การตรวจเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* จากตัวอย่างพืช และเมล็ดข้าวโพด ด้วยเทคนิค PCR

Dectection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* from plant and corn seed by PCR Technique

จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์[1,2] นิพนธ์ ทวีชัย[3] และวิชัย โฆสิตรัตน[1,2,4]

Jutatape Watcharachaiyakup[1,2] Niphone Thaveechai[3] and Wichai Kositratana[1,2,4]

Abstract

Pantoea stewartii subps. *stewartii* (Pss) is a serious cause of Stewart's wilt of corn. The specific detection method which distinguishes Pss from other *Pantoea* spp. to prevent the false-positive detection result is needed PCR method was used with three pairs of primers specific to the 16s-23s rDNA / ITS, *cpsDE* and *hrpS* genes. Only *hrpS* primer gave a specific detection to Pss. The PCR method with primer specific to *hrpS* gene was therefore, developed for detection of Pss in corn plant and seed which normally contain PCR inhibitor. Detection sensitivity of Pss by PCR technique was at the level of 10^3 CFU. This method was also able to detect Pss in infected corn and in corn seed soaking with water. Further testing of this method for sensitivity determination, showed sensitivity as low as 10^3 CFU per seed lot. The seed sampling with standard protocol for 400 seeds and sub-sampling into 100 seeds combination with PCR detection method was able to detect contaminated seed lot at the rate of 0.5-10% with 100% repeatability. Therefore, this PCR detection method combined with the standard seed sampling could be used for phytosanitary certification and solved the problem of the error detection obtained from the ELISA method.

Keywords: seed detection, maize, corn seed, Stewart's wilt, quarantine pest

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

[4] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : พฤษภาคม 2551

Corresponding author : agrwck@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จากการตรวจเชื้อ Pss และเชื้อแบคทีเรียใกล้ชิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค PCR โดยเปรียบเทียบคู่ไพรเมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะต่อ 16s-23s rDNA/ITS, ยีน *cpsDE* และ *hrpS* พบว่าคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *hrp*S มีความจำเพาะต่อเชื้อ Pss, และได้พัฒนาเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *hrpS* สำหรับตรวจเชื้อ Pss ในตัวอย่างพืช และเมล็ด ที่มักมีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งนี้ยังพบว่า การตรวจเชื้อ Pss ในตัวอย่างพืชโดยการตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2x2 มิลลิลิตร แช่ในน้ำ แล้วนำน้ำแช่พืชผสมรวมกับเชื้อแบคทีเรียที่รู้ปริมาณแน่นอน จากนั้นนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยตรง ให้ความไวในการตรวจเชื้อในเมื่อมีเชื้อ 10^3 CFU, และเมื่อนำชิ้นใบข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ Pss จำนวน 2-3 ชิ้นเล็กๆ แช่น้ำ 100 ไมโครลิตร สามารถนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR ได้, สำหรับการตรวจสอบเชื้อ Pss ในเมล็ดข้าวโพดโดยเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบบดเมล็ดและการแช่เมล็ดด้วยน้ำ พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Pss จากวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการแช่เมล็ดด้วยน้ำเท่านั้น จากนั้นนำมาพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ Pss ในกองเมล็ด ด้วยการนำเมล็ดแช่น้ำอัตรา 100 เมล็ดต่อน้ำ 30 มิลลิลิตร ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำแช่เมล็ดผสมกับแบคทีเรียที่รู้ความเข้มข้นที่แน่นอน พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อในระดับเชื้อ 10^3 CFU/กองเมล็ด, เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐานสากล โดยสุ่มเมล็ดจำนวน 400 เมล็ด และแบ่งกองย่อย กองละ 100 เมล็ด ร่วมกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจเมล็ดที่มีการปนเปื้อนอัตราตั้งแต่ 0.5 ถึง 10% โดยมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบซ้ำได้ 100% สรุปได้ว่าหากนำวิธีการสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานสากลมาร่วมกับการตรวจเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อ Pss เพื่อออกใบรับรองสุขอนามัยพืชจะแก้ปัญหาที่ผิดพลาดจากการตรวจด้วยวิธี ELISA ได้อย่างดี

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพด ที่เป็นปัญหารุนแรงกับอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในประเทศต่างๆ ทั้งที่มีการนำเข้าหรือส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดกว่า 70 ประเทศ ซึ่งจะต้องผ่านการตรวจสอบ และแสดงใบรับรองปลอดศัตรูพืช (Pataky and Ikin, 2003) วิธีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากลของการตรวจสอบเชื้อนี้ โดยการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ การเพาะเมล็ดตรวจสอบอาการ และตรวจด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา ได้แก่ เทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งพัฒนาโดย Seed Science Center , Iowa State University (Lamka, *et al.*, 1991) และพัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปของบริษัท Agdia Inc., Elkart, USA ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาในการทดสอบ และความไวในการตรวจค่อนข้างต่ำประมาณ 10^5 CFU/ปฏิกิริยา นอกจากนี้Watcharachaiyakup *et.al*. (2007) ได้รายงานว่าชุดตรวจสอบสำเร็จรูปดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในจีนัส *Pantoea* spp. ส่งผลให้มีโอกาสตรวจสอบผิดพลาดได้

Coplin *et. al.* (2002)ได้รายงานการพัฒนาวิธีตรวจเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวข้าวโพด ด้วยวิธีการที่ใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 16S-23S rDNA/ITS (intergenic transcribed spacer) region ยีน *cpsDE* และยีน *hrp*S ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี ELISA ในการตรวจเชื้อ Pss ในตัวอย่างต้นข้าวโพด แต่ยังไม่มีรายงานถึงการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อในเมล็ดข้าวโพด การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อ Pss จากตัวอย่างพืช และเมล็ดข้าวโพด และศึกษาถึงประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อนี้ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด โดยเปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจโรคเพื่อออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย และการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์มาตรฐาน LMG 2715 (จาก Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Belgium ตามใบอนุญาตนำเข้าสิ่งต้องห้าม เพื่อศึกษาวิจัย เลขที่ 017/2548) และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด ที่แสดงอาการใบขีดมีรอยหยักคลื่นที่ขอบแผลและใบไหม้คล้ายอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ Pss จำนวน 11 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ XE1, XE2, XE3, XE4, XE5, XE6, XE7, XE8, XE9, XE11 (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณณัฏฐพร อุทัยมงคล กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กรมวิชาการเกษตร) และสายพันธุ์ Y001 และเชื้อ *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ DMST4045 และ DMST4633 (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์) นำมาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยน้ำ ปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml จากการตรวจนับโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตกตะกอนเชื้อด้วยการนำเชื้อปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนด้วยแรง 5,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทดสอบในปฏิกิริยา PCR

การทำปฏิกิริยา PCR

ทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ ESIG2c (5’ GCGCTTGCGTGTTATG AG 3’) และ ES16 (5’ GCGAACTTGGCAGAGAT 3’) สำหรับดีเอ็นเอบริเวณ 16s-23s rDNA/ITS คู่ไพรเมอร์ CPSL1 (5’ CCTGTCAGTCTCGAACC 3’) และ CPSR2c (5’ ATCTCGAACCGGTAACC 3’) สำหรับยีน *cpsDE* และคู่ไพรเมอร์ HRP1d (5’ GCACTCATTCCG ACCAC 3’) และ HRP3c (5’ GCGGCATACCTAACTCC 3’) สำหรับยีน *hrpS* (Coplin *et al*., 2002) ใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterics bacteria คือคู่ไพรเมอร์ fd2 (5’ CCGAATTCGTCGACA ACAGAGTTTG ATCATGGCTCAG 3’) และ rp1 (5’ CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT 3’) (Weisburg, *et al.* 1991) เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยในปฏิกิริยา multiplex PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 0.2 mM ของ dNTPs แต่ละชนิด, 0.25 mM $MgCl_2$, 200 nM ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และ *Taq* DNA polymerase 0.3 unit ในปริมาตรรวมทั้งหมด 15 ไมโครลิตร โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 1 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอของส่วน 16s-23s rDNA/ITS, *cpsDE* และ *hrpS* ซึ่งจะมีขนาด 0.92, 1.1 และ 0.9 kb ตามลำดับ (Coplin *et al*., 2002) และ 16s rDNA ขนาด 1.5 kb (Weisburg, *et al.* 1991)โดยนำผลผลิตดีเอ็นเอมาแยกด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเลคโตโฟริซีส ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ทำการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และนำมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

การศึกษาความไวในการตรวจเชื้อ Pss โดยเทคนิค PCR

นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Pss สายพันธุ์ LMG 2715 ที่มีปริมาณเซลล์ตั้งแต่ 1 ถึง 10^5 CFU มาใช้ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* เป็นยีนเป้าหมาย และ 16s rDNA เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา โดยใช้ความเข้มข้นและรูปแบบของการทำปฏิกิริยา ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การตรวจเชื้อ Pss ในตัวอย่างพืชสดการศึกษาความไวของการตรวจเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR โดยการเติมเชื้อ Pss ลงในตัวอย่างน้ำแช่ใบข้าวโพด

นำใบข้าวโพดจากต้นไม่เป็นโรค มาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จำนวน 15 ชิ้นแช่ในน้ำ 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำแช่ใบ 3 ไมโครลิตร ผสมกับตะกอนเซลล์แบคทีเรีย Pss สายพันธุ์ LMG 2715 ที่ได้

จากการปั่นตกตะกอนเซลล์ จากปริมาตรเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ที่มีปริมาณเซลล์ระหว่าง 1-10^5 CFU แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ทั้ง 3 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำแช่ใบที่ไม่ผสมเชื้อแบคทีเรีย เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

การปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโพด

นำเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG 2715 และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวโพด ได้แก่ สายพันธุ์ XE1, XE6, XE8, XE9, XE11 และ Y001 ที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง เตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเข้มข้นในน้ำ และนำมาเจือจางในสารละลายเตรียมเซลล์ประกอบด้วย 1XPBS, pH 7.4 ผสมด้วยสาร TritonX-100 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02% ปรับให้เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียมีค่าดูดกลืนแสง 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (เชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 10^9 CFU/ml) นำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียประมาณ 100 ไมโครลิตร ปลูกเชื้อโดยหยดลงในกรวยของใบยอดกล้าข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน ปลูกในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100% ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิในช่วงประมาณ 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบกับต้นข้าวโพดที่หยอดกรวยยอด ด้วยสารละลายเตรียมเซลล์ที่ไม่มีแบคทีเรีย (Coplin *et al*., 2002) สังเกตอาการของโรค เป็นเวลา 3 วัน

การตรวจเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ

นำใบข้าวโพดที่ได้จากการปลูกเชื้อที่แสดงอาการใบไหม้ เลือกตัดชิ้นส่วนที่มีอาการแผลคาบเกี่ยวของส่วนแผลสีน้ำตาลและสีเขียว ขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จำนวน 2 – 3 ชิ้น แช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารแช่ใบดังกล่าวปริมาตร 3 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *hrpS* ตามวิธีข้างต้น

การตรวจเชื้อ Pss ในเมล็ดข้าวโพดเตรียมตัวอย่างเมล็ดด้วยการแช่และการบดเมล็ด เพื่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

เตรียมน้ำแช่เมล็ดข้าวโพดด้วยการนำเมล็ดข้าวโพด 200 เมล็ด แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองเมล็ดออกด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำกรองที่ได้เติมเซลล์แขวนลอยเชื้อ Pss ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียระหว่าง 1-10^4 CFU เพื่อทดสอบเสมือนการติดเชื้อมากับเมล็ดต่อไป

เตรียมน้ำบดเมล็ดด้วยการนำเมล็ดข้าวโพด 200 เมล็ด บดด้วยเครื่องบด (Rongtsong iron works รุ่น RT-02A) ด้วยความเร็วรอบ 30,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันประมาณหนึ่งนาที กรองผ่านแผ่น Miracloth (Calbiochem, USA.) สองชั้น นำน้ำบดเมล็ดที่ได้ผสมกับเชื้อ Pss ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียระหว่าง 1-10^4 CFU/ปฏิกิริยา เพื่อทดสอบเสมือนการติดเชื้อมากับเมล็ดต่อไป

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ Pss ในเมล็ดข้าวโพดที่มีวิธีการเตรียมเมล็ดแบบแช่ และบดเมล็ด

การตรวจเชื้อ Pss ในเมล็ดข้าวโพด โดยนำตัวอย่างน้ำแช่ และน้ำบดเมล็ดข้าวโพดที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรีย Pss ดังรายละเอียดการเตรียมข้างต้น ในแต่ละตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจยีน *hrpS* ต่อไป

การตรวจเชื้อแบคทีเรีย Pss ในกองเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

การเตรียมเมล็ดข้าวโพดติดเชื้อ

การเตรียมเมล็ดข้าวโพดติดเชื้อ เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Poussier *et al.* (2002) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG 2715 ที่เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.2 (10^8 CFU/ml) นำเมล็ดข้าวโพดหวานสายพันธุ์อินทรี 2 แช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียในอัตรา 400 เม็ด ต่อเซลล์แขวนลอยเชื้อ 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร โดยให้เซลล์แขวนลอยเชื้อท่วมเมล็ด นำบีกเกอร์ดังกล่าวไว้ในโถแก้ว ดูดอากาศออกด้วยเครื่องปั๊มดูดอากาศ จนเป็นสุญญากาศ และแช่เมล็ดข้าวโพด

ในสภาพสุญญากาศ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ปล่อยให้อากาศเข้าไปในโถแก้ว นำเมล็ดผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ ใช้เมล็ดข้าวโพดที่แช่ในน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเมล็ดข้าวโพดปลูกเชื้อ

นำเมล็ดข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ จากวิธีการเตรียมข้างต้น แต่ละเมล็ดแช่ในน้ำ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำส่วนน้ำใสทั้งหมดไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส และละลายตะกอนด้วยน้ำ 5 ไมโครลิตร ดูดน้ำละลายตะกอน 2 ไมโครลิตรไปตรวจเชื้อ Pss เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวโพดที่แช่น้ำ โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *hrpS*

ความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ขนาดกอง 100 เมล็ด

นำเมล็ดข้าวโพดแช่น้ำในอัตรา 100 เมล็ดต่อน้ำ 30 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกและปิดผนึกปากถุง แช่เมล็ดเป็นเวลาข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG 2715 ที่มีปริมาณเชื้อระหว่าง 10-10^6 CFU

นำน้ำแช่ข้าวโพด ที่ผสมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียกรองผ่านกระดาษ Whatman® No. 1 จำนวนสองครั้ง และกรองผ่านแผ่นกรองแบคทีเรียชนิด mixed cellulose ester membrane ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน (Advantec MFS, Inc.) นำแผ่นกรอง แช่ในน้ำปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อแผ่นในจานเลี้ยงเชื้อ เขย่าล้างเชื้อที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำล้างแผ่นกรองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ 10 ไมโครลิตร และนำสารละลายตะกอนปริมาตร 3 ไมโครลิตร ตรวจสอบเชื้อ Pss ด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *hrpS*

การตรวจสอบการปนเปื้อนเมล็ดข้าวโพดติดเชื้อในกองเมล็ด

นำเมล็ดที่ปลูกเชื้อผสมกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ขนาดกอง 400 เมล็ด ในอัตราการปนเปื้อนเมล็ดติดเชื้อ 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจโดยการแบ่งกองเมล็ดพันธุ์เป็นกองย่อย (sub-sample) กองละ 100 เมล็ด จำนวน 4 กอง แช่เมล็ดข้าวโพดแต่ละกองย่อยในน้ำ และตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ ตรวจสอบทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง

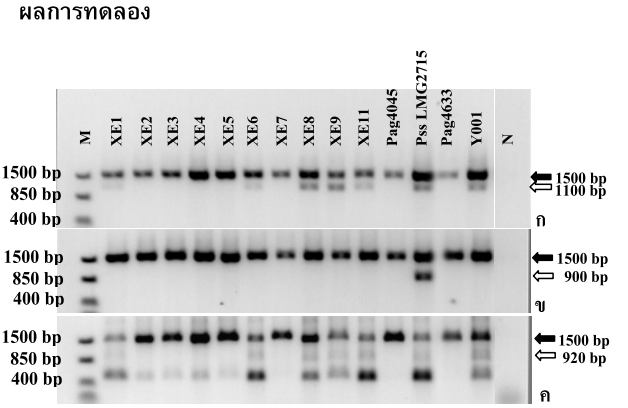
การตรวจเชื้อ และความไวในการตรวจเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR

จากการทดลองตรวจเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ที่จำเพาะต่อส่วน 16s-23s rDNA/ITS, *cpsDE* และ *hrpS* ของเชื้อ Pss นั้น พบว่าไพรเมอร์ต่อส่วน 16s-23s rDNA/ITS และยีน *cpsDE* สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ XE1, XE6, XE8, XE9, XE11, Y001 และ Pss LMG2715 ได้ (ภาพที่ 1 ก และ ค) ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ต่อยีน *hrpS* ทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG2715 เท่านั้น (ภาพที่1 ข) โดยทุกปฏิกิริยาทดสอบพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.5 kb ของ 16s rDNA ที่เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา PCR

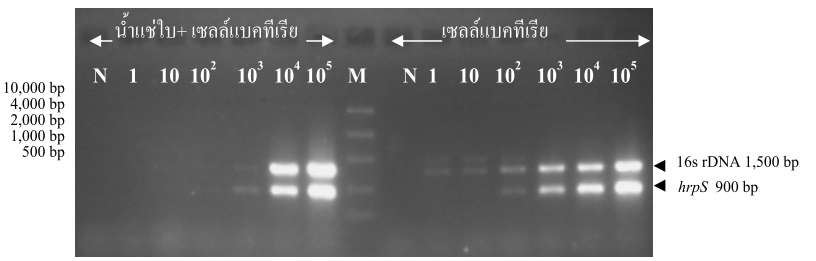
เมื่อทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* สามารถตรวจพบเชื้อ Pss เมื่อมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่ 10^2 CFU เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ผสมกับน้ำแช่ใบข้าวโพด พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Pss ได้เมื่อมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่ 10^3 CFU ขึ้นไป (ภาพที่ 2)

การตรวจสอบเชื้อ Pss จากตัวอย่างต้นข้าวโพด

เมื่อตรวจข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG2715 ด้วยเทคนิค PCR และใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *hrpS* พบว่าสามารถตรวจตัวอย่างพืชได้ 5 ใน 7 ตัวอย่าง ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ โดยตรวจพบผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hrpS* ที่มีขนาด 0.9 kb ในขณะที่ตัวอย่างพืชที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อ XE ทุกสายพันธุ์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 การตรวจเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์ LMG2715 และเชื้อใกล้ชิดที่แยกได้จากข้าวโพด (XE1-XE9, XE11 and Y001) และเชื้อ *P. agglomerans* สายพันธุ์ 4045 and 4633 (Pag 4045 and 4633) และตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอ (N) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cpsDE* (ก) *hrpS* (ข) and 16s-23s rDNA/ITS (ค) (ลูกศรชี้สีขาว) และยีนควบคุม 16s rDNA (ลูกศรชี้สีดำ) M แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 2 การศึกษาความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์ LMG2715 ที่ปริมาณเชื้อในระดับต่างๆ จาก 1- 10^5 CFU โดยเปรียบเทียบระหว่างการผสมเชื้อ Pss กับน้ำแช่ใบ (ซ้าย) และจากเชื้อ Pss โดยตรง (ขวา) ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* และใช้ยีน 16s rDNA เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยมีตัวอย่างจากน้ำแช่ใบ และน้ำที่ไม่มีเชื้อ Pss (N) เป็นกรรมวิธีควบคุม และ M แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

การตรวจเชื้อ Pss ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ Pss ในเมล็ดข้าวโพดที่มีวิธีการเตรียมเมล็ดแบบแช่และบดเมล็ด

เมื่อตรวจเชื้อ Pss จากตัวอย่างเมล็ดที่ผสมเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1-10^5 CFU จากการเตรียมตัวอย่างเมล็ดต่างกัน คือ ตัวอย่างน้ำแช่เมล็ดและน้ำบดเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Pss ที่ผสมในตัวอย่างน้ำแช่เมล็ดได้ ในปริมาณเชื้อ Pss ต่ำสุดที่ 10^3 CFU แต่ไม่สามารถตรวจเชื้อ Pss ที่ผสมรวมกับน้ำบดเมล็ดได้ แม้จะมีปริมาณเชื้อ Pss สูงถึง 10^4 CFU (ภาพที่ 4)

การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเมล็ดข้าวโพดปลูกเชื้อ

การทดสอบปลูกเชื้อ Pss ลงในเมล็ดข้าวโพด ด้วยวิธีการแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ในสภาพสุญญากาศ ตรวจพบจำนวนเมล็ดข้าวโพดที่ให้ผลเป็นบวกจากการทำปฏิกิริยา PCR/เมล็ดที่ทดสอบทั้งหมด จากการทดลอง 3 ซ้ำ ได้ผลการตรวจเป็น 98/102 101/108 และ 45/46 เมล็ด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเมล็ดได้เฉลี่ย 95.8% ของเมล็ดที่ทดสอบทั้งหมด โดยตรวจไม่พบเชื้อ Pss จากเมล็ดข้าวโพดแช่น้ำ ที่เป็นกรรมวิธีควบคุม

ความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ขนาดกอง 100 เมล็ด

การตรวจเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ ขนาดกอง 100 เมล็ด ด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ เมื่อมีปริมาณเซลล์ตั้งแต่ 10^3 CFU ต่อกอง (ภาพที่ 5)

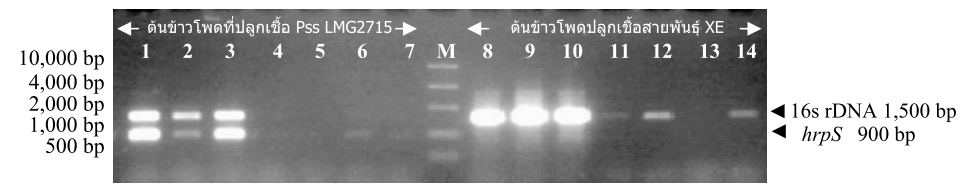
การตรวจการปนเปื้อนเมล็ดข้าวโพดติดเชื้อในกองเมล็ด

เมื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนเมล็ดที่ปลูกเชื้อ Pss ในอัตราการปนเปื้อนต่างๆ ด้วยวิธีการแบ่งกองย่อย พบว่าสามารถตรวจการปนเปื้อนได้ทุกระดับการปนเปื้อนที่ทดสอบ ตั้งแต่การปนเปื้อนเมล็ดติดเชื้อที่ 0.5 -10% โดยมีประสิทธิภาพการตรวจซ้ำได้ทุกซ้ำทดสอบ คิดเป็น 100% (ตารางที่ 1)

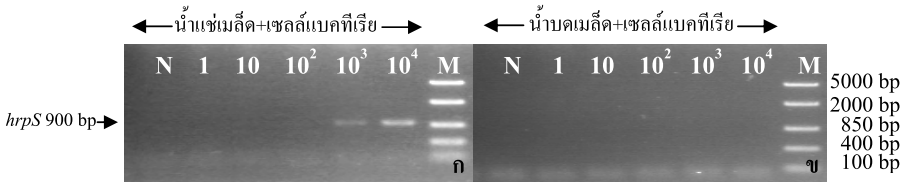
วิจารณ์

การตรวจเชื้อ Pss สายพันธุ์ LMG2715 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 ชุด พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *hrpS* ให้ผลการทดลองที่แม่นยำกว่าคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cpsDE* และจำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณ 16s-23s rDNA/ITS ที่แสดงผลบวกจากการทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงที่แยกได้จากข้าวโพด (ภาพที่ 1) และจากรายงานของ Coplin *et al.* (2002) ที่ได้ทำการทดสอบกับเชื้อ Pss และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ใกล้เคียง พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cpsDE* สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pantoea agglomerans* pv. *herbicola* Eh7/95 และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอบริเวณ 16s-23s rDNA/ITS สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย *P. ananas* และ *P. agglomerans* pv. *herbicola* แสดงให้เห็นถึงความไม่จำเพาะของไพรเมอร์นี้ต่อเชื้อ Pss

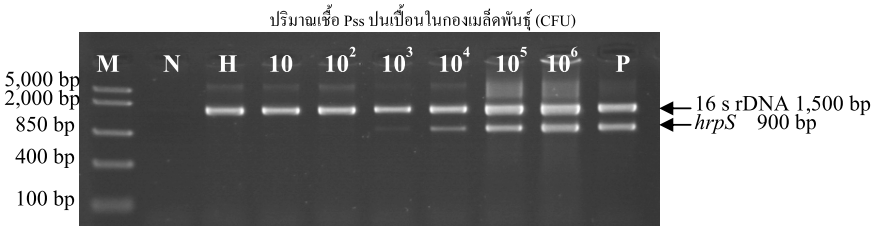
นอกจากนี้ ในการทดลองนี้เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16s-23s rDNA/ITS ร่วมกับไพรเมอร์ต่อ 16s rDNA พบว่าปฏิกิริยา PCR ให้แถบดีเอ็นเอหลายขนาด โดยดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 1) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าแถบขนาด 920 bp ที่เป็นแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ข้ามคู่กันจากการทำ PCR แบบหลายคู่ไพรเมอร์ในปฏิกิริยาเดียว



ภาพที่ 3 การตรวจเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์ LMG2715 จากตัวอย่างข้าวโพดที่ได้รับการปลูกเชื้อ Pss (ช่องที่ 1 -7) และเชื้อใกล้ชิดที่แยกได้จากข้าวโพด สายพันธุ์ XE ต่างๆ (ช่องที่ 8 - 14) โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* และใช้ยีน 16s rDNA เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา และ M แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 4 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์ LMG2715 ที่มีเชื้อ Pss ปริมาณ 1-10^4 CFU เมื่อผสมรวมกับการเตรียมตัวอย่างจากวิธีการแช่เมล็ด (ก) และบดเมล็ด (ข) โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* โดยมีตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ (N) เป็นกรรมวิธีควบคุม และ M แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 5 ความไวในการตรวจเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss) สายพันธุ์ LMG2715 ที่ปนเปื้อนในกองเมล็ด ขนาด 100 เมล็ดต่อกอง จากการเตรียมเมล็ดข้าวโพดด้วยวิธีการแช่น้ำ เมื่อมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียในช่วง 10 -10^6 CFU/กอง โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* และใช้ยีน 16s rDNA เป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา โดยมีตัวอย่างเมล็ดที่ไม่มีดีเอ็นเอของเชื้อ Pss (H) เป็นกรรมวิธีควบคุม ตัวอย่างที่ไม่มี DNA (N) ตัวอย่างที่มี DNA ของเชื้อ Pss (P) เป็นกรรมวิธีควบคุม และM แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

กัน (multiplex PCR) โดยจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของส่วน 16s ITS และ 23s ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *stewartii* สายพันธุ์ DC283 (gi 21715876) มีส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1,483-1,895 ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ของ ESIG2c และ rp1 ได้ มีขนาด 412 bp ซึ่งใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ดังนั้นในการทดสอบเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ต่อ 16s-23s rDNA/ITS ร่วมกับไพรเมอร์ต่อ 16s rDNA ไม่ควรทำปฏิกิริยาแบบหลายคู่ไพรเมอร์ในหลอดเดียวกัน (multiplex PCR) หรือควรจะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้มีความเหมาะสมมากขึ้น

Pantoea dispersa สายพันธุ์ NCBP 2285 (Wensing *et al*., 2010) ซึ่งไม่ได้ทดสอบคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวในการทดลองนี้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบการตรวจเชื้อในขั้นตอนอื่นๆ ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hrpS* เท่านั้น

การทดสอบการตรวจเชื้อแบคทีเรีย จากตัวอย่างต้นข้าวโพดนั้น พบว่าความไวในการตรวจเชื้อเมื่อมีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^3 CFU ซึ่งจะลดลงเมื่อเทียบกับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 10^2 CFU แสดงให้เห็นว่าสารจากน้ำแช่ใบมีอิทธิพลต่อการทำปฏิกิริยา PCR และเมื่อนำไปใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียจากต้นข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อเพียง 6 สายพันธุ์ในการปลูกเชื้อ ได้แก่ XE1 XE6 XE8 XE9 XE11 และ Y001 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ให้ปฏิกิริยาบวกจากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cpsDE* ในขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ (ภาพที่ 1 ก) และเมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ Pss พบว่าวิธีการตรวจนี้มีความจำเพาะในการตรวจโดยผลปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอ 16s rDNA ซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุมปฏิกิริยา PCR ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแบคทีเรียหลายชนิด ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่พบแถบดี

ตารางที่ 1 การตรวจการปนเปื้อนเมล็ดติดเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ที่อัตราการปนเปื้อนต่างๆ

ผลการทดสอบ	อัตราการปนเปื้อน (%)							
	0	0.5	1	2	4	6	8	10
ผลการตรวจ[1]	0/4	2/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
ประสิทธิภาพ[2]	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

[1] จำนวนกองย่อยที่ให้ผลปฏิกิริยาบวก/จำนวนกองย่อย 4 กองๆ ละ 100 เมล็ด

[2] จำนวนครั้งทดสอบ (event) ที่ให้ผลปฏิกิริยาบวก/จำนวนครั้งทดสอบทั้งหมด

เอ็นเอของยีน *hrpS* ในข้าวโพดทุกตัวอย่างที่ปลูกเชื้อ ด้วยเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง (ภาพที่ 3 ขวา) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อแบคทีเรียจากต้นข้าวโพดในการทดลองนี้ยังพบว่าให้ผลการตรวจไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 3) อาจเนื่องจากปัจจัยที่เกิดจากสารยับยั้งปฏิกิริยา ที่มากับตัวอย่างพืช และเมล็ด เช่นสารโพลีแซคคาไรด์ และสารฟีนอลิค รวมทั้งเศษซากของแบคทีเรียเอง ส่งผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR (Watson and Blackwell, 2000) หรือจากการปรับสภาพความเหมาะสมของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากเอกสารอ้างอิง ซึ่งเดิมไม่ได้มีการนำมาทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน ส่งผลให้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ที่นำมาทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน อาจยังไม่เหมาะสม หรือศักยภาพการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์สองคู่ไม่เท่ากันทำให้การเกิดปฏิกิริยาไม่สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับที่เกิดกับการตรวจสอบยีน 16s rDNA และจากภาพที่ 3 พบว่าแถบของดีเอ็นเอทั้งสองแถบมีความเข้มแตกต่างกัน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าศักยภาพการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ทำปฏิกิริยาได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 6 และ 7 ในตัวอย่างที่ปลูกเชื้อ Pss LMG 2715 มีแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มน้อย โดยสันนิษฐานว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างมีปริมาณน้อย หรือเกิดจากสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการตรวจสอบด้วยวิธีการนี้

การตรวจเชื้อจากเมล็ด เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดต่างกัน ได้แก่ การบด และการแช่เมล็ดในน้ำ พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างมีอิทธิพลอย่างมากต่อการตรวจเชื้อ ด้วยเทคนิค PCR โดยวิธีการเตรียมเมล็ดด้วยวิธีการแช่เมล็ด ทำให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพดีกว่าการเตรียมเมล็ดด้วยการบดเมล็ด ซึ่งในการบดเมล็ดนั้นจะทำให้เกิดสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR ได้แก่ สารโพลีแซคคาไรด์ รวมทั้งเศษซากพืช ซึ่งมีรายงานว่าส่งผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR (Watson and Blackwell, 2000) ออกมาจากเมล็ดมากกว่าวิธีการแช่เมล็ด ดังแสดงให้เห็นในการทดลอง (ภาพที่ 4) ที่ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่บดเมล็ด ด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบเชื้อในกองเมล็ดที่ขนาดกอง 100 เมล็ด ซึ่งในการทดลองนี้ใช้น้ำแช่เมล็ดข้าวโพดตามสัดส่วนเมล็ด 100 เมล็ดต่อน้ำ 30 มิลลิลิตร ซึ่งได้จากการประมาณปริมาตรน้ำ ที่ภายหลังจากการแช่เมล็ดข้าวโพดแห้งแล้ว ยังมีน้ำส่วนเหลือจากการดูดซึมเข้าไปในเมล็ด ในปริมาตรที่ทำงานได้ และสามารถแช่เมล็ดได้ท่วม และใช้ปริมาตรน้ำแช่เมล็ดเป็นตัวแทนของขนาดกองเมล็ดพันธุ์ เพื่อให้การทดลองมีความสม่ำเสมอ จากผลการทดลองพบว่ามีความไวในการตรวจสอบเมื่อมีเชื้อPss ตั้งแต่ 10^3 CFU/กอง แต่เมื่อประมาณการเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจต่อปฏิกิริยา พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจต่อปฏิกิริยาเพียง 150 CFU/ปฏิกิริยาเท่านั้น เนื่องจากมีการสูญเสียเชื้อแบคทีเรียไปในระหว่างเตรียมตัวอย่าง โดยในการตรวจสอบนั้นได้นำสารล้างแผ่นเมมเบรนมาเพียง $^1/_2$ ส่วน ของน้ำล้างทั้งหมด (1.5 มิลลิลิตร จากน้ำล้างทั้งหมด 3 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตกตะกอนสารล้างแผ่นเมมเบรน ละลายตะกอนด้วยน้ำ 10 ไมโครลิตร แต่ดูดสารละลายตะกอนไปทำปฏิกิริยา PCR เพียง 3 ไมโครลิตร (3/10 ส่วน จากสารละลายตะกอนทั้งหมด) ดังนั้นวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Pss จากกองเมล็ดด้วยเทคนิค PCR จากการเตรียมตัวอย่างด้วยการแช่เมล็ดในน้ำ ที่ขนาดกองเมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ดต่อกอง มีความไวในการตรวจเชื้อต่ำกว่าการตรวจเซลล์เชื้อแบคทีเรียโดยตรงเพียง 10 เท่า

การตรวจการปนเปื้อนเมล็ดติดเชื้อ ในกองเมล็ดพันธุ์นั้น ในการทดลองนี้ใช้เมล็ดติดเชื้อ ซึ่งได้มาจากการปลูกเชื้อ (artificial infection) แทนเมล็ดที่มีการติดเชื้อในธรรมชาติ ในการทดสอบ เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่พบเชื้อแบคทีเรีย Pss (Watcharachaiyakup *et al*., 2007) โดยจากการทดสอบการปลูกเชื้อในเมล็ดและทดสอบการติดเชื้อจากแต่ละเมล็ด พบว่าประสิทธิภาพการปลูกเชื้อมีมากถึง 95.8% ทำให้มั่นใจว่าความผิดพลาดจากการทดลองที่นำเมล็ดที่ไม่มีเชื้อ ไปใช้ในการทดสอบต่อไปมีน้อย อย่างไรก็ตามไม่ได้มีการตรวจสอบความมีชีวิต หรือปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายหลังจากการปลูกเชื้อ เนื่องจากไม่มีอาหารคัดเลือกจำเพาะที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย Pss ออกจากเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ จากเมล็ดได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการศึกษาเชื้อนี้ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานอาหารคัดเลือกจำเพาะ Nigrosine medium สำหรับเชื้อ Pss (Guo, 1982) แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นสามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้เช่นกัน (Blakemore *et al*, 1999)

เชื้อ Pss ปกติเป็นเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ในอัตราต่ำ ถ้าเมล็ดติดเชื้อต่ำกว่า 10% จะไม่พบการถ่ายทอด

ตารางที่ 2 การพิจารณาผลการตรวจพบเชื้อในเมล็ดข้าวโพด เพื่อการออกใบรับรองสุขอนามัยพืช โดยใช้วิธีสุ่มตัวอย่าง 400 เมล็ด และแบ่งตัวอย่างย่อยเป็น 4 กอง ในการตรวจ

ขนาดกองย่อย (เมล็ด)	จำนวนกองย่อยที่ตรวจพบเชื้อ/ จำนวนกองย่อยทั้งหมด	% การมีเมล็ดติดเชื้อ จากการคำนวณ	การพิจารณาออกใบรับรองสุขอนามัยพืช
100	0/4	<0.29	ออกใบรับรอง
100	1/4	0.29	ออกใบรับรอง
100	2/4	0.63	ไม่ออกใบรับรอง หรือทดสอบใหม่
100	3/4	1.38	ไม่ออกใบรับรอง หรือทดสอบใหม่
100	4/4	>1.38	ไม่ออกใบรับรอง หรือทดสอบใหม่

ที่มา: Pataky and Ikin, 2003

โรคจากเมล็ดสู่ต้นกล้า ในเขตพื้นที่ที่ไม่มีแมลงพาหะ แต่ถ้านำไปปลูกที่เขตพื้นที่ที่มีแมลงพาหะจะพบการถ่ายทอดเชื้อจากเมล็ดสู่ต้นกล้าเพียง 0.02% ดังนั้นจึงกำหนดมาตรฐานรับรองเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดกับเมล็ดที่ติดเชื้อที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5% ซึ่งจะเทียบเท่ากับโอกาสของการถ่ายทอดเชื้อจากเมล็ดสู่ต้นกล้าต่ำกว่าหนึ่งในแสนต้นกล้า เมื่อนำไปปลูกในพื้นที่ ๆ มีแมลงพาหะ (Pataky and Ikin, 2003) จากมาตรฐานการตรวจของ National Seed Health Testing ซึ่งพัฒนาโดย Iowa State University ซึ่งจากกองเมล็ดพันธุ์ที่มีการติดเชื้อ 1% เมล็ดพันธุ์จำนวน 400 เมล็ด แบ่งเป็นกองย่อย 4 กอง ๆ ละ 100 เมล็ด จากการคำนวณความน่าจะเป็นจะมีโอกาสในการสุ่มได้เมล็ดติดเชื้อถึง 98.2% ทำให้เป็นตัวแทนของเมล็ดในการตรวจที่ดีได้ และขนาดตัวอย่างเหมาะสมในการทำงาน ดังนั้นหากตรวจไม่พบผลปฏิกิริยาเป็นบวก หรือพบปฏิกิริยาเป็นบวก 1 กอง แสดงว่าเมล็ดพันธุ์กองนั้นมีอัตราการติดเชื้อต่ำกว่า 0.29 หรือ 0.29% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยต่ำกว่า 0.5% (Pataky and Ikins, 2003) เมื่อนำหลักการดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Pss โดยเปลี่ยนจากวิธีการตรวจด้วย ELISA เป็นวิธีการตรวจด้วย PCR ซึ่งวิธีการนี้มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ที่สามารถแก้ไขความผิดพลาดของการตรวจโดยวิธี ELISA ได้

สรุป

การตรวจสอบเชื้อ Pss ด้วยเทคนิค PCR พบว่าคู่ไพรเมอร์ของยีน *hrpS* เท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ Pss สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างพืช ตัวอย่างเมล็ดโดยไม่ต้องบดตัวอย่าง และแยกสกัดดีเอ็นเอ มีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ระดับ 10^3 CFU ทั้งในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากพืช และเมล็ด การตรวจเชื้อแบคทีเรียจากเมล็ดด้วยวิธีการเตรียมเมล็ดแบบแช่เมล็ดให้ผลดีกว่าการเตรียมเมล็ดแบบบดเมล็ด การตรวจสอบกองเมล็ดขนาดสุ่มตัวอย่าง 400 เมล็ดแบ่งเป็นกองย่อยละ 100 เมล็ด ให้ความไวในการตรวจสอบเชื้อตั้งแต่ 10^3 CFU ต่อกองย่อย วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบได้ 100% เมื่อมีเมล็ดติดเชื้อในอัตรา 0.5 -10% ซึ่งแสดงว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อให้ผลดี มีประสิทธิภาพสูง เทียบเท่า หรือดีกว่าวิธีการ ELISA แต่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า เมื่อนำมาตรวจเชื้อ Pss ร่วมกับวิธีการสุ่มตัวอย่าง ตามวิธีข้างต้น จึงเหมาะสมกับการนำไปตรวจเมล็ด เพื่อใช้พิจารณาการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชที่เป็นไปตามมาตรฐานสากลได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตร และอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยภายใต้โครงการ การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวในข้าวโพด และขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Blakemore, E.J.A., J.C. Reeves and S.F.L. Ball. 1992. Polymerase chain reaction used in the development of a DNA probe to identifify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. Seed Science and Technology 20. 527-530.

Coplin, D. L., D.R. Majerczak, Y. Zhang, W.S. Kim, S. Jock and K. Geider. 2002. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. Plant Dis. 86: 304-311.

Guo Y, Liang Z, Yu D, 1982. Nigrosine medium — selective medium for isolation of *Erwinia stewartii* from imported corn. Acta Microbiologica Sinica, 22: 339-344.

Lamka, G.L., J.H. Hill, D.C. McGee, E.J. Braun and J.K. Jo. 1991. Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. Phytopathology 81: 839-846.

Pataky, J. K. and R. Ikin. 2003. Pest Risk Analysis: The Risk of Introducing *Erwinia stewartii* in Maize Seed. The International Seed Federation, Switzerland.

Poussier, S., J.J. Cheron, A. Couteau, and J. Luisetti. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. J. Microbiol. Method 51: 349-359.

Watcharachaiyakup, J., W. Theppota, S. Patarapuwadol, N. Uthaimongkol, N. Thaveechai, and W. Kositratana. 2007. Limitation of detection techniques of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. pp 263-270. *In* The proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference (Plant science), Kasetsart University, Bangkok. (English abstract)

Watson, R.J. and B. Blackwell. 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol. 46:633-42.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, S.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol.173: 697-703.

Wensing, A., S. Zimmermann and K. Geider. 2010. Identification of the corn pathogen *Pantoea stewartii* by mass spectrometry of whole-cell extracts and its detection with novel PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6248–6256.