ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้

PCR detection for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, the causal agent of bacterial spot on orchids

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] วงศ์ บุญสืบสกุล[1] และขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[2]

[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, [2]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้ ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. avenae* จำนวน 6 คู่ ได้แก่ RST49/RST51, BX-L1F/BX-S-R2, AacF2/AacR2, AacF3/AacR2, WFB1/WFB2, Oaf1/Oar1 และ Oaf1/Oar2 พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อได้คือ WFB1/WFB2 ขนาดแถบดีเอ็นเอ 350 bp ไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp และคู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar2 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp ทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ชนิดอื่น พบว่าทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* และ *Burkholderia gladioli* แต่ไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* หรือแบคทีเรียซาโปรไฟท์อื่นที่แยกจากกล้วยไม้ ปฏิกิริยาความไวในการตรวจเชื้อด้วยคู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 สามารถตรวจเชื้อได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุด 10 พิโคโมล และตรวจในระดับเซลล์แบคทีเรียได้ต่ำสุดที่ 10^5 cfu/ml ทดสอบการตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้

รหัสโครงการวิจัย 09 01 49 02

คำนำ

โรคพืชนับเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่นับเป็นปัญหามากขึ้นในการผลิตกล้วยไม้ที่มีคุณภาพ แบคทีเรียเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดการแพร่ระบาดได้รวดเร็วและรุนแรง ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้เกิดจาก *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* พบการแพร่ระบาดมากบนกล้วยไม้สกุลแวนดา แอสโคเซนดา ช้าง อะแรนเธอร่า และฟาแลนอปซิส อาการเริ่มแรกที่พบบนใบกล้วยไม้ลักษณะเป็นจุดสีเขียวอมเหลือง ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นสีน้ำตาลถึงดำ กลางแผลเนื้อเยื่อยุบตัวเป็นแอ่ง มีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ อาการบนกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส แผลจุดค่อนข้างดำไม่กลม ส่วนใหญ่แผลยุบตัวรูปหลายลักษณะ อาจพบเส้นสีขาวบริเวณกลางแผลที่เป็นสีดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ จากรายงานการเกิดโรคในต่างประเทศ Miller (1990) กล่าวถึงการเกิดโรค bacterial brown spot จากแบคทีเรีย *Pseudomonas cattleyae* ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส แคทลียา Cypripedium สกุลหวาย ออนซิเดียม และแวนดา โดยมีอาการเนื้อเยื่อนุ่ม ช้ำฉ่ำน้ำ ต่อมาเนื้อเยื่อยุบตัวเป็นแผลสีน้ำตาลถึงดำ อาการโรคดังกล่าวสามารถทำให้ต้นกล้าฟาแลนอปซิสตายได้ โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วนบนใบ และสามารถติดไปกับการกระเด็นของน้ำ และ Stovold et al. (2001) รายงานการเกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส จากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (syn. *Pseudomonas cattleyae*) Abdullah and Kadzimin (1993) ทั้งนี้โรคใบจุดแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตกล้วยไม้ชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลแวนดา สกุลช้าง และฟาแลนอปซิส ที่มีการจำหน่ายต้นในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ซึ่งมีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจเชื้อและจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ จะช่วยให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรค และสาเหตุของการเกิดโรคได้รวดเร็ว เพื่อการป้องกันกำจัด และเพื่อการตรวจรับรองการนำเข้าหรือส่งออกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ทำการแยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรค โดยตัดเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เกิดโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างด้วยน้ำกรองฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำกรองฆ่าเชื้อบนชิ้นส่วนพืช บดด้วยแท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ จนเซลล์พืชแตก ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อแตะไปลากบนอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGAบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีมีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร นำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร NGA ทดสอบคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทในหลอดอาหารเอียง น้ำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

เพื่อใช้ในการศึกษาระยะสั้น และเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาระยะยาว

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ เลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลท (ตารางที่ 1) บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไปเปตดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนเก็บเซลล์แบคทีเรีย และนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneAid DNA extraction ตามกรรมวิธีของชุดสกัด จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ด้วย TE buffer (10 mM Tris- HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 30-50 µl ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรส 0.8% ด้วยวิธี electrophoresis และวัดปริมาณและคุณภาพด้วยสเปกโตโฟเรซิส เก็บสารละลายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการทดสอบการตรวจเชื้อด้วยคู่ไพรเมอร์แต่ละชนิด

3. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ 6 คู่ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริษัท QIAGEN Operon (QIAGEN, Cologne, Germany) และได้รับการอนุเคราะห์ไพรเมอร์ Aacf2/ Aacr2 จาก Dr.Norman Schaad ซึ่งแต่ละชนิดไพรเมอร์มีลำดับเบส ดังนี้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Annealing temp. (°C)	ขนาด (bp)	อ้างอิง
RST49	5'-GATGGCCGTGCCCTTCTTCATCCTCG-3'	53	390	Minsavage et al. 1995
RST51	5'-CATGGCCACGATGAGGATCG-3'			
WFB1	5'-GACCAGCCACACTGGGAC-3'	55	350	Walcott et al. 2000
WFB2	5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3'			
BX-L1	5'-CAGCTGGGAGCGATCTTCAT-3'	68	279	Bahar et al. 2008
BX-S-R2	5'-GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA			
Oaf1	5'-GTCGGTGCTAACGACATGG-3'			Song et al. 2002
Oar1	5'-AGACATCTCCGCTTTCTTTCAA-3'	55	550	
Oaf2	5'-TCCTCGCATCTTATGTTCGGAA-3'	55	150	
Aacf2	5'-GGAAGAAATTCGGTGCTACCC-3'	60	450	Song et al. 2002
Aacr2	5'-TCGTCATTACTGAATTTCAACA-3'			

เตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

สารประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5x Green GoTaq Flexi buffer	4
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.2
25 pM ไพรเมอร์ ชนิดที่1	1
25 pM ไพรเมอร์ ชนิดที่ 2	1
Taq DNA polymerase 5 U/ ul	0.25
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	10

สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ PE 2400 thermal cycler และ PE9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้อุณหภูมิและเวลา ในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 1.เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (initial denaturation) 94°C 2 นาที 2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) 94 °C 30 วินาที 3.ไพรเมอร์จับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) (ตารางด้านบน ตามชนิดไพรเมอร์) 45 วินาที- 1 นาที 4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) 30 วินาที – 1 นาที 5.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 72 °C 7 นาที ทุกคู่ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30- 35 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสาย ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ในอะกาโรส เจล เจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 2% อะกาโรส เจล ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ ใน 0.5X TBE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ นาน 85 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพ ด้วย Gel Document

4. ทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

ทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะในการตรวจเชื้อ โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* จำนวน 3 คู่ ทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ คือ *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่ากล้วยไม้ *Burkholderia gladioli* แบคทีเรียซาโปรไฟท์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* และแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* โดยใช้กรรมวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3

ทดสอบความไวของปฏิกิริยาในการตรวจระดับดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ P285 และ P391 ทำการเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 1 เฟมโตกรัม ใช้ดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นต้นแบบ ในการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3 โดยใช้ตัวอย่างละ 2ไมโครลิตร และทดสอบความไวของปฏิกิริยาในการตรวจเชื้อในระดับเซลล์ โดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 2 สายพันธุ์ บนอาหาร NGA บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็มละลายในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดทดลอง 9 มิลลิลิตร นำมาเจือจาง ครั้งละ 10 เท่า ให้มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10 ถึง 10^8 colony forming unit/ milliliter (cfu/ml) นำมาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร ใช้น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ ใช้อุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น โดยเพิ่มเวลาสำหรับแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น นาน 5 นาที และเวลาในการลอกสายดีเอ็นเอ เพิ่มเป็น 1 นาที ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส บน 2% อะกาโรส เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

5. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืช

เตรียมตัวอย่างพืชทดสอบ โดยตัดเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่เกิดอาการแผลจุดเชื่อมต่อกับบริเวณเนื้อเยื่อปกติ ขนาด ประมาณ 0.2x0.2 มิลลิเมตร หยดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใช้ใบมีดผ่าตัดลนไฟฆ่าเชื้อตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้แบคทีเรียที่อยู่บริเวณท่อลำเลียงพืชหลุดออกมาอยู่ในน้ำ แช่ทิ้งไว้นาน 5 นาที ใช้ไปเปตดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อในน้ำบดตัวอย่าง ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อด้วยไพรเมอร์ เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 – กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
อาคารปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

