วิทยานิพนธ์

การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิค เอเอฟแอลพี

DIFFERENTIATION OF *Erwinia carotovora* STRAINS ISOLATED FROM SOFT ROT OF VEGETABLE CROPS AND DIE-BACK DISEASE OF JACKFRUITS BY AFLP FINGERPRINTING

นายวัฒนิกร เทพโพธา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิค เอเอฟแอลพี

Differentiation of *Erwinia carotovora* Strains Isolated from Soft Rot of Vegetable Crops and Die-Back Disease of Jackfruits by AFLP Fingerprinting

นามผู้วิจัย นายวัฒนิกร เทพโพธา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โฆสิตรัตน, Ph.D.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์นิพนธ์ ทวีชัย, Ph.D.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์อรรัตน์ มงคลพร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 4 **เดือน** มิถุนายน **พ.ศ.** 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิค เอเอฟแอลพี

Differentiation of *Erwinia carotovora* Strains Isolated from Soft Rot of Vegetable Crops and Die-Back Disease of Jackfruits by AFLP Fingerprinting

โดย

นายวัฒนิกร เทพโพธา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2550

วัฒนิกร เทพโพธา 2550: การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิค เอเอฟแอลพี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โฆสิตรัตน, Ph.D. 90 หน้า

เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) เป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผักต่างๆ และโรคแห้งตายของขนุน และจำปาดะ คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุนต่างไปจากเชื้อที่แยกมาจากผัก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน และเชื้อที่แยกมาจากผักด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) โดยเชื้อ Ecc จำนวน 37 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อที่แยกมาจากขนุน 17 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกมาจากผัก 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอแอฟแอลพี โดยใช้ค่า Dice's coefficient และจัดกลุ่มโดยวิธี unweighted pair group method of averages (UPGMA) พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนที่ค่า similarity 0.42 ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่แยกมาจากผักต่างๆ พบว่ากลุ่มเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุนมีความคงที่ทางพันธุกรรมสูงโดยมีค่า similarity 0.92 ส่วนเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากผักมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง อยู่ในช่วงค่า similarity 0.44-1.00 จากการศึกษานี้สามารถใช้เทคนิค AFLP ในการแยกเชื้อ Ecc สาเหตุโรคแห้งตายขนุนออกจาก Ecc สาเหตุโรคเน่าเละของผักได้

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ 29 / พ.ค. / 2550

Wattanigone Theppota 2007: Differentiation of *Erwinia carotovora* Strains Isolated from Soft Rot of Vegetable Crops and Die-Back Disease of Jackfruits by AFLP Fingerprinting. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 90 pages.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (Ecc) is an important pathogen causing soft rot disease in many vegetables and die-back disease of jackfruit and champedak. Serological characteristics of Ecc from jackfruits were different from the Ecc strains of vegetables. An investigation using amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting was undertaken to determine the taxonomic relationship of Ecc strains isolated from vegetables and jackfruit. Total 37 isolates of Ecc were included in this study, of which 20 were isolated from vegetable crops and 17 were isolated from jackfruits. Cluster analysis of DNA fingerprinting profiles by using Dice's coefficient and the unweighted pair group method of averages (UPGMA) divided the Ecc isolate into two groups. Cluster 1 contained Ecc isolates from jackfruits which was clearly separated from cluster 2, containing vegetable isolates at the similarity coefficient of 0.42. Ecc isolates from jackfruits revealed homogenous DNA fingerprinting profiles at similarity coefficient 0.92 while the Ecc from vegetable crops showed a high level of genetic diversity (0.44 to 1.00 similarity coefficients).

Wattanigone Theppota ______ Student's signature

______ Thesis Advisor's signature 29 / May / 2007

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. วิชัย โฆสิตรัตน ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ พร้อมทั้งให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นิพนธ์ ทวีชัย กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร. อรรัตน์ มงคลพร กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ดร. วิทิตร ใจอารีย์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย คณาจารย์ภาควิชาโรคพืชทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและแนะนำในการศึกษา และทำวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย และจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบพระคุณ คุณณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล คุณรุ่งรัตน์ วารีเขต คุณนิโลบล สุจสินธุ์ และคุณจุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์ ที่ได้กรุณาให้ตัวอย่างเชื้อสาเหตุต้นแห้งตายของขนุน และเชื้ออื่นๆ ในการวิจัยครั้งนี้รวมถึงข้อมูลต่างๆ ของเชื้อ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ ดร. สุจินต์ ภัทรภูวดล ดร. จินตนา อันอาตม์งาม ดร. สุตเขตต์ นาคะเสถียร และ อ. ปิยะฉัตร เชยชุ่ม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ดูแลเอาใจใส่มาตลอด และขอขอบคุณ คุณวรางคนา แซ่อ้วง พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาโรคพืช และทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ที่ช่วยเหลือระหว่างการทำวิจัย

ประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อวิชัย และ คุณแม่วิไล เทพโพธา ที่ให้การอบรมเลี้ยงดูให้โอกาสในการศึกษา และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดมา

วัฒนิกร เทพโพธา

มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	35
ผล	35
วิจารณ์	57
สรุป	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	69

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียต่างๆ โดยเทคนิค AFLP	12
2	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย พืชอาศัย แหล่งที่เก็บ ปีที่เก็บ และที่มาของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา	19
3	ลำดับเบสของ adapter ในเทคนิค AFLP	28
4	ลำดับเบสไพรเมอร์ในขั้นตอน nonselective amplification และ selective amplification	29
5	คุณสมบัติของแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สายพันธุ์ต่างๆ ในด้านการติดสีแกรม ความสามารถในการทำให้เกิดโรค และการมี *pel* gene	38
6	ผลการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. ที่นำมาทดสอบจากการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตด้วยระบบ BIOLOG System	42
7	คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบในการการทดสอบ *In silico* analysis	44
8	เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCR1043 ด้วยเทคนิค *in silico* AFLP และ AFLP PCR amplification ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 2 สายพันธุ์	48
9	การใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดในถาดอาหาร GN2 (Biolog, Inc., CA, USA) ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 8 สายพันธุ์ และ *Erwinia chrysanthemi* จำนวน 2 สายพันธุ์	51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพเทคนิค AFLP (Vos *et al.*, 1995)	11
2	แสดงขั้นตอนการใช้โปรแกรม *In silico* AFLP ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ตทางเว็บไซต์ http://insilico.ehu.es	21
3	ตัวอย่างการแสดงผลของโปรแกรม *In silico* AFLP – PCR amplification ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เมื่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนน้อยกว่า 200 แถบ	23
4	ตัวอย่างการแสดงผลของโปรแกรม *In silico* AFLP – PCR amplification ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เมื่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนมากกว่า 200 แถบ	25
5	ขั้นตอนการศึกษาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ในห้องปฏิบัติการ	33
6	โปรแกรม Gene Tools (Syngene, Cambridge, U.K.) ในการนับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากโพลีอะคริลาไมด์เจล	34
7	ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การสร้าง pectolytic enzyme ย่อยชิ้นแตงกวา ความสามารถเกิดโรคเน่าเละบนผักกาดขาว และคุณสมบัติการเป็น facultative anaerobic bacteria ของเชื้อแบคทีเรีย	40
8	การตรวจสอบเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละที่แยกได้จากผักด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจยีน *pel* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย และมี 16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายกับเชื้อแบคทีเรีย	41
9	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์แบบต่างๆ ในขั้นตอน selective amplification กับ เชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ JK2001 และ VECC1596 ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I	49
10	เดนโดแกรมจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* แสดงการจัดกลุ่มของเชื้อจากแหล่ง พืชอาศัยต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice’s coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA วิเคราะห์ค่า bootstrap 1000 ซ้ำ	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

11 เดนโดแกรมจากการวิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สายพันธุ์ที่แยกได้จากขนุน และผัก โดยค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA วิเคราะห์ค่า bootstrap 1000 ซ้ำ 56

การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

Differentiation of *Erwinia carotovora* Strains Isolated from Soft Rot of Vegetable Crops and Die-Back Disease of Jackfruits by AFLP Fingerprinting

คำนำ

ประเทศไทยอยู่ในแถบเขตร้อนชื้น ซึ่งมีไม้ผลหลายชนิดที่สามารถปลูกได้ ขนุนจัดเป็นไม้ผลที่นิยมปลูกทั่วประเทศโดยเฉพาะในจังหวัด ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ระยอง ปราจีนบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ และสงขลา ขนุนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artrocarpus heterophyllus* ชื่อสามัญ Jackfruit ขนุนเป็นต้นไม้ที่มีขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ อายุยืน มียางสีขาว ทรงพุ่มทึบ ออกดอกและผลตามส่วนของลำต้น (นฤชิต, 2529)

โรคต้นแห้งตายของขนุนเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการปลูกขนุน อาการเริ่มแรกจะพบยางสีขาวหรือสีน้ำตาลไหลออกมาจากกิ่งหรือลำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อถากเปลือกไม้ใต้เปลือกปรากฏรอยแผลเนื้อไม้เป็นสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน ผลร่วง ใบเปลี่ยนเป็นสีส้มและร่วง กิ่งและลำต้นแห้งตายจากยอดลงมา เมื่อมีอาการรุนแรงมากจะทำให้ต้นขนุนตายในที่สุด (เสมอใจ และ บรรหาร, 2533; ณัฏฐิมา และคณะ, 2536) โรคต้นแห้งตายของขนุนพบรายงานครั้งแรกในประเทศมาเลเซีย จำแนกเชื้อสาเหตุพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (Lim and Yasin, 1983) ในประเทศไทย เสมอใจ และ บรรหาร (2533) รายงานว่าโรคดังกล่าวมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia nigrifluens* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม amylovora group ส่วนใหญ่เชื้อในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคไหม้กับไม้ผลยืนต้น หลังจากนั้น ณัฏฐิมา และคณะ (2536) ทำการจำแนกอีกครั้ง พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *nov* อยู่ในกลุ่มของ carotovora group ซึ่งกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดอาการเน่าเละในพืชผักต่างๆ ต่อมา รุ่งรัตน์ (2548) และนิโลบล (2548) ใช้ระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) จัดจำแนกเชื้อ สาเหตุโรคแห้งตายของขนุน พบว่าเป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดย Lim and Yasin (1983) และ ณัฏฐิมา และคณะ (2536) ซึ่งเชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม carotovora group เชื้อในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นคือ สร้าง pectolytic enzyme มาย่อยสาร pectin ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชทำให้เกิดอาการเน่าเละ เช่นเดียวกับเชื้อ *E. chrysanthemi* และ *Pseudomonas* spp. (Schaad *et al.*,

2001) จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคโดย รุ่งรัตน์ (2548) และ นิโลบล (2548) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคเน่าเละของพืชผักไม่สามารถเกิดโรคต้นแห้งตายในขนุนได้ แต่เชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคต้นแห้งตายขนุนสามารถทำให้เกิดอาการเน่าเละกับชิ้นมันฝรั่งได้ และมีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาที่แตกต่างไปจาก Ecc สาเหตุโรคเน่าเละในพืชผัก (รุ่งรัตน์, 2548) จากความแตกต่างในการเกิดโรค และลักษณะทางเซรุ่มวิทยา เป็นลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เชื้อ Ecc แสดงออกมา แต่ยังไม่มีข้อมูลที่บ่งชี้ถึงความแตกต่างทางด้านจีโนไทป์ของเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้

เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นวิธีการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายงานครั้งแรกโดย Vos *et al.* (1995) มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ดังเช่น การจัดจำแนกเชื้อ และการหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย soft rot group ระหว่าง *Erwinia carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* (Avrova *et al*., 2002) ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทดลองในครั้งนี้คือ การประเมินความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคแห้งตายขนุนกับเชื้อ Ecc สาเหตุของโรคเน่าเละในพืชผักด้วยเทคนิค AFLP

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ที่แยกได้จากโรคเน่าเละของผัก และที่แยกได้จากโรคต้นแห้งตายของขนุน ด้วยเทคนิค AFLP

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ Genus *Erwinia*

แบคทีเรียในสกุล (Genus) *Erwinia* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, ไม่สร้างสปอร์, มี flagella รอบตัว (peritrichous flagella), สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic), มีรูปร่างท่อนตรง (rod shapped) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Erwinias* นี้มีรายงานว่าเป็นเชื้อเกิดโรคกับพืช (plant pathogen), ซาโปรไฟท์ (saprophyte) และ พวกอิพิไฟท์ (epiphytes) โดยเชื้อในกลุ่ม carotovora สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทำให้พืชมีลักษณะอาการเน่าเละ ส่วนเชื้อในกลุ่ม amylovora เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ทำให้เกิดลักษณะอาการแห้งตาย (dry necrotic) หรือเหี่ยว (wilt) กับพืชอาศัย ส่วนเชื้อในกลุ่ม herbicola เป็นพวกอิพิไฟท์เกิดโรคกับพืชที่อ่อนแอ และเป็นซาโปรไฟท์ในดิน น้ำ และอากาศ (Beji *et al.*, 1988) เชื้อในกลุ่ม carotovora ประกอบด้วย เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), และ *Erwinia chrysanthemi* (Ech) ทุก species ในกลุ่มนี้ให้ผลเป็นลบในปฏิกิริยา oxidase test แต่ให้ผลเป็นบวกในปฏิกิริยา catalase test สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลชนิดอื่นๆ หลายชนิดแตกต่างกันไปแต่ละ species (Schaad *et al.*, 2001)

กลไกการทำลายพืชของเชื้อชนิดนี้คือ การสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์พืชทำให้เซลล์พืชหลุดสลาย และปลดปล่อยสารอาหารออกมา หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะใช้สารอาหารเหล่านั้นในการเจริญเติบโต เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายเซลล์พืชมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น pectinase, cellulases และ proteases เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเกิดโรคคือ pectinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย pectin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ primary cell wall และ meddle lamella (Pérombelon, 2002) เอนไซม์ pectinase ได้แก่ Pectate lyase (Pel), Pectin lyase (Pnl), Pectin methylesterase (Pme) และ Polygalacturonase (Peh) แต่ Pectate lyase เป็นเอนไซม์หลักที่ทำให้เกิดโรค (Collmer and Keen, 1986) เชื้อ soft rot Erwinias เข้าทำลายพืชโดยผ่านทางบาดแผล หรือช่องเปิดทางธรรมชาติ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะเกิดโรคกับพืช นอกจากนี้เชื้อยังมีการติดเชื้อแบบ latent infection ในหัวมันฝรั่งทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อ และจะเข้าทำลายเมื่อพืชอ่อนแอ จึงเรียกได้ว่าเป็น opportunistic pathogens (Pérombelon & Kelman, 1980) พืชอาศัยในกลุ่มเชื้อ *Erwinia* โดยเชื้อ Ecc เกิดโรคกับพืชได้หลายชนิด ส่วน Eca เกิดโรคกับมันฝรั่ง เนื่องจากว่ามีปัจจัยทางด้านนิเวศวิทยา ที่เอื้ออำนวยให้เชื้ออยู่รอดข้ามฤดู บนส่วนขยายพันธุ์ในแถบเขตหนาว ตรงกัน

ข้ามกับ Ech ที่สามารถเกิดโรคในพืชหลายชนิดในเขตร้อน และเขตอบอุ่น สร้างความเสียหายให้แก่พืชปลูกในเขตร้อน โดยสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อเป็น biovars , serovar และ pathovar ได้ หลายสายพันธุ์ เมื่อนำมาจัดกลุ่มแล้วพบว่ามีพืชอาศัยที่เหมือนกัน จึงยากในการจัดแบ่งให้เชื้อจำเพาะกับพืชแต่ละชนิด (Young *et al.,* 1992) เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีเฉพาะเชื้อ Eca และ Ech เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค black leg ในมันฝรั่ง แต่ว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดสามารถทำให้เกิดโรคเน่าเละในหัวมันฝรั่งได้ (Pérombelon and Kelman, 1987)

2. โรคเน่าเละของผักต่างๆ

โรคเน่าเละของผักต่างๆ (soft rot) มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ผู้ที่พบและรายงานเกี่ยวกับโรคนี้คนแรก คือ L.R. Jones และให้ชื่อเชื้อในขณะนั้นว่า *Bacillus carotovorus* ต่อมาได้มีผู้สนใจทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกหลายท่าน โรคเน่าเละจัดได้ว่าเป็นโรคที่อยู่ในกลุ่มของโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งของพืชผัก เป็นโรคที่เกิดขึ้นทั่วไปในทุกท้องถิ่นที่มีการปลูกผัก โดยเฉพาะหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะสร้างความเสียหายให้กับพืชผักอย่างรุนแรง ทำให้พืชผักต่าง ๆ เป็นโรคเน่าเละ เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม ผักกาดขาว ผักกวางตุ้ง ผักกาดเขียวปลี ผักกาดหอม บร็อคโคลี่ คื่นฉ่าย แครอท ผักกาดหัว แตงร้าน แตงกวา ฟัก แฟง สคว๊อทซ์ ฟักทอง มะเขือยาว มะเขือเทศ ถั่วแขก ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว หอมใหญ่ มันเทศ มันฝรั่ง ข้าวโพดหวาน หน่อไม้ฝรั่ง โดยโรคจะเกิดขึ้นกับทุกส่วนที่เป็นเนื้ออ่อน และอวบน้ำของผักเหล่านี้ (ศักดิ์, 2537) ลักษณะอาการโรคเน่าเละโดยในระยะแรกพบเป็นจุดมีลักษณะฉ่ำน้ำคล้ายรอยช้ำ ต่อมาบริเวณนี้จะขยายลุกลามออกไปทำให้เกิดการเน่าเละ มีกลิ่นเหม็นฉุน (สมศิริ, 2532) ในผักหัว เช่น แครอท ผักกาดหัว กะหล่ำปม หากเกิดโรคขึ้นในแปลงปลูก จะสังเกตเห็นส่วนยอดของต้น หรือใบมีลักษณะเหลือง ต้นเหี่ยวและตายในที่สุด ในผลมะเขือเทศถ้าเกิดโรคกับผลสุกขณะที่ยังอยู่บนต้น เนื้อภายในจะถูกทำลายเละหมดแม้ว่าเปลือก และผิวนอกของผลยังคงลักษณะอยู่ สำหรับกะหล่ำดอกหรือบร็อคโคลีในแปลงปลูก โรคมักจะเกิดตรงส่วนของต้นระหว่างใบกับช่อดอกโดยจะเกิดเป็นแผลช้ำ และเน่าเป็นสีน้ำตาล เมื่อเอามือไปจับต้นจะหักหลุดขาดออกมาโดยง่าย ส่วนกะหล่ำปลี และผักกาดขาวปลี โรคจะเกิดขึ้นกับส่วนของก้านใบหรือใบที่ห่อ หัวชั้นนอกสุดก่อน แล้วลุกลามเข้าไปภายในหัว ผักกาดขาวหรือผักกาดเขียวปลีส่วนใหญ่โรคจะเกิดตรงโคนใบที่ติดกับต้นตรงระดับดิน อาการแรกที่จะเห็นได้คือ ต้นพืชจะเหี่ยวฟุบลงอย่างรวดเร็วทั้งที่ใบยังเขียวอยู่ เมื่อใช้มือจับดึงต้นเพียงเบาๆ ก็จะขาดหลุดติดมือขึ้นมาอย่างง่ายดาย เพราะเนื้อเยื่อตรงส่วนโคนถูกทำลาย (ศักดิ์, 2537)

2.1 การแพร่ระบาด

การแพร่ระบาดของโรคนี้ในประเทศไทย น่าจะเกิดจากการมีเชื้อสาเหตุโรคสะสมอยู่ในดินบริเวณแหล่งปลูกพืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีผักที่อ่อนแอต่อโรค เชื้อที่อาศัยอยู่ในดินสามารถเพิ่มปริมาณ และก่อให้เกิดโรคแก่พืชได้ เมื่อมีต้นพืชเป็นโรคอยู่ในแปลง แม้เพียง 1-2 ต้น จะกลายเป็นแหล่งของเชื้อพร้อมที่จะแพร่ระบาดทั้งแปลงโดยแบคทีเรียสาเหตุโรคจะเข้าสู่พืชทางบาดแผล ตัวการที่ทำให้เกิดแผลมักเป็นหนอนต่างๆ เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก ถ้าในแปลงผักมีหนอนเหล่านี้มาก จะทำให้เชื้อเข้าสู่พืชได้ดีและทำให้โรคแพร่ระบาดได้มากขึ้น (ศักดิ์, 2537)

2.2 การป้องกันกำจัด

วิธีลดความเสียหายและป้องกันกำจัด โรคเน่าเละที่เกิดจากแบคทีเรีย คือ การหมั่นสังเกตดูแลเอาใจใส่แปลง และเมื่อพบต้นใดแสดงอาการ ให้รีบเก็บทำลายทันทีที่เห็นโดยนำไปทิ้งให้ไกลจากแปลงปลูกหรือฝังดินลึกๆ หรือเผาไฟให้หมด หลังจากเก็บเกี่ยวพืชผลแล้วควรเก็บเศษซากพืชทำลาย ตลอดจนเก็บซากพืชออกจากแปลงปลูกให้หมดโดยเฉพาะหลังจากเกิดโรคขึ้น ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้ออาศัยอยู่ในเศษซากพืชจนถึงการปลูกในช่วงต่อไปได้ ขณะที่แปลงปลูกว่างอยู่ควรขุดหรือไถพลิกกลับหน้าดินขึ้นมาตากแดด 2-3 ครั้ง โดยทิ้งระยะเวลาห่างกันพอสมควรหรือหากเป็นไปได้ควรจะเปลี่ยนชนิดของพืชปลูก ไม่ควรปลูกผักชนิดเดียวกันกับพืชที่เคยเป็นโรคหรือง่ายต่อการเกิดโรคซ้ำลงในแปลงเดิม และไม่ควรปลูกผักแน่นหรือเบียดกันมากเกินไป การรดน้ำหรือให้น้ำกับต้นพืชควรให้เป็นเวลา และให้พอเพียงในครั้งเดียว ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหรือกระทำการใดๆ ต่อต้นพืชควรระวังอย่าให้เกิดแผลหรือเกิดการฉีกขาดในส่วนของพืชโดยไม่จำเป็น ภาชนะที่ใช้บรรจุควรจะใหม่หรือต้องสะอาดปราศจากเชื้อติดอยู่ ในการขนส่งจากไร่หรือแปลงปลูก ไม่ควรวางภาชนะที่บรรจุซ้อนทับกันหลายชั้น ควรมีไม้วางขวางกั้นระหว่างชั้นเพื่อลดการเกิดบาดแผลระหว่างการขนส่ง การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคควรจะเป็นวิธีสุดท้ายในกรณีที่ใช้วิธีอื่นแล้วไม่ได้ผล (ศักดิ์, 2537)

สำหรับการใช้เชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ Erwinias ช่อทิพย์ (2538) รายงานว่า การควบคุมโรคเน่าเละของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือนโดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ NK-T03 สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ soft rot erwinias โดยมีต้นกล้ามันฝรั่งตายเพียง 8.3 เปอร์เซ็นต์

3. โรคต้นแห้งตายของขนุน

โรคต้นแห้งตายหรือโรคทรุดโทรมในขนุน พบว่าอาการเริ่มแรกยางไหลออกมาจากกิ่งหรือลำต้น เมื่อถากเปลือกไม้บริเวณที่มียางไหลออกมาจะเห็นบริเวณด้านในของเปลือกเป็นสีน้ำตาลเข้ม ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ลึก 1 มิลลิเมตร เนื้อไม้ใต้เปลือกพบริ้วสีน้ำตาลเช่นกัน ผลร่วง ใบเปลี่ยนเป็นสีส้มและร่วง กิ่งและลำต้นแห้งตาย ต้นขนุนที่ถูกเชื้อเข้าทำลายอาจไม่ตาย แต่ถ้ามีอาการรุนแรงมากจะทำให้ต้นตายได้ในที่สุด หากมีการบำรุงรักษาดี พบว่ามีการสร้างเปลือกใหม่และให้ผลผลิตได้ภายหลังจากการสร้างเปลือกใหม่ (เสมอใจ และ บรรหาร, 2533; ณัฏฐิมา และคณะ, 2536) จากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี พบว่ามีลักษณะรูปร่างท่อนตรง ขนาด 0.5 - 1.0 x 1.0 - 3.0 ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้หางแบบ peritrichous ติดสีแกรมลบ จัดเป็นพวก facultative anaerobe ปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิเดสเป็นลบ แต่คะตะเลสเป็นบวก เจริญเติบโตได้ใน 5 เปอร์เซ็นต์ NaCl และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin สามารถย่อยชิ้นมันฝรั่ง แตงกวา แครอท และผักกาดขาวได้ สามารถใช้ pectate โดยทำให้เกิดหลุมบนอาหาร CVP ได้ (รุ่งรัตน์, 2548) เมื่อจัดจำแนกเชื้อโดยระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) พบว่าเป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) (รุ่งรัตน์, 2548; นิโลบล, 2548) โดย ณัฏฐิมา และคณะ (2536) รายงานว่าเชื้อมีคุณสมบัติจัดอยู่ในกลุ่ม Ecc สาเหตุโรคเน่าเละของผักต่างๆ แต่มีคุณสมบัติที่สำคัญบางประการที่แตกต่าง ได้แก่ ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล cellobiose สามารถใช้ malonate, galacturonate และ tartrate ได้ รวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้าขนุน (ณัฏฐิมา และคณะ, 2539 ; รุ่งรัตน์, 2548; นิโลบล, 2548) นอกจากนี้ รุ่งรัตน์ (2548) ได้พัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อ Ecc โดยพบว่าวิธีการ ELISA สามารถตรวจให้ผลความไวต่อเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ระดับ 6×10^2 เซลล์/มิลิลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบดังกล่าวใช้เชื้อบริสุทธิ์ และไม่ได้ทดสอบกับเชื้อในตัวอย่างธรรมชาติ ซึ่งอาจจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการตรวจจากตัวอย่างพืชลงลดได้ เนื่องจากในตัวอย่างธรรมชาติ อาจจะมีปัจจัยอื่นๆ มาเกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณเชื้อมีน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ และสารในพืชที่มีผลต่อการตรวจ นอกจากการพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยา นิโลบล (2548) ได้ออกแบบไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจสอบยีน *pel* ของเชื้อ Ecc ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคต้นแห้งตายในขนุน และสาเหตุโรคเน่าเละในผัก และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างธรรมชาติ พบว่า การเตรียมตัวอย่างตรวจควรทำการเจือจางน้ำคั้นที่เตรียมได้ในอาหารเหลว PE-PGA (อาหารเหลวที่เติม polygalacturonic acid) ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้มากขึ้น และทำให้มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ Ecc เนื่องจากในชิ้นขนุนมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดยวิธีการ

เหมาะที่สุดคือเขย่าแยกเชื้อจากชิ้นพืช 1 กรัม ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดน้ำที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร ไปเจือจางในอาหารเหลว PE-PGA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกเชื้อสาเหตุได้มากที่สุด 10^7 CFU/มิลลิลิตร และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน ของยีน *pel* ของเชื้อ Ecc สาเหตุโรคแห้งตายของขนุนเหมือนกับ *pel*C ของเชื้อ Ecc สาเหตุโรคเน่าเละผัก

4. การจัดจำแนกเชื้อ *Erwinia carotovora*

แบคทีเรียในสกุล *Erwinia* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae จัดอยู่ใน 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม amylovora group และ carotovora group ภายในกลุ่ม carotovora ประกอบด้วย *E. carotovora* และ *E. chrysanthemi* ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ทำให้พืชเกิดอาการเน่า จนกระทั่งปี 1981 *E. carotovora* ได้แบ่งเป็น 2 subspecies คือ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าเละกับพืชหลายชนิดในโรงเก็บ และ *E. carotovora* subsp. *atroseptica* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในระบบท่อลำเลียงพืช เช่น โรค black-leg ของมันฝรั่ง ปัจจุบันจำนวนของ subspecies ใหม่ได้เพิ่มมากขึ้น คือ *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* สาเหตุโรคเน่าเละของ sugar beet, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* ที่แยกเชื้อได้จาก horseradish ในประเทศญี่ปุ่น เชื้อนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคเน่าเละกับผักอีกหลายชนิด และ *E. carotovora* subsp. *odorrifera* สาเหตุโรคเน่าเละของกระเทียมและผักชี (Avrova *et al.*, 2002)

หลังจากนั้นในปี 1998 Hauben และคณะ จัดจำแนกเชื้อ *E. carotovora* และ *E. chrysanthemi* ใหม่โดยศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA สามารถจัดจำแนก และบอกความสัมพันธ์ระหว่าง species ในกลุ่มของเชื้อ *Erwinia* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อในสกุล *Erwinia* ควรจะแบ่งเป็น 4 สกุล คือ *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* และ *Brenneria* ซึ่งในสกุล *Erwinia* มี 6 species ประกอบด้วย *E. amylovora*, *E. mallotivova*, *E. persicina*, *E. psidii*, *E. rhapontici* และ *E. tracheiphila* ส่วนสกุล *Pectobacterium* มี 4 species ประกอบด้วย *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. cacticida* และ *E. pypripedii* ส่วนสกุล *Brenneria* มี 6 species ประกอบด้วย *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. parodisiaca*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* และ *E. salicis* ส่วนสกุล *Pantoea* มี 5 species ประกอบด้วย *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. milletiae*, *E. stewartii* และ *E. uredovora* แม้ว่าชื่อของ *Pectobacterium* สามารถใช้แทนชื่อ *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละแล้วก็ตามแต่นักโรคพืชที่ศึกษาเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ยังไม่นิยมใช้ และอ้างอิงชื่อ *Erwinia* มากกว่า (Avrova *et al.*,

2002) และยังคงใช้การจัดจำแนกเชื้อในสกุล *Erwinia* โดยใช้ลักษณะ biochemical และ physiological (Schaad *et al*., 2001)

เนื่องจากเชื้อ Ecc มีพืชอาศัยที่กว้างจึงมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างภายในกลุ่มเชื้อ Ecc ที่เกิดโรคในพืชต่างๆ ดังเช่น Seo *et al.* (2002) ได้ทดสอบเชื้อ Ecc จำนวน 87 สายพันธุ์จาก 3 ประเทศ คือ ญี่ปุ่น, เกาหลี, และ ไทย มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย คุณสมบัติทางพันธุกรรมและ การเกิดโรคกับพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ มันฝรั่ง, มะเขือเทศ, หอมหัวใหญ่ และ แตงกวา จากผลการทดสอบการเกิดโรคบนพืชทดสอบแบ่งเชื้อ Ecc ได้ 4 กลุ่ม อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ของเชื้อ ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI เมื่อวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เชื้อ Ecc สายพันธุ์จากประเทศเกาหลี และญี่ปุ่น และกลุ่มที่ 2 เชื้อสายพันธุ์ที่นำมาจากเมืองไทย ในขณะที่ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของ *pel* gene แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ *Sau*3AI แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อทั้ง 86 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ขณะที่เชื้อเพียง 1 สายพันธุ์ที่แยกมาจากโรคยอดเน่าของหม่อนมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไปจึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งต่อมา Seo *et al.* (2004) ได้รายงานว่าเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากหม่อนสามารถแบ่งได้เป็น 2 type จากผลการวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากหม่อน และเชื้อ Ecc ที่เป็น type strain โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) และการศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เทคนิค (RAPD)

5. เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP)

เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่พัฒนาโดย Vos *et al.* (1995) ซึ่งมีพื้นฐานของเทคนิคคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (ภาพที่ 1) เทคนิค AFLP ให้ลักษณะลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ไม่ขึ้นกับขนาด และความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ผลได้ โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ (สุรินทร์, 2543) ปัจจุบันเทคนิค AFLP ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาคุณลักษณะทางจีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิต เช่น นำมาศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่ของจีโนมได้ โดยมีข้อดีกว่าเทคนิคอื่น คือ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ไม่ต้องใช้ข้อมูลลำดับเบสของ

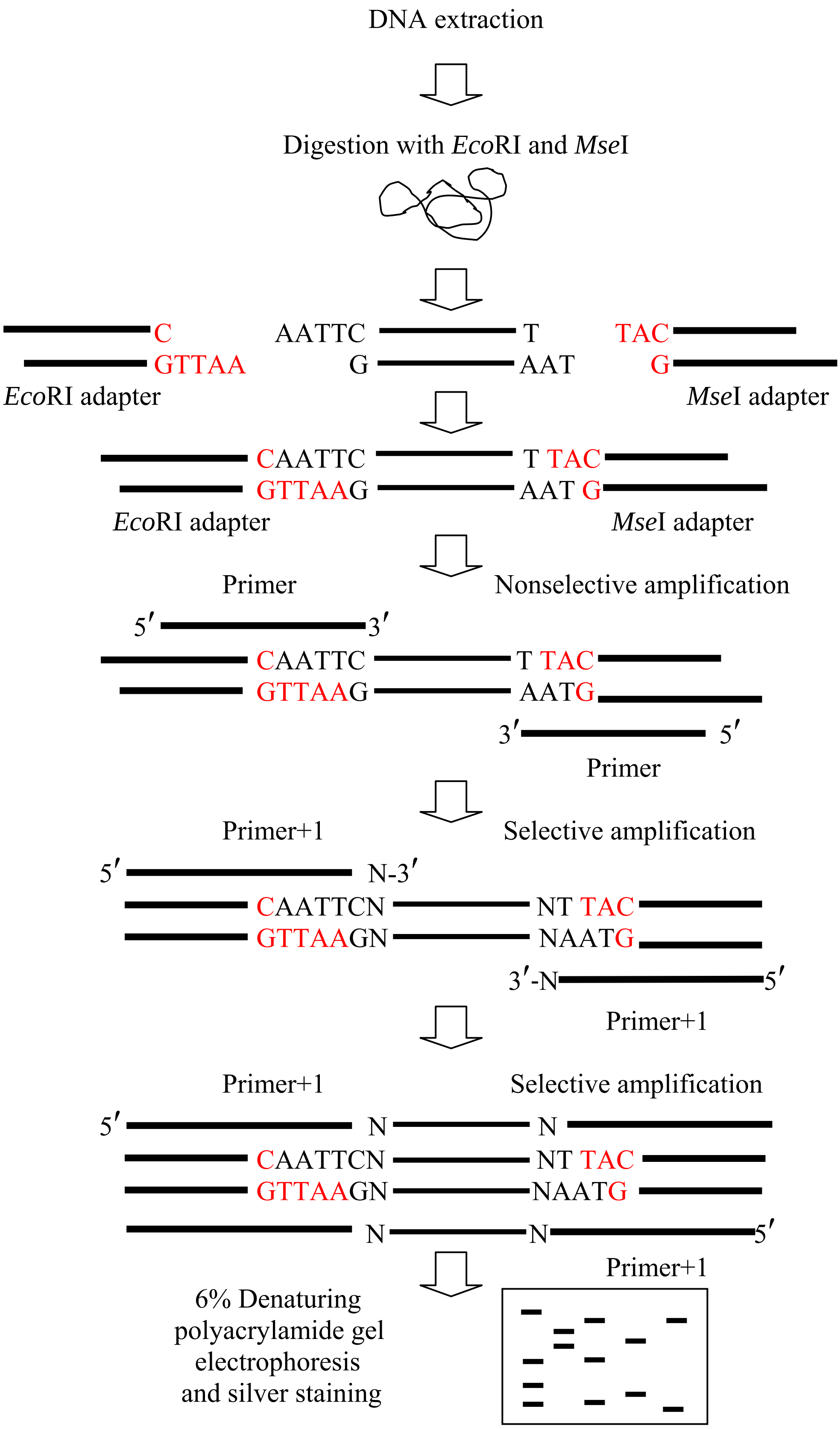
ดีเอ็นเอ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย การทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multi-loci) นอกจากนี้เทคนิค AFLP ยังทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี (สุรินทร์, 2545)

6. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค AFLP

สำหรับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค AFLP องค์ประกอบที่สำคัญคือ การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมกับเปอร์เซ็นต์ GC content ในจีโนมของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา (ตารางที่ 1) เนื่องมาจากชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะเป็นตัวกำหนดขนาด และจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสม ดังเห็นได้จากการศึกษาของ Janssen *et al*. (1996)

การใช้เทคนิค AFLP ในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม soft rot ของเชื้อ *Erwinia carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* จากการวิเคราะห์สามารถจัดจำแนกเชื้อได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. carotovora* subsp. *odorifera* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *E. carotovora* subsp. *atroseptica* และ *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *E. carotovora* subsp. *wasabiae* และ *E. chrysanthemi* ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงในเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ของ *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ขณะที่สายพันธุต่างๆ ของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *odorifera*, *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* และ *E. carotovora* subsp. *wasabiae* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของการแพร่กระจาย และพืชอาศัย นอกจากนี้ยังพบว่าผลการจัดกลุ่มเชื้อที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค AFLP ให้รายละเอียดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีกว่าเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อ *Erwinia* ที่อยู่ใน กลุ่ม soft rot (Avrova *et al.,* 2002)

นอกจากนี้มีการศึกษาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) สาเหตุของโรคใบไหม้ มันสำปะหลังด้วยเทคนิค AFLP เปรียบเทียบกับเทคนิค RFLP พบว่าทั้งสองเทคนิคสามารถตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อได้ถึงระดับ strain แต่ AFLP ให้รายละเอียดความสัมพันธ์ทางจีโนไทป์ระหว่าง Xam ได้ดีกว่า (Restrepo *et al*., 1999)



ภาพที่ 1 แผนภาพเทคนิค AFLP (Vos *et al*., 1995)

ตารางที่ 1 ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียต่างๆ โดยเทคนิค AFLP

สกุลเชื้อแบคทีเรีย	G+C content (mol%)	ชนิดของเอนไซม์
Clostridium	24-54	-
beijerinckii	26-28	*Eco*RI/*Mse*I
acetobutylicum	28-29	*Eco*RI/*Mse*I
Bacillus	32-69	-
thuringiensis	34	*Eco*RI/*Mse*I
cereus	36	*Eco*RI/*Mse*I
larvae	42	*Eco*RI/*Mse*I
Acinetobacter	38-47	*Eco*RI/*Mse*I
		*Hin*dIII/*Taq*I
Vibrio	40-50	*Hin*dIII/*Taq*I
		*Apa*I/*Taq*I
Aeromonas	57-63	*Apa*I/*Taq*I
		*Eco*RI/*Mse*I
Pseudomonas	58-68	*Apa*I/*Taq*I
Xanthomonas	63-71	*Apa*I/*Taq*I
		*Eco*RI/*Mse*I

ที่มา: Janssen *et al.* (1996)

7. การศึกษาวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลด้วยเทคนิค *In silico*

In silico มาจากคำว่า in the silicon chip หมายถึง กระทำในคอมพิวเตอร์ หรือ จำลองโดยใช้คอมพิวเตอร์ คำว่า *In silico* ใช้ครั้งแรกในปี 1989 ในงานอบรมเชิงปฏิบัติการ " Cellular Automata: Theory and Applications" ใน Los Alamos รัฐนิวเม็กซิโก สหรัฐอเมริกา ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค *In silico* analysis มาใช้ในการคาดคะเน (prediction) ผลการทดลอง โดยใช้คอมพิวเตอร์กับข้อมูลด้านอณูชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตและเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะข้อมูลลำดับเบสที่นำมาศึกษา จำลองการทดลอง โดยประมวลผลการทดลองด้วยระบบคอมพิวเตอร์

เมื่อจำนวนข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียมีเพิ่มขึ้น ความต้องการโปรแกรมเฉพาะทางที่จะใช้ประโยชน์จากจากฐานข้อมูลลำดับเบสจึงมีมากขึ้นตามลำดับ อาทิเช่นโปรแกรม *In silico* AFLP ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีทั้งจำหน่ายเป็นการค้า และไม่คิดค่าใช้จ่าย ดังเช่นโปรแกรม AFLPinSilico (http://intra.psb.ugent.be:8080/bioinformatics/AFLPinSilico.html), *In silico* AFLP (http://insilico.ehu.es/AFLP/), ALFIE (http://bioinfosoftware.phls.org.uk/aflp.html) ส่วนโปรแกรม RemComb และ In-silico AFLP (http://www.keygene.com) เป็นโปรแกรมที่มีจำหน่ายเป็นการค้า

โปรแกรม *In silico* AFLP พัฒนาขึ้นโดย Bikandi *et al.* (2004) เป็นโปรแกรมสร้างแบบจำลองเทคนิค AFLP ที่สามารถทำการทดลองผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ตได้ โดยมีฐานข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชิวิตหลายชนิดรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีรวบรวมไว้กว่า 100 ชนิด โดยข้อมูลเหล่านี้ได้มาจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) และประกอบเข้ากับฐานข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาจาก Roberts *et al.* (2003) การจำลองการทดลองเทคนิค AFLP ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP แสดงผลผ่านทางระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ตในระยะเวลาเพียง 1 - 2 นาที โดยผลที่แสดงเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ที่วิเคราะห์บนอะคริลาไมด์เจล และให้รายละเอียดจำนวนชิ้น ขนาด และลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้ ทำให้นักวิจัย สามารถวางแผนการทดลองก่อนทำการทดลอง ช่วยลดจำนวนของการทดลองก่อนทำในห้องปฏิบัติการจริง (Rombauts *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แบคทีเรียสาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุนและโรคเน่าเละของผัก

เชื้อ *Erwinia carotovora* ทั้ง 37 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษานี้ ได้รับจาก ณัฏฐิมา และคณะ (2536), กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, นิโลบล (2548) และ รุ่งรัตน์ (2548) และจากการเก็บแยกเชื้อสาเหตุจากผักต่างๆ ที่เป็นโรคเน่าเละเนื่องจากเชื้อ Ecc ในพื้นที่ปลูกผักหลายแหล่ง (ตารางที่ 2) โดยสายพันธุ์เชื้อทั้งหมดที่ทำการศึกษานี้ ได้นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษายืนยันว่าเป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* โดยเชื้อมีคุณสมบัติสามารถทำให้พืชทดสอบมีอาการเน่าเละ เป็นเชื้อแกรมลบ รูปร่าง rod shape ขนาดประมาณ 0.5-1.0 x 1.0-3.0 ไมครอน มีคุณสมบัติเป็น facultative anaerobic bacteria และทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่จำเพาะในส่วนของ *pel* gene (นิโลบล, 2548) โดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae คือ เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC1596 (นิโลบล, 2548) และ เชื้อ *Erwinia chrysanthemi* ซึ่งมีลักษณะการเกิดโรคเน่าเละเหมือนกับเชื้อ Ecc จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ ECH1680 และ 1076-1 แบคทีเรียซาโปรไฟท์ที่มีอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อม คือ เชื้อ *Pantoea dispersa* และเชื้อแบคทีเรียวงศ์ Pseudomonadaceae สาเหตุโรคเหี่ยวของพืช คือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) จำนวน 1 สายพันธุ์ นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 2 และ 5)

2. การทดสอบยืนยันเชื้อ Ecc

ทดสอบคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคเน่าเละกับพืชทดสอบ รูปร่างลักษณะโคโลนี รูปร่างของเชื้อ คุณสมบัติการติดสีแกรม ด้วย 3% KOH การเป็น facultative anaerobic bacteria การตรวจหายีน *pel* (pectate lyase) เชื้อ Ecc โดยเทคนิค PCR และการตรวจจำแนกยืนยันจากการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต 95 ชนิด ด้วยระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA)โดยวิเคราะห์จำแนกตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

2.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่ประกอบด้วย beef extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม, agar 15 กรัม ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร (Schaad *et al.*, 2001) เตรียมสารแขวนลอยเชื้อโดยใช้น้ำกลั่น นำไปวัดปรับค่า optical density (O.D.) หรือค่า

ดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรให้มีค่า 0.2 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อ Ecc จำนวน 10^8 CFU/มิลลิลิตร (รุ่งรัตน์, 2548) นำสารแขวนลอยเชื้อไปทดสอบการเกิดโรค กับพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ ชิ้นแตงกวา (cucumber slice) และกาบใบผักกาดขาวปลี โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรบนชิ้นแตงกวาที่ผ่านการล้างทำความสะอาดฆ่าเชื้อพื้นผิวผลด้วย 0.6% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ก่อนนำผลแตงกวามาหั่นตามขวางเป็นชิ้นหนาขนาด 1 เซนติเมตร นำไปบ่มในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตรวจบันทึกผลการทดลอง

การทดสอบการเกิดอาการเน่าและบนกาบใบผักกาดขาวปลี ใช้วิธีการดัดแปลงมาจาก Ahmed (2001) โดยล้างฆ่าเชื้อที่พื้นผิวกาบใบผักกาดขาวด้วย 0.6% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ผึ่งให้แห้งในตู้เขี่ยเชื้อ หั่นกาบใบผักกาดขาวตามขวาง เป็นชิ้นๆ ละประมาณ 3 เซนติเมตร ดูดสารแขวนลอยเชื้อทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตรด้วย automatic pipette และนำ pipette tip ที่มีสารแขวนลอยเชื้อปักค้างบนกาบใบผักกาดขาวปลีเพื่อทำให้เกิดแผล และให้สารแขวนลอยเชื้อเข้าไปในเนื้อเยื่อผักกาดขาว หลังจากนั้นบ่มในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคกับพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละ คือ Ecc สายพันธุ์ VECC1596 และเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรคเน่าเละคือ เชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) ตรวจบันทึกผลการทดลอง

2.2 รูปร่างลักษณะโคโลนีของเชื้อ

นำเชื้อทดสอบที่บริสุทธิ์มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูลักษณะรูปร่าง ขนาด สี ของโคโลนีบันทึกผลการทดลอง (Schaad *et al.*, 2001)

2.3 รูปร่าง และการติดสีแกรมของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาย้อมสีตามวิธีการของแกรม ตรวจดูการติดสีแกรม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และดูขนาด และรูปร่าง (วิชัย, 2537; Schaad *et al.*, 2001) นอกจากการย้อมดูการติดสีแกรมแล้วยังมีการทดสอบด้วยสารละลาย 3% KOH โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเมื่อนำเชื้อมากวนบนหยดสารละลาย 3% KOH

ด้วยไม้จิ้มฟันที่สะอาด KOH จะมีผลต่อผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตก ทำให้สายดีเอ็นเอของเชื้อติดกับไม้จิ้มฟัน และ มีลักษณะเป็นเมือก ยืดเป็นสายได้ (Schaad *et al.*, 2001)

2.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็น facultative anaerobic bacteria

นำเชื้อทดสอบเลี้ยงบนอาหาร Huge and Leifson's medium ที่ประกอบด้วย peptone 10 กรัม, NaCl 5 กรัม, K_2HPO_4 0.3 กรัม, bromthymol blue 0.03 กรัม และ agar 3 กรัม (Schaad *et al.*, 2001) โดยใช้ stab inoculation เชื้อละ 2 หลอด โดยอีกหลอดหนึ่งเททับด้วย paraffin oil ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 - 2 มิลลิลิตร หลังจากปลูกเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหาร และการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารทั้งสองหลอด เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็น facultative anaerobic bacteria คือเชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC1596 และเชื้อที่เป็น aerobic bacteria คือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) (วิชัย, 2537; Schaad *et al.*, 2001)

2.5 การตรวจหายีน pectate lyase (*pel*) ด้วยเทคนิค PCR

โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการตรวจยีน *pel* ที่จำเพาะต่อเชื้อ Ecc (นิโลบล, 2548) ด้วยคู่ไพรเมอร์ FER1 (5'-CGGGGGGTTATGCCACCACTG-3') และ RER-1 (5'-GTTTGTCCTTCACGCACTGTGC-3') โดยปฏิกิริยา PCR ที่ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอจากเชื้อทดสอบ 100 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40), 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 Unit *Taq* polymerase (Fermentas, Maryland, USA) และไพรเมอร์ FER1 และ RER-1 อย่างละ 1 μM โดยการทดลองจะใส่ไพรเมอร์ควบคุมร่วม เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ปฏิกิริยา PCR (internal control primer) คือไพรเมอร์ fD2 (5′-CCGAATTCGTCGACAACAGACTTTGATCATGGCTCAG-3′) และ rP1 (5′-CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) ที่ใช้ในการตรวจยีน 16S rDNA (Weisburg *et al.,* 1990) นำหลอดที่ใส่ปฏิกิริยา PCR ใส่ลงในเครื่อง Thermocycler (T-personal, Biometra GmbH, Gottingen, Germany) โดยตั้งการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิตามการทดลองของนิโลบล (2548) ดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 นาที
ขั้นที่ 5 ทำซ้ำ ขั้นที่ 2 ถึง 4 จำนวน 25 รอบ
ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

นำผลผลิตการขยายยีน (PCR products) ไปตรวจวิเคราะห์โดยแยกบนอะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส ย้อมดูแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต บันทึกผลการทดลอง

2.6 การตรวจจำแนกเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต

การตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของเชื้อโดยทดสอบในอาหารสำเร็จรูป GN2 (Biolog, Inc., CA, USA) โดยทดสอบตามคำแนะนำของผู้ผลิต ซึ่งมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญมาเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียโดยละลายใน inoculum fluid (IF) ปรับค่าความเข้มข้นของเชื้อตามคำแนะนำ โดยวัดด้วยเครื่อง Biolog turbidimeter ให้มีค่าแสงส่องผ่าน (transmittance, T) เป็น 63 เปอร์เซ็นต์ นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเติมลงในหลุมอาหาร GN2 หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลค่าการใช้แหล่งคาร์บอนด้วย spectrophotometer (Micrologᵀᴹ System) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเชื่อมโยงกับคอมพิวเตอร์ที่มีฐานข้อมูลเชื้อ และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Microlog Version 4.2 (Biolog, Inc., Hayward, USA) ในการวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรีย

3. การตรวจวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP

3.1 การศึกษาวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Erwinia carotovora* เพื่อเลือกใช้เอนไซม์ และไพรเมอร์สำหรับ AFLP โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลด้วยเทคนิค *In silico* analysis

จากการศึกษาจากฐานข้อมูล Genbank พบว่า เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *cartovora* (Ecc) ยังไม่มีข้อมูลลำดับเบสของจีโนมครบถ้วน เมื่อพิจารณาแบ่ง subspecies ในกลุ่ม

เชื้อ Erwinias พบว่าเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) มีลักษณะการใช้น้ำตาล sorbitol, melibiose, citrate, raffinose, arabitol และ lactose เหมือนกับเชื้อ Ecc แตกต่างกันที่เชื้อ Eca ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Schaad *et al*., 2001) ด้วยเหตุนี้เชื้อ Eca จึงมีความใกล้ชิดกับเชื้อ Ecc มากที่สุด และปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของเชื้อ Eca ทั้งจีโนมแล้ว ดังนั้นจึงนำเชื้อ Eca มาศึกษาด้วยเทคนิค *In silico* analysis แทนเชื้อ Ecc ในการวิเคราะห์เลือกชนิดของเอนไซม์ และลำดับเบสในขั้นตอน selective amplification ซึ่งเชื้อ Eca มีเปอร์เซ็นต์ GC content เท่ากับ 50.97 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ *Apa*I/*Taq*I, *Hin*dIII/*Taq*I และ *Eco*RI/*Mse*I (ตารางที่ 1) จึงนำข้อมูลการเลือกชนิดของเอนไซม์มาร่วมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In silico* analysis บนเว็บไซต์ http://insilco.ehu.es เพื่อเลือกชนิดของเอนไซม์ และลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบ วิเคราะห์ combination โดยขั้นตอนการใช้โปรแกรม *In silico* AFLP ดังแสดงสรุปในภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์จะแสดงที่หน้าเว็บไซต์ ซึ่งโปรแกรมจะจำลองภาพลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp เมื่อผลการวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เกิน 200 แถบ (ภาพที่ 3) และไม่แสดงภาพลักษณะของแถบดีเอ็นเอ เมื่อได้ผลการวิเคราะห์เกิน 200 แถบ (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย พืชอาศัย แหล่งที่เก็บ ปีที่เก็บ และที่มาของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

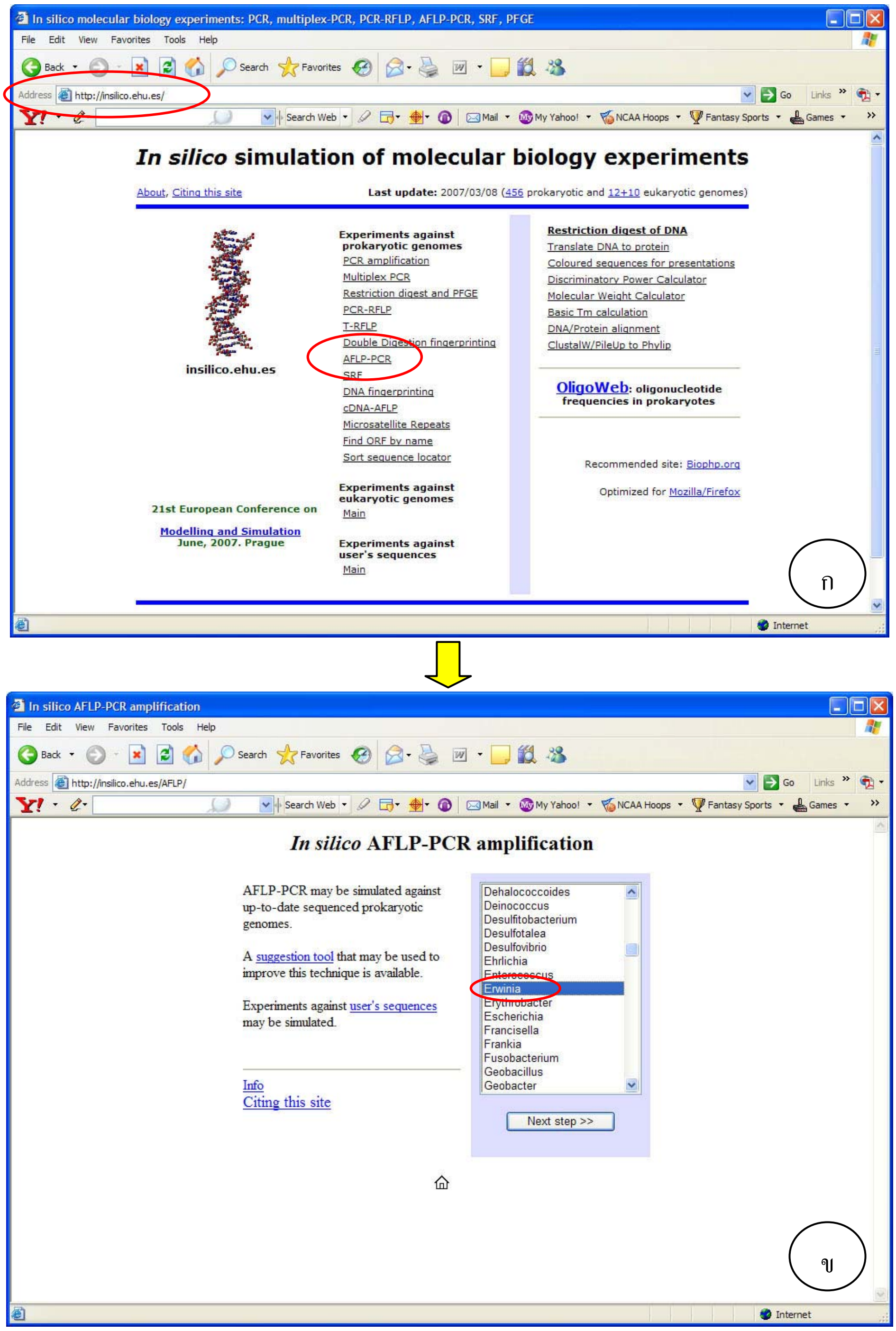
ชื่อสายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่เก็บ	ปีที่เก็บ[2/]	แหล่งที่มาของเชื้อ [1/]
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*				
1408	พริกหยวก	นครราชสีมา	2540	กบว
1428	ผักกาดขาวปลี	เชียงราย	2540	กบว
64-4	มันฝรั่ง	เชียงใหม่	2527	กบว
681-1	หน่อไม้ฝรั่ง	เพชรบูรณ์	2530	กบว
CDOA1028	จำปาดะ	สงขลา	2536	ณัฏฐิมาและคณะ (2536)
CS1006	จำปาดะ	สงขลา	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
CS2001	จำปาดะ	สงขลา	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
CS2003	จำปาดะ	สงขลา	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
CS2004	จำปาดะ	สงขลา	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JDOA1147	ขนุน	ระยอง	2536	ณัฏฐิมาและคณะ (2536)
JK2001	ขนุน	กาญจนบุรี	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JK2005	ขนุน	กาญจนบุรี	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JK2007	ขนุน	กาญจนบุรี	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JK2009	ขนุน	กาญจนบุรี	2546	นิโลบล (2548)
JN2001	ขนุน	นครปฐม	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JN2003	ขนุน	นครปฐม	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JN2004	ขนุน	นครปฐม	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JN2005	ขนุน	นครปฐม	2546	รุ่งรัตน์ (2548)
JN2007	ขนุน	นครปฐม	2546	นิโลบล (2548)
JR2001	ขนุน	ระยอง	2546	นิโลบล (2548)
JR2002	ขนุน	ระยอง	2546	นิโลบล (2548)
VECC1596	ผักกาดหัว	ปราจีนบุรี	2546	นิโลบล (2548)
VECC2000	ผักกาดหอม	อุบล	2549	การศึกษานี้
VECC2001	ผักกาดหอม	อุบล	2549	การศึกษานี้
VECC2002	ผักกาดหอม	อุบล	2549	การศึกษานี้
VECC2003	ผักกาดหอม	อุบล	2549	การศึกษานี้
VECC2004	ผักกาดหอม	นครปฐม	2549	การศึกษานี้
VECC2005	ผักกาดหอม	นครปฐม	2549	การศึกษานี้
VECC2006	มันฝรั่ง	ตาก	2549	การศึกษานี้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่เก็บ	ปีที่เก็บ[2/]	แหล่งที่มาของเชื้อ [1/]
VECC2007	มันฝรั่ง	ตาก	2549	การศึกษานี้
VECC2008	มันฝรั่ง	ตาก	2549	การศึกษานี้
VECC2009	ผักกาดขาวปลี	เชียงใหม่	2549	การศึกษานี้
VECC2010	ผักกาดขาวปลี	เชียงใหม่	2549	การศึกษานี้
VECC2011	ผักกาดขาวปลี	เชียงใหม่	2549	การศึกษานี้
VECC2012	กะหล่ำ	นครราชสีมา	2549	การศึกษานี้
VECC2013	กะหล่ำ	นครราชสีมา	2549	การศึกษานี้
VECC2014	คื่นฉ่าย	เชียงใหม่	2549	การศึกษานี้
Erwinia chrysanthemi (ECH1680)	กล้วยไม้	เชียงราย	2546	นิโลบล (2548)
Erwinia chrysanthemi (1076-1)	มันฝรั่ง	เชียงใหม่	2534	กบว
Pantoea dispersa	ข้าวโพด	นครราชสีมา	2548	จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์ (ติดต่อส่วนตัว)
Ralstonia solanacearum (1295)	ขิง	เชียงราย	-	กบว

[1/] กบว = กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์

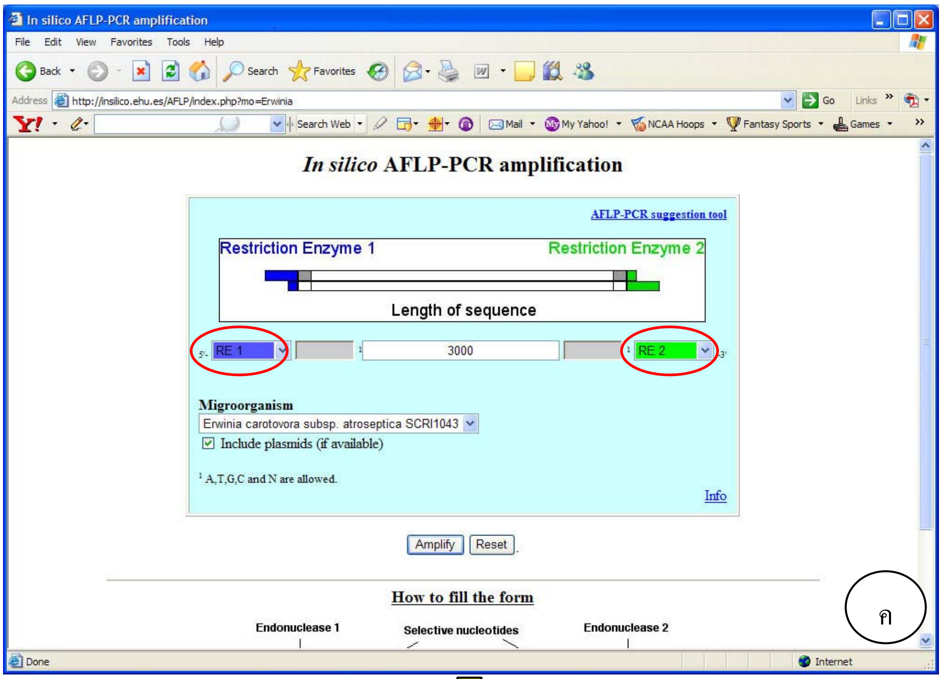
[2/] - = ไม่มีข้อมูล

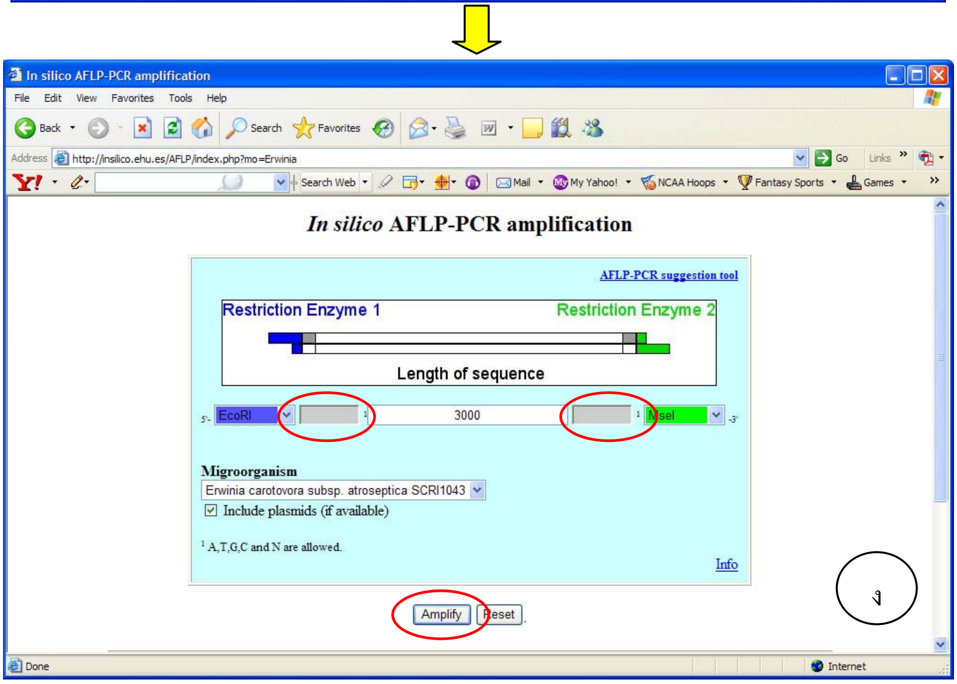


ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการใช้โปรแกรม *In silico* AFLP ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ตทางเว็บไซต์ http://insilico.ehu.es

