การใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Erwinia* spp. สาเหตุโรคเน่าเละของผักภายหลังการเก็บเกี่ยว

ชลลดา โพธิ์ขำ*

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผัก 10 ชนิดที่แสดงอาการเน่าเละ ได้แก่ กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกวางตุ้ง ผักปวยเล้ง แครอท หัวไชเท้า แตงกวา มะเขือเทศ และหน่อไม้ฝรั่ง ได้ถูกนำมาตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด primer Y ซึ่งออกแบบมาจาก conserved sequences ของยีน *pelB* และ *pel153* ของ *Erwinia carotovora* และสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *pel* ของ *E. carotovora* ได้ขนาด 434 bp และ primer ADE ซึ่งออกแบบมาจาก conserved sequences ของยีน *pelA, pelD, pelE* ของ *Erwinia chrysanthemi* และสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *pel* ของ *E. chrysanthemi* ได้ขนาด 420 bp พบว่ามีเพียงชุด primer Y ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วน DNA ของ *Erwinia* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกๆ ผลิตผล PCR จากชุด primer Y ที่ตรวจสอบได้มี similarity กับลำดับ นิวคลีโอไทด์บนยีน *pel* ของ *E. carotovora* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผักปวยเล้งและกะหล่ำดอกที่ similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pelB* ของ *E. carotovora* เท่ากับ 90 และ 94% สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผักชนิดอื่นๆ มี similarity กับลำดับนิงคลีโอไทด์บนยีน *pel153* ของ *E. carotovora* อยู่ในช่วง 90-96% ผลการศึกษาการจัดจำแนกกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pel* ของ *Erwinia* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Erwinia* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผักชนิดต่างๆ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *E. carotovora* การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเน่าและความรุนแรงของเชื้อ *E. carotovora* โดยการปลูกเชื้อลงบนผักกาดขาวพบว่าเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากผักทั้ง 10 ชนิด สามารถทำให้เกิดโรคเน่าเละบนกาบผักกาดขาวได้แต่มีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคแตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. carotovora* สายพันธุ์ที่แยกได้จากแครอทสามารถทำให้เกิดโรคเน่าเละได้รุนแรงที่สุด และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ pactate lyase, polygalacturonase, cellulose และ protease โดยวิธี spectrophotometer และวิธี cup plate พบว่าเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากผักต่างชนิดกัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ แตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากแครอทมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สูงที่สุด

---

* วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว) คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 94 หน้า.

PCR Detection of *Erwinia* Soft Rot Associated Vegetable after Harvest

Chonlada Pokhum*

Abstract

PCR was applied to detection and classification of *Erwinia* spp. Isolate from 10 various vegetables including, cauliflower, cabbage, Chinese cabbage, pak-choi, spinach, carrot, Chinese radish, cucumber, tomato and asparagus. Primers Y, in which conserved sequences of *pelB* and *pel153* of *Erwinia carotovora*, are specific to amplify 434 bp of *pe*l gene of *E. carotovora*. Primers ADE, in which conserve sequences of *pelA*, *pelD* and pelE of *Erwinina chrysathemi*, are specific to amplify 420 bp of pel gene of E. chrysanthemi. Primers Y showed the specificity to amplify DNA of 10 *Erwinia* spp. Neucleotide sequences of PCR product using primer Y of all isolates showed similarity with pel genes of *E. carotovora*. Neucleotide sequences of isolates from spinach and cauliflower had 90 and 94% similarity with *pelB* while neucleotide sequences of the other isolates were in the rang of 90-96% similarity with pel153. The classification obtained by phylogenetic tree analyses showed that all of 10 *Erwinia spp*. contained in the same group with *E. carotovora*. Disease severity of *E. carotovora* was tested on the artificially would Chinese cabbage. All isolates were able to macerate Chinese cabbage with different severity. *E. carotovora* isolated from carrot showed the highest ability to macerate Chinese cabbage tissue. The activities of pectate lyase, polygalacturonase, cellulose, and protease enzymes were undertaken using spectrophotometer and cup plate. The result demonstrated that each isolate had variation in their enzyme activities. The *E. carotovora* isolated from carrot was the highest production of all enzymes to cause tissue maceration.

---

* Master of Science (Postharvest Technology), Faculty of School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi. 94 p.