รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย วิจัยการกักกันพืช

กิจกรรม การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยวิธี PCR-ELISA

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Development of PCR-ELISA for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง วันเพ็ญ ศรีชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กาญจนา วาระวิชะนี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

จากการพัฒนาเทคนิคการการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) แยกได้จากผลแตงโม ด้วยวิธี PCR-ELISA โดยใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R) พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml ซึ่งแสดงผลชัดเจน และสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml และเมื่อตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยวิธี direct-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml พบแถบดีเอ็นเอบางๆ และตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml เช่นกัน ส่วนการตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยเทคนิค DAS-ELISA พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 cfu/ml และตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml และจากการตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ไม่พบเชื้อ Aac กับชุดตรวจดังกล่าว

6. คำนำ

โรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของพืชสกุลแตง สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) เดิมคือเชื้อ *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* ซึ่งเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ได้ ในประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 ในพื้นที่ปลูกแตงโมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญเพื่อส่งออกไปจำหน่ายยังหลายประเทศ ในการส่งออกต้องมีการรับรองการปลอดเชื้อโรคศัตรูพืชที่สำคัญตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง โรคนี้เป็นปัญหา

สำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชสกุลแตงไปยังต่างประเทศ จากการศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Aac ในเมล็ดพันธุ์แตงโมด้วยวิธี Immunomagnetic separation และ PCR โดยการสังเคราะห์ไพรเมอร์จากยีน 16S rRNA ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถตรวจจากน้ำล้างเมล็ดแตงโมที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10 cfu/ml และตรวจสอบกับเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ 0.1% ได้ (Walcott, et al, 2000) ซึ่งการตรวจสอบเชื้อสาเหตุเพื่อให้มั่นใจและสามารถตรวจกับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่น้อย เช่น การปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ ELISA เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าเพื่อเป็นการยืนยันการรับรองเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกได้ อีกทั้งสามารถ นำเทคนิคการตรวจสอบดังกล่าวไปปรับใช้กับการตรวจสอบเชื้อโรคที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์อื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธภาพต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์
  1. ชุดสารเคมี พีซีอาร์ อิไลซ่า ดิกเลเบลลิ่ง
  2. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ ไพรเมอร์ โพรบ
  3. ตัวอย่างเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
  4. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
  5. วัสดุและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้ว ไปเปรตดูดสาร อีไลซ่ารีดเดอร์ เป็นต้น
  6. ชุด ELISA Kit สำหรับตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ของ Agdia
  7. ชุดตรวจสอบของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

1.1 ไอโซเลทเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ และการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเพิ่มปริมาณ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* โดยทำการเกลี่ยขยายเชื้อบนอาหาร Nutrient agar แล้วทำการบ่มเชื้อในอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวบรวมสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในบีกเกอร์ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 µl ใส่ในจานหลุมอิไลซ่าแล้วนำไปตรวจด้วยเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 600 (OD_{600}) ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียเท่ากับ 10^8cfu/ml หลังจากนั้น ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในหลอด ปริมาตร 1 ml แล้วจึงนำหลอดที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอย

แบคทีเรียในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำสารเขวนลอยแบคทีเรียใช้เป็น DNA template ทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และการหาลำดับดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* แล้วนำไปทำการ Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product แล้วทำการเลือกลำดับเบสตรงกลางของ PCR Product เพื่อนำไปออกแบบ ดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) สำหรับใช้ตรวจสอบในขั้นตอน ELISA และทำการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์และดีเอ็นเอตัวตรวจกับบริษัท

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer)

2.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์

ทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl , 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ความเข้มข้น คือ 10^7 และ 10^8 cfu/ml) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ตรวจ วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ และคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนนำไปทดสอบต่อ ข้อ 2.2.2

2.2.2 การปรับค่าของ Annealing temperature ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกจาก 2.2.1

ทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl , 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้น คือ 10^7 cfu/ml) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	อุณหภูมิต่างๆ	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอน annealing ปรับค่าให้เครื่องทำ gradient ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 61.1, 62.3, 63.2, 64.2, 65.2, 66.3, 67.2, 66.3 และ 68.9 องศาเซลเซียส หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

2.2.3 การทดสอบไพรเมอร์กับการจำเพาะเจาะจงกับเชื้อต่างๆ

เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์จาก ข้อ 2.2.2 ทำการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับไพรเมอร์กับเชื้อต่างๆ ได้แก่ *A. avenae* subsp. *citrulli* (ไอโซเลท PSB1228), *Comamonas acidovorans*, *Fluorescent pseudomonas*, *Stenophotomonas* spp. และ *A. avenae* subsp. *citrulli* (ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl , 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อต่างๆ ที่ความเข้มข้น คือ 10^7 cfu/ml) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	62 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

3. การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

3.1 การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยเตรียมหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำหลอดของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอยแบคทีเรียในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น DNA template ทดสอบต่อไป

3.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมสารเคมีที่ได้จากชุดตรวจสอบ ซึ่งมีการเติมสาร DIG ร่วมกับสารละลายที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ และนำหลอดสารละลายเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบสเป้าหมาย โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 6 µl, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 2.5 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 2.5 µl, nuclease-free water ปริมาตร 64.5 µl, Taq polymerase 5

u/µl ปริมาตร 0.5 µl, DNA template ปริมาตร 4 µl (ส่วนหลอดที่เป็น Negative control ให้เติม nuclease-free water แทน DNA template ปริมาตร 4 µl) total volume 100 µl)

ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	62 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมสารเคมีที่ได้จากชุดตรวจสอบ ซึ่งมีการเติมสาร DIG ร่วมกับสารละลายที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ และนำหลอดสารละลายเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบสเป้าหมาย โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 4 µl, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 µl, 125 pmol Control primer ปริมาตร 10 µl, nuclease-free water ปริมาตร 55.5 µl, Taq polymerase 5 u/µl ปริมาตร 0.5 µl, Human control DNA 3 ng/ µl ปริมาตร 10 µl (ส่วนหลอดที่เป็น Negative control ให้เติม nuclease-free water แทน DNA template ปริมาตร 10 µl) total volume 100 µl)

ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	45 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60 °C	1 นาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	2 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	10 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุมด้วยเทคนิค ELISA

ทำการตรวจสอบการติดฉลากของ DIG ใน PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม โดยนำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 นำมาตรวจสอบกับจานหลุม ELISA ที่มีการเคลือบสาร streptavidin แล้วทำ hybridization เชื่อมต่อ probe ที่ติดด้วยสารไบโอติน โดยทดสอบตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.1 เตรียมหลอด PCR product ได้แก่ ชุดควบคุม เชื้อทดสอบ และ Negative Control ดูดสารละลายจากหลอด PCR ตัวอย่างละ 5 µl ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml. แล้วเติมสาร Denaturation solution หลอดละ 20 µl และทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงพอให้สารละลายผสมกัน หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.3.2 เติมสาร Hybridization solution ในหลอดข้อที่ 3.3.1 หลอดละ 225 µl แล้วทำการผสมสารละลายด้วยเครื่อง vortex

3.3.3 ทำการดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละหลอดลงในจานหลุม ELISA (MTP strip) หลุมละ 200 µl ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วนำไปบ่มไว้ใน water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง

3.3.4 ทำการเตรียมสาร Anti-DIG-POD working solution : Conjugate dilution buffer เท่ากับ 1 vol : 99 vol. โดยเก็บไว้ที่มืด

3.3.5 เทสารละลายในข้อ 3.3.3 ทิ้งในอ่างล้าง และทำการล้างหลุม MTP strip ด้วย washing solution 3-5 ครั้ง ครั้งละ 250 µl ต่อหลุม ครั้งสุดท้ายของการล้างให้ตบจานหลุมให้แห้งบนกระดาษ

3.3.6 เติมสารละลายในข้อ 3.3.4 ที่เตรียมไว้ หลุมละ 200 µl และปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วห่อจานหลุมด้วยฟอยด์ และบ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.7 เตรียมสารละลาย ABTS substrate solution ใช้ 1 เม็ด ของ ABTS ต่อ substrate buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด

3.3.8 ล้างจานหลุมเหมือนในข้อ 3.3.5

3.3.9 เติมสารละลาย ABTS ใส่ในหลุมหลุมละ 200 µl ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว และห่อด้วยฟอยด์ บ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.10 นำจานหลุม วัดค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ค่าความยาวคลื่น 405 nm. ทำการบันทึกผล

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR

ทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 2mMdNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primerปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 9 ความเข้มข้น) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100V นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

4.2 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยละลายสารแขวนลอยกับบัฟเฟอร์ที่ชุดตรวจหลอดละ 1 มิลลิลิตร

4.2.2 ใช้หลอดดูดสารละลายที่ได้ จำนวน 10 หยด หยดลงในชุดตรวจ โดยระวังอย่าให้ปริมาณของน้ำคั้นเกินขีดขาวของชุดตรวจ

4.2.3 ทำการอ่านผลหากเกิดแถบสีทั้ง test line และ control line แสดงว่ามีเชื้อ Aac หรือถ้าเกิดแถบสีที่ control line อย่างเดียว แสดงว่าไม่มีเชื้อ Aac. ในตัวอย่าง ทำการบันทึกผล

4.3 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

4.3.1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

4.3.2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.4 ทำการหยอดเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3.5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.8 ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD_{405}) และทำการบันทึกผล

- เวลาและสถานที่

เวลา	เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 (2 ปี)
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ *A. avenae subsp. citrulli*

ได้ขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ เชื้อที่ได้จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลเมลอน (Aac001) และจากกลุ่มงานแบคทีเรีย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลแตงโม (PSA1228)

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และการหาลำดับดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

- **ไพรเมอร์ (primer)** ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่

คู่ที่ 1 สืบค้นจากรายงานของ Walcott and Gitaitis (2000)

WFB1 (F) 5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'

WEB2 (R) 5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 360 bp

คู่ที่ 2 ได้จากการปรับไพรเมอร์ของ Walcott and Gitaitis (2000) หลังจากนำไป Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product

WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'

WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 364 bp

- **ลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)**

Probe 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3'

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer)

2.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์

ทำการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Aac001 และ PSA1228 ไอโซเลทละ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ WFB1 (F)/WEB2 (R) และ WFBA (F)/WFBA (R) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ไพรเมอร์คู่ **WFB1 (F)/WEB2 (R)** สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้อย่างชัดเจน แต่ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เห็นแถบดีเอ็นเอของไอโซเลท Aac001 บางๆ ส่วน ไอโซเลท PSA1228 ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ

ส่วนไพรเมอร์คู่ **WFBA (F)/WFBA (R)** ให้ผลเช่นเดียวกับไพรเมอร์คู่ WFB1 (F)/WEB2 (R) แต่ชัดเจนกว่า แต่ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เห็นแถบดีเอ็นเอของไอโซเลท Aac001 ชัดเจน ส่วน ไอโซเลท PSA1228 สามารถเห็นได้บางๆ (ภาพที่ 1)

2.2.2 การปรับค่าของ Annealing temperature ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์จากข้อ 2.2.1

จากการทดสอบปรับค่าของ Annealing temperature อุณหภูมิที่ระดับต่างๆ กับไพรเมอร์ **WFB1 (F)/WEB2** (R) พบ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ Aac ทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าทุกอุณหภูมิเหมาะสมกับไพรเมอร์คู่นี้ ส่วนไพรเมอร์ **WFBA (F)/ WFBA (R)** พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดชัดเจนที่สุด ได้แก่ 62.3 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์คู่นี้ (ภาพที่ 2) ดังนั้น จึงใช้อุณหภูมินี้ในขั้นตอนต่อไป

2.2.3 การทดสอบไพรเมอร์กับการจำเพาะเจาะจงกับเชื้อต่างๆ

จากการตรวจสอบไพรเมอร์ 2 คู่ (ที่ได้จากข้อ 2.1) ในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในข้อ 2.2.2 คือ 62 องศาเซลเซียส กับเชื้อทดสอบต่างๆ พบว่า ไพรเมอร์ **WFB1 (F)/WEB2 (R)** พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ ***A. avenae* subsp. *citrulli*** ทั้งสองไอโซเลท คือ PSB1228 และ ไอโซเลทที่ได้จากได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 360 bp. และเชื้อ *Comamonas acidovorans* ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนการทดสอบไพรเมอร์ **WFBA (F)/WFBA (R)** พบเกิดแถบดีเอ็นเอของเชื้อ ***A. avenae* subsp. *citrulli*** ทั้งสอง ไอโซเลท คือ PSB1228 และ ไอโซเลทที่ได้จากได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งมีขนาดประมาณ 364 bp. ส่วนเชื้ออื่นๆ ไม่พบแถบดีเอ็นเอบน agarose gel แสดงว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถตรวจหาเชื้อ ***A. avenae* subsp. *citrulli*** ได้ดี แต่ไพรเมอร์คู่ **WFB1 (F)/WEB2 (R)** อาจตรวจพบเชื้อ *Comamonas acidovorans* ได้ ซึ่งจะมีขนาดที่ต่างกับเชื้อ ***A. avenae* subsp. *citrulli*** (ภาพที่ 3)

3. การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

3.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.1.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ได้สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml จำนวน 9 ตัวอย่าง

3.1.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชองชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control

3.2 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิค ELISA

ได้ PCR product ของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PSA1228 จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml **และ** ได้ PCR product ของชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control และจากการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค PCR-ELISA พบว่า ในหลุมที่ใส่ตัวอย่างของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 cfu/ml รวมถึงหลุมที่เป็น positive control แสดงผลบวก (แสดงสีน้ำเงินม่วง) ส่วนหลุมที่ใส่ตัวอย่างของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml และในหลุม negative

control แสดงผลเป็นลบ (แสดงสีใส) แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิควิธีการนี้สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1 cfu/ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้คือ 10^7 cfu/ml (ภาพที่ 4)

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA กับเทคนิคอื่นๆ

จากการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR

จากการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อที่ความเข้มข้น 1, 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 และ 10^7 cfu/ml ซึ่งที่ความเข้มข้น 1 cfu /ml ของเชื้อ เห็นแถบดีเอ็นเอแบบจางๆ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10^8 และ Negative Control แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1 cfu /ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้ คือ 10^7 cfu /ml (ภาพที่ 5)

4.2 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

จากการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแถบ Test line ไม่เกิด Positive กับทุกความเข้มข้นของเชื้อที่ทดสอบ ส่วนแถบ Control line ขึ้นแถบปกติ แสดงว่า ชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย อาจไม่สามารถตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (ภาพที่ 6)

4.3 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia)

จากการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 และ 10^7 CFU/ml ให้ผลบวก (เกิดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) แต่ที่ 1,10 และ10^8 CFU/ml และ Negative control ให้ผลลบ (สีใส) แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 CFU/ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้ คือ 10^7 CFU/ml ได้ (ภาพที่ 7)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาเทคนิคการการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) แยกได้จากผลแตงโม ด้วยวิธี PCR-ELISA โดยใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R) (มีลำดับเบส ได้แก่ WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'/ WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3') และ Probe จำนวน 1 เส้น คือ 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3' พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ Aac ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml ซึ่งแสดงผลชัดเจน และตรวจสอบเชื้อ Aac ได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml โดยไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับเชื้ออื่นๆ ได้แก่ *Comamonas acidovorans*, *Fluorescent pseudomonas* และ *Stenophotomonas* spp. ที่อาจปนเปื้อนมาได้ และเมื่อตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยวิธี direct-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml พบแถบดีเอ็นเอจางๆ และตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml เช่นกัน ส่วนการตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยเทคนิค DAS-ELISA พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 cfu/ml และตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml และจากการตรวจสอบเชื้อ Aac ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ไม่พบเชื้อ Aac กับชุดตรวจ

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

- นำเทคนิคที่ได้พัฒนานำไปใช้ตรวจสอบเชื้อ Aac กับเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออก และตรวจจากอาการของพืชที่สงสัยที่ให้การรับรองการปลอดเชื้อกับพืชสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

11. ขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา คุณชลิตา ดาหาญ และคุณอัญชลี ราศรี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง และด่านตรวจพืชแหลมฉบัง สำนักควบคุมพืชและ-วัสดุการเกษตรและน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

ประภาษ กาวิชา เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ พิศาล ศิริธร . 2545. ความหลากหลายของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเขตผลิตแตงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ . หน้า 415-430. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2545, วันที่ 28-29 มกราคม 2545 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พยอม พินยพงค์. 2537. รายงานครั้งแรกของโรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของแตงโมในประเทศไทย. แก่นเกษตร 22 : 55-57.

เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และประภาษ กาวิชา . 2541. โรคผลเน่าแตงโมของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย . รายงานการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2543, หน้า 34-45. วันที่ 24-25 มกราคม 2543 ณ ห้องประชุมกวีจุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Babadoost, M., and Pataky, N. 2002. First Report of Bacterial Fruit of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. Plant Dis. 86:443.

Evans, T.A., and R. P. Mulrooney. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. Plant Dis. 73: 1074.

Feng, J.J., Li, J.Q., Walcott, R.R., Zhang, G.M., Luo, L.X., Kang, L., Zheng, Y. and Schaad, N.W. 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. Seed Sci. & Technol., 41, 1-15.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Isakeit, T., M.C. Black, L.W. Barnes and J.B. Jones. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 81: 694.

OYA, H., NAKAGAWA, H., SAITO, N., UEMATSU, H. and OHARA, T. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304–310.

Pinyapong, P.S. 1994. Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum&Nakai) in Northeastern Thailand. M.S. Thesis. University of the Philippines at Los Banos. 99.

Rane, K.K. and R.X. Latin 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon : association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.

Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson.1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

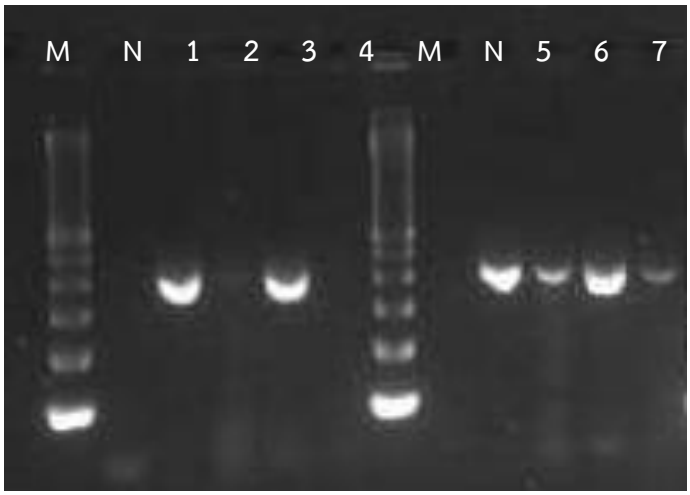
Walcott, R. R., and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.

Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease, 84, 470-474.

Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehaie, A.C. and Ling, K. (2006).Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology, 34, 101-106.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L, and Thomas, C.E. 1996. Bacterial fruit blotch in Compendium of Cucurbit Disease. The America Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota . 34-35 p.

13. ภาคผนวก



M = Marker 100 bp ladder

N = Negative

1 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

2 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

3 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

4 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

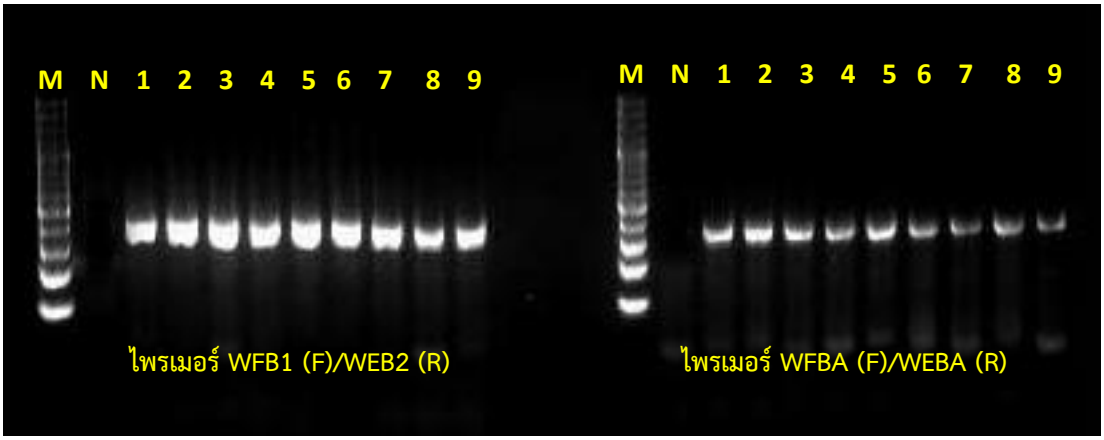
5 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

6 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

7 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

8 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบไพรเมอร์ 2 คู่กับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ไอโซเลทละ 2 ความเข้มข้น



M : Marker

N : น้ำกลั่น

1 : Annealing temperature อุณหภูมิ 61.1 องศาเซลเซียส

2 : Annealing temperature อุณหภูมิ 62.3 องศาเซลเซียส

3 : Annealing temperature อุณหภูมิ 63.2 องศาเซลเซียส

4 : Annealing temperature อุณหภูมิ 64.2 องศาเซลเซียส

5 : Annealing temperature อุณหภูมิ 65.2 องศาเซลเซียส

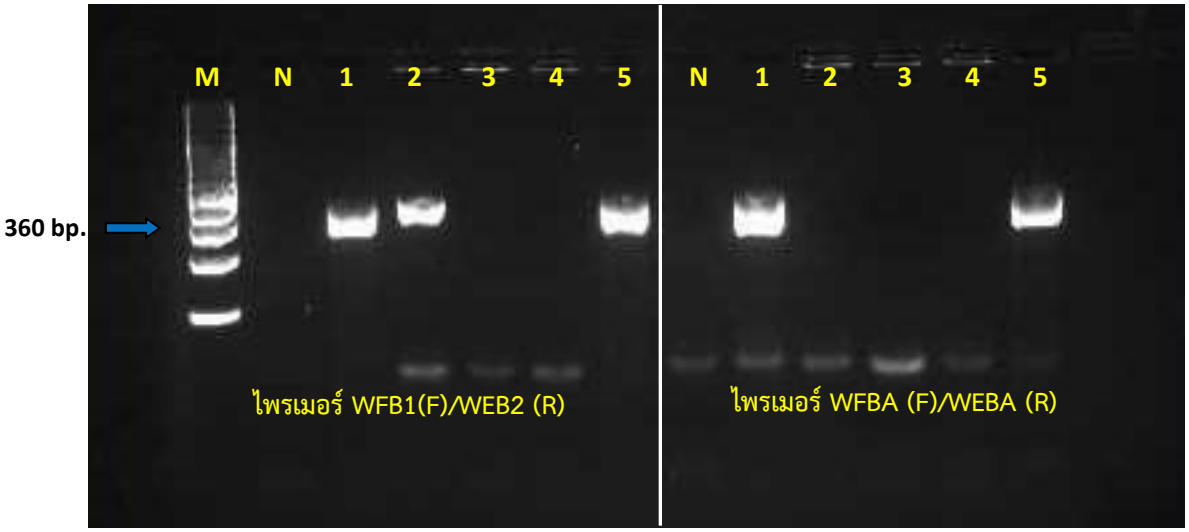
6 : Annealing temperature อุณหภูมิ 66.3 องศาเซลเซียส

7 : Annealing temperature อุณหภูมิ 67.2 องศาเซลเซียส

8 : Annealing temperature อุณหภูมิ 66.3 องศาเซลเซียส

9 : Annealing temperature อุณหภูมิ 68.9 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 2 การทดสอบ Annealing temperature ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กับไพรเมอร์ **WFB1(F)/WEB2 (R) และ ไพรเมอร์ WFBA (F)/WEBA (R)**



M : Marker

N : น้ำกลั่น

1 : เชื้อ *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (ไอโซเลท PSA1228)

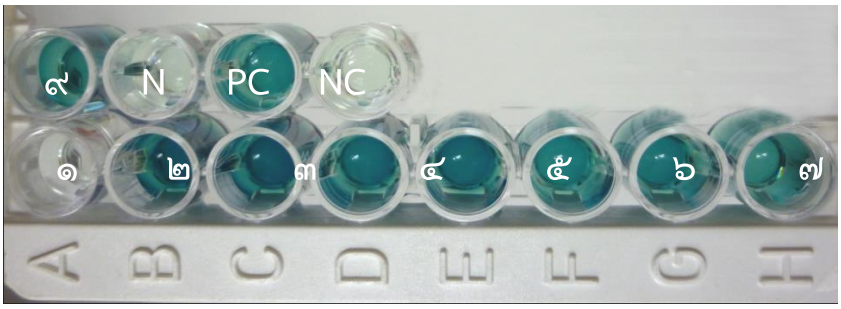
2 : เชื้อ *Comamonas acidovorans*

3 : เชื้อ *Fluorescent pseudomonas*

4 : เชื้อ *Stenophotomonas* spp.

5 : เชื้อ *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (ไอโซเลทจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

ภาพที่ 3 การทดสอบไพรเมอร์ ไพรเมอร์ WFB1(F)/WEB2 (R) และ ไพรเมอร์ WFBA (F)/WEBA (R) กับความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อชนิดอื่นๆ



1 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^8

2: สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^7

3 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^6

4 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^5

5 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^4

6 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^3

7 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^2

8 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10

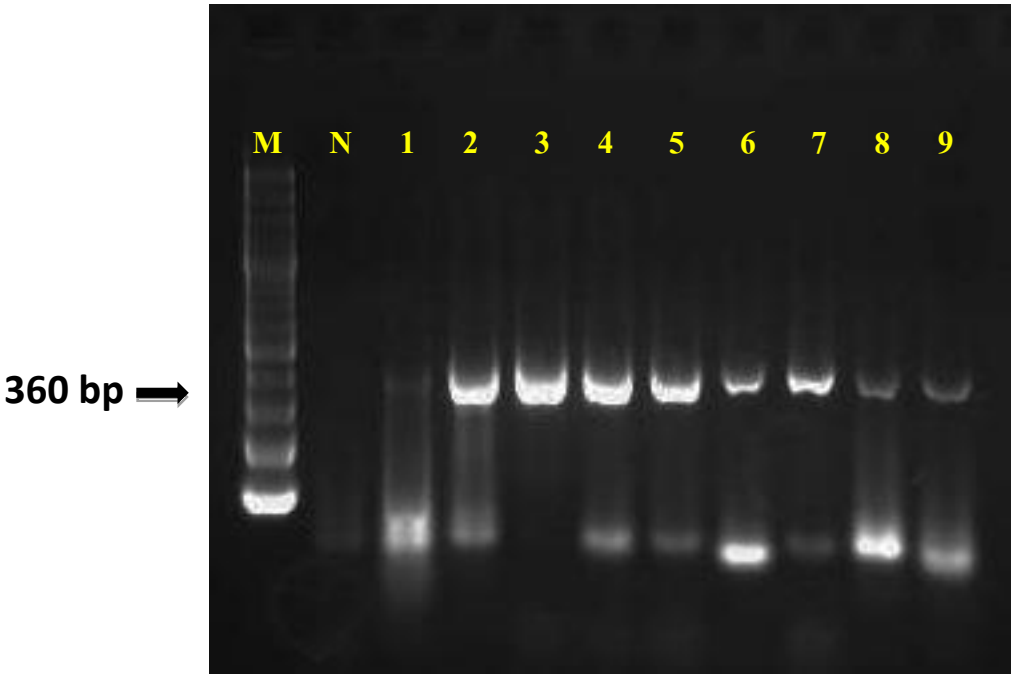
9 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 1

N : น้ำกลั่น

PC: Positive control ของชุด PCR product control

NC: Negative control คือ น้ำกลั่น ของชุด PCR product control

ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และ ชุดควบคุม ด้วยเทคนิค PCR-ELISA



M: Marker

N: Buffer

1: สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^8

2: สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^7

3 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^6

4 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^5

5 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^4

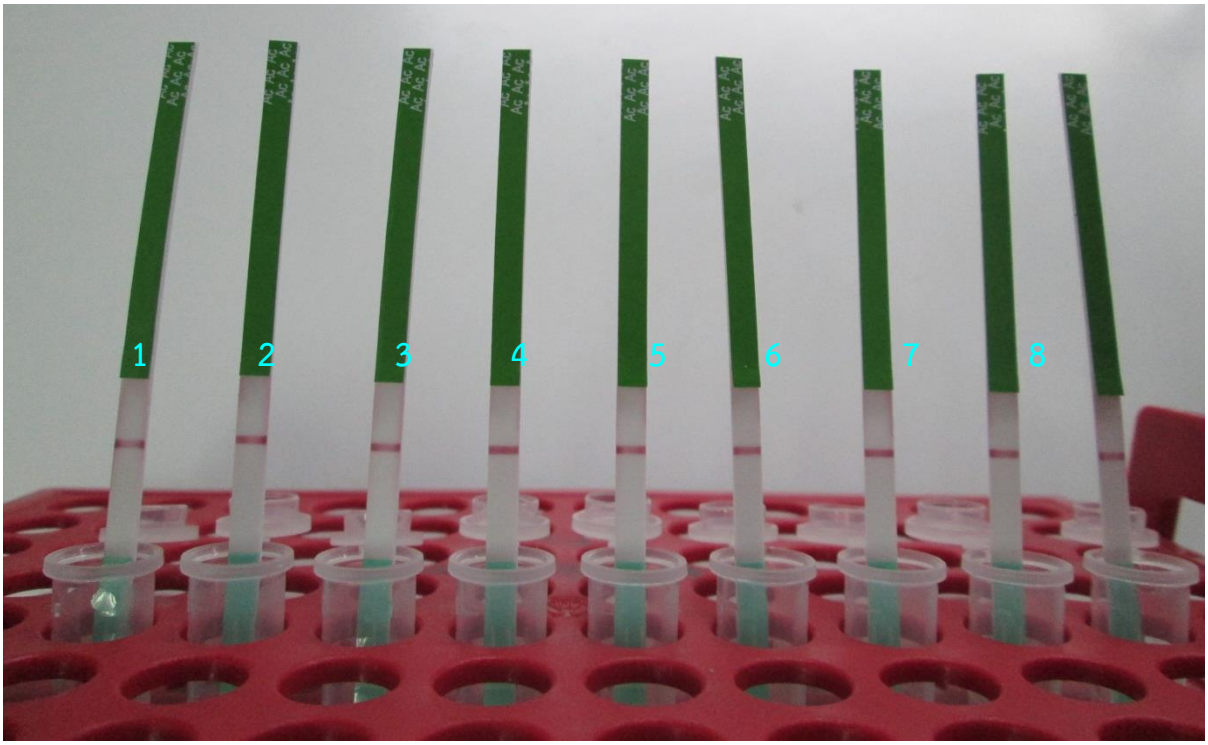
6 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^3

7 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^2

8 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10

9 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 1

ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่เข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิค direct-PCR



1 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^8

2: สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^7

3 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^6

4 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^5

5 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^4

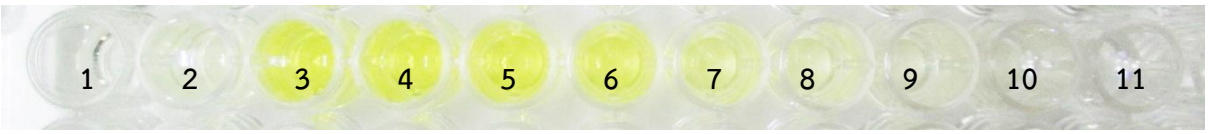
6 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^3

7 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^2

8 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10

9 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 1

ภาพที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และ ชุดควบคุม ที่เข้มข้นต่างๆ ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรียของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ



1 : Buffer

2 : น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

3 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^8

4: สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^7

5 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^6

6 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^5

7 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^4

8 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^3

9 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10^2

10 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 10

11 : สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้น 1

ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และ ชุดควบคุม (Buffer และ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ที่เข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia)