แบบ 1

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย :

2. โครงการวิจัย : การประเมินผลการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่ง

3. ชื่อการทดลอง : ผลของการใช้สารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

Effect of Antibiotic to Control Citrus Greening

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอัมพิกา ปุนนจิต สถาบันวิจัยพืชสวน

ผู้ร่วมงาน : นางสาวนันทรัตน์ ศุภกำเนิด[1] นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์[1]
นายแสนชัย คำหล้า[2] นายมนต์ชัย คงสมโอษฐ์[2]

5. บทคัดย่อ

สถาบันวิจัยพืชสวน ร่วมกับสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ดำเนินการศึกษาผลการใช้สารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งของส้มสายน้ำผึ้ง โดยเก็บตัวอย่างกิ่ง/ใบส้ม และผลส้มจากสวนส้มในเขตอำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีการใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการกำจัดโรคกรีนนิ่ง นำมาตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในกิ่งและใบ และวิเคราะห์ปริมาณสารแอมพิซิลลินตกค้างในผลส้มอายุต่างๆ ดำเนินการระหว่างเดือนมกราคม – กันยายน 2557 ผลการตรวจเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง *Candidatus* Liberibacter asiaticus (‘*Ca*. L. asiaticus’) โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ไม่พบเชื้อสาเหตุหลังการฉีดสารแอมพิซิลลินเข้าลำต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งผลการตรวจเชื้อโดยวิธีนี้ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการตรวจสอบโดยใช้พืชทดสอบ (Indexing plant) ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอมพิซิลลินในผลส้มอายุต่างๆ พบว่า มีสารแอมพิซิลลินตกค้างในผลส้มภายหลังการฉีดสารเป็นระยะเวลาประมาณ 2 เดือน โดยผลที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วจะมีสารตกค้างในผลมากกว่าผลที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า หลังการฉีดสารครั้งที่ 1 ในเดือนกุมภาพันธ์ผลส้มที่มีอายุมากกว่า 5 เดือนมีการสะสมของสารมากกว่า 0.8 μg/kg ส่วนผลที่มีอายุน้อยกว่า 5 เดือนมีการสะสมของสารน้อยกว่าร้อยละ 50 ส่วนหลังการฉีด

---

[1] สถาบันวิจัยพืชสวน

[2] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารครั้งที่ 2 ในเดือนสิงหาคม ผลส้มอายุประมาณ 5 เดือนมีการสะสมของสาร 9.01 μg/kg ส่วนผลส้มใกล้เก็บเกี่ยวอายุประมาณ 8 เดือนมีการสะสมของสารเพียง 1.47 μg/kg

6. คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (Greening disease) หรือที่รู้จักกันอีกชื่อหนึ่งว่า โรคฮวงลองบิง (Huanglongbing, HLB) เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้แก่ส้มที่ปลูกในประเทศไทยมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคนี้มี 3 ชนิด คือ 1.) *Candidatus* Liberibacter asiaticus (‘*Ca*. L. asiaticus’) พบในประเทศในทวีปเอเชียตะวันออกกลาง อเมริกากลางและใต้ หมู่เกาะแคริบเบียน และในรัฐทางตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา เชื้อแสดงอาการได้ทั้งในสภาพอากาศเย็นและอบอุ่น (ccol and warm conditions) มีเพลี้ยไก่แจ้ส้มเอเชียน (Asian citrus phyllid, *Diaphorina citir*) เป็นพาหะ 2.) *Candidatus* Liberibacter africanus พบในประเทศแถบทวีปอัฟริกาและตะวันออกกลาง เชื้อแสดงอาการในสภาพอากาศเย็น (20-25C̊) โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้มอัฟริกา (African citrus psyllid, *Trioza erytreae*) เป็นพาหะ และ 3) *Candidatus* Liberibacter americanus พบเฉพาะในประเทศบราซิล โดยมี Asian citrus psyllid เป็นพาหะ (Anon (c), 2013; Bove, 2006; Grafton-Cardwell, 2014) โรคนี้เริ่มพบทำความเสียหายแก่ส้มที่ปลูกในรัฐฟลอริด้า ซึ่งเป็นแหล่งปลูกส้มที่สำคัญของประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี 2005 (Grafton-Cardwell, 2014) ทำให้เกิดการตื่นตัวในการวิจัยเพื่อหาทางป้องกันกำจัด เนื่องจากเกรงว่าจะมีการแพร่กระจายไปยังแหล่งปลูกอื่นและทำลายอุตสาหกรรมส้มในสหรัฐฯ

เชื้อ *Candidatus* Liberibacter เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (gram-negative bacteria) ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารพืช (phloem) ทำให้ขัดขวางการเคลื่อนย้ายของอาหารที่พืชสังเคราะห์ (phloem-restricted) โดยแบคทีเรียชนิดที่ทำความเสียหายแก่ส้มในประเทศไทย คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus (‘*Ca*. L. asiaticus’) ส้มที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตน้อยลง และเป็นส้มที่ไม่มีคุณภาพ โรคกรีนนิ่งจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลให้พื้นที่เพาะปลูกส้มลดลงอย่างมากและรวดเร็ว จากพื้นที่ปลูก 232,014 ไร่ในปี 2552 เหลือเพียง 147,673 ไร่ ในปี 2553 และ 102,726 ไร่ ในปี 2555 โดยมีผลผลิตลดลงจาก 514,678 ตัน เป็น 280,190 และ 185,084 ตัน ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556)

ในปี 2554 ทีมวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้เผยแพร่ผลการวิจัยการใช้สาร Tetracycline ในการป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่งในส้มสายน้ำผึ้ง โดยแนะนำให้ใช้สาร Tetracycline ความเข้มข้น 12,500 ppm ฉีดเข้าที่ลำต้นส้มสายน้ำผึ้งที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ร่วมกับการตัดแต่งทรงพุ่มต้นส้มที่ทรุดโทรม ทำการฉีดปีละ 2 ครั้ง คือ ช่วงหลังเก็บเกี่ยวส้มปี (เดือนมีนาคม) และฉีดอีกครั้งไม่เกินเดือนกรกฎาคม ต้นส้มที่ได้รับสารฟื้นตัวและให้ผลผลิตได้ โดยทีมวิจัยเก็บผลส้มไปวิเคราะห์ แต่ไม่พบสารตกค้างในผลส้มหลังการใช้สาร 0, 5, 10 และ 15 วัน (เคหการเกษตร, 2554) มีเกษตรกรชาวสวนส้มจำนวนมากนำวิธีการนี้ไปใช้ ต่อมาการใช้สาร Tetracycline ไม่มีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูต้นส้มที่เป็นโรค จึงเริ่มมีการนำสารปฏิชีวนะชนิดแอมพิซิลลินมาใช้ในการกำจัดโรคกรีนนิ่ง (เคหการเกษตร, 2556)

จากการสำรวจการระบาดของโรคกรีนนิ่งในเขตอำเภอ ฝาง แม่อาย และไชยปราการ โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ปี 2555 พื้นที่สำรวจทั้งหมด 29,600 ไร่ จำนวนเกษตรกร 986 ราย พบว่าร้อยละ 91 ของพื้นที่ทั้งหมดเป็นโรคกรีนนิ่งในระดับรุนแรง มีต้นส้มเป็นโรคมากกว่าร้อยละ 50 ซึ่ง

แนวทางในการป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่งคือ ในแปลงที่เป็นโรคน้อยกว่าร้อยละ 50 ให้ตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรคออกเผาทำลาย ส่วนแปลงที่เป็นโรคมากกว่าร้อยละ 50 ให้กำจัดต้นส้มทิ้งและหยุดการปลูกส้ม 1 ปี เพื่อตัดวงจรเชื้อสาเหตุของโรค แต่แนวทางแนะนำนี้เกษตรกรส่วนใหญ่ยังไม่ยอมรับ เนื่องจากทำให้ขาดรายได้

แอมพิซิลลิน (Ampicillin, AMP) เป็นหนึ่งในสารสังเคราะห์ที่ได้จากเพนนิซิลลิน (Geddes and Gould, 2012) มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) หลายชนิดทั้งแกรมบวก เช่น *Streptococcus*, *Staphylococcus* และแกรมลบ เช่น *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้หลายโรค แอมพิซิลลินทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ transpeptidase ที่มีความจำเป็นในการสร้าง cell wall ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการแตกของเซล (cell lysis) (Anon (a), 2015)

การฉีดสารแอมพิซิลลินแก่ต้นส้มได้เผยแพร่และมีการนำไปใช้ไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากต้นส้มที่เป็นโรคมีความสมบูรณ์ขึ้นและสามารถให้ผลผลิตที่มีคุณภาพได้ดังเดิม ทำรายได้มหาศาลให้กับเกษตรกร อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลวิจัยเชิงวิชาการเกี่ยวกับการใช้สารอย่างเหมาะสมและปลอดภัย ไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับวิธีการใช้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด และการตกค้างของสารปฏิชีวนะในผลส้มซึ่งอาจมีผลต่อความปลอดภัยของเกษตรกรผู้ผลิตและผู้บริโภค จากปัญหาที่กล่าวมาจึงมีการศึกษาการใช้สารปฏิชีวนะของเกษตรกร และผลตกค้างของสารในสวนส้ม เพื่อเป็นข้อมูลเตรียมพร้อมสำหรับผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคต

7. วิธีดำเนินการ :

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1. การตรวจหาเชื้อกรีนนิ่งหลังการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้าลำต้นส้มที่มีอาการของโรครุนแรง

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างใบส้มที่เก็บมาจากสวนส้มเกษตรกร อ. ฝาง จ.เชียงใหม่ จำนวน ๖๐ ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างส้มที่แสดงอาการโรคกรีนนิ่ง
3. ตัวอย่างส้มปกติ
4. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - โกร่งบดตัวอย่าง
   - กระติกสูญญากาศ
   - หลอดพลาสติกขนาด 0.5, 1.5 และ 2 ไมโครลิตร
   - ตู้แช่แข็ง -20^{0}C
   - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
   - เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
   - ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
   - เครื่อง Thermal cycler
   - เครื่อง Gel electrophoresis

- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

5. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - ไนโตรเจนเหลว
   - สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40)
   - เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen)
   - GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
   - Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
   - Ethanol
   - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
   - Agarose gel

<u>วิธีการ</u>

เก็บตัวอย่างใบส้มจากสวนเกษตรกรที่มีการใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) โดยเลือกใบที่คลี่เต็มที่ ทั้งที่มีอาการหรือแสดงอาการคล้ายโรคกรีนนิ่งสำหรับใช้สกัดดีเอ็นสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (‘*Ca*. L. asiaticus’) และเก็บกิ่งส้มที่มีตาสมบูรณ์เพื่อนำตาไปติดบนต้นตอ เปรียบเทียบกับตาจากส้มพันธุ์มาดามไวนัส (Madam Vinous) ซึ่งใช้เป็นพืชทดสอบ เนื่องจากวิธีการนี้ช่วยในการคัดแยก (screen) ต้นส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งได้อย่างเด่นชัด (ไมตรี, 2548; Zhang *et al*., 2012)

ดำเนินการเก็บตัวอย่าง จำนวน 3 ครั้งๆละ 20 ตัวอย่าง คือ

1. ก่อนฉีดสารปฏิชีวนะ (วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2557**)**
2. หลังฉีดปฏิชีวนะประมาณ 2.5 เดือน (วันที่ 1 พฤษภาคม 2557)
3. หลังการฉีดปฏิชีวนะประมาณ 5.5 เดือน (วันที่ 6 สิงหาคม 2557)

นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)[3] ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. การวัดปริมาณสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในผลส้มอายุต่างๆหลังการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้าลำต้นเป็นระยะเวลาต่างๆกัน

<u>วิธีการ</u>

2.1. สุ่ม tag ตัวอย่างผลอายุ 2 เดือนให้มากพอสำหรับเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณสารฯทุก 2 เดือนจนกระทั่งเก็บเกี่ยว

2.2. สุ่ม tag ตัวอย่างผลอายุ 3, 4, 5, 7 และ 9 เดือนให้มีจำนวนมากพอมากพอสำหรับเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณสารฯ หลังการฉีดสารเข้าลำต้น 1, 2 และ 3 เดือน

---

[3] วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มและการตรวจสอบหาเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR แสดงในภาคผนวก 1

2.3. วิเคราะห์ปริมาณสารสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในตัวอย่างผลโดยวิธีการของห้องปฏิบัติการของสถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา มกราคม 2557-กันยายน 2557

สถานที่ สวนส้มของเกษตรกร อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการ-อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

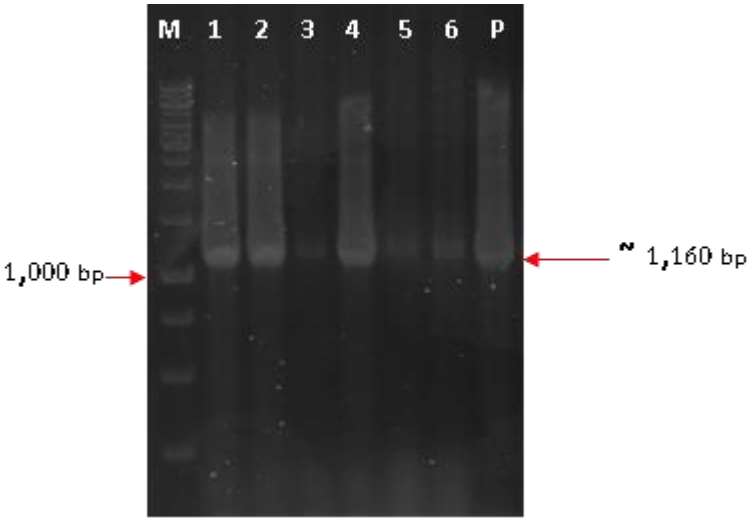
ห้องปฏิบัติการ สถาบันอาหาร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบการเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR

การใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อ '*Ca*. L. asiaticus' โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ OI1(5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3') และ OI2c (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') จะให้แถบดีเอ็นขนาด 1,160 bp (ภาพที่ 1)

เมื่อนำตัวอย่างส้มที่เก็บทั้ง 3 ครั้ง มาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) แช่ในสารละลายเอธิเดียมและนำไปตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งในตัวอย่างจากการเก็บครั้งที่ 1 และ 2 แต่ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง 5 ตัวอย่าง (จาก 20 ตัวอย่าง) จากการเก็บครั้งที่ 3



ภาพที่ 1 ภาพเจลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย '*Ca*. L. asiaticus' ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c ของตัวอย่างใบส้มจากสวนเกษตรกรที่ใช้สารปฏิชีวนะ อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่

ช่องที่		ผล
M. DNA Marker 1 kb (fermentas®)		
1. ตัวอย่างที่	3	+
2. ตัวอย่างที่	4	+
3. ตัวอย่างที่	5	+
4. ตัวอย่างที่	7	+
5. ตัวอย่างที่	10	+
6. ตัวอย่างที่	Positive control	+

หมายเหตุ

+ หมายถึง ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus

การตรวจสอบโรคด้วยการใช้พืชทดสอบ (Indexing plant)

อาการโรคกรีนนิ่งบนพืชทดสอบ คือ ส้มพันธุ์มาดามไวนัส ให้ผลสอดคล้องกับตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR (ภาพที่ 2) โดยยอดของส้มพันธุ์มาดามไวนัส ที่ติดตาบนต้นตอเดียวกับตาจากตัวอย่างที่ 3, 4, 5, 7 และ 10 ในการเก็บครั้งที่ 3 แสดงอาการเหลืองอย่างชัดเจน ส่วนยอดของส้มพันธุ์มาดามไวนัสในตัวอย่างปกติจะไม่พบอาการยอดเหลือง

ภาพที่ 2 แสดงอาการยอดเหลืองหลังจากติดตาบนพืชทดสอบโดยใช้ส้มพันธุ์มาดาม ไวนัส
(<u>หมายเหตุ</u> : + หมายถึง เป็นโรคกรีนนิ่ง ; - หมายถึง ไม่เป็นโรคกรีนนิ่ง)