ก. การพิมพ์ชื่อ http://insilico.ehu.es ในช่อง address เข้าไปสู่หน้าเวปไซต์เลือก AFLP-PCR โดยการคลิกเมาท์ที่ตัวอักษร

ข. การเข้าสู่การเลือกชนิดของจีโนม Prokaryote ที่ต้องการทำ AFLP เลือก *Erwinia*





ภาพที่ 2 (ต่อ)

ค. การเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง

ง. การพิมพ์เบสในขั้นตอน selective amplified ลงในช่องที่ทำสัญลักษณ์วงกลม เมื่อเลือกชนิดของเบสเลือกแล้ว คลิกตรงที่ไอคอน Amplify กำหนด Maximum Length of sequence เป็น 3000 bp

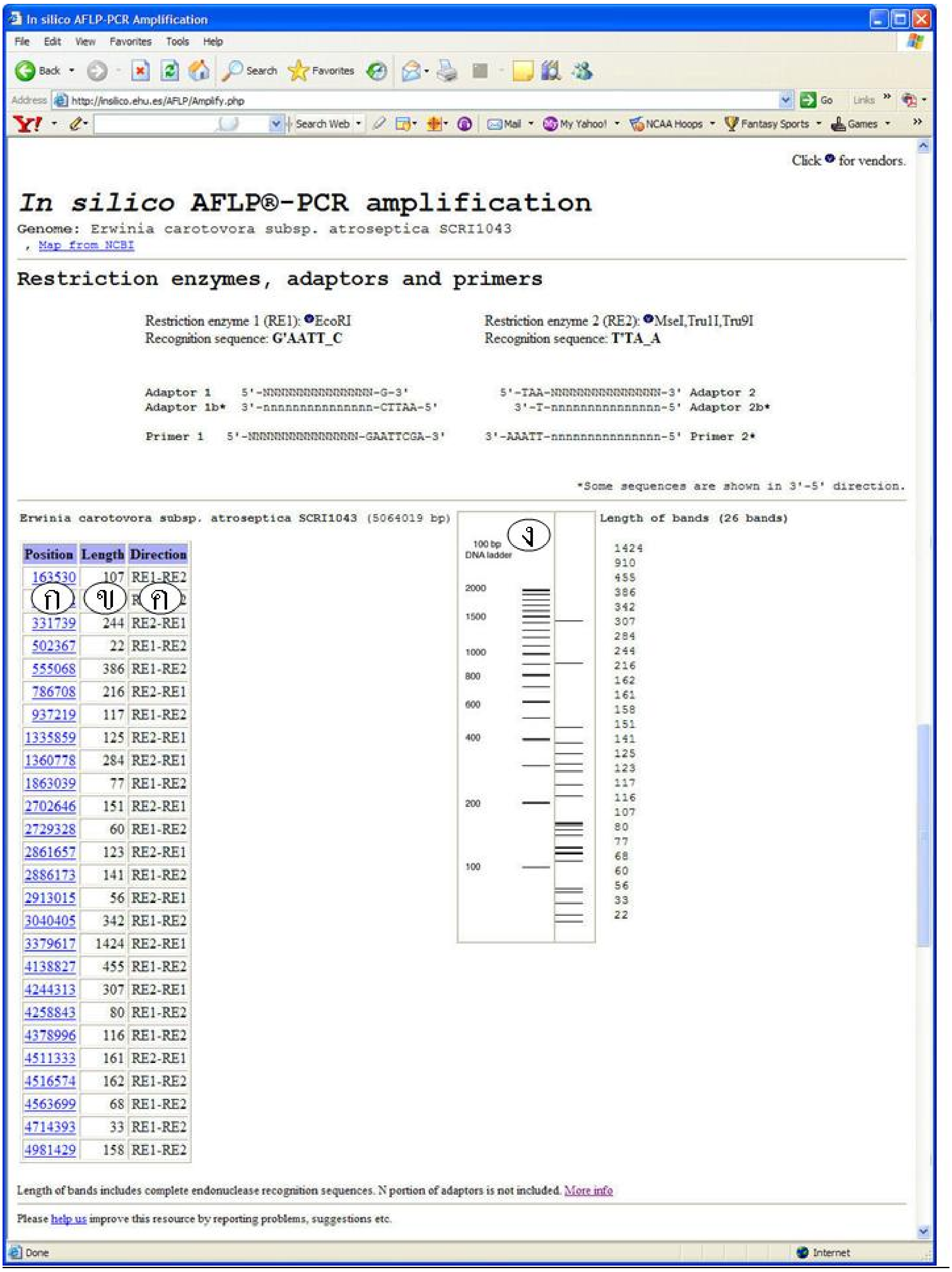
ภาพที่ 3 ตัวอย่างการแสดงผลของโปรแกรม *In silico* AFLP – PCR amplification ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เมื่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนน้อยกว่า 200 แถบ

ก. Position สามารถคลิกเข้าไปดูลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการ วิเคราะห์

ข. Length แสดงจำนวนเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์

ค. Direction แสดงทิศของชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

ง. Length of bands แสดงภาพจำลองแถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder



In silico AFLP-PCR Amplification

File Edit View Favorites Tools Help

Address http://insilico.ehu.es/AFLP/Amplify.php

Click for vendors.

In silico AFLP®-PCR amplification

Genome: Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043
, Map from NCBI

Restriction enzymes, adaptors and primers

Restriction enzyme 1 (RE1): EcoRI
Recognition sequence: **G'AATT_C**

Restriction enzyme 2 (RE2): MseI,Tru1I,Tru9I
Recognition sequence: **T'TA_A**

```
Adaptor 1    5'-NNNNNNNNNNNNNNNN-G-3'           5'-TAA-NNNNNNNNNNNNNNNN-3' Adaptor 2
Adaptor 1b*  3'-nnnnnnnnnnnnnnnn-CTTAA-5'          3'-T-nnnnnnnnnnnnnnnn-5' Adaptor 2b*

Primer 1   5'-NNNNNNNNNNNNNNNN-GAATTCGA-3'     3'-AAATT-nnnnnnnnnnnnnnnn-5' Primer 2*
```

*Some sequences are shown in 3'-5' direction.

Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043 (5064019 bp)

Position	Length	Direction
163530	107	RE1-RE2
ก	ข	ค
331739	244	RE2-RE1
502367	22	RE1-RE2
555068	386	RE1-RE2
786708	216	RE2-RE1
937219	117	RE1-RE2
1335859	125	RE2-RE1
1360778	284	RE2-RE1
1863039	77	RE1-RE2
2702646	151	RE2-RE1
2729328	60	RE1-RE2
2861657	123	RE2-RE1
2886173	141	RE1-RE2
2913015	56	RE2-RE1
3040405	342	RE1-RE2
3379617	1424	RE2-RE1
4138827	455	RE1-RE2
4244313	307	RE2-RE1
4258843	80	RE1-RE2
4378996	116	RE1-RE2
4511333	161	RE2-RE1
4516574	162	RE1-RE2
4563699	68	RE1-RE2
4714393	33	RE1-RE2
4981429	158	RE1-RE2

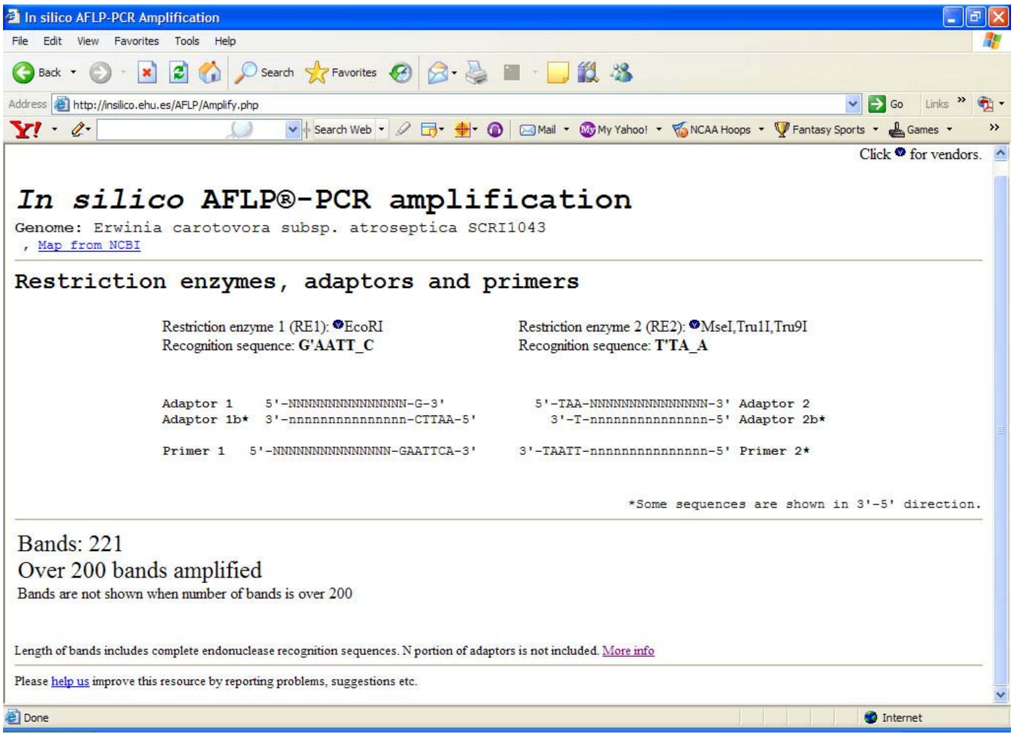
Length of bands (26 bands)

1424
910
455
386
342
307
284
244
216
162
161
158
151
141
125
123
117
116
107
80
77
68
60
56
33
22

Length of bands includes complete endonuclease recognition sequences. N portion of adaptors is not included. More info

Please help us improve this resource by reporting problems, suggestions etc.

Done Internet



ภาพที่ 4 ตัวอย่างการแสดงผลของโปรแกรม *In silico* AFLP – PCR amplification ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เมื่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนมากกว่า 200 แถบ

3.2 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 37 สายพันธุ์ และเชื้อที่นำมาทดสอบร่วมจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยใช้วิธีการดัดแปลงจาก Ausubel *et al.* (1999) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหารเหลว Luria – Bertani (LB) agar (Tryptone 10 กรัม, NaCl 5 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, Agar 15 กรัม และเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร) (Schaad *et al.*, 2001) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนด้วยบัพเฟอร์ TE ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (10 mM Tris•Cl, pH 7.5, EDTA, pH 8.0) เติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ เติม 10% CTAB/ 0.7 M NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) เท่ากับปริมาตรส่วนของเหลวที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที ที่ 9,727 x g แล้วย้ายส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่เติม isopropanol ที่เย็นปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปหมุนเหวี่ยง 1 นาที ที่ 9,727 x g ทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว คว่ำหลอดปล่อยตะกอนทิ้งไว้ให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอในการนำไปใช้ศึกษาต่อ

3.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter

การตัดดีเอ็นเอ และต่อด้วย adapter ดัดแปลงจากวิธีการของ Avrova *et al.* (2002)โดยนำจีโนมิคดีเอ็นเอแบคทีเรียแต่ละเชื้อมา 0.25 ไมโครกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทั้ง *Eco*RI และ *Mse*I ใน OnePhorAll buffer (Amersham Bioscience) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ บ่มไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วย *Eco*RI-adapter และ *Mse*I-adapter (ตารางที่ 3)โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA-ligase ใน OnePhorAll buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ต่อไป

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำ 2 ขั้นตอนคือ nonselective amplification และ selective amplification ใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Vos *et al*. (1995) การทำ nonselective amplification โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.3 มา 2.5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (*Eco*RI-Primer E00 0.2 µM, *Mse*I-Primer M00 0.2 µM, *Taq* polymerase 1 unit, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM และ dNTPs 0.2 mM) (ตารางที่ 4) โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 4 ทำซ้ำขั้นที่ 1 ถึง 3 เป็นจำนวน 30 รอบ

นำ PCR products มาเจือจาง 10 เท่าของปริมาตรด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น template - DNA ในการทำ selective amplification โดยนำปฏิกิริยา nonselective amplification เปลี่ยนไพรเมอร์คัดเลือกให้มีความจำเพาะเจาะจงขึ้น โดยนำ PCR product ที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (*Eco*RI-Primer E19 0.25 µM, *Mse*I-Primer M00 0.25 µM, *Taq* polymerase 0.5 unit, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5mM และ dNTPs 0.2mM) (ตารางที่ 4) ใช้โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 4 ทำซ้ำขั้นที่ 1 ถึงขั้นที่ 3 เป็นจำนวน 12 รอบ แต่ลดอุณหภูมิขั้นที่ 2 ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส
ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 7 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 8 ทำซ้ำขั้นที่ 5 ถึงขั้นที่ 7 เป็นจำนวน 23 รอบ

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ adapter ในเทคนิค AFLP

ลำดับเบส adapter	อ้างอิง
*Eco*RI adapter	
5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′	Vos *et al*. (1995)
5′-AATTGGTACGCAGTC-3′	
*Mse*I adapter	
5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′	Vos *et al*. (1995)
5′-TACTCAGGATCTAT-3′	

ตารางที่ 4 ลำดับเบสไพรเมอร์ในขั้นตอน nonselective amplification และ selective amplification

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง
E00	5′-GACTGCGTACCAATTC-3′	Vos *et al*. (1995)
M00	5′-GATGAGTCCTGTAGTAA-3′	Vos *et al*. (1995)
E19	5′-GACTGCGTACCAATTC**GA**-3′	Avrova *et al*. (2002)
Eco+A	5′-GACTGCGTACCAATTC**A**-3′	-
Eco+T	5′-GACTGCGTACCAATTC**T**-3′	-
Eco+C	5′-GACTGCGTACCAATTC**C**-3′	-
Mse+T	5′-GATGAGTCCTGTAGTAA**T**-3′	-
Mse+A	5′-GATGAGTCCTGTAGTAA**A**-3′	-
Mse+G	5′-GATGAGTCCTGTAGTAA**G**-3′	-
Mse+T	5′-GATGAGTCCTGTAGTAA**T**-3′	-

3.5 การแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด เช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นใหญ่ด้วย Plus One Bind Silane (Amersham Bioscience) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก เช็ดกระจกอีกแผ่นด้วย PlusOne Repel Silane (Amersham Bioscience) เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5 - 10 นาที นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยใช้ด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ หลังจากนั้นเตรียม 6% polyacrylamidgel โดยผสม acrylamide, TBE บัฟเฟอร์, น้ำ และยูเรียให้เข้ากันที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เมื่อยูเรียละลายหมด กรองผ่านเครื่องกรอง จากนั้นจึงเติม 10% APS และ TEMED (ตารางผนวกที่ 1) เทเจลลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หวีลงที่ด้านบนสุดของระดับเจล รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วดึงหวีออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาด 33 x 40 ตารางเซนติเมตร (Life Technologies/Gibco BRL Model S2) เติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงในช่องด้านบน และด้านล่างโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกาะส่วนที่เป็นเจล ทำ pre-run 30 นาที ใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ หลังจากนั้นปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟตรง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างผิวหน้าเจล และยูเรียที่อยู่ช่องหวีแต่ละช่องออกให้หมด หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตรในแต่ละช่อง เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟโดยใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งสีของ xylene cyanol เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออกนำกระจกออกจากเครื่องแยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังนำไปย้อมสีต่อไป

3.6 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีย้อมด้วย silver staining

การย้อมเจลด้วย silver nitrate ดัดแปลงจากวิธีการ DNA Silver Staining System (Promega, Wisconsin, USA) นำกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่สารละลาย fixative (10% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที บนเครื่องเขย่า ย้อมเจลในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.1% silver nitrate) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลจุ่มลงในน้ำกลั่นเพื่อล้างซิลเวอร์ที่มากเกินพอออก นำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาทีจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ลงในสารละลาย

10% acetic acid เป็นเวลา 3-5 นาที จุ่มลงในน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งในอากาศ โดยขั้นตอนเทคนิค AFLP สรุปดังภาพที่ 5

3.7 การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP

นำโพลีอะคริลาไมด์เจลที่แห้งแล้วมาสแกนภาพ ด้วยเครื่องสแกนให้อยู่ในรูปแบบ jpeg ไฟล์ นำไปวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools (Syngene, Cambridge, U.K.) เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ Ecc ในแต่ละสายพันธุ์ โดยพิจารณาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม โดยโปรแกรมจะตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มและความสว่างในแต่ละ lane ของไฟล์ภาพ แล้วทำให้อยู่ในรูปแบบของกราฟในแต่ละ lane เมื่อโปรแกรมตรวจพบแถบดีเอ็นเอภายใน lane ระดับ peak ของกราฟจะสูงขึ้น และจะต่ำลงเมื่อเป็นบริเวณที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอ โดยมีพารามิเตอร์ที่กำหนดการตรวจนับดีเอ็นเอ ดังนี้ เลือกวิธีการ (Method) เป็น Rolling Disk กำหนดให้ตรวจนับแถบดีเอเอ็นที่มีฐาน peak กว้างอย่างน้อย 8 pixels (Rolling Disk Width), กำหนดให้ตรวจนับแถบดีเอ็นเอมีความกว้างมากกว่า 2 pixels (Minimum peak Width), กำหนดให้ตรวจนับแถบดีเอ็นเอมีความสูงมากกว่า 1 (Minimum peak height), กำหนดให้ตรวจนับแถบดีเอ็นเอที่ระดับเปอร์เซ็นต์ของ peak ไม่ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ของ peak ทั้งหมดใน lane (Minimum peak volume) และกำหนดให้ตรวจนับค่าของแต่ละ peak ให้มีความกว้างเท่ากันทุก peak คือ 3 (All peaks same width) ดังแสดงในภาพที่ 6

เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ทดสอบโดยกำหนดแถบดีเอ็นเอให้เป็น binary data คือให้การปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น “1” และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น “0” หาความสัมพันธ์และสร้างเดนโดแกรม โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ Dice (1945) และมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages clustering (UPGMA) (Sokal and Michener, 1958) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS) version 2.20e (Rohlf, 1993) วิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม WinBoot (Yap and Nelson, 1996) จำนวน 1000 ซ้ำ

4. การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด

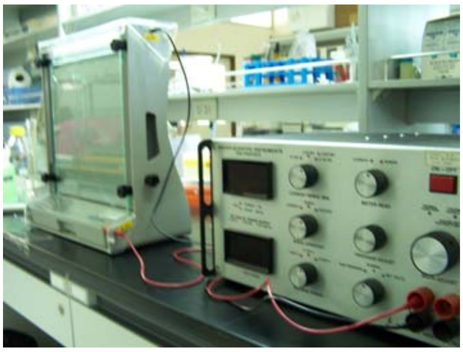
นำข้อมูลจากวิธีการข้อ 1.6 มาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อทดสอบ จากการใช้แหล่งคาร์บอนจำนวน 95 ชนิด ในถาดหลุมอาหาร GN2 ดังแสดงชนิดของแหล่งคาร์บอนในภาพ

ผนวกที่ 1 โดยเตรียมเชื้อทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรีย ดังได้กล่าวข้างต้น หลังจากบ่มเชื้อที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำถาดหลุมอาหารไปตรวจปฏิกิริยา โดยใช้ spectrophotometer (Microlog™ System) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ทดสอบโดยกำหนดให้เป็น binary data คือ เมื่อเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้มีค่าเป็น “1” และเมื่อเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้มีค่าเป็น “0” หาความสัมพันธ์และสร้างเดนโดแกรม โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ Dice (1945) และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method arithmetic averages clustering (UPGMA) (Sokal and Michener, 1958) สร้างเดนโดแกรมด้วย Numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS) version 2.20e (Rohlf, 1993)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์

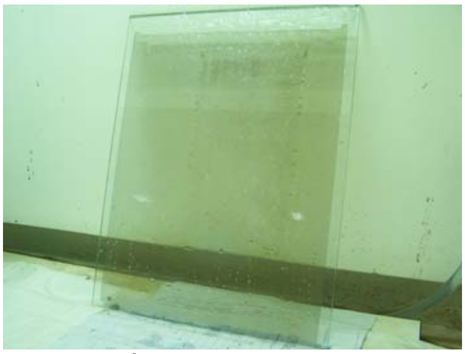
เตรียม genomic DNA

AFLP-PCR amplification



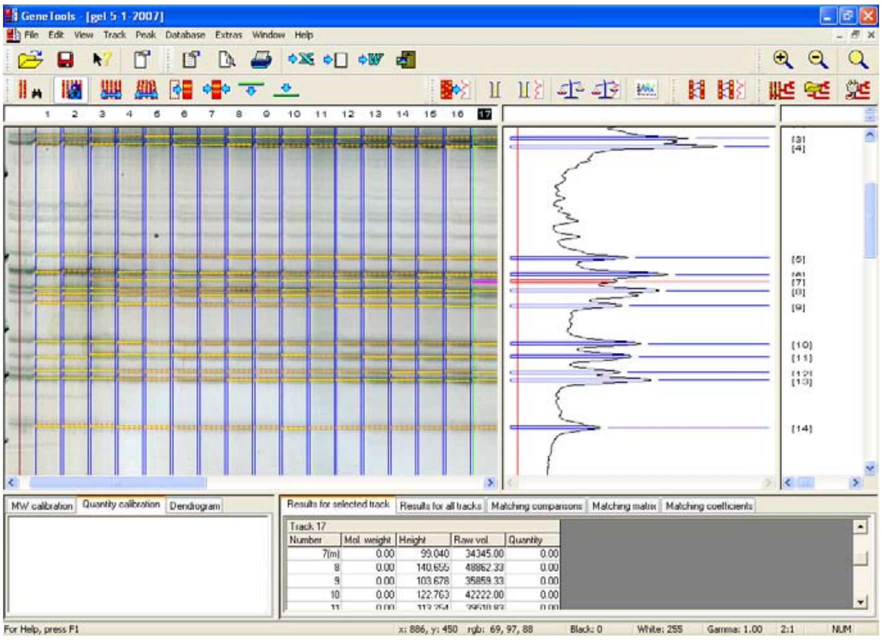
แยกแถบดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธี silver staining



AFLP gel ที่พร้อมนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ภาพที่ 5 ขั้นตอนการศึกษาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 6 โปรแกรม Gene Tools (Syngene, Cambridge, U.K.) ในการนับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากโพลีอะครีลาไมด์เจล

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก

จากตัวอย่างโรคเน่าเละของผักในแหล่งปลูกจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ ตาก นครราชสีมา อุบลราชธานี นครปฐม ดังตารางที่ 2 มาแยกเชื้อ ทดสอบจำแนกเชื้อโดยคุณลักษณะที่สำคัญ แยกเชื้อ Ecc ได้จำนวน 20 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 5 ส่วนเชื้อ Ecc สาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุน จำนวน 17 สายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ณัฏฐิมา และคณะ (2536), นิโลบล (2548) และ รุ่งรัตน์ (2548) โดยเชื้อทั้งหมดนำมาทดสอบยืนยันคุณสมบัติต่างๆ ที่สำคัญของเชื้อ Ecc ให้ผลดังนี้

2. การทดสอบยืนยันเชื้อ Ecc

2.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนชิ้นแตงกวา และผักกาดขาว พบว่าเชื้อ Ecc สายพันธุ์ที่แยกมาจากขนุน และผักเน่าเละ รวมทั้งเชื้อ Ech สามารถทำให้พืชทดสอบเกิดอาการเน่าเละได้ หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงอาการเน่าคล้ำสีน้ำตาล (ภาพที่ 7 ง และ จ) แต่เชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบ คือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) ไม่ทำให้ชิ้นแตงกวา และผักกาดขาวเน่าเละ เหมือนกับการทดสอบด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2.2 รูปร่างลักษณะโคโลนีของเชื้อ

จากการนำผักเน่าเละมาแยกเชื้อ บนอาหาร NA ที่บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบโคโลนีเชื้อที่มีลักษณะโตช้า สีขาวครีม ค่อนข้างกลม ขอบหยักเล็กน้อย ไม่เป็นมันเยิ้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 7 ก) เหมือนกับเชื้อ สายพันธุ์ VECC1596 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จัดจำแนกด้วยระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) แล้วว่าเป็นเชื้อ Ecc (นิโลบล, 2548)

2.3 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อ

แบคทีเรียแกรมลบเมื่อนำมากวนกับสารละลาย 3% KOH จะเกิดเมือกเนียวติดลูป (ตารางที่ 5) ตรงกันข้ามกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นตัวอย่างเชื้อแกรมบวกเปรียบเทียบ ไม่เกิดเมือกเหนียว และเซลล์ย้อมติดสีแดงของ safranin-o เชื้อ Ecc มีรูปร่างแบบท่อนตรง ขนาดประมาณ 0.5-1.0 x 1.0-3.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7 ข) ได้แก่เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผัก และขนุน (ตารางที่ 2)

2.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็น facultative anaerobic bacteria

เชื้อ Ecc เป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศ และไร้อากาศ (facultative anaerobic bacteria) เมื่อทดสอบกับอาหาร Huge and Leifson’s medium โดยใช้ stab inoculation เชื้อละ 2 หลอด โดยอีกหลอดหนึ่งจะเททับด้วย paraffin oil ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1-2 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิดสภาพที่ไร้อากาศ หลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมงพบว่าอาหารทั้ง 2 หลอด เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อทดสอบทั้ง 37 สายพันธุ์ และเชื้อ Ech จำนวน 2 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติเป็น facultative anaerobic bacteria เจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศ และไร้อากาศ (ภาพที่ 7 ค) ส่วนเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในหลอดอาหารที่เททับด้วย paraffin oil เนื่องจากว่าเชื้อมีคุณสมบัติเป็น aerobic bacteria อาหารจึงมีสีเขียว

2.5 การตรวจหายีน Pectate lyase (*pel*) ด้วยเทคนิค PCR

จากการตรวจหายีน *pel* โดยปฏิกิริยา PCR เชื้อ Ecc ทั้ง 37 สายพันธุ์ ด้วยคู่ไพร์เมอร์ FER-1 และ RER-1 ที่จำเพาะต่อเชื้อ Ecc ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (นิโลบล, 2548) และกับคู่ไพรเมอร์ fD2 และ rP1 ที่ใช้ในการตรวจยีน 16S rDNA (Weisburg *et al*., 1990) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (ภาพที่ 8) ส่วนเชื้อ Ech ไม่ให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเมื่อใช้ไพรเมอร์ FER-1 และ RER-1 (ตารางที่ 5) แต่ให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายกับไพรเมอร์ fD2 และ rP1 ซึ่งใช้ในการขยายยีน 16S rDNA

2.6 การตรวจจำแนกเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต

เนื่องจากการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) อาศัยการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด กับเชื้อที่เป็น type strain ที่มีในฐานข้อมูลในโปรแกรม Micrlog Version 4.2 (Biolog, Inc., Hayward, USA) จากการตรวจจำแนกเชื้อจากแหล่งคาร์บอนโดยใช้ถาดอาหาร GN2 (ภาพผนวกที่ 1) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อ และวิเคราะห์ จัดจำแนกชนิดเชื้อตัวอย่าง โดยให้ค่าความเหมือนกับการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ type strain ในฐานข้อมูล (similarity index value) ค่าลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมือนกับเชื้อ type strain ในฐานข้อมูล (distance) และค่าความเป็นไปได้เมื่อเทียบกับเชื้อ type stain ที่มีในฐานข้อมูล (%Probability) เมื่อตรวจจำแนกเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอน เชื้อบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากผักเน่าเละ พบว่าเป็นเชื้อ Ecc คือ เชื้อสายพันธุ์ VECC2001, VECC2014 และ VECC1596 ส่วนเชื้อที่แยกมาจากขนุนบางสายพันธุ์ พบว่าเป็นเชื้อ Ecc เช่นเดียวกัน คือ สายพันธุ์ CDOA1028, CDOA1147, JN2001, JN2005 ส่วนเชื้อ Ech คือ เชื้อสายพันธุ์ 1076-1 และ ECH1680 (ตารางที่ 6) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจหายีน *pel* ด้วยเทคนิค PCR (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สายพันธุ์ต่างๆ ในด้านการติดสีแกรม ความสามารถในการทำให้เกิดโรค และการมี *pel* gene

ชื่อสายพันธุ์	การติดสีแกรม	อาการเน่าและแตงกวา[1/]	อาการเน่าและผักกาดขาว[2/]	*pel* gene[3/]
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*				
1408	ลบ	+	+	+
1428	ลบ	+	+	+
64-4	ลบ	+	+	+
681-1	ลบ	+	+	+
CDOA1028	ลบ	+	+	+
CS1006	ลบ	+	+	+
CS2001	ลบ	+	+	+
CS2003	ลบ	+	+	+
CS2004	ลบ	+	+	+
JDOA1147	ลบ	+	+	+
JK2001	ลบ	+	+	+
JK2005	ลบ	+	+	+
JK2007	ลบ	+	+	+
JK2009	ลบ	+	+	+
JN2001	ลบ	+	+	+
JN2003	ลบ	+	+	+
JN2004	ลบ	+	+	+
JN2005	ลบ	+	+	+
JN2007	ลบ	+	+	+
JR2001	ลบ	+	+	+
JR2002	ลบ	+	+	+
VECC1596	ลบ	+	+	+
VECC2000	ลบ	+	+	+
VECC2001	ลบ	+	+	+
VECC2002	ลบ	+	+	+
VECC2003	ลบ	+	+	+
VECC2004	ลบ	+	+	+
VECC2005	ลบ	+	+	+
VECC2006	ลบ	+	+	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

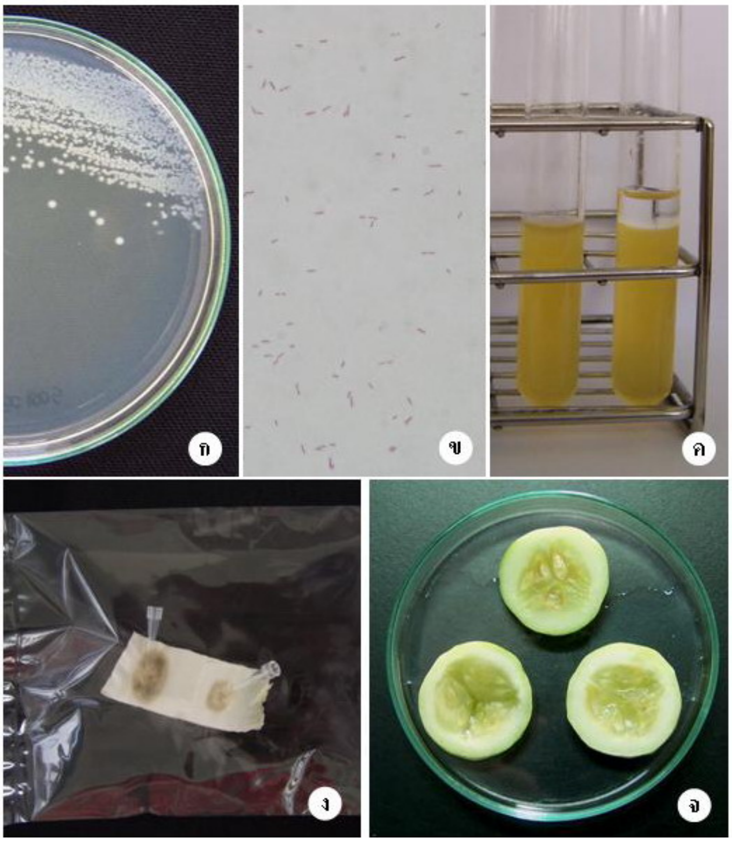
ชื่อสายพันธุ์	การติดสีแกรม	อาการเน่าและแตงกวา[1/]	อาการเน่าและผักกาดขาว[2/]	*pel* gene[3/]
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*				
VECC2007	ลบ	+	+	+
VECC2008	ลบ	+	+	+
VECC2009	ลบ	+	+	+
VECC2010	ลบ	+	+	+
VECC2011	ลบ	+	+	+
VECC2012	ลบ	+	+	+
VECC2013	ลบ	+	+	+
VECC2014	ลบ	+	+	+
E. chrysanthemi (ECH1680)	ลบ	+	+	-
E. chrysanthemi (1076-1)	ลบ	+	+	-
Pantoea dispersa	ลบ	ND	ND	ND
Ralstonia solanacearum (1295)	ลบ	-	-	-

[1/] + สามารถทำให้เกิดโรคเน่าและบนชิ้นแตงกวา, - ไม่สามารถทำให้เกิดโรคเน่าและบนชิ้นแตงกวา

[2/] + สามารถทำให้เกิดโรคเน่าและผักกาดขาว, - ไม่สามารถทำให้เกิดโรคเน่าและกับผักกาดขาว

[3/] + ให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ Ecc, - ไม่ให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ Ecc

ND = not determined



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การสร้าง pectolytic enzyme ย่อยชิ้นแตงกวา ความสามารถเกิดโรคเน่าเละบนผักกาดขาว และคุณสมบัติการเป็น facultative anaerobic bacteria ของเชื้อแบคทีเรีย

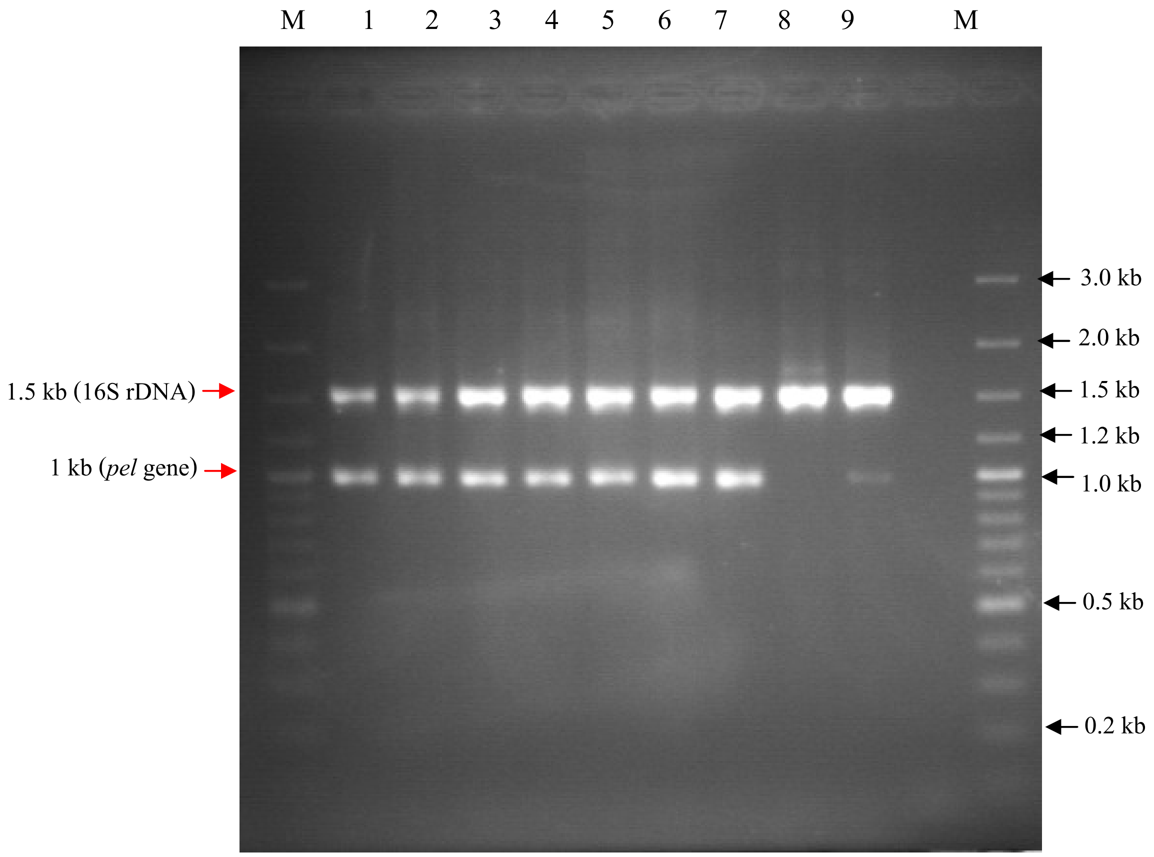
ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* บนอาหาร Nutrient agar (NA)

ข. การติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากโรคเน่าเละของผัก อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร NA

ค. การเจริญในสภาพที่มีอากาศ และไร้อากาศ (facultative anaerobic bacteria) ในอาหาร Oxidative/Fermentative medium

ง. การทดสอบการเกิดโรคเน่าเละบนกาบใบผักกาดขาวปลี

จ. การทดสอบการเกิดโรคเน่าเละของชิ้นแตงกวา



ภาพที่ 8 การตรวจสอบเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละที่แยกได้จากผักด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจยีน *pel* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย และมี 16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายกับเชื้อแบคทีเรีย

Lane M 100 bp standard DNA marker

Lane 1 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2001

Lane 2 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2004

Lane 3 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2012

Lane 4 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2014

Lane 5 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2007

Lane 6 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC2009

Lane 7 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ VECC1596

Lane 8 *E. chrysnthemi* สายพันธุ์ ECH1680

Lane 9 เชื้อ Ecc สายพันธุ์ 681-1

ตารางที่ 6 ผลการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. ที่นำมาทดสอบจากการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตด้วยระบบ BIOLOG System

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ผลการจัดจำแนก	ค่า similarity[1/]	ค่า distance[2/]	%Probability[3/]
VECC2001	Ecc	0.74	3.75	99
VECC2014	Ecc	0.77	3.47	100
VECC1596	Ecc	0.67	4.62	96
CDOA1028	Ecc	0.50	8.04	100
CDOA1147	Ecc	0.58	6.50	100
JN2001	Ecc	0.51	7.76	100
JN2005	Ecc	0.50	8.04	100
JK2005	Ecc	0.56	7.00	100
1076-1	Ech	0.75	3.71	100
ECH1680	Ech	0.70	4.48	99

Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Ech = *E. chrysanthemi*

[1/] ค่า similarity คือ ค่าความเหมือนกับการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ type strain ในฐานข้อมูล

[2/] ค่า distance คือ ค่าลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมือนกับเชื้อ type strain ในฐานข้อมูล

[3/] % Probability คือ ค่าความเป็นไปได้เมื่อเทียบกับเชื้อ type stain ที่มีในฐานข้อมูล

3. การตรวจวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP

3.1 การวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Erwinia carotovora* เพื่อเลือกใช้เอนไซม์ และไพรเมอร์สำหรับ AFLP โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลด้วยเทคนิค *In silico* analysis

จากการวิเคราะห์คู่เอนไซม์และไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) ที่จะนำมาใช้ในเทคนิค AFLP กับเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP พบว่าการเพิ่มเบสคัดเลือกด้านปลาย 3′ ของไพรเมอร์ในขั้นตอน selective amplification มีส่วนสำคัญต่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะได้จากการทดลอง AFLP หากพิจารณาจากคู่ของเอนไซม์แต่ละคู่ และเบสคัดเลือกของไพรเมอร์ในขั้นตอน selective amplification ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 100-200 แถบ (ตารางผนวกที่ 2-7) ซึ่งเป็นจำนวนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบนอะครีลาไมด์เจล พบว่ามีคู่เอนไซม์และไพรเมอร์โดยใช้เอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบ ได้ 11 คู่ไพรเมอร์ซึ่งมากกว่าคู่เอนไซม์ชนิดอื่น (ตารางที่ 7) สำหรับคู่เอนไซม์และไพรเมอร์อื่นๆ ที่เลือกมาทำการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่แนะนำตามตารางที่ 1 พบว่ามีคู่เอนไซม์และไพรเมอร์อีกหลายคู่มีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบดังที่แสดงไว้ตารางที่ 7 หลังจากนั้นเลือกคู่เอนไซม์ *Eco*RI กับ *Mse*I และไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ โดยเลือก 4 คู่ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอกระจายอยู่ในช่วง 100-200 แถบ ได้แก่ Eco+A/Mse+T, Eco+T/Mse+A, Eco+T/Mse+G และ Eco+C/Mse+T และไพรเมอร์ที่มีการรายงานใช้จัดจำแนกเชื้อ Ecc คือ Eco+GA (E19)/Mse+0 (M00) (Avrova *et al.,* 2002) มาทดสอบจริงกับเชื้อ Ecc สายพันธุ์ JK2001 และ VECC1596 ที่แยกได้จากขนุนและผักกาดหัวตามลำดับ (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบในการการทดสอบ *In silico* analysis

คู่เอนไซม์	คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบ	จำนวนคู่
*Eco*RI + *Mse*I	Eco+GA/Mse+0, Eco+C/Mse+A, Eco+G/Mse+A, Eco+T/Mse+A, Eco+C/Mse+G, Eco+G/Mse+G, Eco+T/Mse+G, Eco+A/Mse+T, Eco+C/Mse+T, Eco+T/Mse+T	11
*Eco*RI + *Taq*I	Eco+G/Taq+A, Eco+T/Taq+A, Eco+A/Taq+C, Eco+A/Taq+G, Eco+C/Taq+G, Eco+G/Taq+G, Eco+A/Taq+T, Eco+C/Taq+T, Eco+G/Taq+T	9
*Apa*I + *Mse*I	Apa+G/Mse+0	1
*Apa*I + *Taq*I	Apa+G/Mse+0, Apa+0/Mse+A	2
*Hin*dIII + *Mse*I	Hin+A/Mse+0, Hin+T/Mse+A, Hin+0/Mse+C, Hin+T/Mse+T	4
*Hin*dIII + *Taq*I	Hin+C/Taq+A, Hin+G/Taq+A, Hin+T/Taq+A, Hin+0/Taq+C	4

3.2 การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และคู่ไพรเมอร์ในขั้นตอน selective amplification ของเทคนิค AFLP

จากการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ กับเชื้อ Ecc สายพันธุ์ JK2001 และ VECC1596 ที่แยกได้จากขนุนและผักกาดหัวตามลำดับ บนอะคริลาไมด์เจล (ภาพที่ 9) พบว่า คู่ไพรเมอร์ Eco+GA (E19) กับ Mse+0 (M00) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 87 แถบ รองลงมา คือ คู่ไพรเมอร์ Eco+C กับ Mse+G ได้ 80 แถบ และน้อยที่สุดคือ คู่ไพรเมอร์ Eco+A กับ Mse+T ได้ 52 แถบ (ตารางที่ 8) ขณะที่การวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ Eca ด้วย *In silico* analysis จากคู่ไพร์เมอร์ E19 และ M00 มีจำนวนดีเอ็นเอ 113 แถบ คู่ไพรเมอร์ Eco+C กับ Mse+G ได้ 149 แถบ และคู่ไพรเมอร์ Eco+A กับ Mse+T ได้ 185 แถบ (ตารางที่ 8) ส่วนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) ระหว่างเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ E19 และ M00 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากที่สุดคือ 61 แถบ และมีเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากกว่าไพร์เมอร์คู่อื่น (ตารางที่ 8)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากผลการทดลองคู่ไพรเมอร์ M00 (Mse+0) และ E19 (Eco+GA) ในขั้นตอนของ selective amplification กับเชื้อ Ecc จำนวน 2 สายพันธุ์ได้ผลดีกว่าไพรเมอร์คู่อื่น (ตารางที่ 8) จึงได้นำเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I กับ ไพรเมอร์ E19 และ M00 มาใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ Ecc จำนวน 37 สายพันธุ์, เชื้อ Ech (ECH1680 และ 1076 -1), เชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) และเชื้อ *Pantoea dispersa* ซึ่งผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบนเจลพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด 102 แถบ (ภาพที่ 10)

3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ Ecc ด้วยเทคนิค AFLP

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ Ecc สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากขนุนและผักเน่า เมื่อพิจารณาที่ค่า similarity 0.42 (ภาพที่ 10) สามารถ แบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรก ประกอบด้วย กลุ่มเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากขนุน และกลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากผักเน่า โดยเชื้อกลุ่มแรกที่แยกได้จากขนุนมีลักษณะทางจีโนไทป์ที่ใกล้ชิดกันเนื่องจากมีค่า similarity อยู่ที่ระหว่าง 0.92-1.00 ตรงกันข้ามกับเชื้อกลุ่มที่สองที่แยกได้จากผักพบว่า สายพันธุ์เชื้อมีลักษณะทางจีโนไทป์ที่แตกต่างและมีค่า similarity ตั้งแต่ 0.43 จนถึง 1.00

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า similarity ที่ 0.92 พบว่าเชื้อภายในกลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่เชื้อสายพันธุ์ JK2009 และ JDOA1147 ส่วนกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ JN2001, JN2003, JN2004, JN2005, JN2007, CS2003, CS2001, CS2001, CS2004, CDOA1028, CS1006, JK2001, JK2005, JK2007, JR2001 และ JR2002 เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธุ์ระหว่างแหล่งที่มาในกลุ่มย่อย พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บ เนื่องจากเชื้อในกลุ่มย่อยที่ 1 เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากขนุนในจังหวัด กาญจนบุรีและระยองตามลำดับ ส่วนในกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ JK2001, JK2005 และ JK2007 เป็นเชื้อที่แยกมาจากจังหวัดกาญจนบุรี ส่วนเชื้อสายพันธุ์ JR2001 และ JR2002 เป็นเชื้อที่แยกมาจากจังหวัดระยองเช่นกัน ดังนั้นภายในกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีเชื้อสายพันธุ์ที่แยกมาจากจังหวัดเดียวกันอยู่ภายในกลุ่ม และการแบ่งกลุ่มย่อยจึงไม่เกี่ยวข้องกับแหล่งที่มา (ภาพที่ 10)

สำหรับการจัดกลุ่มย่อยของเชื้อ Ecc กลุ่มที่ 2 ที่แยกได้จากผัก เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของเชื้อกับพืชอาศัยที่ค่า similarity 0.8 พบว่า เชื้อที่แยกได้จากผักกาดหอมจังหวัดอุบลราชธานี ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ VECC2000, VECC2001, VECC2002 และ VECC2003 และจังหวัดนครปฐม ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ VECC2004 และ VECC2005 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเชื้อที่แยกมาจากมันฝรั่งจังหวัดตากจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด ดังนั้นการจัดกลุ่มของเชื้อจึงมีความสัมพันธ์กับชนิดของพืชอาศัย และเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของเชื้อกับแหล่งที่เก็บตัวอย่าง พบว่า เชื้อที่แยกมาจากคื่นฉ่าย จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ VECC2014 จัดอยู่ต่างกลุ่มกันกับเชื้อที่แยกมาจากผักกาดขาวปลี จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ VECC2009, VECC2010 และ VECC2011 ดังนั้นการจัดกลุ่มย่อยของเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากผักเน่าจึงไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บที่ค่า similarity 0.8

จากภาพที่ 10 พบว่า ปฏิกิริยา AFLP-PCR amplification นอกจากจะแยกเชื้อ Ecc จากขนุนออกจาก Ecc จากผักได้อย่างชัดเจน ยังพบมีแถบดีเอ็นเอที่พบจาก Ecc ขนุนที่แตกต่างไปจากที่พบใน Ecc ของพืชผัก ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นคู่ไพรเมอร์ที่อาจให้ความเฉพาะเจาะจงกับการตรวจ Ecc สายพันธุ์ขนุนอย่างรวดเร็วโดยวิธี PCR และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเหล่านี้อาจเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต้นแห้งตายในขนุน ซึ่งเป็นส่วนที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ เพื่อดูถึงความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่อไป

4. การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด

เนื่องจากการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นลักษณะทางจีโนไทป์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ ที่แยกได้จากผักเน่า และขนุนแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจนที่ค่า similarity 0.42 ซึ่งมีความแตกต่างมาก จึงนำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิดเพื่อศึกษาความแตกต่างของลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากผักเน่าและขนุน และเชื้อ Ech จำนวน 2 สายพันธุ์คือ ECH1680 และ1076-1 และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ค่า similarity 0.43 มีเชื้อสายพันธุ์ VECC2014 ที่แยกได้จากคื่นฉ่ายจังหวัดเชียงใหม่ไม่เข้ากลุ่มภายในกลุ่มผัก จึงนำมาเปรียบเทียบลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อกับเชื้อสายพันธุ์ VECC1596 และเชื้อ VECC2001 ที่แยกได้จากผักกาดหอม จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มใหญ่ในกลุ่มผักเน่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากขนุนที่ค่า similarity 0.92 เชื้อสายพันธุ์ JDOA1147 และสายพันธุ์ JK2009 แยกออกมาจากกลุ่มเชื้อที่แยกมาจากขนุนเป็นกลุ่มย่อยที่ 1 และเชื้ออีก 15 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 จึงนำเชื้อสายพันธุ์ JDOA1147 มาศึกษาลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิดเปรียบเทียบกับเชื้อบางสายพันธุ์ในกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่เชื้อสายพันธุ์ CDOA1028, JN2001, JN2005 และJK2005

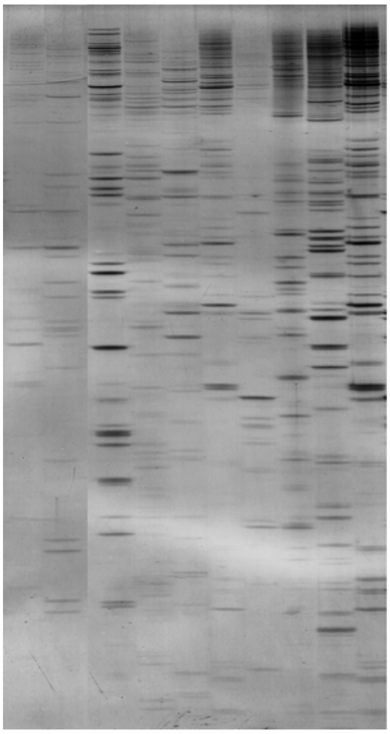
จากเดนโดแกรม (ภาพที่ 11) ที่ได้จากลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด (ตารางที่ 9) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ Ecc และ Ech ที่ค่า similarity 0.72 และที่ค่า similarity 0.86 สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ Ech สายพันธุ์ 1076-1 และ ECH1680 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ VECC2001 และ VECC1596 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ VECC2014 และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อที่แยกมาจากขนุนทั้งหมด ที่ค่า similarity 0.83 ถึง 0.86 เชื้อสายพันธุ์ VECC2014 จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อที่แยกมาจากขนุน ส่วนเชื้อสายพันธุ์ JDOA1147 ที่ค่า similarity 0.95 แยกออกมาจากกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ที่แยกมาจากขนุน

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCR1043 ด้วยเทคนิค *in silico* AFLP และ AFLP PCR amplification ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 2 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	*In silico* AFLP[1/]	AFLP gel[2/]		
		แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	% ความแตกต่าง
Eco+A, Mse+T	185	52	36	69.2
Eco+T, Mse+A	108	44	27	61.3
Eco+T, Mse+G	128	46	27	58.6
Eco+C, Mse+T	149	80	35	43.7
E19, M00	113	87	61	70.1

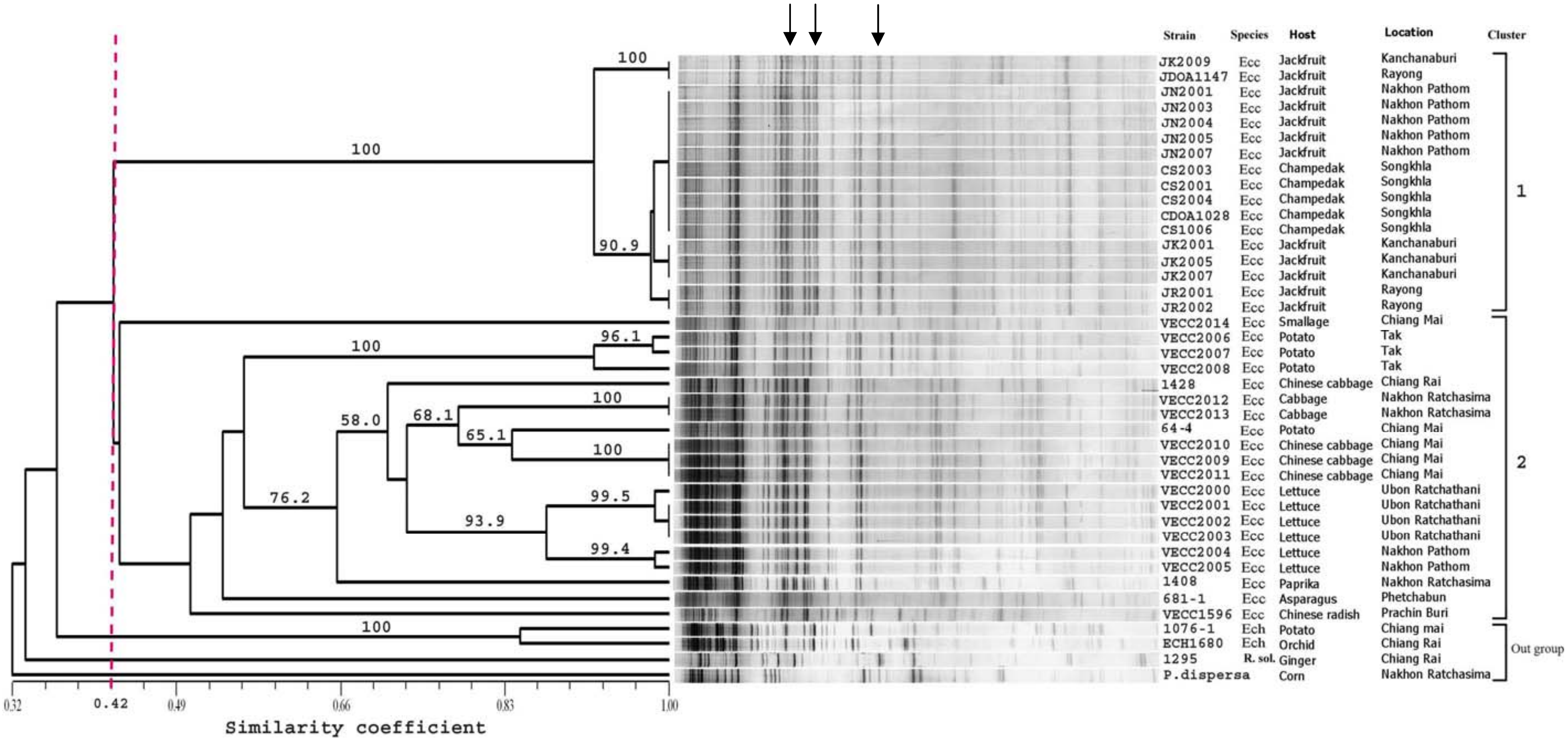
[1/] การทดลองจากฐานข้อมูลจีโนมิค เชื้อ *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCR1043

[2/] ทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยใช้เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ JK2001 และ VECC1596 ที่แยกได้จากขนุน และผักกาดหัวเน่า ตามลำดับ



ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์แบบต่างๆ ในขั้นตอน selective amplification กับ เชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ JK2001 และ VECC1596 ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I

Lane 1 เชื้อสายพันธุ์ JK2001 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+T และ Mse+A
Lane 2 เชื้อสายพันธุ์ VECC1596 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+T และ Mse+A
Lane 3 เชื้อสายพันธุ์ JK2001 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+C และ Mse+T
Lane 4 เชื้อสายพันธุ์ VECC1596 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+C และ Mse+T
Lane 5 เชื้อสายพันธุ์ JK2001 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+A และ Mse+T
Lane 6 เชื้อสายพันธุ์ VECC1596 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+A และ Mse+T
Lane 7 เชื้อสายพันธุ์ JK2001 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+T และ Mse+G
Lane 8 เชื้อสายพันธุ์ VECC1596 ทดสอบกับไพรเมอร์ Eco+T และ Mse+G
Lane 9 เชื้อสายพันธุ์ JK2001 ทดสอบกับไพรเมอร์ E-GA และ M-0
Lane 10 เชื้อสายพันธุ์ VECC1596 ทดสอบกับไพรเมอร์ E-GA และ M-0



ภาพที่ 10 เดนโดแกรมจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* แสดงการจัดกลุ่มของเชื้อจากแหล่ง พืชอาศัยต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA วิเคราะห์ค่า bootstrap 1000 ซ้ำ

↑ แสดงแถบดีเอ็นเอจำเพาะของเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน, **Cluster** แสดงกลุ่มเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน (กลุ่ม 1) และผักเน่าเละ (กลุ่ม 2)

ตารางที่ 9 การใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดในถาดอาหาร GN2 (Biolog, Inc., CA, USA) ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จำนวน 8 สายพันธุ์ และ *Erwinia chrysanthemi* จำนวน 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอนบนถาดอาหาร GN2																		
	α-Cyclodextrin	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl-D-Galactosamine	N-Acetyl-D-Glucosamine	Adonitol	L-Arabinose	D-Arabitol	D-Cellobiose	i-Erythritol	D-Fructose	L-Fucose	D-Galactose	Gentiobiose	α-D-Glucose	m-Inositol	α-D-Lactose
VECC2001	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
VECC1596	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
VECC2014	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
CDOA1028	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
JN2001	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
JN2005	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
JK2005	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
CDOA1147	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
1046-1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
ECH1680	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+

ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอนบนถาดอาหาร GN2																		
	Lactulose	Maltose	D-Mannitol	D-Mannose	D-Melibiose	β-Methyl-D-Glucoside	D-Psicose	D-Raffinose	L-Rhamnose	D-Sorbitol	Sucrose	D-Trehalose	Turanose	Xylitol	Pyruvic Acid Methyl Ester	Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	Acetic Acid	Cis-Aconitic Acid	Citric Acid
VECC2001	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
VECC1596	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
VECC2014	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
CDOA1028	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
JN2001	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
JN2005	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
JK2005	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CDOA1147	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
1046-1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
ECH1680	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอนบนถาดอาหาร GN2																		
	Formic Acid	D-Galactonic Acid Lactone	D-Galacturonic Acid	D-Gluconic Acid	D-Glucosaminic Acid	D-Glucuronic Acid	α-Hydroxybutyric Acid	ß-Hydroxybutyric Acid	r-Hydroxybutyric Acid	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	Itaconic Acid	α-Keto Butyric Acid	α-Keto Glutaric Acid	α-Keto Valeric Acid	D,L-Lactic Acid	Malonic Acid	Propionic Acid	Quinic Acid	D-Saccharic Acid
VECC2001	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VECC1596	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VECC2014	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDOA1028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
JN2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
JN2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
JK2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDOA1147	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1046-1	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ECH1680	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

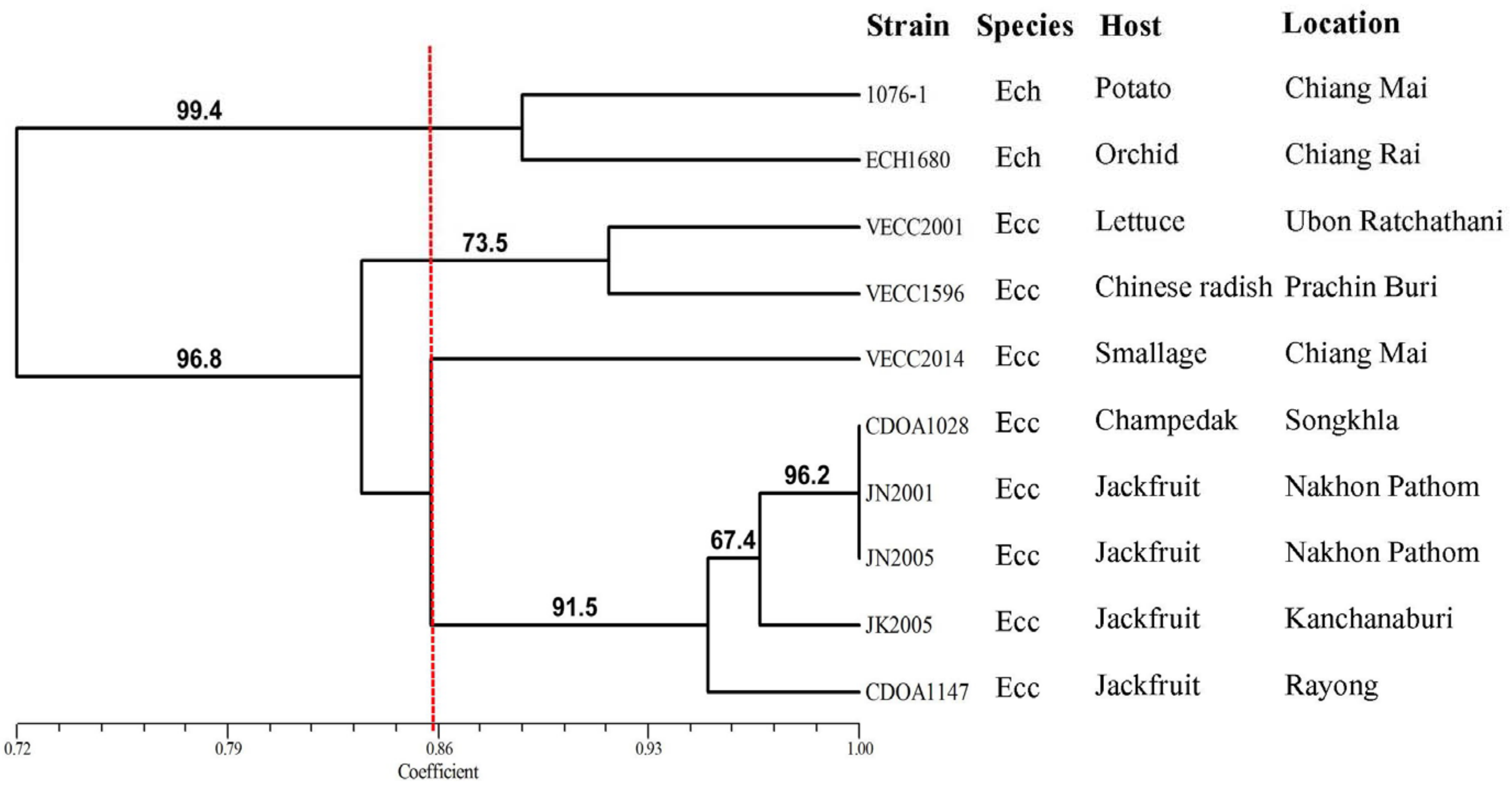
ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอนบนถาดอาหาร GN2																		
	Sebacic Acid	Succinic Acid	Bromosuccinic Acid	Succinamic Acid	Glucuronamide	L-Alaninamide	D-Alanine	L-Alanine	L-Alanyl-glycine	L-Asparagine	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	Glycyl-L-Aspartic Acid	Glycyl-L-Glutamic Acid	L-Histidine	Hydroxy-L-Proline	L-Leucine	L-Ornithine	L-Phenylalanine
VECC2001	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VECC1596	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VECC2014	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CDOA1028	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JN2001	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JN2005	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JK2005	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CDOA1147	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1046-1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ECH1680	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอนบนถาดอาหาร GN2																		
	L-Proline	L-Pyroglutamic Acid	D-Serine	L-Serine	L-Threonine	D,L-Camitine	r-Amino Butyric Acid	Urocanic Acid	D-Glucose-6-Phosphate	Uridine	Thymidine	Phenyethyl-amine	Putrescine	2-Aminoethanol	2,3-Butanediol	Glycerol	D,L-α-Glycerol Phosphate	α-D-Glucose-1-Phosphate	D-Glucose-6-Phosphate
VECC2001	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
VECC1596	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
VECC2014	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
CDOA1028	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
JN2001	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
JN2005	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
JK2005	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
CDOA1147	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
1046-1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
ECH1680	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

+ = สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้, - = ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้



ภาพที่ 11 เดนโดแกรมจากการวิเคราะห์รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สายพันธุ์ที่แยกได้จากขนุน และผัก โดยค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA วิเคราะห์ค่า bootstrap 1000 ซ้ำ

วิจารณ์

การทดสอบยืนยันการจัดจำแนกเชื้อ Ecc จากตัวอย่างของผักแสดงอาการเน่าเละนอกจากจะพบเชื้อ Ecc สาเหตุโรคเน่าเละแล้ว ยังพบเชื้ออื่นที่เป็นซาโปรไฟท์ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับเชื้อ Ecc จึงต้องทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ Ecc โดยทำการปลูกเชื้อทดสอบการเกิดโรคบนชิ้นแตงกวาก่อนเพื่อคัดเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อ กลุ่ม soft rot ออกไป จากนั้นจึงตรวจยืนยันการจำแนกเชื้อทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม คุณสมบัติการเป็น facultative anaerobic bacteria การตรวจหายีน *pel* ที่จำเพาะกับเชื้อ Ecc และใช้ระบบการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) ตรวจสอบยืนยันเพื่อความสมบูรณ์ของการจำแนกเชื้อ

การใช้เทคนิค *In silico* analysis ในการทดลองครั้งนี้ เพื่อทดสอบจำนวนแถบดีเอ็นเอจาก combination ของเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด และไพรเมอร์แต่ละคู่ ในเว็บไซต์ http://insilico.ehu.es/AFLP/ ก่อนทำการทดลองในห้องปฏิบัติการช่วยให้ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายเอนไซม์กับไพรเมอร์โดยประมาณ 15,055 บาท ในการทดสอบคู่ไพรเมอร์ในห้องปฏิบัติการ ดังการทดลองของ Mitchell *et al.* (2006) การใช้ข้อมูลจีโนมิคของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCR1043 เป็นตัวแทนทดสอบไพรเมอร์โดยเทคนิค *In silico* analysis เนื่องจากว่าปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่สมบูรณ์ของลำดับเบสของจีโนมเชื้อ Ecc จากผลการทดสอบคู่เอนไซม์โดยเทคนิค *In silico* analysis ที่ให้แถบดีเอ็นเอ 100 - 200 แถบเหมาะสมที่สุดคือ เอนไซม์ *Eco*RI กับ *Mse*I ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในเชื้อ Ecc ของ Avrova *et al.* (2002) แต่จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค *In silico* analysis ต่างไปจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ Ecc จำนวน 2 สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ กับคู่ไพรเมอร์ M00 และ E19 สามารถตรวจนับได้อย่างชัดเจนเพียง 87 แถบดีเอ็นเอ อาจเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคด้วยเทคนิค *In silico* analysis จากเว็บไซต์สามารถวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 100 bp ผลการวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงในเว็บไซต์จึงมากกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่ใช้ตรวจแยกแถบดีเอ็นเอบน denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กอาจเคลื่อนออกนอกแผ่นเจลไป หรือมีดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันแต่ลำดับเบสที่แตกต่างกันก็จะไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้จากเจล แต่เนื่องจากเทคนิค *In silico* analysis สามารถระบุได้ทั้งขนาดของแถบดีเอ็นเอและลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลจึงแยกนับเป็นแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันทำให้มีจำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าวิเคราะห์บน polyacrylamide gel electrophoresis แม้ว่าจะใช้การตรวจผลด้วยสายตา ร่วมกับใช้โปรแกรม Gene Tools Match (Syngene, Cambridge, UK) ที่กำหนดค่า integration parameter เพื่อช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการนับแถบดีเอ็นเอ และโดยทั่วไปแล้วจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Vos *et al.* (1995) ซึ่งโดยปกติเทคนิค AFLP

จะให้แถบดีเอ็นเอในช่วง 50 - 100 แถบ และหากนำวิธีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เช่น 6-carboxyfluorescein (FAM) มาใช้ และตรวจวิเคราะห์ AFLP-PCR ที่ได้โดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (Automatic Sequence Analyzer) จะให้ผลที่แม่นยำในการวิเคราะห์ยิ่งขึ้น (Hsieh and Pan, 2006)

การเพิ่มเบสต่อจากไพรเมอร์ในขั้นตอนของ selective amplification ทำให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8) ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอบน AFLP gel จะขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนเบส (selective base) ที่เพิ่มต่อจากไพรเมอร์ (Koopman and Gort, 2003) ในการทดลองนี้ พบว่า การเพิ่มเบสในไพรเมอร์ *Eco*RI เป็น GA (E19) และ *Mse*I ไม่เพิ่มเบส (M00) ให้แถบดีเอ็นเอมาก และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน และผักมากกว่าไพรเมอร์คู่อื่นที่ทำการทดสอบคู่ไพรเมอร์เบื้องต้น สอดคล้องกับการทดลองของ Avrova *et al.* (2002) ที่ใช้คู่ไพรเมอร์นี้ในขั้นตอนการคัดเลือกในการศึกษาเชื้อ *E. carotovora* และเชื้อ *E. chrysanthemi* จากการทดลองนี้ได้ทำ AFLP ซ้ำจำนวน 3 ครั้งให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน

การใช้คู่ไพรเมอร์ E19 และ M00 ในขั้นตอนของ selective amplification กับเชื้อ Ecc จำนวน 37 สายพันธุ์, เชื้อ Ech (ECH1680 และ 1076-1), เชื้อ *Ralstonia solanacearum* (1295) และเชื้อ *Pantoea dispersa* ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 102 แถบ จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ Ecc และ Ech สามารถแบ่งเชื้อทั้งสองออกจากกันอย่างชัดเจนที่ค่า similarity 0.36 สำหรับรูปแบบ (pattern) ของแถบดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ Ecc มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอคล้ายกัน มีบางส่วนที่แตกต่างกันและสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนและผักเน่า ดังเช่นพบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 3 แถบ (ภาพที่ 10 ลูกศรชี้) ที่แตกต่างอย่างชัดเจน และสามารถพัฒนาเป็น molecular marker ที่เป็นเป้าหมายในการตรวจเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลเมื่อนำมาจัดกลุ่ม โดยการทำ cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มที่ค่า similarity 0.42 ซึ่งแยกเชื้อที่มาจากขนุน และผักออกจากกันอย่างชัดเจนสอดคล้องกับการศึกษาของ Avrova *et al.* (2002)

จากค่า similarity ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อที่แยกมาจากผักเน่า และขนุน ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แสดงถึงความแตกต่างในระดับจีโนมของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางจีโนไทป์ที่เชื้อแสดงออกมา คือเชื้อ Ecc เป็นสาเหตุโรคเน่าและกับผักชนิดต่างๆ (ศักดิ์, 2537) จากการทดลองของรุ่งรัตน์ (2548) และนิโลบล (2548) พบว่าเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากผักเน่าไม่สามารถเกิดโรคต้นแห้งตายในกล้าขนุนได้ แต่เชื้อ Ecc สาเหตุโรคต้นแห้งตายขนุนสามารถทำให้เกิดอาการเน่า

และกับชิ้นแตงกวาได้ และมีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาที่แตกต่างไปจากเชื้อ Ecc สาเหตุโรคเน่าเละของผัก (รุ่งรัตน์, 2548) รวมถึงลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 9) เมื่อนำมาวิเคราะห์สร้างเดนโดแกรม ภายในกลุ่มเชื้อ Ecc แบ่งเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจนที่ค่า similarity 0.86 (ภาพที่ 11)

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ค่า similarity 0.43 พบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ VECC2014 ที่แยกได้จากคื่นฉ่าย จังหวัดเชียงใหม่ ไม่เข้ากลุ่มภายในกลุ่มของผักโดยให้ผลสอดคล้องกับลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ VECC2014 มาจัดจำแนกด้วยระบบ BIOLOG System (Biolog, Hayward, CA, USA) เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ VECC2001 พบว่าเป็นเชื้อ Ecc ทั้งคู่แต่มีความแตกต่างในการใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิด (ตารางที่ 9) คือ เชื้อสายพันธุ์ VECC2001 สามารถใช้ D-Galactonic Acid Lactone และ Thymidine ได้แต่ไม่สามารถใช้ Turanose, L-serine และ Succinamic Acid ตรงกันข้ามกับเชื้อสายพันธุ์ VECC2014 ที่สามารถใช้ Turanose, L-serine และ Succinamic Acid แต่ไม่สามารถใช้ D-Galactonic Acid Lactone และ Thymidine ส่วนในกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนไม่มีความผันแปรจนกระทั่งที่ค่า similarity 0.92 กลุ่มเชื้อ Ecc ของขนุนแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย สอดคล้องกับลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน เมื่อนำตัวแทนเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม คือเชื้อสายพันธุ์ JDOA1147 และเชื้อสายพันธุ์ CDOA1028 มาศึกษาลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสายพันธุ์ JDOA1147 สามารถใช้ D-Gluconic Acid แต่ไม่สามารถใช้ Turanose และ Maltose ส่วนเชื้อสายพันธุ์ CDOA1028 สามารถใช้ Turanose และ Maltose แต่ไม่สามารถใช้ D-Gluconic ได้ (ตารางที่ 9) ด้วยเหตุนี้ทำให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้แบ่งเป็น 2 กลุ่มในระดับ similarity 0.92 (ภาพที่ 10) และสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด พบว่าเกิดการแบ่งกลุ่มย่อยภายในกลุ่มเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุน (ภาพที่ 11)

เดนโดแกรมที่ได้จากคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิดเป็นอีกข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์ที่ใช้ประกอบเพิ่มเติม นอกเหนือจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ซึ่งเป็นข้อมูลทางด้านจีโนไทป์ที่แสดงถึงความแตกต่างของเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนและผัก ผลการทดลองคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอนในครั้งนี้ยืนยันถึงความแตกต่างระหว่างเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากผักเน่า และขนุน (ภาพที่ 11) ให้ผลที่สอดคล้องกับลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งเชื้อที่แยกมาจากผักเน่าจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อที่แยกได้จากขนุน (ภาพที่ 10)

ความผันแปรในกลุ่มเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากผักเน่ามากกว่าเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุน อาจเป็นเพราะว่าเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผักนั้นมาจากผักหลายตระกูลและหลายแหล่งปลูก จึงทำให้

ลักษณะเดนโดแกรมที่ได้มีความหลากหลายในกลุ่มของผัก ส่วนความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มขนุนเกิดขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากจำนวน Ecc จากขนุนมีเพียง 17 สายพันธุ์จากแหล่งปลูกเพียง 4 จังหวัด จึงอาจเป็นไปได้ที่ทำให้ไม่พบความผันแปรของเชื้อให้เห็น เมื่อพิจารณาเชื้อ Ecc ในภาพรวมแล้วลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้บ่งชี้ว่าเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนนั้น มีความแตกต่างกับเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากผักแต่ละตระกูลและแหล่งต่างๆ อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อ Ecc ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีเพียง 37 สายพันธุ์ และการกระจายตัวของแหล่งที่เก็บเชื้อ ยังไม่เป็นตัวแทนที่ดี จึงแสดงให้เห็นเพียงว่า เชื้อ Ecc จากพืชผักที่เป็นโรคเน่าเละ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค AFLP มีแนวโน้มว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมที่สูง และให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Avrova *et al.* (2002) ในการศึกษาทดลองครั้งต่อไปควรสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากผักเน่า และขนุนให้มากกว่านี้ โดยตัวอย่างของผักควรจะมีตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากพืชครอบคลุมแต่ละตระกูลและกระจายตัวอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ รวมทั้งเชื้อที่เป็น type strain จาก culture collection ที่ได้รับการยอมรับจะทำให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่าง Ecc ที่เข้าเกิดโรคกับผักเน่า และขนุนชัดเจนมากขึ้น

ข้อมูล AFLP ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ นับว่าเป็นข้อมูลส่วนหนึ่งที่ชี้ให้เห็นลักษณะทางจีโนมที่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อ Ecc สายพันธุ์ที่แยกได้จากผักเน่าและขนุน ซึ่งจะนำไปสู่การทดลองต่อไปในการศึกษาข้อมูลทางจีโนไทป์และคุณสมบัติอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อแสดงให้เห็นความความแตกต่างระหว่างเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนและผักเน่า ดังเช่น การศึกษาลำดับเบสของ 16SrDNA และ DNA-DNA hybridization ถ้าพบว่าเชื้อ Ecc ที่แยกมาจากขนุนมีความเหมือนต่ำกว่า 70% (Stackebrandt and Goebel, 1994) กับเชื้อ type strain อื่นๆ และมีข้อมูลลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ประกอบ ดังเช่นองค์ประกอบของ fatty acid (Wells and Moline, 1991) และลักษณะการใช้แหล่งคาร์บอน (Duarte *et al.*, 2003) สามารถจัดจำแนกเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากขนุนเป็น subspecies ใหม่ (Ursing *et al.*, 1994) โดยนำไปตรวจสอบชื่อแบคทีเรียในเอกสาร *Approved Lists of Bacterial Names* แล้วตีพิมพ์รายละเอียดของแบคทีเรียในวารสาร *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB) หรือใน *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) และมีการเปรียบเทียบกับชื่อแบคทีเรียใน *Bacteriological Code*. ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2002 เป็นต้นมา โดยการตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่ (new species, new subspecies และ new combinations) จะต้องปฏิบัติตามกติกาของ IJSEM โดยต้องเก็บตัวอย่างต้นแบบแบคทีเรียบริสุทธิ์ไว้ใน culture collection ที่ได้รับการยอมรับอย่างน้อย 2 แห่งใน 2 ประเทศ (Lapage *et al.*, 1992) จึงจะสามารถจัดจำแนกเชื้อ Ecc ที่แยกได้จากโรคแห้งตายของขนุนไปอยู่ใน subspecies ใหม่ได้

สรุป

1. จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ Ecc ที่เป็นสาเหตุของโรคในขนุน และพืชผัก โดยใช้เทคนิค AFLP ใช้คู่ไพรเมอร์ E19 และ M00 ในขั้นตอน selective amplification ของเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากโรคต้นแห้งตายของขนุน และโรคเน่าเละของพืชผักพบว่า ที่ค่า similarity 0.42 เชื้อที่แยกได้จากขนุน และเชื้อที่แยกได้จากผักเน่าเละ แยกอยู่ต่างกลุ่มกันอย่างชัดเจน บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่จะจัดแยกเชื้อ Ecc สาเหตุโรคต้นแห้งตายขนุนเป็นเชื้อใน subspecies ใหม่ได้

2. เทคนิค AFLP สามารถนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ Ecc ได้ เป็นเทคนิคที่ทำได้รวดเร็วมีประสิทธิภาพ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และให้ผลที่เชื่อถือได้สอดคล้องกับการจำแนกเชื้อโดยวิธีดั้งเดิม (Classical bacterial identification)

3. การนำข้อมูลจีโนมิค ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช มาวิเคราะห์โดยวิธี *In silico* analysis ทำให้สามารถประหยัดเวลาลดการใช้สารเคมีในการทดลอง ซึ่งยังมีราคาแพง และลดการทดลองให้ห้องปฏิบัติการลงได้อย่างมาก ให้ผลการทดลองที่ดี และเชื่อถือได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ช่อทิพย์ ถนอมถิ่น. 2538. **การใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ Erwinias สาเหตุโรคเน่าเละในมันฝรั่ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์, สุเนตรา ภาวิจิตร, วนิดา ฐิตะฐาน และชัยวัฒน์ กระตุฤกษ์. 2536. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทรุดโทรมของขนุนและจำปาดะ. **รายงานประจำปี 2536.** กลุ่มงานบักเตรีวิทยา. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. หน้า 91-29.

นฤชิต แววศรีผ่อง. 2529. การปลูกขนุน. บริษัท พิมพ์สวย จำกัด กรุงเทพมหานคร. 78 หน้า

นิโลบล สุจสินธุ์. 2548. **วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุน และจำปาดะโดยเทคนิคพีซีอาร์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เสมอใจ ชื่นจิตร และบรรหาร วิสมิตตินันท์. 2533. ต้นแห้งตาย:โรคใหม่ของจำปาดะขนุน (*Artrocarpus* sp. (Merr.) Thumb). **วารสารโรคพืช** 10: 19-29.

รุ่งรัตน์ วารีเขต. 2548. **การจัดจำแนกและการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุนและจำปาดะ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วิชัย โฆสิตรัตน. 2537. **บทปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 161 หน้า

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด.** พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 144 หน้า

สมศิริ แสงโชติ. 2532. โรคของพืชเศรษฐกิจ พืชผัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท ประชาชน จำกัด กรุงเทพมหานคร. 50 หน้า

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 155 หน้า

__________________. 2543. **เอกสารการฝึกอบรม เชิงปฏิบัติการเทคนิค AFLP แบบปลอดรังสี Nonradioactive AFLP Techniques.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 41 หน้า

Ahmed, M.E.E. 2001. **Detection and effects of latent contamination of potato tubers by soft rot bacteria, and investigation on the effect of hydrogen peroxide on lipopolysaccharides of *Erwinia carotovora* in relation to acquired resistance against biocides.** Ph.D. Thesis, Georg-August-University, Germany.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 1499-1508.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1999. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4 th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Beji, A., J. Mergaert, F. Gavini, D. Izard, K. Leclerc, H.& J. De ley. 1988. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 38:77-88.

Bikandi, J., R. San Millán, A. Rementeria and J. Garaizar. 2004. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. **Bioinformatics** 20: 798-799.

Collmer, A. and N. T. Keen. 1986. The role of pectin enzyme in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol**. 24: 383-409.

Danchin A., C. Medigue, O. Gascuel, H. Soldano and A. Henaut. 1991. From data bank to data bases. **Res. Microbiol**. 142: 913-916.

Dice, L.R. 1945. Measurement of the amount of ecologic association between species. **Ecology** 26: 297-302.

Duarte, V., S. H. De Boer, L. J. Ward and A. M. R. de Oliveira. 2003. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **J. Appl. Microbiol.** 96: 535-545.

Hauben, L., E. R. B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, L. Verdonck and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriacae. **Syst. Appl. Microbiol**. 21: 384-387.

Hsieh, Y. T. and T. M. Pan. 2006. Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity. **J. Agric. Food Chem.** 54: 130-137.

Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau and K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology** 142: 1881-1893.

Jonas, D., B. Spitzmüller, K. Weist, H. Rüden and F.D. Daschner. 2002. Comparison of PCR-based methods for typing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection** 9: 823-831.

Koopman, W. J. M. and G. Gort. 2003. Significance tests and weighted values for AFLP similarities, based on arabidopsis *in silico* AFLP fragment length distributions. **Genetics** 167: 1915-1928.

Lapage, S. P., P. H. A. Sneath, E. F. Lessel, V. B. D. Skerman, H. P. R. Seeliger and W. A. Clark. 1992**. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision)**. Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology and Statutes of the Bacteriology and Applied Microbiology Section of The International Union of Microbiological Societies. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=icnb, May 8, 2007.

Lim, W.H., and I. Yasin. 1983. A new bacterial disease of jack-fruit and champedak. **MAPRS Newsletter** 3: 6-8.

Lin, J.J., J. Kuo and J. Ma. 1996. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Res**. 24: 3649-3650.

Miramontes P. 1992. **A cellular automaton model for the evolution of nucleic acids**. Ph.D. Thesis. National Autonomous University of Mexico, Mexico.

Mitchell, M. G., D. Tabarini and M. Ziman. 2006. Single nucleotide polymorphisms associated with the intronic cis regulatory regions of PAX7: a potential linkage to increased tumorigenesis of rhabdomyosarcoma elucidated via *In silico* biology and pyrosequencing. **Nature and Science** 4: 6-20.

Nair, S., E. Schreiber, K.L. Thong, T. Pang and M. Altwegg. 1999. Genotypic characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination. **J. Microbiol. Methods** 41: 35-43.

Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 76:5269-5273.

Pérombelon M. C. M. and A. Kelman. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. **Annu. Rev. Phytopathol.** 18: 361-387.

Pérombelon M. C. M. and A. Kelman. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: a proposal for a revision of the terminology. **Plant Disease** 71:283-285.

Pérombelon M. C. M. 2002. Potato disease cause by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathol**. 18:361-387.

Restrepo, S., M. Duque, J. Tohme and V. Verdier. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology** 145: 107-114.

Roberts, R. J., T. Vincze, J. Posfai and D. Macelis. 2003. REBASE restriction enzymes and methyltransferase. **Nucleic Acids Res**. 31: 418-420.

Rohlf, F. J. 1993. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Exeter Software, New York. 206 p.

Rombauts, S., Y. V. Peer and P. Rouzé. AFLPinSilico, simulating AFLP fingerprints. 2003. **Bioinformatics** 19: 776-777.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning**: **A Laboratory Manual**. **2nd** ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

San Millán, R., J. Garaizar and J. Bikandi. 2005. *In silico* simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. ***In Silico* Biology** 5: 341-346.

Schaad, N.W., J.B. Jone and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria.** American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.

Seo, S. T., N. Furuya, C. K. Lim, Y. Takanami and K. Tsuchiya. 2002. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia. **J. Phytopathology** 150: 120-127.

Seo, S. T., K. Tsuchiya and R. Murakami. 2004. Characterization and differentaiation of *Erwinia carotovora* strains from mulberry trees. **J. Gen. Plant Pathol**. 70: 120-123.

Sokal, R.R., and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systemic relationships. **Univ. Kans. Sci. Bull.** 28: 1409-1438.

Stackebrandt E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 846-849.

Ursing, J. B., H. Lior and R. J. Owen. 1994. Proposal of minimal standards for describing new species of the family Campylobacteraceae. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 842-845.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1990. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol**. 173: 697-703

Wells, J. M. and H. E. Moline. 1991. Dfferentiation of the soft-rotting *Erwinia* of the *carotovora* group by fatty acid composition. **J. Phytopathol.** 131: 22-32.

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 dendograms**. IRRI discussion paper series 14. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.

Young J.M., Y. Takikawa, L. Gardan and D. E. Stead. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 67-105.

ภาคผนวก

สูตรการคำนวณค่า Similarity Coefficient ด้วยวิธีของ Dice’s similarity coefficients (Dice, 1945)

$$S_{ij} = \frac{2A}{2A+B+C}$$

เมื่อ S_{ij} คือ ค่า similarity ระหว่างตัวอย่าง i และ j

A คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏทั้งตัวอย่าง i และ j

B คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตัวอย่างที่ i แต่ไม่ปรากฏที่ j

C คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตัวอย่างที่ j แต่ไม่ปรากฏที่ i (Nei and Li, 1979)

ตารางผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide: bisacrylamide = 19:1, 7.5 M urea)

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6%	
	ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร	ปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร
30% acrylamide (19:1)	2.0 มิลลิลิตร	8 มิลลิลิตร
5x TBE	2.0 มิลลิลิตร	8 มิลลิลิตร
ยูเรีย 7.5 M	4.5 กรัม	18 กรัม
น้ำกลั่น	2.5 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
10% APS	100 ไมโครลิตร	400 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร

TBE = 89 mM Tris base, 2.5 mM EDTA

APS = ammonium persulfate

TEMED = N,N,N’,N’,N’-tetramethylethylenediamine

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Eco+0	Eco+A	Eco+C	Eco+G	Eco+T	Eco+GA
Mse + 0	2184	704	552	513	412	113
Mse + A	655	221	158	165	108	44
Mse + C	276	92	78	50	55	26
Mse + G	662	204	166	160	128	33
Mse + T	593	185	149	136	122	10

ตารางผนวกที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Eco*RI และ *Taq*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Eco+0	Eco+A	Eco+C	Eco+G	Eco+T	Eco+GA
Taq + 0	2083	682	544	458	402	68
Taq + A	823	263	233	179	145	39
Taq + C	358	114	77	92	71	20
Taq + G	522	180	116	130	95	31
Taq + T	469	138	127	106	98	21

ตารางผนวกที่ 4 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Apa*I และ *Mse*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Apa+0	Apa +A	Apa +C	Apa +G	Apa +T	Apa +GA
Mse + 0	311	80	57	126	48	27
Mse + A	91	28	18	34	12	3
Mse + C	45	11	10	15	9	4
Mse + G	90	22	12	39	17	13
Mse + T	84	19	17	38	10	7

ตารางผนวกที่ 5 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Apa*I และ *Taq*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Apa+0	Apa +A	Apa +C	Apa +G	Apa +T	Apa +GA
Taq + 0	314	82	57	125	50	26
Taq + A	133	42	17	54	20	11
Taq + C	42	11	11	15	5	4
Taq + G	83	18	24	28	14	8
Taq + T	55	11	5	28	11	3

ตารางผนวกที่ 6 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Mse*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Hin+0	Hin+A	Hin+C	Hin+G	Hin+T	Hin+GA
Mse + 0	1060	185	293	246	335	76
Mse + A	344	72	86	75	112	26
Mse + C	155	32	43	35	44	8
Mse + G	298	47	90	74	90	22
Mse + T	314	61	77	69	104	23

ตารางผนวกที่ 7 จำนวนแถบดีเอ็นเอของ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In silico* AFLP-PCR amplification โดยเลือกใช้เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Taq*I

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์					
	Hin+0	Hin+A	Hin+C	Hin+G	Hin+T	Hin+GA
Taq + 0	1114	211	294	254	350	77
Taq + A	430	70	105	109	146	30
Taq + C	155	28	49	33	45	9
Taq + G	266	58	73	56	79	19
Taq + T	265	56	70	55	84	19

ตารางผนวกที่ 8 ข้อมูล AFLP จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* ด้วยไพรเมอร์ E19 และM00

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
1408	0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1428	0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
64-4	0 0 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
681-1	1 0 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0
CDOA1028	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
CS1006	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
CS2001	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
CS2003	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
CS2004	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JDOA1147	1 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JK2001	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JK2005	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JK2007	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JK2009	1 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JN2001	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JN2003	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JN2004	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
JN2005	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JN2007	1 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JR2001	0 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
JR2002	0 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
VECC1596	0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0 0 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0
VECC2000	0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2001	0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2002	0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2003	0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2004	0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2005	0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2006	0 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0
VECC2007	0 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0
VECC2008	0 0 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0
VECC2009	1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2010	1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2011	1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2012	1 1 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
VECC2013	1 1 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2014	0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0
1076-1	1 1 1 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
ECH1680	1 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1
1295	0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0
P.dispersa	0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
1408	0 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 1 0
1428	0 1 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1
64-4	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1
681-1	0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1
CDOA1028	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
CS1006	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
CS2001	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
CS2003	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
CS2004	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JDOA1147	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1
JK2001	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JK2005	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JK2007	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JK2009	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1
JN2001	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JN2003	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JN2004	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JN2005	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
JN2007	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JR2001	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
JR2002	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0
VECC1596	0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1
VECC2000	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2001	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2002	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2003	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2004	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2005	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2006	1 1 0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
VECC2007	1 1 0 0 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
VECC2008	1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
VECC2009	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2010	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2011	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
VECC2012	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1
VECC2013	0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

เชื้อสายพันธุ์	Binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
VECC2014	0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0
1076-1	0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0
ECH1680	0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0
1295	0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
P.dispersa	0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0

ตารางผนวกที่ 9 ข้อมูล similarity matrix จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* ด้วยไพรเมอร์ E19 และ M00

index	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1.00	1.00	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.35	0.38	0.38
2	1.00	1.00	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.35	0.38	0.38
3	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
4	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
5	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
6	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
7	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
8	0.91	0.91	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.97	0.40	0.45	0.46
9	0.91	0.91	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.97	0.40	0.45	0.46
10	0.91	0.91	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.97	0.40	0.45	0.46
11	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
12	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
13	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
14	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
15	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	0.40	0.43	0.43
16	0.91	0.91	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.97	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	0.41	0.43	0.44
17	0.91	0.91	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.97	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	0.41	0.43	0.44

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1	0.38	0.40	0.37	0.40	0.44	0.42	0.42	0.43	0.43	0.43	0.40	0.42	0.42	0.42	0.45	0.42	0.35	0.33	0.38
2	0.38	0.40	0.37	0.40	0.44	0.42	0.42	0.43	0.43	0.43	0.40	0.42	0.42	0.42	0.45	0.42	0.35	0.33	0.38
3	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
4	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
5	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
6	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
7	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
8	0.45	0.38	0.38	0.38	0.45	0.41	0.41	0.44	0.44	0.44	0.41	0.43	0.43	0.43	0.49	0.47	0.39	0.34	0.39
9	0.45	0.38	0.38	0.38	0.45	0.41	0.41	0.44	0.44	0.44	0.41	0.43	0.43	0.43	0.49	0.47	0.39	0.34	0.39
10	0.45	0.38	0.38	0.38	0.45	0.41	0.41	0.44	0.44	0.44	0.41	0.43	0.43	0.43	0.49	0.47	0.39	0.34	0.39
11	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
12	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
13	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
14	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
15	0.43	0.38	0.39	0.38	0.46	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.44	0.44	0.44	0.50	0.47	0.40	0.32	0.36
16	0.44	0.39	0.36	0.39	0.47	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.42	0.44	0.44	0.44	0.50	0.48	0.40	0.29	0.34
17	0.44	0.39	0.36	0.39	0.47	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.42	0.44	0.44	0.44	0.50	0.48	0.40	0.29	0.34

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	40	41
1	0.35	0.34
2	0.35	0.34
3	0.37	0.36
4	0.37	0.36
5	0.37	0.36
6	0.37	0.36
7	0.37	0.36
8	0.37	0.36
9	0.37	0.36
10	0.37	0.36
11	0.37	0.36
12	0.37	0.36
13	0.37	0.36
14	0.37	0.36
15	0.37	0.36
16	0.38	0.37
17	0.38	0.37

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
18	0.35	0.35	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.41	0.41	1.00	0.52	0.53
19	0.38	0.38	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.45	0.45	0.45	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.52	1.00	0.98
20	0.38	0.38	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.46	0.46	0.46	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.53	0.98	1.00
21	0.38	0.38	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.45	0.45	0.45	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.45	0.91	0.93
22	0.40	0.40	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.39	0.39	0.36	0.42	0.43
23	0.37	0.37	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.36	0.36	0.44	0.53	0.50
24	0.40	0.40	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.39	0.39	0.40	0.54	0.52
25	0.44	0.44	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.38	0.61	0.59
26	0.42	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.39	0.39	0.29	0.51	0.49
27	0.42	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.39	0.39	0.29	0.51	0.49
28	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.40	0.40	0.37	0.57	0.55
29	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.40	0.40	0.37	0.57	0.55
30	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.40	0.40	0.37	0.57	0.55
31	0.40	0.40	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.47	0.63	0.61
32	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.46	0.62	0.60
33	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.46	0.62	0.60
34	0.42	0.42	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.46	0.62	0.60
35	0.45	0.45	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.53	0.65	0.63

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
18	0.45	0.36	0.44	0.40	0.38	0.29	0.29	0.37	0.37	0.37	0.47	0.46	0.46	0.46	0.53	0.54	0.44	0.32	0.28
19	0.91	0.42	0.53	0.54	0.61	0.51	0.51	0.57	0.57	0.57	0.63	0.62	0.62	0.62	0.65	0.66	0.52	0.38	0.37
20	0.93	0.43	0.50	0.52	0.59	0.49	0.49	0.55	0.55	0.55	0.61	0.60	0.60	0.60	0.63	0.64	0.52	0.39	0.37
21	1.00	0.42	0.47	0.49	0.57	0.45	0.45	0.49	0.49	0.49	0.55	0.54	0.54	0.54	0.58	0.59	0.46	0.38	0.40
22	0.42	1.00	0.42	0.57	0.52	0.57	0.57	0.53	0.53	0.53	0.50	0.50	0.50	0.50	0.53	0.54	0.45	0.25	0.30
23	0.47	0.42	1.00	0.45	0.59	0.51	0.51	0.57	0.57	0.57	0.58	0.57	0.57	0.57	0.57	0.54	0.43	0.31	0.31
24	0.49	0.57	0.45	1.00	0.68	0.70	0.70	0.69	0.69	0.69	0.70	0.72	0.72	0.72	0.72	0.73	0.62	0.43	0.44
25	0.57	0.52	0.59	0.68	1.00	0.80	0.80	0.83	0.83	0.83	0.77	0.76	0.76	0.76	0.76	0.74	0.65	0.39	0.38
26	0.45	0.57	0.51	0.70	0.80	1.00	1.00	0.77	0.77	0.77	0.67	0.66	0.66	0.66	0.69	0.67	0.56	0.37	0.39
27	0.45	0.57	0.51	0.70	0.80	1.00	1.00	0.77	0.77	0.77	0.67	0.66	0.66	0.66	0.69	0.67	0.56	0.37	0.39
28	0.49	0.53	0.57	0.69	0.83	0.77	0.77	1.00	1.00	1.00	0.77	0.76	0.76	0.76	0.74	0.72	0.64	0.46	0.44
29	0.49	0.53	0.57	0.69	0.83	0.77	0.77	1.00	1.00	1.00	0.77	0.76	0.76	0.76	0.74	0.72	0.64	0.46	0.44
30	0.49	0.53	0.57	0.69	0.83	0.77	0.77	1.00	1.00	1.00	0.77	0.76	0.76	0.76	0.74	0.72	0.64	0.46	0.44
31	0.55	0.50	0.58	0.70	0.77	0.67	0.67	0.77	0.77	0.77	1.00	0.98	0.98	0.98	0.87	0.85	0.67	0.37	0.36
32	0.54	0.50	0.57	0.72	0.76	0.66	0.66	0.76	0.76	0.76	0.98	1.00	1.00	1.00	0.88	0.87	0.69	0.37	0.35
33	0.54	0.50	0.57	0.72	0.76	0.66	0.66	0.76	0.76	0.76	0.98	1.00	1.00	1.00	0.88	0.87	0.69	0.37	0.35
34	0.54	0.50	0.57	0.72	0.76	0.66	0.66	0.76	0.76	0.76	0.98	1.00	1.00	1.00	0.88	0.87	0.69	0.37	0.35
35	0.58	0.53	0.57	0.72	0.76	0.69	0.69	0.74	0.74	0.74	0.87	0.88	0.88	0.88	1.00	0.98	0.72	0.37	0.38

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	40	41
18	0.24	0.27
19	0.23	0.37
20	0.23	0.38
21	0.21	0.37
22	0.20	0.26
23	0.16	0.22
24	0.33	0.28
25	0.25	0.30
26	0.22	0.32
27	0.22	0.32
28	0.31	0.33
29	0.31	0.33
30	0.31	0.33
31	0.33	0.32
32	0.36	0.31
33	0.36	0.31
34	0.36	0.31
35	0.40	0.35

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
36	0.42	0.42	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.48	0.48	0.54	0.66	0.64
37	0.35	0.35	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.44	0.52	0.52
38	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.34	0.34	0.34	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.29	0.29	0.32	0.38	0.39
39	0.38	0.38	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.39	0.39	0.39	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.34	0.34	0.28	0.37	0.37
40	0.35	0.35	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.24	0.23	0.23
41	0.34	0.34	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.37	0.37	0.27	0.37	0.38

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
36	0.59	0.54	0.54	0.73	0.74	0.67	0.67	0.72	0.72	0.72	0.85	0.87	0.87	0.87	0.98	1.00	0.73	0.37	0.39
37	0.46	0.45	0.43	0.62	0.65	0.56	0.56	0.64	0.64	0.64	0.67	0.69	0.69	0.69	0.72	0.73	1.00	0.44	0.45
38	0.38	0.25	0.31	0.43	0.39	0.37	0.37	0.46	0.46	0.46	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.44	1.00	0.84
39	0.40	0.30	0.31	0.44	0.38	0.39	0.39	0.44	0.44	0.44	0.36	0.35	0.35	0.35	0.38	0.39	0.45	0.84	1.00
40	0.21	0.20	0.16	0.33	0.25	0.22	0.22	0.31	0.31	0.31	0.33	0.36	0.36	0.36	0.40	0.37	0.31	0.21	0.19
41	0.37	0.26	0.22	0.28	0.30	0.32	0.32	0.33	0.33	0.33	0.32	0.31	0.31	0.31	0.35	0.32	0.30	0.23	0.27

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

index	40	41
36	0.37	0.32
37	0.31	0.30
38	0.21	0.23
39	0.19	0.27
40	1.00	0.33
41	0.33	1.00

1 = JK2009, 2 = JDOA1147, 3 = JN2001, 4 = JN2003, 5 = JN2004, 6 = JN2005, 7 = JN2007, 8 = JK2001, 9 = JK2005, 10 = JK2007, 11 = CS2003, 12 = CS2001, 13 = CS2004, 14 = CDOA1028, 15 = CS1006, 16 = JR2001, 17 = JR2002, 18 = VECC2014, 19 = VECC2006, 20 = VECC2007, 21 = VECC2008, 22 = VECC1596, 23 = 681-1, 24 = VECC2013, 25 = 64-4, 26 = VECC2012, 27 = VECC2013, 28 = VECC2010, 29 = VECC2009, 30 = VECC2011, 31 = VECC2000, 32 = VECC2001, 33 = VECC2002, 34 = VECC2003, 35 = VECC2004, 36 = VECC2005, 37 = 1408, 38 = 1076-1, 39 = ECH1680, 40 = *P.dispersa*, 41 = 1295

ตารางผนวกที่ 10 ข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด ในถาดอาหาร GN2 ของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ

สายพันธุ์	Binary data ของการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด
1076-1	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 1
ECH1680	0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 1 1 1
VECC2001	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 0 1
VECC2014	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
CDOA1028	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
CDOA1147	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
VECC1596	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
JN2001	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
JN2005	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1
JK2005	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1

ตารางผนวกที่ 11 ข้อมูล similarity matrix จากการวิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด ในถาดอาหาร GN2 ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi*

สายพันธุ์แบคทีเรีย	1076-1	ECH1680	VECC2001	VECC2014	CDOA1028	CDOA1147	VECC1596	JN2001	JN2005	JK2005
1076-1	1.00	0.88	0.73	0.73	0.71	0.75	0.67	0.71	0.71	0.71
ECH1680	0.88	1.00	0.74	0.71	0.69	0.73	0.68	0.69	0.69	0.72
VECC2001	0.73	0.74	1.00	0.87	0.82	0.86	0.91	0.82	0.82	0.82
VECC2014	0.73	0.71	0.87	1.00	0.85	0.86	0.81	0.85	0.85	0.85
CDOA1028	0.71	0.69	0.82	0.85	1.00	0.94	0.82	1.00	1.00	0.96
CDOA1147	0.75	0.73	0.86	0.86	0.94	1.00	0.84	0.94	0.94	0.94
VECC1596	0.67	0.68	0.91	0.81	0.82	0.84	1.00	0.82	0.82	0.82
JN2001	0.71	0.69	0.82	0.85	1.00	0.94	0.82	1.00	1.00	0.96
JN2005	0.71	0.69	0.82	0.85	1.00	0.94	0.82	1.00	1.00	0.96
JK2005	0.71	0.72	0.82	0.85	0.96	0.94	0.82	0.96	0.96	1.00

ภาพผนวกที่ 1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนแต่ละหลุมในถาดอาหาร GN2 (Biolog, Inc., CA, USA)

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 Turanose	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-Glucuronic 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 Phenyethyl-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

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายวัฒนิกร เทพโพธา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 พฤศจิกายน 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงราย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (พ.ศ. 2546)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2548 2. Training in marker-assisted selection in rice and field evaluation of marsh grass plants (California bulrush and smooth cordgrass) July 28 2005 – October 27 2005 at LSU Agricultural Center Rice Research Station. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA.