การปรับปรุงวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาโดยใช้ชุดตรวจสอบ (GLIFT kit) โรคเหี่ยวของปทุมมา

Improvement method for detection of *Ralstonia solanacearum* in Curcuma seed using Curcuma bacterial wilt GLIFT kit

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ดารุณี ปุญญพิทักษ์[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/]
รุ่งนภา ทองเครั่ง[1/] วิภาดา ทองทักษิณ[2/] สุธามาศ ณ น่าน[3/]
[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน
[3/] ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีประสิทธิภาพโดยการนำหัวพันธุ์ปทุมมา มาตัดชิ้นส่วน นำเอาเฉพาะส่วนท่อน้ำ ท่ออาหารมาตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ดีที่สุด ทดสอบบัปเฟอร์ต่างๆในการทำ GLIFT kit ได้แก่ coating buffer phosphate buffer citrate buffer Tris buffer ได้สารละลายbuffer ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบ ทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ได้ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ 1:500 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่ม พบว่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย RS ที่ความเข้มข้นต่ำสุด $1x10^3$ cfu/ml ทดสอบ buffer ต่างๆกับกระดาษชนิดต่างๆในการทำชุด GLIFT kit พบว่า buffer สามารถใช้ได้ดีกับกระดาษไนโตรเซลูโลส AE99 โดยมีความไวในการตรวจ $10x10^3$ cfu/ml

เก็บหัวพันธุ์ปทุมมาจากแปลงจังหวัดเชียงใหม่ นำมาเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจ พบหัวพันธุ์จำนวน 5% ตรวจพบเชื้อ *R. solanacearum* ทำการปรับปรุงขนาดกระดาษให้เหมาะสมโดยทดสอบการปรับขนาดของกระดาษกรองที่ใช้ในการประกอบชุด GLIFT kit โดยปรับให้ยาวขึ้น 0.5 ซ.ม. ทำให้การไหลของสารในแนวตั้งดีขึ้น สามารถตัดชุดตรวจสอบเป็นแผ่นแล้วจุ่มลงไปในสารละลายเชื้อแบคทีเรียได้เลยโดยไม่ต้องใส่ลงในตลับ

รหัสการทดลอง 01-32-54-01-01-01-02-54

คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับและไม้ตัดดอก มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมามีโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิด โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่พืชเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียทางดินสามารถอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้จึงสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็วและทั่วประเทศเมื่อมีการขนย้ายส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไปปลูกในที่ต่าง ๆ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบแบคทีเรียนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้

นอกจากนี้เนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว *R. solanacearum* สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ เมื่อในไปปลูกในฤดูต่อไปจะเกิดการระบาดของโรครุนแรง ฉะนั้นการใช้หัวพันธุ์ปทุมมาปลอดโรคเป็นวิธีการหนึ่งที่จะลดการระบาดของโรคหรือการเกิดโรคเหี่ยวในแปลงปลูก ซึ่งการคัดเลือกหาหัวพันธุ์ปลอดโรคต้องใช้เครื่องมือและวิธีการในการตรวจสอบที่รวดเร็ว ณัฏฐิมา *et al.* (2543) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบELISA kit สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา ซึ่งชุดตรวจสอบสำเร็จรูปดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้แต่ยังมีความยุ่งยาก และต้องใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการตรวจ ทำให้เกษตรกรนำใช้ไม่สะดวก สุรภี *et al.* (2551) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit ตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ซึ่งสามารถตรวจเห็นผลภายใน 5 นาที แต่เมื่อในไปใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ พบว่าแป้งที่อยู่ในหัวพันธุ์ทำปฏิกริยากับกระดาษรองรับในชุดตรวจสอบทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงควรปรับปรุงวิธีการตรวจ ตลอดจนสารละลายที่ใช้กับตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพ และง่ายต่อการใช้งาน เพื่อขยายการใช้งานชุดตรวจสอบในขบวนการผลิตหัวพันธุ์ปทุมมาของเกษตรกร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ

(oven)

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ปทุมมา

วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา ทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างจากหัวพันธุ์ปทุมมา จำนวน 6 วิธีการ **ได้แก่**

1) ส่วนเนื้อเยื่อทั้งหมดของหัวพันธุ์ บดละเอียดใน PBS buffer
2) ส่วนเนื้อเยื่อทั้งหมดของหัวพันธุ์ แช่ใน PBS buffer 5 นาที
3) เฉพาะส่วนท่อน้ำท่ออาหารของหัวพันธุ์ บดละเอียดใน PBS buffer
4) เฉพาะส่วนท่อน้ำท่ออาหารของหัวพันธุ์ แช่ใน PBS buffer 5 นาที
5) ส่วนรากสะสมอาหารของหัวพันธุ์ บดละเอียดใน PBS buffer
6) ส่วนรากสะสมอาหารของหัวพันธุ์ แช่ใน PBS buffer 5 นาที

2. **ทดสอบสารละลาย(buffer) ที่ใช้ในชุดตรวจสอบ** ทำการทดสอบชนิดสารละลายที่ใช้เป็นตัวละลายน้ำบดตัวอย่างที่ใช้ประกอบในชุดตรวจสอบ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่

1) PBS buffer,
2) Citrate buffer
3) TBS buffer
4) coating buffer

3. **การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมและการทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *R. solanacearum***

ทำการทดสอบ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของIgG ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* บนเส้น test line โดยทดสอบกับ membrane 4 ชนิด ได้แก่

1) membrane S&S AE 100 ขนาด 12 ไมโครเมตร
2) membrane S&S AE 99 ขนาด 8 ไมโครเมตร
3) membrane Millipore HC 100 ขนาด 10 ไมโครเมตร
4) membrane Immunopore FP 100 ขนาด 5 ไมโครเมตร

นำแผ่น membrane ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายด้วยดินสอที่ด้านบนของแผ่น เป็นตำแหน่ง control line ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น membrane 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจาก control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง แตะปากกา

ลงและลากเส้นจากซ้ายไปทางขวาช้า ๆ จนสุดปลาย membrane ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น membrane มีขนาดเท่า ๆ กันทั้งเส้น ใช้ปากกาด้ามใหม่ (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มซับ IgG ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4. การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ GLIFT

- วางmembrane ที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น (plastic backing polymer) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร
- วางแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ให้เกยทับ membrane ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร
- วางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) เกยแผ่น CRP 1-2 มิลลิเมตร
- วางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับแผ่น NCM 1-2 มิลลิเมตร
- ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นให้มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร
- บรรจุชุดตรวจสอบลงตลับพลาสติกนำไปทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรีย*R. solanacearum*
- เก็บ GLIFT kit ไว้ในถุงอลูมินั่มฟอล์ย และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง
- ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* นำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยาบน membrane ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกัน

5. ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของชุดเตรียมสอบ ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา ทดสอบกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในหัวปทุมมา โดยนำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่แยกได้จากหัวพันธุ์ปทุมมา และแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่สามารถเกิดโรคกับหัวพันธุ์ปทุมมาได้ ได้แก่ *Erwinia carotovora* , *E. chrysanthemi* เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* นำสารแขวนลอยแบคทีเรียต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยา ถ้าปฏิกริยาเป็นบวกจะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากปฏิกริยาเป็นลบจะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

6. **ทดสอบความไวในการตรวจสอบ** นำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในน้ำคั้นปทุมมาที่ระดับความเข้มข้น 10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แทนหัวพันธุ์ปทุมมา หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3

หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยา ในกรณีตัวอย่างที่ตรวจสอบมีแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากไม่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

7. **ทดสอบการใช้ชุดตรวจสอบในแปลงปลูกปทุมมา** เป็นการนำชุดตรวจสอบไปใช้จริงในแปลงปลูกปทุมมา

เวลาและสถานที่

ต.ค.54 - ก.ย.56 ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร และ แปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีประสิทธิภาพโดยการนำหัวพันธุ์ปทุมมา มาตัดชิ้นส่วน นำเอาเฉพาะส่วนท่อน้ำ ท่ออาหารมาตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ดีที่สุด ทดสอบบัปเฟอร์ต่างๆในการทำ GLIFT kit ได้แก่ coating buffer phosphate buffer citrate buffer Tris buffer ได้สารละลายbuffer ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบ ทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ได้ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ 1:500 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่ม พบว่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย RS ที่ความเข้มข้นต่ำสุด $1x10^3$ cfu/ml ทดสอบ buffer ต่างๆกับกระดาษชนิดต่างๆในการทำชุด GLIFT kit พบว่า buffer สามารถใช้ได้ดีกับกระดาษไนโตรเซลูโลส AE99 โดยมีความไวในการตรวจ $10x10^3$ cfu/ml

เก็บหัวพันธุ์ปทุมมาจากแปลงจังหวัดเชียงใหม่ นำมาเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจ พบหัวพันธุ์จำนวน 5% ตรวจพบเชื้อ *R. solanacearum* ทำการปรับปรุงขนาดกระดาษให้เหมาะสมโดยทดสอบการปรับขนาดของกระดาษกรองที่ใช้ในการประกอบชุด GLIFT kit โดยปรับให้ยาวขึ้น 0.5 ซ.ม. ทำให้การไหลของสารในแนวตั้งดีขึ้น สามารถตัดชุดตรวจสอบเป็นแผ่นแล้วจุ่มลงไปในสารละลายเชื้อแบคทีเรียได้เลยโดยไม่ต้องใส่ลงในตลับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

วิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีประสิทธิภาพและดีที่สุดคือการนำหัวพันธุ์ปทุมมา มาตัดชิ้นส่วน นำเอาเฉพาะส่วนท่อน้ำ ท่ออาหารมาตรวจหาแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

ทำการปรับปรุงขนาดกระดาษให้เหมาะสมโดยทดสอบการปรับขนาดของกระดาษกรองที่ใช้ในการประกอบชุด GLIFT kit โดยปรับให้ยาวขึ้น 0.5 ซ.ม. ทำให้การไหลของสารในแนวตั้งดีขึ้น สามารถตัดชุดตรวจสอบเป็นแผ่นแล้วจุ่มลงไปในสารละลายเชื้อแบคทีเรียได้เลยโดยไม่ต้องใส่ลงในตลับ อยู่ในระหว่างการนำชุดตรวจสอบที่ปรับปรุงแล้วไปทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum*

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2541. ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา. รายงานผลงานวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 24-35.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วนิดา ฐิตะฐาน และอรทัย เอื้อตระกูล 2543. ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวของปทุมมา. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา ปีที่10 เล่มที่3 :57-61.

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร. 67(5):415-419.

สุเนตรา ภาวิจิตร , ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี. 2538. โรคหัวเน่าของกระเจียวและปทุมมา ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 5(4) : 92

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537 ปทุมมาและกระเจียว. น.58-72. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.159 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด,กรุงเทพฯ.128 น.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ “ กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.