

การประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค
สำหรับจำแนก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*
สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง
Application of Particle Size Analysis Technique to
Identification of Soybean Bacterial Pustule Pathogen,
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines*

ดุษิต อธินววัฒน์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วรรณพร เทพบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

ภัทรเดช ขวัญอยู่

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Dusit Athinuwat*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Wannaporn Thepbandit

School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology, Suranari, Muang, Nakhon Ratchasima 30000

Pattaradate Kwanyou

Central Scientific Instrument Center, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การจำแนก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง มีการประยุกต์เทคนิคต่าง ๆ เข้าร่วมในการจัดจำแนก ได้แก่ เทคนิคทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และเทคนิคต่าง ๆ ด้านดีเอ็นเอ ซึ่งการศึกษานี้มีขึ้นเพื่อพัฒนาและประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค

ด้วยโปรแกรมวินโดว์ SZ-100 ในการจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในจีนัสเดียวกันและต่างจีนัส ประกอบด้วย *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Escherichia coli* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ผลการวิจัยพบว่าเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* ออกจากแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบอื่น ๆ ได้แตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$) โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้คือ 2×10^8 cfu/ml หรือ optical density เท่ากับ 0.3 เทคนิคที่ประสบความสำเร็จนี้แสดงผลได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำสูง และไม่ต้องใช้สารเคมีอันตราย ซึ่งสามารถนำเข้าร่วมในกระบวนการจำแนกเชื้อสาเหตุโรใบจุดบนและแบคทีเรียอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : ความกว้างเซลล์; ความยาวเซลล์; สัณฐานวิทยา; เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาคนาโน

Abstract

Identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of pustule disease on soybean using several techniques including morphology, pathotype and DNA-based techniques, was performed. This study focused on development and application of particle size analysis technique using windows SZ- 100 to identify *X. axonopodis* pv. *glycines* compared to other *Xanthomonads* and other bacteria including *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Escherichia coli* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Results revealed that particle size analysis technique showed significantly difference between *X. axonopodis* pv. *glycines* and others ($P = 0.05$). The minimum concentration of bacterial suspension that suits for this technique was 2×10^8 cfu/ml or optical density with 0.3. This successful technique showed quick results with high accuracy and did not use dangerous chemicals that could integrate to bacterial pustule pathogen and other bacterial identification.

Keywords: cell width; cell length; cell morphology; nanoparticle analyzer

1. คำนำ

โรใบจุดบนเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งในระบบการผลิตถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสด มักพบระบาดรุนแรงมากในช่วงฤดูฝน สาเหตุเกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงขนาด $0.4-1.0 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยมีหาง 1 เส้น ที่ขั้วด้านใดด้าน

หนึ่งของเซลล์ อาการโรคในระยะแรกจะพบจุดสีเขียวอ่อนขนาดเล็ก ทั้งใต้ใบและบนใบ ต่อมาจุดเล็ก ๆ นี้จะขยายใหญ่ ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อย (pustule) รอบรอยนูนจะมีสีเหลืองล้อมรอบ (halo) จุดแผลเหล่านี้เมื่อถูกลามติดกันจะทำให้ใบแห้ง และร่วงก่อนกำหนด ทำให้น้ำหนักเมล็ด โปรตีน และน้ำมันในเมล็ดรวมถึงเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง ผลผลิตต่อไร่ลดลง (ชัยสิทธิ์, 2531; Prathuang-

wong and Khandej, 1989) วิธีการตรวจสอบและจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* ทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นักโรคพืชและนักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมใช้ ต่อมาได้มีการนำเทคนิคอื่น ๆ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อ เพื่อให้ได้ความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ได้แก่ การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *X. axonopodis* pv. *glycines* ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยอาหารกึ่งเลือกเฉพาะ MXG (Prathuangwong *et al.*, 1994; Violatti and Tebaldi, 2016) การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ 6 ชนิด สามารถจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* จำนวน 127 สายพันธุ์ ออกเป็น 10 กลุ่ม (RAPD type A ถึง J) ซึ่งมีความสัมพันธ์สูงกับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับถั่วเหลืองพันธุ์สง 4 จำนวน 3 ระดับ คือ รุนแรงน้อย ปานกลาง และรุนแรงมาก แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิค RAPD ในการตรวจสอบและจำแนกความรุนแรงของเชื้อนี้ (สายเดือน, 2542) การใช้เทคนิค rep-PCR ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ BOX, ERIC และ REP ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *X. axonopodis* pv. *glycines* จำนวน 199 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ BOX และ ERIC ตรวจสอบและจำแนกเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์รุนแรงได้ชัดเจน ยิ่งไปกว่านั้นไพรเมอร์ BOX ยังสังเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 650 bp ใน *X. axonopodis* pv. *glycines* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและสังเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 840 bp เฉพาะสายพันธุ์รุนแรงเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ BOX และ ERIC มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบและจำแนกความรุนแรงของ *X. axonopodis* pv. *glycines* แต่ละสายพันธุ์ได้เป็น

อย่างดี (กุลขนา, 2546) การใช้ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์ Spencer, PI 520733 และ Williams82 ในการตรวจสอบและจำแนก race ของ *X. axonopodis* pv. *glycines* พบ 3 race แตกต่างกันได้แก่ race 1 กลุ่มสายพันธุ์ที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลืองทั้ง 3 พันธุ์ race 2 กลุ่มสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลืองได้ทั้ง 3 พันธุ์ และ race 3 กลุ่มสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลืองพันธุ์อ่อนแอ (Spencer, PI520733) แต่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนพันธุ์ต้านทาน (Williams82) (Athinuwat *et al.*, 2009)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ สำหรับตรวจสอบและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืช เพื่อความแม่นยำ สะดวก และรวดเร็วทันสถานการณ์การระบาด การศึกษาในครั้งนี้เป็นการประยุกต์เทคนิคการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านวัสดุศาสตร์ที่มีความปลอดภัยสูง ไม่ต้องใช้สารที่เป็นอันตราย สามารถแสดงผลได้รวดเร็ว มาปรับใช้ในการตรวจสอบและจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* ออกจาก Xanthomonads อื่น ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นได้รวดเร็ว แม่นยำ และไม่ต้องใช้สารอันตราย ตลอดจนสามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ต่อไป โดยการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคใช้การกระจายแสงแบบไดนามิก (dynamic light scattering) แหล่งกำเนิดแสงถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยและแสงที่กระจัดกระจายจะถูกเก็บรวบรวมไว้ที่ 90° หรือ 173° ระบบจะเลือกมุมการกระเจิงและตำแหน่งที่เหมาะสมโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย สัญญาณที่ได้จากแสงกระจัดกระจายจะถูกป้อนเข้าสู่ระบบประมวลผลเพื่อหาสัมประสิทธิ์การแพร่ของเซลล์แบคทีเรียที่วิเคราะห์ เพื่อคำนวณหาขนาดของเซลล์แบคทีเรียต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคสำหรับจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดหนูนั่วเหลือง

แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนั่วเหลือง race 1, race 2 และ race 3 ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ โดย race 1 ประกอบด้วย KU-P-34001, KU-P-34009, KU-P-34017, KU-P-34021, KU-P-34028, KU-P-34031, KU-P-34032, KU-P-34040, KU-K-34043 และ KU-P-34054 ส่วน race 2 ประกอบด้วย KU-P-34008, KU-P-34016, KU-P-34042, KU-P-34089, KU-P-34098, ST015 และ race 3 ประกอบด้วย KU-P-KPS01, KU-P-KPS04, KU-P-SW008 และ KU-P-SW005 (กุลشنا, 2546; Athinuwat *et al.*, 2009) นำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ขนาดเซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค โปรแกรมนินโดว์ SZ-100 วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) จำนวน 11 กรรมวิธี [optical density (OD) เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 และ 1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร] กรรมวิธีละ 60 ซ้ำ (20 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ) โดยนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 2 ลิตร เขย่า 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 5 องศาเซลเซียส) นาน 48 ชั่วโมง บั่นตกตะกอนเซลล์ 6,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาปรับความขุ่นด้วยการผสมกับน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ และวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 และ 1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำความเข้มข้นประมาณ 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 7×10^8 ,

8×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 และ 5×10^9 cfu/ml ตามลำดับ (วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน dilution plate method) แล้ววิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* แต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรมนินโดว์ SZ-100 เลือกรูปแบบการวัดแบบ Nano Analysis Mode และวิเคราะห์ซ้ำ ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2 การจำแนกแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนั่วด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค

นำ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนั่วเหลือง จำนวน 20 สายพันธุ์ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคขอบใบทองพีชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 3 สายพันธุ์ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าว จำนวน 10 สายพันธุ์ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปรงแสงข้าว จำนวน 5 สายพันธุ์ *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศ จำนวน 3 สายพันธุ์ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม จำนวน 3 สายพันธุ์ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมฝ้าย จำนวน 3 สายพันธุ์ *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง จำนวน 2 สายพันธุ์ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* สาเหตุโรคเน่าและพืชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 10 สายพันธุ์ *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen™) และแบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus amyloliquefaciens* (กุลشنا, 2546; นลินา, 2554; ปาริชาติ และคณะ, 2555; จิตติมา และคณะ, 2558; นิภาพร และคณะ, 2558; Athinuwat *et al.*, 2009; Prathuangwong and Kasem, 2004; Prathuangwong *et al.*, 2005) มาศึกษาการจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนั่วเหลืองด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค วาง

แผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 11 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ โดยนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มาเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำความเข้มข้น ประมาณ 2×10^8 cfu/ml (OD = 0.3) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ดังรายละเอียดข้างต้น วิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในจีโนส *Xanthomonads* ได้แก่ *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* รวมทั้งเปรียบเทียบกับแบคทีเรียต่าง จีโนส ได้แก่ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *E. coli* และ *B. amyloliquefaciens*

2.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคสำหรับจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดหน่อกล้วยเหลือ

การประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคในการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดหน่อกล้วยเหลือเริ่มต้นจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *X. axonopodis* pv. *glycines* สำหรับการวิเคราะห์ขนาดเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้ด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค โดยวิเคราะห์ความกว้างและความยาวของเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดหน่อแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่ปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า OD เท่ากับ

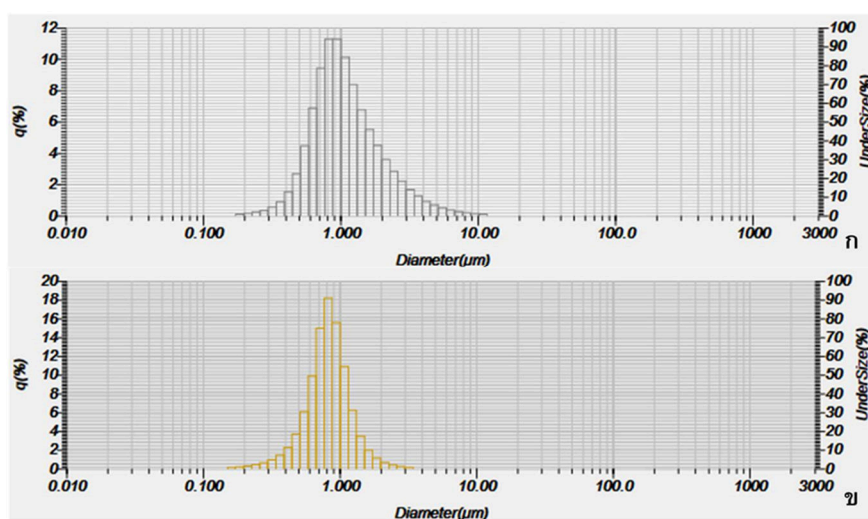
0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 และ 1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีเซลล์ *X. axonopodis* pv. *glycines* แขวนลอยในน้ำความเข้มข้นประมาณ 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 และ 5×10^9 cfu/ml ตามลำดับ นั้น ผลการทดลองพบว่าเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคมีศักยภาพในการวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ช่วงความเข้มข้นประมาณ 2×10^8 ถึง 5×10^9 cfu/ml (OD = 0.3-1.5) โดยแสดงผลวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* มีเซลล์กว้างเฉลี่ย 0.911-0.946 μm และยาวเฉลี่ย 1.309-1.314 μm (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของ Sain และ Gour (2013) ว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* มีขนาด $0.9 \times 1.6 \mu\text{m}$ ขณะที่ Alipour (2013) รายงานว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* มีขนาด $0.5-1.0 \times 1.3-2.3 \mu\text{m}$ รวมทั้ง Schaad และคณะ (2001) รายงานว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* มีขนาด $0.4-1.0 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ ตลอดจน Gautam และ Sharma (2003) รายงานว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* มีขนาด $0.4-1.0 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ บ่งชี้ให้เห็นว่าการวิจัยครั้งนี้สามารถประยุกต์เทคนิควิเคราะห์อนุภาค สำหรับวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว โดย *X. axonopodis* pv. *glycines* ความเข้มข้นประมาณ 2×10^8 cfu/ml (OD = 0.3) จัดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค และ *X. axonopodis* pv. *glycines* ความเข้มข้นประมาณ 4×10^8 cfu/ml (OD = 0.5) จัดเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมมากที่สุด ในการวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ซึ่งใช้โปรแกรมวินโดว์ SZ-100 (รูปที่ 1) ในขณะที่เทคนิคนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ที่ค่า OD เท่ากับ 0.1 และ 0.2 ซึ่งมี

ความเข้มข้นแบคทีเรียประมาณ 5×10^7 และ 1×10^8 ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิคการ
ตามลำดับ จัดเป็นหนึ่งข้อจำกัดของการวิเคราะห์ วิเคราะห์ขนาดอนุภาค

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ขนาด *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค

ความเข้มข้นเซลล์ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (OD : cfu/ml)	ผลเฉลี่ยการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (โปรแกรมวินโดว์ SZ-100) ^{1/}	
	ความกว้างเซลล์ (μm)	ความยาวเซลล์ (μm)
0.3 : 2×10^8	0.921±0.022	1.309±0.452
0.4 : 3×10^8	0.935±0.033	1.311±0.423
0.5 : 4×10^8	0.946±0.051	1.311±0.612
0.6 : 5×10^8	0.945±0.025	1.310±0.716
0.7 : 7×10^8	0.929±0.062	1.310±0.505
0.8 : 8×10^8	0.924±0.073	1.314±0.711
0.9 : 1×10^9	0.941±0.015	1.311±0.611
1.0 : 2×10^9	0.911±0.019	1.312±0.634
1.5 : 5×10^9	0.927±0.047	1.314±0.877

^{1/}ผลการวิเคราะห์ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ด้วยเทคนิควิเคราะห์อนุภาค ซึ่งใช้เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาคนาโน (โปรแกรมวินโดว์ SZ-100) บ่งชี้ความไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test



รูปที่ 1 ผลของการใช้เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยโปรแกรมวินโดว์ SZ-100 ในการวิเคราะห์ขนาดของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ในเซลล์แขวนลอยในน้ำความเข้มข้นประมาณ 4×10^8 cfu/ml (OD = 0.5) โดย (ก) ผลวิเคราะห์ความยาวเซลล์ และ (ข) ผลวิเคราะห์ความกว้างเซลล์

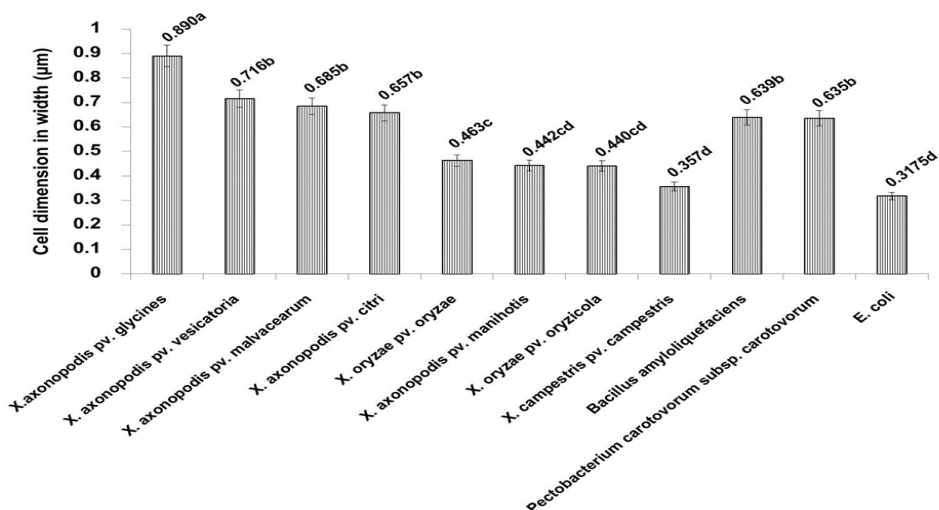
3.2 การจำแนกแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค

การประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคในการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดหนูนถั่วเหลือง โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้ (OD = 0.3) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในจีนัสเดียวกันและต่างจีนัส ด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค โปรแกรมวินโดวส์ SZ-100 พบว่าเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค มีศักยภาพในการวิเคราะห์ขนาด *X. axonopodis* pv. *glycines* เท่ากับ $0.89 \times 1.34 \mu\text{m}$ ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($P = 0.05$) กับแบคทีเรียอื่น ๆ ในจีนัส *Xanthomonads* และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่างจีนัส ได้แก่ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *E. coli* และ *B. amyloliquefaciens* (รูปที่ 2 และ 3 และตารางที่ 2) โดยพบว่า *X. campestris* pv. *campestris* มีขนาด $0.357 \times 1.101 \mu\text{m}$, *X. oryzae* pv. *oryzae* มีขนาด $0.463 \times 1.145 \mu\text{m}$, *X. oryzae* pv. *oryzicola* มีขนาด $0.440 \times 1.019 \mu\text{m}$, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* มีขนาด $0.716 \times 2.190 \mu\text{m}$, *X. axonopodis* pv. *citri* มีขนาด $0.657 \times 1.126 \mu\text{m}$, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* มีขนาด $0.685 \times 1.215 \mu\text{m}$ และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* มีขนาด $0.442 \times 1.556 \mu\text{m}$, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* มีขนาด $0.635 \times 1.484 \mu\text{m}$, *E. coli* มีขนาด $0.317 \times 1.912 \mu\text{m}$ และ *B. amyloliquefaciens* มีขนาด $0.639 \times 2.480 \mu\text{m}$ (รูปที่ 2 และ 3 และตารางที่ 2) สอดคล้องกับรายงานขนาดของ *X. axonopodis* pv. *glycines* เท่ากับ $0.4-1.0 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ (Gautam and Sharma, 2003; Alipour, 2013; Sain and Gour, 2013), *X. campestris* pv. *campestris* มีขนาด $0.4-0.6 \times 1.0-2.9 \mu\text{m}$ (Vauterin et al., 1995; Rodriguez-R et al., 2012), *X. oryzae* pv. *oryzae* มีขนาด $0.4-0.6 \times 1.1-$

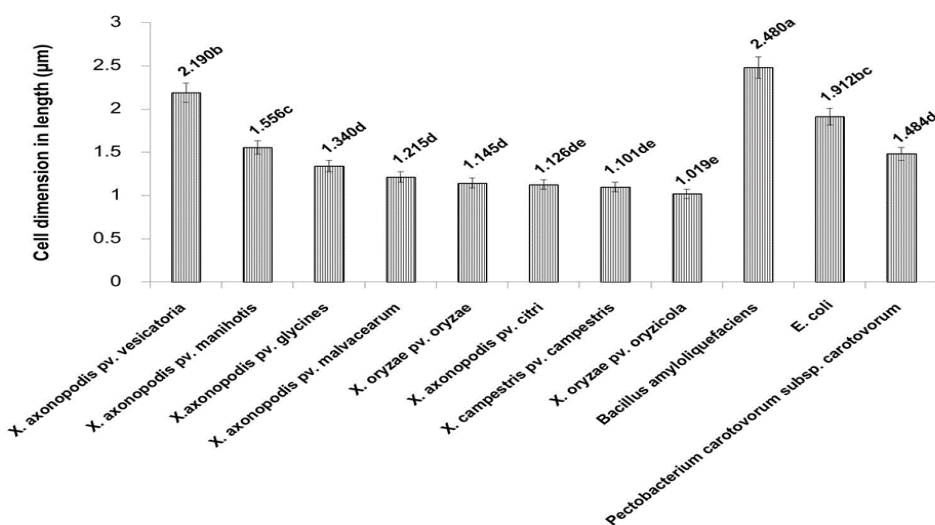
$2.0 \mu\text{m}$ (OEPP/EPPO, 1980; OEPP/EPPO, 1990), *X. oryzae* pv. *oryzicola* มีขนาด $0.4-0.6 \times 1.0-2.5 \mu\text{m}$ (OEPP/EPPO, 1979), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* มีขนาด $0.6 \times 1.0-1.5 \mu\text{m}$ (OEPP/EPPO, 1988), *X. axonopodis* pv. *citri* มีขนาด $0.5-0.75 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ (Goto, 1992), *X. axonopodis* pv. *malvacearum* มีขนาด $0.6-0.9 \times 1.2-1.4 \mu\text{m}$ (Sambamurty, 2006) และ *X. axonopodis* pv. *manihotis* มีขนาด $0.28-0.6 \times 1.0-1.75 \mu\text{m}$ (Dye, 1978), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* มีขนาด $0.5-1.0 \times 1.0-3.0 \mu\text{m}$ (Mehrotra and Aggarwal, 2003), *E. coli* มีขนาด $0.25-1.0 \times 2 \mu\text{m}$ (Reshes et al., 2008) และ *B. amyloliquefaciens* มีขนาด $0.7-0.9 \times 1.8-3.0 \mu\text{m}$ (Whitman, 2009) เช่นเดียวกับ Wyatt (1968; 1969) ในการพัฒนาเทคนิคทางกายภาพซึ่งเรียกว่า light scattering สำหรับการตรวจสอบและจำแนกจีนัสด้วยการวิเคราะห์ขนาดเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิดได้อย่างรวดเร็ว เช่น *B. subtilis*, *B. anthracis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* และวิเคราะห์ขนาดสปอร์ของ *B. megaterium* และ *B. cereus* รวมทั้ง Stull (1972) ประยุกต์ใช้เครื่องวิเคราะห์ขนาดเซลล์ *S. epidermidis* ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ light-scattering และ Kotlarchyk (1979) แสดงให้เห็นว่าquasi-elastic light scattering จัดเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกจีนัสแบคทีเรียในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว เช่น การใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์ขนาดเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งมีขนาดเท่ากับ $1 \mu\text{m}$ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการนำเทคนิคนี้มาวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และงานวิจัยนี้ยังชี้ให้เห็นว่าเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคมีประสิทธิภาพในการจำแนก *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดหนูนถั่วเหลือง ออกจาก *Xanthomonads* อื่น ๆ และ

แบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่างชนิดกันได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และไม่ต้องใช้สารเคมีอันตราย จัดเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่สามารถประยุกต์ใช้ร่วมในกระบวนการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดหนูน

นอกเหนือจากอาหารที่เลือกจำเพาะ ลักษณะความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค และเทคนิคด้านดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 2 ผลของเทคนิควิเคราะห์ความกว้างเซลล์ของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ด้วยโปรแกรมวินโดว์ SZ-100 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น ๆ ในจีนัส *Xanthomonads* และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่างชนิด



รูปที่ 3 ผลของเทคนิควิเคราะห์ความยาวเซลล์ของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ด้วยโปรแกรมวินโดว์ SZ-100 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น ๆ ในจีนัส *Xanthomonads* และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่างชนิด

ตารางที่ 2 ผลการจำแนก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองด้วยเทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาค (โปรแกรมวินโดว์ SZ-100) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น ๆ ในจีนัส *Xanthomonads* และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่างจีนัส^{1/}

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผลเฉลี่ยการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ด้วยโปรแกรมวินโดว์ (µm)		ขนาดอนุภาคอ้างอิง (µm)
	ความกว้างเซลล์	ความยาวเซลล์	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	0.890±0.062a	1.340±0.372d	0.4-1.0 x 1.2-3.0 (Gautam and Sharma, 2003)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0.716±0.069b	2.190±0.152b	0.6 x 1.0-1.5 (OEPP/EPPO, 1988)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	0.685±0.089bc	1.215±0.146de	0.6-0.9 x 1.2-1.4 (Sambamurty, 2006)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	0.657±0.076bc	1.126±0.285de	0.5-0.75 x 1.5-2.0 (Goto, 1992)
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	0.463±0.045d	1.145±0.292de	0.4-0.6 x 1.1-2.0 (OEPP/EPPO, 1980)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	0.442±0.056d	1.556±0.121d	0.28-0.6 x 1.0-1.75 (Dye, 1978)
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	0.440±0.055d	1.019±0.364de	0.4-0.6 x 1.0-2.5 (OEPP/EPPO, 1979)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0.357±0.099e	1.101±0.358de	0.4-0.6 x 1.0-2.9 (Vauterin <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.639±0.137bc	2.480±0.142a	0.7-0.9 x 1.8-3.0 (Whitman, 2009)
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0.635±0.069c	1.484±0.237d	0.5-1.0 x 1.0-3.0 (Mehrotra and Aggarwal, 2003)
<i>E. coli</i>	0.317±0.053e	1.912±0.063c	0.25-1.0 x 2 (Reshes <i>et al.</i> , 2008)

^{1/}อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test

4. สรุป

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ขนาดอนุภาคในการจำแนก *Xantho-*

monas axonopodis pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง ซึ่งมีขนาด 0.89x1.34 µm ออกจาก *Xanthomonads* อื่น ๆ และแบคทีเรียสายพันธุ์

เปรียบเทียบต่างจันส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพแม่นยำชัดเจน และรวดเร็ว พร้อมทั้งพัฒนากระบวนการวิเคราะห์ให้เหมาะสม ซึ่งมีรายละเอียดคือ การใช้เซลล์แบคทีเรีย อายุ 48 ชั่วโมง ในรูปเซลล์แขวนลอยในน้ำ ความเข้มข้น 2×10^8 cfu/ml (OD = 0.3) ขึ้นไป สำหรับวิเคราะห์ความกว้างและความยาวของแบคทีเรียเป้าหมาย ด้วยโปรแกรมวินโดว SZ-100 โดยเลือกรูปแบบการวัดแบบ Nano Analysis Mode และวิเคราะห์ซ้ำ ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์แสดงผลอย่างถูกต้อง รวดเร็ว และไม่ต้องใช้สารเคมีอันตราย

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยโครงการ “โรคระบาดและการจัดการโรคของถั่วเหลืองระหว่างปี 2557-2559 และจีโนมที่ควบคุมการก่อโรครุนแรงของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* และขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

กุลชนา เกศสุวรรณ, 2546, การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิตติมา โสถิติไพลพงศ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิวัฒน์, 2558, สารสกัดหยาบพืชควบคุมโรคเน่าและของผักกาดขาวปลี, Thai J. Sci. Technol. 4(3): 244-254.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา, 2531, การแพร่กระจาย ความรุนแรง

และการประเมินความเสียหายเนื่องจากโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองในประเทศไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิวัฒน์, 2558, แบคทีเรียที่มีประโยชน์ชักนำการสะสมกาบาในเมล็ดข้าวกล้องงอกอินทรีย์, Thai J. Sci. Technol. 4(2): 123-132.

นลินา เหมสนธิ, 2554, การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้คะน้าเกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปาริชาติ สถิตธรรมพนา, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิวัฒน์, 2555, ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 180-188.

แสงเดือน สายแสงทอง, 2542, การศึกษาลักษณะ fingerprinting genome ของ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alipour, Y., 2013, A guide for diagnosis detection of quarantine pests, Soybean bacterial pustule *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano) Vauterin et al., 1995 Xanthomonadales: Xanthomonadaceae, Ministry of Jihad-e-Agriculture Plant Protection Organization, Iran.

Athinuwat, D., Prathuangwong, S. and Burr, T.J., 2009, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* soybean cultivar virulence

- p specificity determinate by
- avrBs3*
- homolog,
- avrXag1*
- ,
- Phytopathology*
- 99: 996-1004.
- Dye, D.W., 1978, Genus *Xanthomonas* Dowson 1939, In Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Pangopoulos, C.G., Robbs, C.F. (Eds.), 1978, A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria, *NZJAR* 21: 153-168.
- Gautam, S. and Sharma, A., 2003, *Xanthomonas* program cell death has similarities with eukaryotic apoptosis, *BARC Newslett.* 249: 81-90.
- Goto, M., 1992, Citrus canker, In Kumer, J., Chaube, H.S., Singh, U.S., Mukhopadhyay, A.N. (Eds.), *Plant Diseases of International Importance*, Vol. III, Diseases of Fruit Crops, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Kotlarchyk, M., Chen, S.H., and Asano, S., 1979, Accuracy of RGD approximation for computing light scattering properties of diffusing and motile bacteria, *Appl. Opt.* 18: 2470-2479.
- Mehrotra, R.S. and Aggarwal, A., 2003, *Plant Pathology*, 2nd Ed., Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- OEPP/EPPO, 1988, Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *OEPP/EPPO Bull.* 18: 521-526.
- OEPP/EPPO, 1979, Data sheets on quarantine organisms No. 3, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*, *OEPP/EPPO Bull.* 9(2).
- OEPP/EPPO, 1980, Data sheets on quarantine organisms No. 2, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 10(1).
- OEPP/EPPO, 1990, Specific quarantine requirements, *EPPO Technical Documents*, No. 1008.
- Prathuangwong, S. and Kasem, S., 2004, Screening and evaluation of thermotolerant epiphytic bacteria from soybean leaves for controlling bacterial pustule disease, *Thai J. Agr. Sci.* 37: 1-8.
- Prathuangwong, S. and Khandej, K., 1989, An artificial inoculation method of soybean seed with *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* for inducing disease expression, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 32: 84-89.
- Prathuangwong, S., Kasem, S., Thowthampitak, J. and Athinuwat, D., 2005, Multiple plant response to bacterial mediated protection against various diseases, *J. ISSAAS* 11(3): 79-87.
- Prathuangwong, S., Khandej, K. and Goto, M., 1994, Development of new methods for ecological study of soybean bacterial pustule: A semiselective medium for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in contaminated soybean seed, pp. 197-202, *Proceedings of World Soybean Research*, Chiang Mai.
- Reshes, G., Vanounou, S., Fishov I. and Feingold, M., 2008, Cell shape dynamics in *Escherichia coli*, *Biophys. J.* 94: 251-264.
- Rodriguez-R, L.M., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M., Salazar, C., Restrepo, S. and Bernal, A., 2012, Genomes based phylogeny of the genus *Xanthomonas*, *BMC Microbiol.* 12: 43.
- Sain, S.K. and Gour, H.N., 2013, Pathological

- and physio-biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, incitant of *Glycine max* leaf pustules, Ind. Phytopath. 66: 20-27.
- Sambamurty, A.V.S.S., 2006, A Textbook of Plant Pathology, I.K. International Pvt. Ltd., New Delhi.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W., 2001, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed., American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Stull, 1972, Size distribution of bacterial cells, J. Bacteriol. 109: 1301-1303.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J., 1995, Reclassification of *Xanthomonas*, Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
- Violatti, M.R. and Tebaldi, N.D., 2016, Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in soybean seeds, Summa phytopathol. 42: 268-270.
- Wyatt, P.J., 1968, Differential light scattering: A physical method for identifying living bacterial cells, Appl. Opt. 7: 1879-1896.
- Wyatt, P.J., 1969, Identification of bacteria by differential light scattering, Nature 221: 1257-1258.
- Whitman, W.B., 2009, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., Springer, Dordrecht Heidelberg, New York.