ชื่อเรื่อง การตรวจเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค *Polymerase* Chain *Reaction*

ผู้แต่ง ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ชลธิชา รักใคร่, ณัฏฐพร อุทัยมงคล และศรีวิเศษ เกษสังข์

ที่มา รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักษาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. 1820 หน้า.

คำสำคัญ เมล็ดพันธุ์; มะเขือเทศ; โรคเมล็ดพันธุ์

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศมีศักยภาพในการเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ เพื่อการส่งออกที่สำคัญ จึงจำเป็นต้องมีเทคนิคการตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์เพื่อป้องกันการติดมาของเชื้อสาเหตุของโรคที่สำคัญ ทั้งนี้ในขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่จากต่างประเทศ และก่อนการส่งออกเมล็ดพันธุ์ต้องมีการตรวจรับรองการปลอดโรคกับพืช ตลอดช่วงการเจริญเติบโตในแปลงปลูก และตรวจรับรองเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยว จึงเป็นต้องพัฒนาและปรับใช้เทคนิค การตรวจเชื้อที่ให้ผลแม่นยำและรวดเร็ว การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Xcv.) สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียมะเขือเทศ ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยทดสอบไพรเมอร์ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อ พบว่าไพรเมอร์ RST9 (5'GGCACTATGCAATGAC TG3') และ RST10 (5'AATACGCTGGAACTGCTG3') ให้ผลของปฏิบัติกิริยา PCR เป็นบวก สามารถสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 355 base pairs (bp) มีความไวในตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอและเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1 นาโนกรัม และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบความจำเพาะในการตรวจเชื้อพบว่าเชื้อ Xcv. บางสายพันธุ์มีการสร้างสายดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งแถบ (multiple bands) ซึ่งอาจทำให้การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบเชื้อผิดพลาดได้ ในการวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ใหม่ โดยการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ จากไพรเมอร์ RST9 และ RST10 พบว่าเชื้อ Xcv. ส่วนใหญ่ให้แถบ ดีเอ็นเอขนาด 355 bp ที่เด่นชัดเจน จึงทำการโคลนสายดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสายดีเอ็นเอมีขนาด 356 base เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ EMBL-EBI พบว่ามีความเหมือน 97% (355 bp) กับบริเวณ *hrp* gene ของเชื้อ *X. campestris* pv. *Vesicatoria* สายพันธุ์ XC33548 ใช้โปรแกรมวิเคราะห์การออกแบบไพรเมอร์ใหม่ สังเคราะห์ไพรเมอร์ และทดสอบปฏิกิริยา PCR พบว่าไพรเมอร์ XCVF2 (5'GAAGCGTTCGTGCTGCAGGA3') และ XCVR2 (5'GGAACTGCTGACCA GCGTGA3') ให้ผลของปฏิกิริยา PCR เป็นบวก สามารถสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ Xcv. ได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวมี

ขนาด 270 bp จากเชื้อทุกสายพันธุ์ โดยมีความไวในการตรวจเชื้อ Xcv. ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอและเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ 1 นาโนกรัม และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ *X. campestris* pathovars อื่นๆ พบว่าปฏิกิริยา PCR สามารถสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* และ *X. campestris* pv. *citri* โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris*