จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างแตงกวา แตงโม แตงเทศ น้ำเต้า สควอช และซุคคินี ที่แสดงอาการ ใบจุด ใบไหม้ เถาแห้ง ยอดไหม้ถอยกลับ และเหี่ยว จากแหล่งจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม เลย กาฬสินธุ์ และสกลนคร พบเชื้อแบคทีเรียที่โคโลนีสีเหลือง และสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบได้ จำนวน 72 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติแบบดั้งเดิม และเทคนิคทางชีวโมเลกุล ตามระบบ polyphasic taxonomy ที่ประกอบด้วย คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, คุณสมบัติการทำให้เกิดโรค, คุณสมบัติทางชีวเคมี, รูปแบบโปรตีน และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR รวมถึงข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rRNA gene ของเชื้อที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 4 สกุล คือ 1) สกุล *Chryseobacterium* แยกเชื้อจากอาการใบจุดใบไหม้ ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *C. scophthalmum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *C. indologenes* จำนวน 2 ไอโซเลต 2) สกุล *Sphingomonas* แยกเชื้อจากอาการใบจุด ระบุชนิดเป็น *S. paucimobilis* จำนวน 40 ไอโซเลต 3) สกุล *Pantoea* แยกเชื้อจากอาการเถาแห้ง ยอดไหม้ถอยกลับ ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ *P. dispersa* จำนวน 6 ไอโซเลต, *Pantoea* sp. (subgroup I) จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Pantoea* sp. (subgroup II) จำนวน 3 ไอโซเลต และ 4) สกุล *Staphylococcus* แยกเชื้อจากอาการเหี่ยว และใบไหม้ จำนวน 17 ไอโซเลต

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Chryseobacterium* (MLMK4-1As) และ *Staphylococcus* (CUKKU8As) ดำเนินการโดยฉีดแอนติเจนผสมกับ incomplete adjuvant เข้าที่กล้ามเนื้อขาหลังจำนวน 3 ครั้ง และฉีดเข้าเส้นเลือดกลางใบหู 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เก็บเลือดหลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 10 วัน จำนวน 8 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน หลังจากเก็บเลือดครั้งที่ 8 เป็นเวลา 14 วันแล้วจึงฉีดกระตุ้นเข้าบริเวณเส้นเลือดกลางใบหู 1 ครั้ง หลังจากนั้น 10 วัน แล้วเก็บเลือดอีก 4 ครั้ง แต่ละครั้งเวลาห่างกัน 7 วัน พบว่า MLMK4-1As ที่ผลิตได้มีค่า titer สูงสุด 1:200,000 (v/v) เมื่อตรวจสอบที่ปริมาณโปรตีน 10 µg/ml, สามารถตรวจหาเชื้อเป้าหมายได้ที่

ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่ 1.25 µg/ml, ตรวจหาเชื้อในน้ำคั้นพืชได้ที่ระดับ 2.5 µg/ml หรือมีเซลล์แบคทีเรีย 10^5 cfu/ml ส่วน CUKKU8As ที่ผลิตได้มีค่า titer สูงสุด 1:100,000 (v/v) เมื่อตรวจสอบที่ปริมาณโปรตีน 100 µg/ml, สามารถตรวจหาเชื้อเป้าหมายได้ที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่ 0.625 µg/ml, ตรวจหาเชื้อในน้ำคั้นพืชได้ที่ระดับ 5 µg/ml หรือมีเซลล์แบคทีเรีย 10^7 cfu/ml

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด ดำเนินการโดยนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคโลนีสีเหลืองที่แยกได้จากพืชวงศ์แตงและจำแนกเป็นสกุล *Chryseobacterium* spp. (4 ไอโซเลต), สกุล *Sphingomonas* sp. (40 ไอโซเลต), สกุล *Pantoea* spp. (11 ไอโซเลต), สกุล *Staphylococcus* sp. (17 ไอโซเลต) และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นๆ คือ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (2 ไอโซเลต), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2 ไอโซเลต), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า MLMK4-1As มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Chryseobacterium* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ ยกเว้นในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่เกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อย ส่วน CUKKU8As ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ ยกเว้น เกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ดังนั้น โพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้ทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้ตรวจ และวินิจฉัยโรคที่เกิดจากแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่จำเพาะที่อยู่ในกลุ่มที่โคโลนีสีเหลืองซึ่งเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้อย่างแม่นยำ และเชื่อถือได้

Total of 72 isolates of yellow-pigmented bacterial colonies were isolated from infected cucumber, watermelon, melon, gourd, squash and zucchini which showing leaf spot, leaf blight, vine necrosis, die-back and wilt collected from Khon Kaen, Maha Sarakham, Loei, Kalasin and Sakon Nakhon Provinces. Based on polyphasic taxonomy including information on their morphology, pathogenicity, biochemical properties, whole cell protein profile, rep-PCR DNA-fingerprint, carbon source utilization by Biolog™ and nucleotide sequence of 16S rRNA gene were used for bacterial taxonomy. Resulting 4 genus of yellow-pigmented pathogenic bacteria were identified including : 1) genus *Chryseobacterium* (*C. scophthalmum* 2 isolates and *C. indologenes* 2 isolates) from leaf spot/blight symptom, 2) *S. paucimobilis* 40 isolates from leaf spot symptom, 3) genus *Pantoea* (*P. dispersa* 6 isolates, *Pantoea* sp. (subgroup I) 2 isolates and *Pantoea* sp. (subgroup II) 3 isolates) from die-back and vine necrosis symptom, and 4) genus *Staphylococcus* 17 isolates from wilt and leaf blight symptom.

The specific polyclonal antiserum production for *Chryseobacterium* (MLMK4-1As) and *Staphylococcus* (CUKKU8As) was done. Immunization program was made by intramuscular injection of antigen plus incomplete adjuvant for 3 times by 7 days interval, followed by intravenous injection of antigen alone for 2 times by 7 days interval. Bleeding was done at 10 days after final immunization and then bleeding weekly for 8 weeks. The antigen was intravenously reinjection at 14 days after 8th bleeding. Bleedings were continued at 10 days after intravenous reinjection and further weekly interval for 4 weeks. The titer of MLMK4-1As obtained was high as 1:200,000 at antigen level at 10 µg/ml. The sensitivity was shown at the minimum protein content of 0.625 µg/ml. In artificially contaminated sap, showed strong signal with 2.5 µg antigen/ml or at 10^5 cfu/ml. The titer of CUKKU8As obtained was high as 1:100,000 at antigen level at 100 µg/ml. The sensitivity was shown at the minimum protein content of

1.25 µg/ml. In artificially contaminated sap, showed strong signal with 5 µg antigen/ml or at 10^7 cfu/ml.

The specificity test of polyclonal antisera was carried out with phytopathogenic bacteria isolated from cucurbits, including genus *Chryseobacterium* spp. (4 isolates), genus *Sphingomonas* sp. (40 isolates), genus *Pantoea* spp. (11 isolates), genus *Staphylococcus* sp. (17 isolates) and other phytopathogenic bacteria including *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (2 isolates), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2 isolates), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. The MLMK4-1As was highly specific to *Chryseobacterium* spp. and was not serologically related with other phytopathogenic bacteria but slightly reacted with *Staphylococcus* sp., The CUKKU8As was highly specific to *Staphylococcus* sp. and was not serologically related with other phytopathogenic bacteria but slightly reacted with *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Therefore, the quality of these polyclonal antisera was good for reliable detection and diagnosis of bacterial diseases caused by particularly yellow-pigmented bacteria in cucurbits by indirect ELISA.