถือและใช้ในการตรวจสอบที่เป็นมาตรฐานในการออกใบรับรองในการกักพืช (plant quarantine) ต้องใช้การตรวจหลายวิธีประกอบกัน ดังนำเสนอแนวทางการตรวจ ดังในภาพที่ 21 และการตรวจเชื้อแบคทีเรียจากกองเมล็ดพันธุ์นั้น โดยมาตรฐานเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ตามรายงานที่ยอมรับการติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ 0.5 % หรือต่ำกว่านั้น และการคำนวณโอกาสการสุ่มเมล็ดที่ติดเชื้อ และโอกาสของเมล็ดที่ติดเชื้อจากการตรวจด้วยวิธีการ ELISA ตามการตรวจของ National Seed Health Test ซึ่งพัฒนาโดย Iowa State University จากการตรวจเมล็ดจำนวน 400 เมล็ดแบ่งเป็นกอง กองละ 100 เมล็ด ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบโดยการตรวจและใช้มาตรฐานเดียวกัน โดยเปลี่ยนจากวิธีการ ELISA เป็นวิธีการตรวจด้วย PCR แต่ยังคงการตรวจแบบใช้การแบ่งกองเป็นกองละ 100 จำนวนกองขึ้นกับขนาดของกองเมล็ดพันธุ์ โดยสามารถประมาณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ได้ดังแสดงในตารางที่ 1 (Pataky and Ikins, 2003)



ภาพที่ 21 แผนผังการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* สำหรับประเทศไทย

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. เชื้อสายพันธุ์ XE Y และ W ที่แยกเชื้อได้จากข้าวโพดในประเทศไทยไม่ใช่เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* โดยใช้ข้อมูลประกอบด้วยคุณสมบัติการเคลื่อนที่ การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP และรูปแบบของ soluble protein
2. เชื้อแบคทีเรียแยกจากโรคเหี่ยวของข้าวโพดในประเทศไทยสายพันธุ์ Y001 และ XE ทั้งหมด ยกเว้น XE7 คือเชื้อ *Pantoea agglomerans* โดยใช้ข้อมูลประกอบด้วยคุณสมบัติทางฟิโนไทป์ และทางชีวเคมี แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP และรูปแบบ soluble protein
3. การใช้อาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium ไม่สามารถใช้เป็นอาหารคัดเลือกจำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ได้
4. การใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา ได้แก่ ELISA ทั้งที่ใช้ polyclonal antibody และ monoclonal antibody (Agdia, Inc) ต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* พบว่าไม่ให้ผลอย่างจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* แต่ยังทำปฏิกิริยากับเชื้อใกล้เคียง ได้แก่ *Pantoea agglomerans* และเชื้อแบคทีเรียที่เกิดอาการเหี่ยวของข้าวโพดในประเทศไทยได้
5. การใช้เทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 16s-23s rRNA/ITS และ *cpsD* ยืนยันตามรายงานของ Coplin and Kado (2002) นั้น ไม่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii*
6. การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* เท่านั้น ที่ให้ผลจำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii*

7. วิธีการ ELISA ด้วย polyclonal antibody มีความไวในการตรวจสอบเซลล์เชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* น้อยที่สุด โดยต้องการปริมาณเซลล์ อย่างน้อย 10^5 cfu ต่อปฏิกิริยา เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ direct-PCR Magnetic bead-PCR Agar-PCR และ Real-time PCR
8. วิธีการ Ampli disk-PCR เป็นวิธีการที่มีความไวในการตรวจสอบเซลล์ *P. stewartii* subsp. *stewartii* ดีที่สุด สามารถตรวจสอบเซลล์ได้แม้มีเซลล์เริ่มต้นน้อยกว่า 10 cfu แต่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจในภาคสนามเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเจริญได้รวดเร็วและปกคลุมเชื้อนี้
9. วิธีการ direct-PCR เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากพืชและเมล็ดดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับในแง่ของความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง ผลการทดลองเชื่อถือได้สูง ระยะเวลาในการตรวจสอบ
10. วิธีการ PCR ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจตัวอย่างเมล็ด ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการบดเมล็ดได้
11. วิธีการ direct-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างพืชและเมล็ดได้เมื่อมีแบคทีเรียอย่างน้อย 6×10^2 และ 10^3 cfu ต่อปฏิกิริยาตามลำดับ
12. วิธีการ direct-PCR ร่วมกับการแช่เมล็ดสามารถตรวจเชื้อในกองเมล็ดเมื่อมีการติดเชื้อ 0.02% หรือ 1 ใน 5,000 เมล็ด เมื่อตรวจเมล็ดแบบแช่ทั้งกองเมล็ดพันธุ์และการแบ่งกองเมล็ดพันธุ์
13. การแบ่งกองเมล็ดพันธุ์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบเมล็ดที่ติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ได้มากขึ้นจาก 33% เป็น 83%
14. การตรวจการติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี direct-PCR นำมาปรับร่วมกับการคำนวณการโอกาสการติดเชื้อในเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากการตรวจสอบเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีการ ELISA สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และพัฒนาเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับประเทศไทยต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2547. สถิติการปลูกพืชตามชนิด. แหล่งที่มา:

<http://pst.doae.go.th/ROR%5FOR>, 20 มีนาคม 2548.

จุฑาทาเพท วัชรไชยคุปต์ วัฒนิกกร เทพโพธา สุจินต์ ภัทรภูวดล ณัฐพร อุทัยมงคล นิพนธ์ ทวีชัย และวิชัย โหมสิดรัตน์. 2550. ข้อจำกัดเทคนิคในการตรวจเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. หน้า 263-270. ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542.

แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/code/code/sum_code/pq_act.pdf, 20 มีนาคม 2548.

สรรัชชัย จันทะจร ธนายุทธ์ จิรัฐพงศ์ รัชนี สงประยูร และสุรัตน์วดี จิระจินดา. 2548. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในไก่โดยใช้สารสกัดจากกะเพราแดง, น. 91-96. ใน สมุนไพรไทย: โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 3 . คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ศูนย์ประชุมสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หลักสี่ กรุงเทพมหานคร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2547. ปริมาณและการส่งออกรายเดือน. แหล่งที่มา:

<http://www.aoc.go.th/Import-Export.php>, 20 มีนาคม 2548.

Ahmad, M., D.R. Majerczak, S. Pike, M. E. Hoyos, A. Novacky and D.L. Coplin. 2001.

Biological activity of harpin produced by *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Molecular Plant Microbe Interaction 14: 1223-1234.

Aldridge, P., F. Bernhard, P. Bugert, D.L. Coplin and K. Geider. 1998. Characterization of gene locus form *Erwinia amylovora* with regulatory functions in exopolysaccharide synthesis of *Erwinia* spp. Canadian Journal of Microbiology 44: 657-666.

Anonymous. 1997. **Corn Stewart's Wilt**. Available Source:

<http://www.extension.iastate.edu/Pages/plantpath/cornstewart.html>. December 15, 2003.

———. 2000. **More on Stewart's Wilt**. Available Source:

<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2000/5-29-2000/morewilt.html>. December 15, 2003.

Avrova, A.O., L.J. Hyman, R.L. Toth and I.K. Toth. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1499-1508.

Azad, H.R., G.J. Holmes and D.A. Cooksey. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Disease* 84: 973-979.

Bernhard, F., D. Schullerus, P. Bellemann, K. Geider, M. Nimtz, D.R. Majerczak and D. L. Coplin. 1996. Genetics and complementation of DNA regions involved in amylovoran synthesis of *Erwinia amylovora* and stewartan synthesis of *Erwinia stewartii*. *Acta Horticulturae* 411: 269-274.

Blakemore, E.J.A., J.C. Reeves and S.F.L. Ball. 1992. Polymerase chain reaction used in the development of a DNA probe to identify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. *Seed Science and Technology* 20: 331-335.

Block, C.C., J.H. Hill and D.C. McGee. 1999. Relationship between late-season severity of Stewart's bacteria wilt and seed infection in maize. *Plant Disease* 83: 527-530.

Bourget, N.L., H. Philippe, I. Mangin and B. Decaris. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S international transcribed spacer sequence analysis reveal inter-and intraspecific

- Bifidobacterium* phylogeny. International Journal of Systemic Bacteriology 46: 102-111.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brady, C.L. 2005. **Taxonomy of *Pantoea* associated with Bacterial Blight of *Eucalyptus*.** M.S. thesis, University of Pretoria.
- Clamp, M., J. Cuff, S.M. Searle and G.J. Barton. 2004. The jalview java alignment editor. Bioinformatics 20: 426-427.
- Coplin, D.L. and C.I. Kado. 2000. *Pantoea*. 73-83. In N. Schaad, J. Jones and W. Chun. **Laboratory Manual for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** American Phytopathological Society Press, St.Paul, MN.
- Coplin, D.L., R.D. Frederick, D.R. Majerczak and L.D. Tuttle. 1992. Characterization of a gene cluster that specifies pathogenicity in *Erwinia stewartii*. Molecular Plant Microbe Interaction 5: 81-88.
- Coplin, D.L., D.R. Majerczak, P. Bugert and K. Geider. 1996. Nucleotide sequence analysis of the *Erwinia stewartii* CPS gene cluster for synthesis of stewartan and comparison to the *Erwinia amylovora* AMS cluster for synthesis of amylovoran. Acta Horticulturae 411: 251-257.
- Coplin, D.L., D.R. Majerczak, Y. Zhang, W.S. Kim, S. Jock and K. Geider. 2001. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. Plant Disease 86: 304-311.

- . 2002. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Disease* 86: 304-311.
- Dice, L.R. 1945. Measurement of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Dolph, P. J., D.R. Majerczak and D.L. Coplin. 1988. Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *Journal of Bacteriology* 170: 865-871.
- Dorak, M.T. 2004. **Real-time PCR**. Available Source: <http://home.att.net/~dorak/genetics/realtime.html>. January 1, 2004.
- Enrothe, H. and L. Engstrand. 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2162-2165.
- Fox, G.E., J.D. Wisotzkey and J.P. Jurtshuk. 1992. How close is close: 16s rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systemic Bacteriology* 42: 166-170.
- Gavini, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters and J. De Ley. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 39: 337-345.
- Guo, Y., Z. Liang and D. Yu. 1982. Nigrosine medium- selective medium for isolation of *Erwinia stewartii* from imported corn. *Acta Microbiologica Sinica* 22: 339-344.

Ham, J. H., D. R. Majerczak, A. S. Arroyo-Rodriguez, D. M. Mackey and D. L. Coplin. 2006. WtsE, an AvrE-family effector protein from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes disease-associated cell death in corn and requires a chaperone protein for stability. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19: 1092-1102.

Hampton, R., E. Ball and S. De Boer. 1989. **Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: A Laboratory Manual.** APS Press, St. Paul.

Hershman, D.E., P. Vincelli and W.C. Nesmith. 2003. **Stewart's Wilt of Corn.** Available Source: <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/ppa/ppa33/ppa33.htm>. December, 15, 2003.

Jaufeerally-Fakim, Y. and A. Dookun. 2000. Extraction of high quality DNA from polysaccharide-secreting *Xanthomonads*. *Science and Technology-Research Journal* 6: 33-44.

Jones, J.B., G.C. Somodi and J.W. Scott. 1997. Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in leaf tissue. *Journal of Applied Microbiology* 83: 397-401.

Klement, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199: 299-300.

Kovacs-Nolan, J. and Y. Mine. 2004. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology Reviews* 15: 25-46.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227: 680-685.

- Lamka, G.L., J.H. Hill, D.C. McGee, E.J. Braun and J.K. Jo. 1991. Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology* 81: 839-846.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Llop, P., A. Bonaterra, J. Penalver and M.M. Lopez. 2000. Development of a highly sensitivity nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2071-2078.
- Mergaert, J., L. Verdonck and K. Kersters. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym., *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 43: 162-173.
- Merighi, M., D.R. Majerczak, E.V. Stover and D.L. Coplin. 2003. The HrpX/HrpY two-component system activates *hrpS* expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16: 238-248.
- Michener, P.M., J.K. Pataky and D.G. White. 2002a. Rates of transmitting *Erwinia stewartii* from seed to seedling of a sweet corn hybrid susceptible to Stewart's wilt. *Plant Disease* 86: 1031-1035.
- . 2002b. Transmission of *Erwinia stewartii* from plants to kernels and reactions of corn hybrids to Stewart's wilt. *Plant Disease* 86: 167-172.

- Nutter-Jr., F.W. and P.D. Esker. 2003. Temporal dynamics of corn flea beetle populations infested with *Pantoea stewartii*, causal agent of Stewart's disease of corn. *Phytopathology* 93: 210-218.
- Mor, H., S. Manulis, M. Zuck, R. Nizan, D. L. Coplin and I. Barash. 2001. Genetic organization of the *hrp* gene cluster and *dspAE/BF* operon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14: 431-436.
- Pataky, J. K. and R. Ikin. 2003. **Pest Risk Analysis: The Risk of Introducing *Erwinia stewartii* in Maize Seed.** The International Seed Federation, Switzerland.
- Pepper, E.H. 1967. **Stewart's Bacterial Wilt of Corn.** The american phytopathological society at the heffernan press., Worcester, Mass.
- Pfaffl, M.W. 2003. **Chapter 3: Quantification Strategies in Real-Time PCR.** Available Source: www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf. December 18, 2003.
- Schaad, N.W. and P. Randhawa. 2003. Ampli-disk PCR, a novel technique for ultra-sensitive detection of bacteria. Patent Application. DN 0110.03, SN 10/689, 624:
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** APS Press, Minnesota, USA.
- Schaad, N.W., S. Sule, J.W.L. Van Vuurde, H. Vruggingk, A.M. Alvarez, A.A. Benedict, L. De Wael and O. Van Laere. 1990. Serology. 155-186. *In* Z. Klement, K. Rudolph and D. C. Sands. **Methods in Phyto bacteriology.** Akademiai Kiado, Budapest.
- Sneath, P.H.A. 1984. Numerical taxonomy. 5-7. *In* N.R. Krieg and J.G. Holt. **Numerical Taxonomy.** Baltimore, MD.

- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1985. A statistical method for evaluating systemic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 28: 1409-1438.
- Sutula, C.L., J.M. Gilett, S.M. Morrissey and D.C. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70: 722-726.
- van der Wolf, J.M., L.J. Hyman, D.A.C. Jones, C. Grevesse, J.R.C.M. van Beckhoven, J.W.L. Van Vuurde and M.C.M. Perombelon. 1996. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on crystal violet pectate medium or by PCR. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 487-495.
- von Bodman, S.B., D.R. Majerczak and D.L. Coplin. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proceeding of Netherland Academic Science* 95: 7687-7692.
- Wacharotanyankun, R., Y. Arkawa, M. Ohta, K. Tanaka, T. Akashi, M. Mori and N. Kato. 1993. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by RmpA2 Which shows homology to NtrC and FixJ. *Infection Immunity* 61: 3164-3174.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, S.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Whitfield, C. and A. Valvano. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advance Microbiology Physiology* 35: 135-246.
- Wilson, W.J., H.R. Dillard and S.V. Beer. 1999. Assessment of phenotypic variability in *Erwinia stewartii* based on metabolic profiles. *Plant Disease* 83: 114-118.

- Wilson, W.J., M. Wiedmann, H.R. Dillard and C.A. Batt. 1994. Identification of *Erwinia stewartii* by a ligase chain reaction assay. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 278-284.
- Yakrus, M. and N.W. Schaad. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 69: 225-552.
- Yap, I.V. and R.J. Nelson. 1996. **Winboot a Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA Based Dendrograms.** International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.

ภาคผนวก

GN2 MicroPlate™

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose
B1 i-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α-D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α-D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β-Methyl-D-Glucoside	C3 D-Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turannose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Gluconic Acid	D10 α-Hydroxybutyric Acid	D11 β-Hydroxybutyric Acid	D12 γ-Hydroxybutyric Acid
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α-Keto Butyric Acid	E4 α-Keto Glutaric Acid	E5 α-Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyroglutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ-Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenethyl-amine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

ภาพผนวกที่ 1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนในงานหุลุม GN2

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	จุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 มิถุนายน 2518
สถานที่เกิด	อุดรธานี
ประวัติการศึกษา	ประถมศึกษา โรงเรียนอุดรวิทยา มัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีราชินูทิศ ปริญญาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น (วท.บ. (เกษตรศาสตร์)) ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (วท.ม. (เกษตรศาสตร์))
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์