รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection *Candidatus Liberibacter* species cause of Huanglongbing (Greening) disease by Real-time PCR

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ดารุณี ปุญญพิทักษ์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : เยาวภา ตันติวานิช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

โรคฮวงลองบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus* Liberibacter species เมื่อส้มถูกเชื้อ *Ca.* Liberibacter เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบด่าง ใบด่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนา และหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม เนื่องจากอาการของโรคมีความหลากหลาย และ มีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงลองบิงจึงมีความสำคัญ เป็นการตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่ง เพื่อจะได้หาแนวทางป้องกันกำจัดไม่ให้แพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้น การทดลองนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค Real time PCR โดยดำเนินสังเคราะห์ probe ที่ออกแบบมาจาก 16S rDNA sequence –ของ Ca. *Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (GenBank accession no. L22532 ของ Las, L22533ของ Laf และ Ay742824ของ Lam) ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ Ca. *Liberibacter* species โดยทำการสังเคราะห์ probe ทั้งหมด 3 probe ได้แก่ Las, Laf และ Lam ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Ca. *Liberibacter* species จากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค

กรีนนิ่ง โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Kit (Qiagen) ทำการทดสอบ probe ที่ได้สังเคราะห์ไว้ทั้ง 3 probe โดยนำมาตรวจกับ DNA ของเชื้อ Ca. Liberibacter species พบว่า probe ของ Lasและ Laf สามารถตรวจ DNA-ของเชื้อ Ca. Liberibacter species ได้ โดยมี positive internal control เป็น primer ทีสังเคราะห์มาจาก ยีน cytochrome oxidase (COX) จากพืชตระกูลส้ม ทดสอบการใช้ probe และเทคนิค Real time PCR ในการตรวจเชื้อ Ca. Liberibacter species กับตัวอย่างใบส้มเขียวหวานที่เก็บมาจากแปลงปลูกอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พบสามารถตรวจได้ผลดี

6. คำนำ

โรคฮวงลองบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม เนื่องจากโรคนี้สามารถเข้าทำลายส้มทุกพื้นที่ที่มีการปลูกส้มทั่วโลก เช่น ประเทศในทวีปเอเชีย อนุทวีปอินเดีย แอฟริกา อเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus* Liberibacter species ซึ่งมีแมลงเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นพาหะนำโรค (Bove′, 2006; Li *et al*.,, 2007; Tatineni *et al*., 2008) สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่า พบโรคฮวงลองบินเมื่อ พ.ศ. 2516 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สัณนิษฐานว่าน่าจะถูกนำเข้าจากประเทศจีน โดยการลักลอบนำเข้าพันธุ์ส้มต่างๆ จากประเทศจีน (ไมตรี, 2548) เมื่อส้มถูกเชื้อ *Ca.* Liberibacter เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบด่าง ใบด่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนาและหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม (ไมตรี, 2548; Nakashima *et al*.,1998;Ohutsu *et at*., 1998; Bove, 2006; Li *et al*., 2007) เนื่องจากอาการของโรคมีความหลากหลาย และ มีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยพืชอาศัย วีธี ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) วิธี IF (Immuno fluorescence test) และวิธี PCR (Polymerase chain reaction) แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะทราบผลการตรวจสอบ อีกทั้งเชื้อต้องมีปริมาณมากจึงจะสามารถตรวจสอบได้ ส่วนวิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่ได้พัฒนามาจากวิธี PCR สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย หรือ แม้กระทั่งต้นส้มไม่แสดงอาการของโรค ทำให้สามารถกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็วและลดการแพร่ระบาดของโรค

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. เครื่อง Real-time PCR
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
3. สารเคมีทีใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
4. เอ็นไซม์ต่างๆ ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Ca.* Liberibacter species ด้วยเทคนิค Real-time PC R เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca.* Liberibacter species

2. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca.* Liberibacter species จากนั้นทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca.* Liberibacter species

2. สกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบส้มด้วย CTAB buffer

3. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา

4. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจเชื้อ *Ca.* Liberibacter species

6. ทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Ca.* Liberibacter species จากตัวอย่างโรคฮวงลองบิง ที่เก็บจากแปลงปลูก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคฮวงลองบิงจำนวน 10 % จากตัวอย่างส้มทั้งหมดในแปลงปลูก

7. การใช้วิธี Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคฮวงลองบิง ในแปลงปลูก

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สวนส้มของเกษตรกร จากจังหวัดต่างๆใน ภาคเหนือ ภาคกลาง

ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉลียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

สังเคราะห์ probe ที่ออกแบบมาจาก 16S rDNA sequence –ของ Ca. *Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (GenBank accession no. L22532 ของ Las, L22533ของ Laf และ Ay742824ของ Lam) ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ Ca. *Liberibacter* species โดยทำการสังเคราะห์ probe ทั้งหมด 3 probe ได้แก่ Las, Laf และ Lam ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Ca. *Liberibacter* species จากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค กรีนนิ่ง โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Kit (Qiagen) ทำการทดสอบ probe ที่ได้สังเคราะห์ไว้ทั้ง 3 probe โดยนำมาตรวจกับ DNA ของเชื้อ Ca. Liberibacter species พบว่า probe ของ Lasและ Laf สามารถตรวจ DNA- ของเชื้อ Ca. Liberibacter species ได้ โดยมี positive internal control เป็น primer ที

สังเคราะห์มาจาก ยีน cytochrome oxidase (COX) จากพืชตระกูลส้ม ทดสอบการใช้ probe และเทคนิค Real time PCR ในการตรวจเชื้อ Ca. Liberibacter species กับตัวอย่างใบส้มเขียวหวานที่เก็บมาจากแปลงปลูกอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พบสามารถตรวจได้ผลดี

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการใช้เทคนิค Real-time PCR นำมาตรวจสอบโรคฮวงลองบิง โดยใช้ probe ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ Ca. Liberibacter species probe ของ Lasและ Laf สามารถตรวจ DNA- ของเชื้อ Ca. Liberibacter species ได้ ทดสอบการใช้ probe และเทคนิค Real time PCR ในการตรวจเชื้อ Ca. Liberibacter species กับตัวอย่างใบส้มเขียวหวานที่เก็บมาจากแปลงปลูกอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พบสามารถตรวจได้ผลดี

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การใช้เทคนิค Real-time PCR นำมาตรวจสอบโรคฮวงลองบิง โดยใช้ probe ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ Ca. Liberibacter species สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อ Ca. Liberibacter species ในแปลงปลูกพืชตระกูลส้มโอได้

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์. 2548. เอกสารวิชาการ โรคทรุดโทรมของส้มและแนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 88 น.

Bove/, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. J. Plant Patho. 88: 7-37.

Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species asscociated with citrus huanglongbing. J. Microbiol. Methods. 66: 104-115.

Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2007. Evalution of DNA amplification methods for improved detection of "Candidatus Liberibacter species" asscociated with citrus huanglongbing. Plant Dis. 91: 51-58.

Nakashima, K., M. Prommintara and Y. Ohtsu. 1998. Detection of citrus greening organism in citrus plants and psylla diaphorina citri in Thailand. Annals of the Phytopathological Society of Japan. Vol. 64, No. 3 p.153-159.

Ohtsu, Y. Nakashima, K., M. Prommintara and Y. Tomiyasu. 1998. Typical symptoms of citrus greening on mandarin trees in Nepal, Supported by detection

and characterization of ribosomal DNA of the causal organism. Annals of the Phytopathological Society of Japan. Vol. 64, No. 3 p.153-159.

Tatineni, S. U.S. Shankar, S. Gowda, C. J. Robertson, W.D. Dawson, T. Iwannami and N. Wang. 2008. In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real- time PCR. Phytopathology. 98: 592-599.