ลักษณะอาการการเกิดโรคในระยะเริ่มแรก พบแผลจุดเล็กสีครีมอมเหลืองหรือแผลจุดสีเขียวอ่อน กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่ยุบตัวเป็นแอ่ง ขอบแผลสีเข้ม และวงนอกสุดล้อมรอบด้วย halo สีเหลืองหรือเขียวอ่อน ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยมากพบบริเวณใบยอด หรือใบอ่อน ต่อมาอาการพัฒนา มีลักษณะแผลค่อนข้างกลม กลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือเข้ม ขอบแผลเป็นวงสีน้ำตาลเข้ม กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1)

จากการแยกเชื้อบนอาหาร NGA แบคทีเรียเจริญหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 36-48 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เมื่อเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้เป็นเวลานานกว่า 5-7 วัน จะพบบริเวณขอบของโคโลนีมีคราบสีขาวใสขอบไม่เรียบบาง ๆ รอบโคโลนี (ภาพที่ 1) ซึ่งจากการทดสอบแยกเชื้อ ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อ และศึกษาการจำแนกเชื้อได้เป็นแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคที่จัดอยู่ในกลุ่มทนร้อน (heat lover bacteria) ซึ่งมีการระบาดและรายงานในประเทศออสเตรเลีย จากรายงานของ Stovold et al. (2001)

การเก็บเชื้อเพื่อการศึกษา เลือกเก็บ 2 วิธี คือเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท อายุ 24 ชั่วโมง เก็บลงในน้ำ ในหลอด eppendrof tube 1.5-2 ml จำนวน 2 ซ้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บเชื้อบนอาหารเอียง เลี้ยงให้เจริญ 24 ชั่วโมง แล้วเทปิดทับด้วยพาราฟินเหลว เก็บในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

แยกสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ ได้แก่ *A. avanae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดกล้วยไม้ จำนวน 11 ไอโซเลท จากกล้วยไม้สกุลการ้า 6 ชนิด แบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่า จำนวน 3 ไอโซเลท แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* จำนวน 6 ไอโซเลท แบคทีเรียที่ไม่เป็นสาเหตุโรคกล้วยไม้ ได้แก่ *Xanthomonas campestris* สาเหตุโรคใบจุดและเน่าดำคะน้า จำนวน 2 ไอโซเลท แบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า (unknown species) จำนวน 3 ไอโซเลท และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. แยกจากใบหน้าวัวและกล้วยไม้ ที่ใช้ในการทดสอบควบคุมโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้ จำนวน 3 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

3. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

ปฏิกิริยาพีซีอาร์การตรวจเชื้อโดยคู่ไพรเมอร์ RST49 และ RST51 (Minsavage et al. 1995) เป็นไพรเมอร์จำเพาะต่อ *A. avenae* พบการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ได้เพียง 1 จาก 8 ไอโซเลท โดยมีแถบจาง ๆ และสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จากแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* ขนาดประมาณ 390 bp ไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *B. gladioli* และ *E. catotovora* subsp. *carotovora* (ตารางที่ 1)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์การตรวจเชื้อโดยคู่ไพรเมอร์ BX-L1F/BX-S-R2 เป็นไพรเมอร์จำเพาะต่อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ออกแบบจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย Box-PCR (Bahar et al. 2008) สังเคราะห์เพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *A. avenae*

subsp. *citrulli* ได้เพียง 3 จาก 4 ไอโซเลท ขนาดประมาณ 270 bp ซึ่งตรวจพบแถบดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งแถบ ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ Aacf2/Aacr2 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จากดีเอ็นเอต้นแบบเชื้อ *A.avenae* subsp. *cattleyae* เพียงตัวอย่างเดียว (ตารางที่ 1)

ปฏิกิริยาการตรวจเชื้อโดยไพรเมอร์ WFB1/WFB2, Oaf1/Oar1 และ Oaf1/Oar2 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350, 550 และ 150 bp ตามลำดับ โดยพบปฏิกิริยาการสังเคราะห์แถดีเอ็นเอข้ามต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นคือ *Burkholderia gladioli E. chrysanthemi* และ*E. carotovora* subsp. *carotovora* ยกเว้น Oaf1/Oar1 ไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจาก *E. carotovora* subsp. *carotovora* คู่ไพรเมอร์ WFB1/WFB2 พบปฏิกิริยาการเกิดแถบดีเอ็นเอสองแถบ และสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *X. campestris* ทั้งนี้อาจเนื่องจากคู่ไพรเมอร์ออกแบบจากบริเวณ 16s rDNA ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกันมา (ตารางที่ 1)

จากรายงานของ Song et al. (2004) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ Aaaf3/Aaar2 จากลำดับเบสบริเวณ 16s-23s rDNA ซึ่งให้ผลทดสอบจำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคข้าวเท่านั้น ไม่สังเคราะห์แบคทีเรียชนิดเดียวกันที่เป็นสาเหตุโรคของข้าวโพดและพืชอาศัยชนิดอื่น และไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ทั้งนี้คู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 (Song et al. 1997) ได้ออกแบบมาจำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. avenae* ทั้งนี้ในการทดลองครั้งนี้พบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจาก *A. a. cattleyae* และ *A. a. citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าเมลอน นอกจากนั้นยังพบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ชนิดอื่น โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเอเท่ากัน

4. ทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ได้แก่ RST49/RST50, BX-L1F/BX-S-R2, Aacf2/Aacr2, WFB1/WFB2, Oaf1/Oar1 และ Oaf1/Oar2 ยังไม่มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อได้ คู่ไพรเมอร์ RST49/RST50, BX-L1F/BX-S-R2, Aacf2/Aacr2 ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเป้าหมายได้ทุกไอโซเลท และมีความไม่สม่ำเสมอในกรตรวจเชื้อเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบ หรือเกิดแถบจาง ทำให้ไม่สามารถระบุได้ สำหรับคู่ไพรเมอร์ WFB1/WFB2, Oaf1/Oar1 และ Oaf1/Oar2 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเชื้อสาเหตุโรคเป้าหมายได้ แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ชนิดอื่น คือ *B. gladioli* , *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* โดยไพรเมอร์ WFB1/WFB2 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *X. campestris* ทั้งนี้อาจเนื่องจากคู่ไพรเมอร์ออกแบบจากลำดับเบสบริเวณ 16s DNA ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับในกลุ่มของแบคทีเรีย ทั้งนี้ไม่เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียซาโปรไฟท์ และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ทดสอบ ปฏิกิริยาความไวใน

การตรวจเชื้อด้วยคู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 สามารถตรวจเชื้อได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุด 10 พิโคโมล และตรวจในระดับเซลล์แบคทีเรียได้ต่ำสุดที่ 10^5 cfu/ml

ทั้งนี้ในรายงานของ Song et al. ได้ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 ซึ่งออกแบบสำหรับการตรวจเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* จากเมล็ดข้าว ซึ่งในการทดสอบพบว่าไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเชื้อ *A. avanae* subsp. *cattleyae* 2 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้

5. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืช (อาการโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้)

ทดสอบการตรวจเชื้อจากตัวอย่างใบพืช พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ อาจเนื่องจากปฏิกิริยายับยั้งจากสารบางชนิด เช่นเดียวกับรายงานของ Song et al. 2004 ที่พบว่าเทคนิคพีซีอาร์มีประโยชน์ในการตรวจเชื้อบริสุทธิ์ แต่มีข้อจำกัดในการตรวจเชื้อจากเมล็ด ตัวอย่างพืช หรือตัวอย่างดิน เนื่องจากสารยับยั้งปฏิกิริยาหลายชนิดจากพืช และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในการแก้ปัญหาสารยับยั้งปฏิกิริยา Song et al. แนะนำว่าควรใช้เทคนิค BIO-PCR มาช่วย โดยการเลี้ยงในอาหารจำเพาะ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อ และลดการเกิดปฏิกิริยายับยั้งได้ด้วย

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. *A. avenae* subsp. *cattleyae* เป็นสาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรีย พบการเข้าทำลายในกล้วยไม้สกุลการค้าหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ แวนดา แอสโคเซนดา ช้าง แคทลียา ฟาแลนอปซิส ควรมีการตรวจสอบและหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสม เพื่อป้องกันผลกระทบการส่งออก และธุรกิจการค้ากล้วยไม้ของประเทศไทยในอนาคต

2. การทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar1 ให้ผลดีที่สุดสามารถใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 pb มีความไวในการตรวจเชื้อระดับเซลล์แขวนลอยเชื้อและดีเอ็นเอที่ 10^5 cfu//ml และ 10 พิโคกรัม ตามลำดับ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ให้ผลเช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ Oaf1/Oar2 ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาด 150 bp ทั้งนี้พบปฏิกิริยาการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอข้ามในแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ชนิดอื่น คือ *E. chrysanthemi* และ *B. gladioli* เช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ WFB1/WFB2 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 350 bp จากแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ทั้งสองชนิด และ *X. campestris*

3. คู่ไพรเมอร์ทั้งสามชนิด สามารถใช้ตรวจสอบได้เพียงระดับเชื้อบริสุทธิ์ ยังไม่สามารถตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืช ตัวอย่างน้อได้ เนื่องจากการตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืช พบการสังเคราะห์

ข้ามในแบคทีเรียสาเหตุโรคชนิดอื่น ในการทำงานวิจัย อาจต้องมีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ร่วมด้วย เพื่อการยืนยัน

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุลแวนดา. เรื่องเต็ม เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 15-17 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Pathology 57:754-763.

Jones, J.B., Gitaitis, R.D. and Schaad, N.W. 2001. *Acidovorax and Xylophilus.* In: Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition, APS Press,121-138.

Miller, J. W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. Plant Pathology Circular no. 330.

Minsavage, G.V., Hoover, R.J.,. Kucharek, T.A, and Stall, R.E.. 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. Phytopathology 85:1162 (Abstr.)

Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae*(Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Systemic and applied microbiology. 31:434-446.

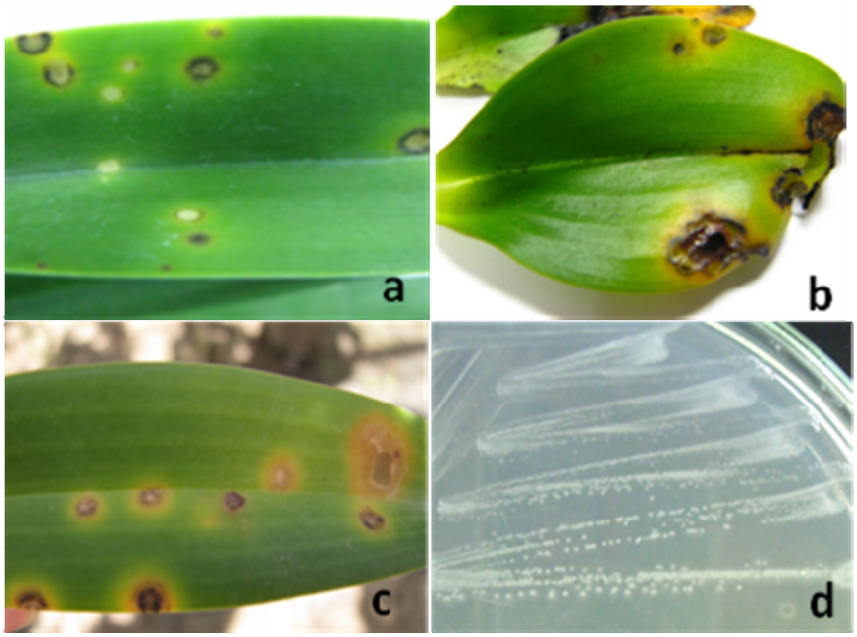
Song, W.Y., Kim, H.M., Hwang, C.Y. and Schaad, N.W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. J. Phytopathology 152:667-676.

Song, W.Y., Sechler, A.J., Hatziloukas, E., Kim, H.M. and Schaad, N.W. 2003. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. In: Iacobellis NS, Collmer A, Hutcheson SW et al., eds. Pseudomonas syringae and Related Pathogens. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 531-544.

Stovold, G. E., Bradley J. and Fahy, P.C.. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*Pseudomonas cattleyae*) causing leafspot and death of *Phalaenopsis* orchids in New South Wales. Australasian Plant Pathology. (30):73-74.

Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehaie, A. and Ling, K. 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Sci.& Technol. 34:101-116.

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.



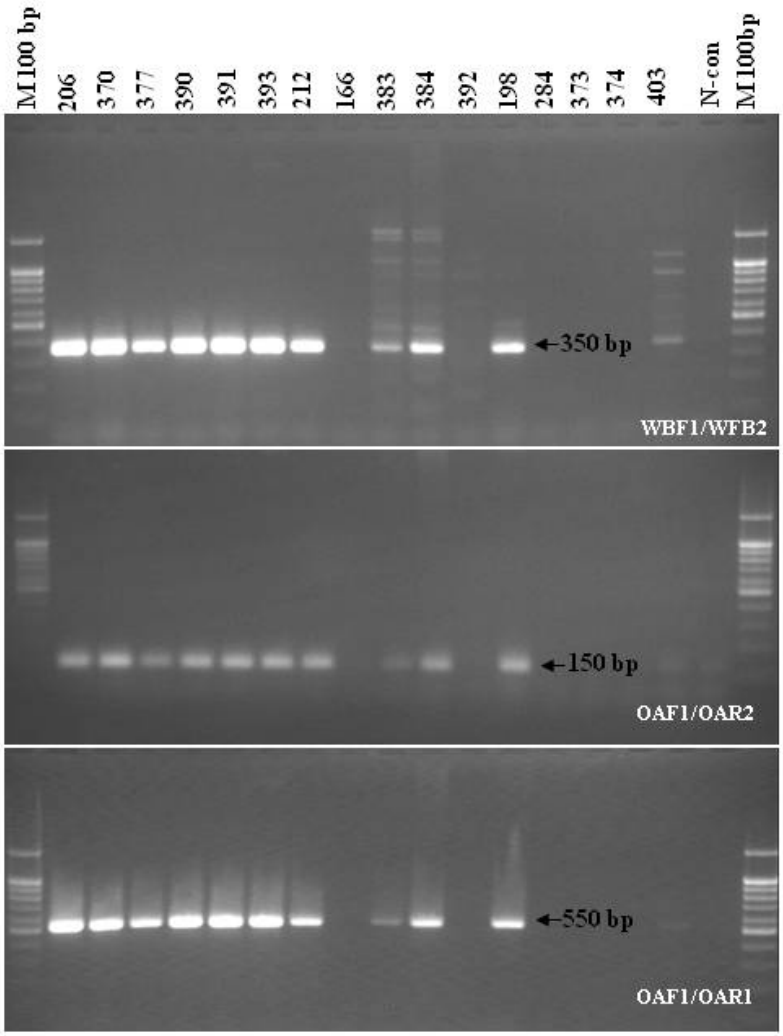
ภาพที่ 1 แสดงอาการโรคใบจุดแบคทีเรียบนกล้วยไม้สกุลการค้า (a) แวนดา, (b) ฟาแลนอปซิส, (c) ช้าง, (d) แบคทีเรีย *A. avenae* subsp.*cattleyae* บนอาหาร NGA

ตารางที่ 1 ไอโซเลทแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียและผลทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 6 คู่

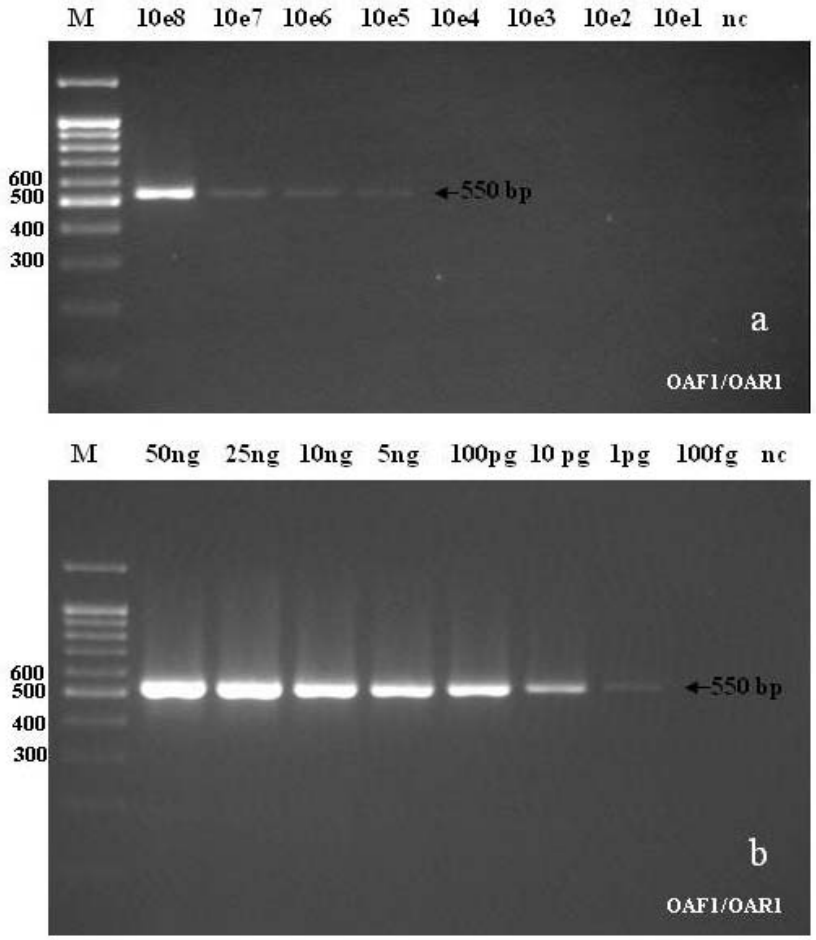
ไอโซเลท	พืชอาศัย	แหล่งปลูก	ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์					
			1	2	3	4	5	6
A. avenae subsp. *cattleyae*								
P206	แวนดา	อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	+	+ mb	-	+db	+fb	+
P236	แอสโคเซนดา	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี	Nd	nd	nd	nd	nd	+
P244	ช้างแดง	อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	Nd	nd	nd	nd	nd	+
P285	แวนดา	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	Nd	nd	nd	nd	nd	+
P356	ฟาแลนอปซิส	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	-	nd	nd	+	+	+
P357	กล้วยไม้ช้าง	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	-	nd	nd	nd	nd	
P370	แวนดา	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	-	-	nd	+	+	+
P377	แคทลียา	อ. โพธาราม จ.ราชบุรี	-	+mb	+	+	+	+
P390	ช้างแดง	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	-	nd	nd	+	+	+
P391	แวนดา	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	-	+mb	nd	nd	nd	+
P393	ฟาแลนอปซิส	อ. โกรกพระ จ. นครสวรรค์	-	nd	nd	+	+	+
A. avenae subsp. *citrulli*								
P091	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	Nd	nd	nd	nd	nd	-
P092	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	Nd	nd	nd	nd	nd	+fb
P212	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	+	-	-	+db	+,-	-
P405	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	Nd	nd	nd	nd	nd	-
P561	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	Nd	nd	nd	nd	nd	+fb
B. gladioli								
P198	ช้างเขาแกะ	อ.สามพราน จ.นครปฐม	-	nd	nd	+db	-	-
P284	แวนดา	อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี	Nd	nd	nd	+db	-	-
P403	แวนดา	อ.คลองขลุง จ.กำแพงเพชร				+,db	+	+
E. carotovora subsp. *carotovora*								
P166	ออนซิเดียม	เขตบางเขน กทม.	-	nd	nd	+db	-	+
E. chrysanthemi								
P248	แวนดา	อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	Nd	nd	nd	+db	-	-
P375	หวาย	อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	Nd	-	nd	nd	nd	nd
P383	ออนซิเดียม	อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	Nd	nd	Nd	+db	+fb	+fb
P384	หวาย	อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	Nd	nd	nd	+db	-	-
P392	แวนดา	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	Nd	nd	nd	+fb,-	+fb	+fb
Xanthomonas campestris คะน้า								
P380, P381		อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	Nd	nd	nd	+db	-	-
Unknown isolate มันคาร่า								
M1, M2, M3		อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	Nd	nd	nd	nd	-	-
NA18, KA33, KA35		*Bacillus* spp. หน้าวัว, กล้วยไม้	Nd	nd	nd	nd	-	-

หมายเหตุ: ไพรเมอร์1, RST49/RST51; 2,BX-L1F/BX-S-R2; 3,Aacf2/Aacr2; 4,WFB1/WFB2; 5, Oaf1/Oar1; 6, Oaf1/Oar2

+, positive; - negative; nd, not determind; mb, multiple band; fb, faint band; db, double band



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ WFB1/WFB2 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 350 bp คู่ไพรเมอร์ OAF1/OAR2 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 150 bp และคู่ไพรเมอร์ OAF1/OAR1 สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp; เลนที่ 1 และ 19, 100 bp ladder; เลนที่ 2-7, *A. avenae* subsp. *cattleyae*; เลนที่ 8, *A. avenae* subsp. *citrulli*; เลนที่ 9, *E. carotovora* subsp. *carotovora*; เลนที่ 10-12, *E. chrysanthimi*; เลนที่ 13-17, *B. gladioli*; เลนที่ 18, control (water)



ภาพที่ 3 แสดงความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ไอโซเลท P285 ด้วยคู่ไพรเมอร์ OAF1/OAR1 ขนาด 550 bp ในระดับเซลล์แขวนลอย เชื้อพบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^5 cfu/ml (a) และระดับดีเอ็นเอพบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 10 pg (b)