จากการนำตัวอย่างใบส้มที่มีการฉีดสารแอมพิซิลลินเข้าลำต้นในระยะต่างๆ มาตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย '*Ca.* L. asiaticus' สาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ทั้งจากวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และเพิ่มปริมาณเชื้อบนพืชทดสอบ พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือพบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งเฉพาะในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 จำนวน 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้าลำต้นส้มที่เกษตรกรปฏิบัติมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียลดปริมาณลงหรือกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ จนทำให้ต้นส้มฟื้นกลับมาให้ผลผลิตได้

อย่างไรก็ตามการที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในครั้งที่ 3 จากการเก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม อาจเป็นเพราะต้นส้มได้รับเชื้อเมื่อเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ต้นพืชกำลังเจริญเติบโต แตกยอดและมีใบใหม่จำนวนมาก มีโอกาสที่เพลี้ยไก่แจ้ส้มจะเข้ามาดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบอ่อนและถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ต้นส้มได้อีก ทำให้เชื้อสาเหตุโรคเพิ่มปริมาณสูงในเดือนสิงหาคม จึงตรวจพบโรคกรีนนิ่งในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นพืชมีปริมาณน้อยในช่วงเวลาดังกล่าว

นอกจากนั้นต้นส้มแต่ละต้นจะได้รับสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินไม่เท่ากัน แม้จะเตรียมสารละลายตั้งต้นเท่ากัน เนื่องจากเกษตรกรเจ้าของสวนจะฉีดสารปฏิชีวนะตั้งแต่ 20 – 90 เซ็ม แล้วแต่อายุและขนาดของลำต้น จากตัวอย่างที่ตรวจพบโรคกรีนนิ่งทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ใน 3 ตัวอย่างสามารถสังเกตอาการบนใบได้ค่อนข้าง

ชัดเจน แสดงว่า แม้ต้นส้มจะได้รับสารปฏิชีวนะไปแล้วก็ยังมีเชื้อเหลืออยู่ในต้นพืช เมื่อสารแอมพิซิลลินที่อยู่ในต้นสลายไปหมด เชื้อก็สามารถกลับมาแสดงอาการโรคได้อีก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhang *et al* (2011) ที่พบว่า การฉีดสารปฏิชีวนะเข้าต้นส้มสามารถกำจัดหรือยับยั้งแบคทีเรียในต้นส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งได้ โดยการใช้สารแพนนิซิลลินร่วมกับสเตรปโตมัยซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ '*Ca*. L. asiaticus' ได้ถึง 4-5 เดือน

การเก็บตัวอย่างใบส้มมาตรวจมีความสำคัญมากเช่นกัน โดยผู้เก็บต้องมีความชำนาญจึงจะให้ผลที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ได้ตรวจในส่วนของเปลือกไม้และส่วนของรากซึ่งมีเชื้อโรคกรีนนิ่งอาศัยอยู่ได้เช่นกัน จึงควรจะมีการดำเนินการศึกษาในรายละเอียดดังกล่าวต่อไป

ปริมาณสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในผลส้มอายุต่างๆหลังการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้าลำต้นเป็นระยะเวลาต่างๆกัน

ในสวนที่มีการติดผลของส้มหลายรุ่น มีการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 15,000 ppm เข้าลำต้นในอัตรา 800-1000 มล./ต้น ครั้งแรกเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2557 พบว่า หลังจากการฉีดสารเข้าลำต้นส้มที่มีอาการของโรคกรีนนิ่งประมาณ 1 เดือน ผลส้มที่มีอายุใกล้เก็บเกี่ยว (อายุประมาณ 9 เดือน) มีปริมาณของสารแอมพิซิลินตกค้างในผล 1.02 μg/kg ขณะที่ผลส้มที่มีอายุ 3-4 เดือน มีปริมาณสารตกค้างต่ำกว่าประมาณร้อยละ 50 และปริมาณสารตกค้างจะลดต่ำลงเมื่อผลส้มเหล่านี้มีอายุมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม การฉีดสารปฏิชีวนะครั้งที่ 2 ในเดือนสิงหาคมขณะที่ผลส้มบนต้นมีอายุ 5 และ 8 เดือน มีผลให้ปริมาณสารตกค้างในผลส้ม ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (24 กันยายน 2557) ซึ่งมีอายุ 7 และ 10 เดือนสูง 9.01 และ 1.47 μg/kg ตามลำดับ การที่มีสารแอมพิซิลลินสะสมในผลส้มอายุ 5-7 เดือนมากกว่าผลส้มที่มีอายุใกล้ระยะเก็บเกี่ยวนั้นอาจเป็นได้ว่าผลส้มอายุ 5-7 เดือนเป็นระยะที่ส้มกำลังมีการขยายขนาดของผล จึงมีแรงดึงอาหารไปสะสมในผลมากกว่าผลส้มใกล้ระยะเก็บเกี่ยวที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า และจากการเก็บตัวอย่างผลส้มในเดือนพฤศจิกายน (หลังการฉีดสารแอมพิซิลลินครั้งที่ 2 ประมาณ 3 เดือน) พบว่าปริมาณสารที่สะสมในผลส้มอายุ 9 เดือนลดลงเหลือน้อยกว่า 0.2 μg/kg

