รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด-2562

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

   กิจกรรม : สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การทดสอบอัตราที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะบางชนิดในการควบคุมโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าและกิ่งตอนส้ม

4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Efficacy of some antibiotics for controlling greening disease in citrus seedling and marcotting

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : แสนชัย คำหล้า สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : กาญจนา วาระวิชะนี สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

โรคกรีนนิ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ Candidatus Liberibacter asiaticus ซึ่งอาศัยอยู่ภายในเซลล์ท่ออาหารของพืชและสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันและไม่มีวิธีการที่เหมาะสมในการจัดการปัญหาโรคกรีนนิ่งที่เป็นที่ยอมรับทั้งในส่วนของเกษตรกรผู้ปลูก หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้บริโภคทั่วไป โรคกรีนนิ่งในประเทศไทยแพร่ระบาดโดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคติดไปกับกิ่งตอนหรือต้นกล้าส้มและการถ่ายทอดโดยเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (citrus psyllid, *Diaphorina citri*) ดังนั้นการกำจัดชื้อแบคทีเรียสาเหตโรคที่ติดไปกับกิ่งตอนหรือต้นกล้าส้มจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาปัญหาการแพร่ระบาดของโรคกรีนนิ่งได้ การทดลองนี้ได้ทำการทดสอบการกำจัดเชื้อในต้นกล้าส้มเขียวหวานโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินและสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ พบว่าหลังการแช่สารปฏิชีวนะ 4 เดือน ตรวจไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่ง แต่สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่เดือนที่ 5 เป็นต้นไป

คำสำคัญ : โรคกรีนนิ่ง, โรคฮวงลองบิง, สารปฏิชีวนะ, แอมพิซิลลิน, เตตร้าไซคลิน

ABSTRACT

Greening disease is caused by the gram-negative bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus, which lives within the phloem cells. Citrus greening infects all citrus commercially grown and there is no suitable method to address the problem that is agreeable among growers, government agencies and consumers. Greening disease in Thailand is spread via citrus vegetative propagations and insect vector; citrus psyllid (*Diaphorina citri*). Elimination of bacterial pathogens from infected citrus seedlings is a promising approach to alleviate spreading disease. In this experiment, the infected mandarin (Citrus reticulata Blanco) seedling roots were immersed in tetracycline and ampicillin solutions at 500, 1,500 and 10,000 ppm, respectively. Four months after root treatment, no greening pathogen detected. However citrus greening disease reappears from the fifth month onwards.

Key words : citrus greening, Huanglongbing, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, antibiotics

6. คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (Greening disease) มีรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2472 โดย Oberholzer และคณะในประเทศแอฟริกาใต้ จากการศึกษาในระยะต่อมาพบว่าได้เคยมีรายงานการศึกษาโรคกรีนนิ่งในประเทศจีนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2462 โดย Reinking กล่าวว่าพบโรคนี้ครั้งแรกในเขตจังหวัดกวางสี โดยเรียกชื่อตามอาการที่ปรากฏว่า โรคยอดเหลือง (yellow shoot) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วให้เรียกโรคดังกล่าวว่า ฮวงลังบิง (ฮวงลองบิง) หรือ Yellow Shoot แทน โรคกรีนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังนิยมเรียก โรคกรีนนิ่ง ควบคู่กันไป สำหรับประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับโรคกรีนนิ่งครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2516 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรีและคณะ) ในกลุ่มส้มเปลือกล่อนเช่นเดียวกันกับที่มีรายงานในประเทศแอฟริกาและประเทศจีน ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ทราบว่าเกิดจากเชื้อโรคชนิดใดจึงเรียกเชื้อที่ตรวจพบซึ่งจำกัดอยู่เฉพาะภายในท่ออาหารพืชว่า เชื้อคล้ายแบคทีเรีย (Bacteria-like organism) ต่อมาในปี 1984 Garnier and Bovè (Bovè, 2006) สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 – 800 นาโนเมตร จึงเสนอชื่อในครั้งแรกว่า Candidatus Liberobacter africanus และในปัจจุบันเปลี่ยนเป็น Candidatus Liberibacter africanus และจากการศึกษาต่อมาพบเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ Candidatus Liberibacter asiaticus, Candidatus Liberibacter americanus , ต่อมาพบการ

ระบาดในประเทศบราซิลและสหรัฐอเมริกาในปี 2004 และ 2005 ตามลำดับ แม้จะมีการศึกษาวิจัยจากทั่วโลกปัญหาโรคกรีนนิ่งก็ยังคงมีเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในปัจจุบัน จึงทำให้ผลผลิตส้มลดลง ขณะเดียวกันก็ทำให้ราคาส้มเพิ่มขึ้นอย่างมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคยังไม่สามารถเลี้ยงบนหาอาหารสังเคราะห์ได้เหมือนแบคทีเรียทั่วไป อาศัยอยู่เฉพาะในท่ออาหารพืช และยังมีแมลงพาหะคือเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ทำให้แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้โรคกรีนนิ่งเป็นปัญหาที่ยังไม่ได้รับการแก้ไขหรือมีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพให้การป้องกันกำจัดโรคได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะทรีทต์ตาส้มก่อนนำไปติดบนต้นตอทำให้กิ่งที่แตกออกมาใหม่ปราศจากเชื้อโรคกรีนนิ่ง (Zhang *et al*.,2012) แต่สำหรับการฉีดสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินและเตตร้าซัยคลินเข้าลำต้นส้มที่ให้ผลผลิตแล้วโดยตรง ในระยะแรกต้นส้มจะมีอาการดีขึ้น แต่ในระต่อมาต้นส้มจะแสดงอาการโรคอีกหลังจากการเลิกใช้สารปฏิชีวนะ (Bovè *et al*., 1980, ไมตรี, 2516, Hong-Ji Su, 2002) ดังนั้นการนำสารปฏิชีวนะมาใช้กับต้นกล้าหรือกิ่งตอนส้มเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาหรือลดความรุนแรงของโรคกรีนนิ่งได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ

- ต้นตอส้มพันธุ์แรงเพอไลม์
- ตาส้มเขียวหวานปลอดโรค
- ตาส้มพันธุ์มาดามไวนัส (madam vinous) เป็นโรคกรีนนิ่ง
- ดินปลูกพืช ถุงเพาะชำ ปุ๋ยเคมี 16-16-16 สารป้องกันกำจัดแมลง
- มีดติดตา, กรรไกรตัดกิ่ง, เทปพันกิ่ง

2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 ตำแหน่ง
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer)
- ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)
- เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
- เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- หลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GeneJET Plant DNA Purification Mini Kit
- GoTaq® Green Master mix (Promega, USA)
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®)
- Agarose gel (SeaKem®)
- สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, laboratory grade)
- ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
- สารปฏิชีวนะเตตร้าไซคลิน (tetracycline, laboratory grade)

- **วิธีการ**

1. เตรียมต้นกล้าส้มเขียวหวานสำหรับทดสอบ

1.1 เพาะเมล็ดส้มพันธุ์แรงเพอร์ไลม์ (Rangpur lime) สำหรับใช้เป็นต้นตอ ในวัสดุปลูกสูตรผสมไทย-เยอรมัน เมื่อต้นกล้าส้มมีอายุ 3 เดือน ทำการย้ายลงถุงเพาะชำ เมื่อต้นกล้าส้มมีอายุ 8 – 10 เดือน หรือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 – 10 มม. ทำการติดตาส้มเขียวหวาน(*Citrus reticulata* Blanco) ปลอดโรค หลังจากนั้น 4 เดือน ทำการสกัดดีเอ็นเพื่อตรวจสอบการปลอดโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.2 ติดตาส้มพันธุ์มาดามไวนัสที่เป็นโรคกรีนนิ่งจำนวน 2 ตา/ต้น หลังจากนั้น 3 เดือน ทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเกิดโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อยืนยันว่าต้นกล้าส้มเขียวหวานได้รับการถ่ายทอดเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่ง และใช้เป็นต้นกล้าส้มสำหรับนำไปทดสอบการกำจัดเชื้อด้วยสารปฏิชีวนะ

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรคกรีนนิ่ง

เตรียมสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและสารละลารปฏิชีวนะเตตร้าไซคลิน 3 ระดับ คือ 500, 1,500, 10,000 พีพีเอ็ม และใช้น้ำสะอาดเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ นำต้นกล้าส้มเขียวหวานล้างรากให้สะอาด แล้วทำการแช่รากต้นกล้าส้มเขียวหวานด้วยสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) และเตตร้าไซคลิน (tetracycline) ที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ต้นต่อกรรมวิธี นาน 24 ชั่วโมง และแช่ในน้ำสะอาดเป็นกรรมวิธีควบคุม จากนั้นจึงย้ายลงปลูกในกระถางและเก็บรักษาไว้โรงเรือนกันแมลง เพื่อตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่ง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเริ่มตรวจเชื้อหลังจากแช่สารปฏิชีวนะแล้ว 3 เดือน

3. การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำตัวอย่างใบส้มเขียวหวานมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยชั่งตัวอย่างใบส้ม ประมาณ 0.1 กรัม นำใส่โกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร

1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ OI1/ OI2c (Jagoueix *et al*., 1996) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,160 เบส ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ดังนี้

OI1 : 5’ GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3’

OI2c : 5’ GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT 3’

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O)	7.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (OI1) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (OI2c) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- Green master mix	10.0	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR มาผสมกันแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 2 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 40 วินาที	
ขั้นที่ 3:	60°C	นาน 60 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 60 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 36 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตร โดย

เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD) ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560-กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง
ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เตรียมต้นกล้าส้มเขียวหวานสำหรับทดสอบ

ต้นกล้าส้มเขียวหวานจำนวน 35 ต้น หลังการติดด้วยตาส้มพันธุ์มาดามไวนัสที่เป็นโรคกรีนนิ่ง จำนวน 2 ตา (ภาพที่ 1) พบว่าต้นกล้าส้มเขียวหวานแสดงการโรคกรีนนิ่งมีอาการใบด่างเป็นจุดจ้ำด่างลายไม่สม่ำเสมอหนาแข็ง (ภาพที่ 2) และเมื่อนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibaacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพร์เมอร์ IO1/OI2c พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,160 bp ซึ่งแสดงว่าทุกต้นเป็นโรคกรีนนิ่งนิ่ง (ภาพที่ 3)

2. การรอดชีวิตของต้นกล้าส้มเขียวหวานหลังการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะ

หลังนำต้นกล้าส้มทั้ง 35 ต้น แช่สารละลายปฏิชีวนะและแช่ในน้ำสะอาดแล้วย้ายลงปลูกในถุงปลูกและเก็บไว้ในโรงเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่แช่ในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม และกรรมวิธีที่แช่ในน้ำสะอาดต้นกล้าส้มรอดชีวิตทุกต้น ส่วนกรรมวิธีที่แช่ในสาระลายปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินอัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ต้นกล้าส้มมีอาการเหลือง ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลุดร่วง แต่ต้นกล้าส้มยังมีชีวิตและมีการแตกยอดใหม่ ส่วนกรรมวิธีที่แช่ต้นกล้าส้มในสารละลายปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินที่อัตรา 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม พบว่าภายในสัปดาห์แรกแสดงอาการใบเหี่ยวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองชัดเจน แห้งติดต้นก่อนที่ต้นกล้าส้มจะตายในที่สุด (ภาพที่ 4)

3. ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรคกรีนนิ่ง

ตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย Candidatus Liberibacter asiaticus ในต้นกล้าส้มที่ได้รับการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะและน้ำสะอาดด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่า กรรมวิธีที่แช่ด้วยสารละลายปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินอัตราความเข้มเข้ม 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม ต้นกล้าส้มแสดงอาการใบเหี่ยวเปลี่ยนเป็นสีส่งผลให้ทุกต้นตายภายใน 1 เดือน จึงไม่สามารถนำมาตรวจหาเชื้อโรคกรีนนิ่งได้ ส่วนอีก 5 กรรมวิธีที่เหลือประกอบด้วย กรรมวิธีที่แช่ในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม กรรมวิธีที่แช่สารละลายปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินที่อัตรา 500 พีพีเอ็ม และกรรมวิธีควบคุมแช่ในน้ำสะอาด ตามลำดับ จากการตรวจติดตามเชื้อโรคกรีนนิ่งครั้งที่ 1 หลังการแช่สารปฏิชีวนะแล้ว 3 เดือน ตรวจไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่ง แต่สามารถตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่งหลังแช่สารปฏิชีวนะแล้ว 5 เดือนและต้นกล้าส้มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งชัดเจนขึ้น ส่วนกรรมวิธีที่แช่ด้วยน้ำ

สะอาดสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 1 เดือนหลังการทดสอบและต้นกล้าส้มแคระแกร็นแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งรุนแรง

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การแช่รากต้นกล้าส้มในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตราความเข้มข้น 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย Candidatus Liberibacter asiaticus สาเหตุของโรคกรีนนิ่งได้ทำให้ต้นกล้าส้มมีการเจริญเติบโตดีกว่าการแช่สารปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินที่อัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย Candidatus Liberibacter asiaticus ได้เนเดียวกับสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน แต่มีผลกระทบกับต้นกล้าส้มค่อนข้างมากคือแสดงอาการใบเหลืองและหลุดร่วง จึงทำให้ต้นกล้าส้มชะงักการเจริญเติบโต และสารละลายปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินที่อัตราสูง 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม มีผลทำให้ต้นกล้าส้มตาย และไม่พบอาการดังกล่าวในต้นกล้าส้มที่แช่สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและน้ำสะอาด ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้กำจัดเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าส้มมากกว่าสารปฏิชีวินะเตตร้าไซคลิน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- สามารถใช้เป็นทางเลือกในการกำจัดเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าส้ม กิ่งตอน หรือ ตาพันธุ์ส้มชนิดต่าง ๆ
- เป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกลูส้มทุกชนิด เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ มะนาว มะกรูด หากเกษตรกรมีต้นกล้าส้ม กิ่ง ตา พันธุ์ที่สะอาดเพื่อนำไปปลูกจะเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิต และเป็นการลดแหล่งสะสมของโรคและแมลงพาหะ

กลุ่มเป้าหมาย

- หน่วยงานและนักวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งภาคภาครัฐและภาคเอกชน
- เกษตรกร

10. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์.2548.เอกสารวิชาการ โรคทรุดโทรมของส้มและแนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย.กรม วิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย.

Bovè J.M.2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus (invited review).Journal of Plant pathology 88(1),7-37.

Hong-Ji Su.2002. The International Workshop on Rehabilitation of Citrus orchard in Tropical Asian Countries. Vietnam. P15 -23.

Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. 1996. PCR detection of two candidatus Liberibacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10, 43-50.

Zhang Muqing, Charles A Powell, Ying Guo, Lesley Benyon and Yongping Duan.2013.Charaterization of the microbial community structure in *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected citrus plant treated with antibiotics in the field. BMC Microbiology.13:112.

Zhang Muqing, Charles A. Powell, Ying Guo, Melissa S. Doud and Yougping Duan.2012. A graft-Based Chemotherapy Method for Screening Effective Molecules and Rescuing Huanlongbing-Affected Citrus plants.phytopathology 102:567-574.

13. ภาคผนวก

Figure 1 Rangpur lime stocks grafted with disease-free Som Keaw wan (*Citrus reticulata* Blanco) bud and two buds of HLB-infected Madam vinous (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Figure 2 Som Kaew wan (*Citrus reticulata* Blanco) seedings exhibits citrus greening disease symptoms after 3 months of disease transmission by bud-grafting, yellowish-mosaic, blotchy symptoms on citrus leaves (inset).

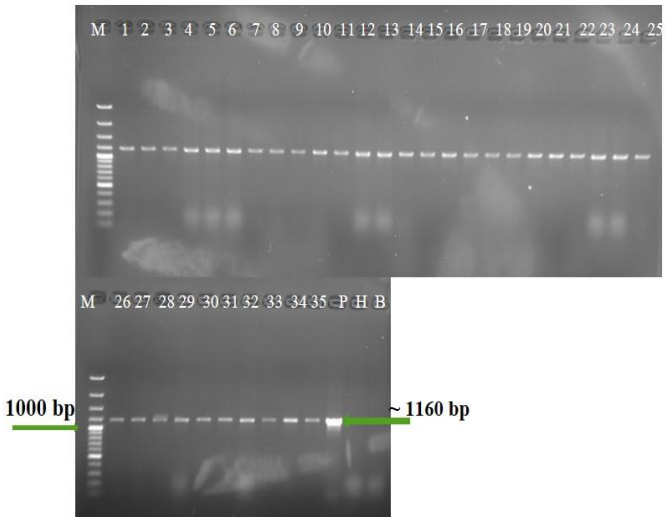

Figure 3 Gel electrophoresis of citrus seeding (*Citrus reticulata* Blanco) 3 months after grafted with two HLB infected buds from Madam vinous variety. Electrophoresis is on 1.2% agarose gel of DNA amplified using OI1/OI2c primers. Lane M = 100 bp DNA ladder, lane 1 -35 samples from citrus seedlings, p = positive control.

Figure 4 Citrus seeding grafted with HLB positive treated with 1,500 ppm tetracycline solution died within one month.