สำหรับปริมาณสารตกค้างในผลส้มในสวนที่มีการติดผลของส้มในฤดู และมีการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 15,000 ppm ในอัตราต่ำกว่า 200 มล./ต้นนั้นจะมีปริมาณสารตกค้างในผลต่ำเพียง 0.22 μg/kg และปริมาณสารตกค้างจะต่ำกว่า 0.2 μg/kg หลังการฉีดสารแล้วเพียง 2 เดือน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารตกค้าง (μg/kg) ในผลส้มหลังการฉีดสารปฏิชีวนะความเข้มข้น 15,000 ppm อัตรา 800-1,000 มล./ต้น

อายุผลส้ม ณ วันที่ฉีดสารครั้งที่ 1	ระยะเวลาหลังการฉีดสารปฏิชีวนะ			
	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	5 เดือน
3 เดือน	0.54	<0.20	<0.20	<0.20
4 เดือน	0.40	0.24	<0.20	<0.20
5 เดือน	0.88	0.58	<0.20	<0.20
7 เดือน	0.83	0.35	<0.20	-
9 เดือน	1.02	-	-	-

ตารางที่ 2 ปริมาณสารตกค้าง (μg/kg) ในผลส้มหลังการฉีดสารปฏิชีวนะความเข้มข้น 15,000 ppm อัตรา 800-1,000 มล./ต้น ครั้งที่ 2 (สิงหาคม 2557)

อายุผลส้ม ณ วันที่ฉีดสารครั้งที่ 2	ระยะเวลาหลังการฉีดสารปฏิชีวนะ	
	1 เดือน	3 เดือน
5 เดือน	9.01	<0.20
8 เดือน	1.47	-

ตารางที่ 3 ปริมาณสารตกค้าง (μg/kg) ในผลส้มหลังการฉีดสารปฏิชีวนะความเข้มข้น 15,000 ppm ในอัตราต่ำกว่า 200 มล./ต้น

ฉีดสารปฏิชีวนะขณะที่ผลส้มมีอายุ 1-2 เดือน	ระยะเวลาหลังการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน				
	ก่อนฉีดสาร	1 เดือน	2 เดือน	4 เดือน	6 เดือน
ปริมาณสารตกค้างในผล	ไม่มี	0.22	<0.20	<0.20	<0.20

เมื่อนำข้อมูลการตรวจสอบเชื้อกรีนนิ่งในใบของส้มและช่วงเวลาการแพร่ระบาดของแมลงพาหะ มาสังเคราะห์ร่วมกับข้อมูลสารแอมพิซิลลินที่ตกค้างในผลส้ม พบว่ามีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ ในตัวอย่างใบส้มที่เก็บครั้งที่ 1 และ 2 ตรวจไม่พบเชื้อกรีนนิ่ง และพบสารตกค้างของสารในผลส้มหลังการฉีดสาร 1-2 เดือน ทั้งนี้เนื่องจากครั้งแรกที่เก็บตัวอย่างใบส้มเป็นช่วงเวลาที่พืชผ่านอากาศหนาวเย็น ส้มไม่มีการแตกใบอ่อน จึงไม่มีการระบาดของเพลี้ยไก่แจ้ส้มซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อกรีนนิ่งในช่วงเวลานั้น การพบสารตกค้างในผลส้มในช่วงแรกของการฉีดสารแอมพิซิลลินในงานทดลองนี้แตกต่างจากที่อำไพวรรณ (2557) รายงานว่าไม่พบการตกค้างของสารปฏิชีวนะทั้ง Tetracycline และ Ampicillin ในผลส้มหลังการฉีดสารเข้าต้น 7, 15 และ 30 วัน ซึ่งอาจเกิดจากอายุผลส้มที่วิเคราะห์ และวิธีการวิเคราะห์สารที่แตกต่างกัน

หลังการฉีดสารแล้ว 1-2 เดือนแม้ว่าเป็นระยะที่ส้มออกดอก และติดผลอ่อนของส้มในฤดู แต่การมีสารแอมพิซิลลินตกค้างในผลส้มแสดงให้เห็นว่าน่าจะมีสารแอมพิซิลลินในท่ออาหารของกิ่งส้มที่แตกใหม่ด้วยเช่นกัน เพราะทั้งผลส้มและกิ่งส้มที่กำลังเจริญเติบโตจะมีแรงดึงน้ำและสารอาหารสะสมมากกว่าส่วนที่มีการเจริญเติบโตช้าหรือหยุดการเจริญเติบโต ทำให้ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในกิ่งและใบส้ม อย่างไรก็ตามในตัวอย่างกิ่งและใบส้มที่เก็บระหว่างเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ตรวจพบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในขณะที่พบสารตกค้างในผลส้มต่ำกว่า 0.2 μg/kg แสดงว่ามีเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นส้ม ขณะที่ไม่มีสารแอมพิ-ซิลลินอยู่ในต้นส้มหรือมีในปริมาณน้อยจนไม่สามารถควบคุมเชื้อโรคได้ สอดคล้องกับการปฏิบัติของเกษตรกรที่ทำการฉีดสารแอมพิซิลลินอีกในปลายเดือนสิงหาคม 2557

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผลส้มที่มีขายในตลาดมาวิเคราะห์ปริมาณสารแอมพิซิลลินในผล พบว่า ผลส้มมีสารตกค้างอยู่ระหว่าง <0.2-0.68 μg/kg ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าต้นส้มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งในระยะที่ผลกำลังมีการเจริญเติบโตและระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นระยะที่ส้มมีความอ่อนแอต่อโรคสูง ทั้งนี้เนื่องจากต้นส้มต้องใช้อาหารไปในการเจริญเติบโตของผลมาก เกษตรกรจึงฉีดสารแอมพิซิลินเพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อกรีนนิ่งก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก สุกรและปศุสัตว์ มีการใช้สารปฏิชีวนะอย่างกว้างขวาง หากไม่มีการใช้อย่างเหมาะสมอาจมีสารตกค้างในเนื้อสัตว์ นม และ/หรืออวัยวะต่างๆ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศแคนาดา ประกาศค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residual Limits, MRL) ของสารแอมพิซิลลิน ในชิ้นส่วนของสัตว์และนมที่ไม่เกิน 0.01 ppm (Anon (d), 2015) ในขณะที่สหภาพยุโรปกำหนดค่า MRL สำหรับชิ้นส่วนของสัตว์และนมที่ 50 μg/kg และ 4 μg/L ตามลำดับ (Anon (b), 2009) โดยกรมปศุสัตว์ของไทยใช้ค่า MRL ที่สหภาพยุโรปกำหนด เนื่องจากมีการส่งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ไปจำหน่ายที่สหภาพฯ (สุจิตตรา, 2558) สำหรับการผลิตสัตว์น้ำ กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้มีการใช้สาร Amoxicillin โดยกำหนดระยะหยุดยาในปลาเป็นเวลา 20 วันและต้องไม่มีสารตกค้างในเนื้อปลาเลย (กรมประมง, ไม่ระบุปี)

แม้ว่าปริมาณการตกค้างของสารแอมพิซิลลินจะลดลงตามระยะเวลาที่นานขึ้นหลังฉีดสาร โดยมีระยะปลอดภัยที่ 3 เดือนหลังการฉีดสาร แต่เนื่องจากส้มที่เกษตรกรผลิตมักจะมีหลายรุ่นในต้นเดียวกัน ก่อให้เกิดข้อกังวลถึงส้มที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวหลังการฉีดสารไม่เกิน 3 เดือน ซึ่งจากการสุ่มตัวอย่างส้มที่ขายตามท้องตลาดไปตรวจ พบมีสารตกค้างอยู่ระหว่าง <0.2-0.68 μg/kg แม้จะเป็นปริมาณไม่สูงเกินค่า MRL แต่ไม่มีข้อมูลว่าหากผู้บริโภคได้รับสารแอมพิซิลลินโดยไม่ได้ตั้งใจแม้เป็นปริมาณน้อยจะมีโอกาสเกิดการดื้อยาของเชื้อโรคในร่างกายของบุคคลนั้นในอนาคตอย่างไร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การฉีดสารแอมพิซิลลินเข้าลำต้นส้มที่มีอาการโรคกรีนนิ่งรุนแรงสามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคและฟื้นฟูสภาพของต้นได้ โดยสารแอมพิซิลลินมีผลในการควบคุมเชื้อโรคได้ไม่เกิน 3 เดือน

ผลส้มที่เก็บเกี่ยวหลังการฉีดสารแอมพิซิลลิน 1 เดือนมีปริมาณสารตกค้างสูง โดยปริมาณสารตกค้างจะลดลงเรื่อยๆ จนอยู่ในระดับน้อยกว่า 0.2 μg/kg ในเดือนที่ 3 ดังนั้นเกษตรกรจึงควรหยุดการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้าลำต้นส้มก่อนการเก็บเกี่ยวอย่างน้อย 3 เดือน เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีสารตกค้างในผลส้มที่นำไปจำหน่าย

เนื่องจากสารแอมพิซิลลินไม่ได้ถูกสังเคราะห์มาเพื่อใช้ในการเกษตร หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งกระทรวงเกษตรฯ และกระทรวงสาธารณสุข จึงควรร่วมมือกันเพื่อเตรียมมาตรการรองรับผลกระทบของการใช้สารแอมพิซิลลินในอุตสาหกรรมการผลิตส้มในระยะยาว

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จัดการอบรมให้ความรู้แก่เกษตรกรในการจัดการสวนส้ม และการใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่งในส้มเพื่อให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายเชาวลิต ศรีธเนศสกุล และนางนวพร บุญรัตน์ เจ้าของสวนส้มที่ให้ใช้สถานที่ในการเก็บข้อมูล และนายไมตรี พรหมมินทร์ อดีตผู้เชี่ยวชาญโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ในการให้คำปรึกษาในระหว่างการทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

กรมประมง ไม่ระบุปี ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) http://www.fisheries.go.th/quality/

เคหการเกษตร. 2554. การวิจัยและทดสอบการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อการยืดอายุต้นส้มสายน้ำผึ้งที่มีเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง หนึ่งในงานวิจัยภายใต้ความช่วยเหลือของกองทุน FTA กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ เคหการเกษตร 35(9): 95-105.

เคหการเกษตร. 2556. กลยุทธ์ชาวสวนส้ม 11 นักสู้เพื่อความอยู่รอด เคหการเกษตร 37(5): 83-102.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2548. โรคทรุดโทรมของส้มและแนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 87 หน้า

ไมตรี พรหมมินทร์ แสนชัย คำหล้า และ มนต์ชัย คงสมโอษฐ์. 2555. โรคที่สำคัญของส้ม เอกสารประกอบการประชุมวิชาการส้ม "เหลียวหลัง แลหน้า อนาคตส้มไทย" 21-22 กุมภาพันธ์ 2555 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส อ. เมือง จ. เชียงใหม่

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ 2558 ติดต่อส่วนตัว

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. ศูนย์ข้อมูลไม้ผล ส้มเขียวหวาน http://www.oae.go.th/fruits/index.php/oranges-data

อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ 2557 การรักษาโรคกรีนนิ่ง (Greening) หรือโรคฮวงลองบิง (Huanglongbing, HLB) ของส้มสายน้ำผึ้งโดยการใช้สารปฏิชีวนะและวิธีฉีดยาเข้าต้น (Trunk injection) เอกสารเผยแพร่ สำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ (องค์การมหาชน) 15 หน้า

Anon (a). 2015. Ampicillin. http://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin

Anon (b). 2009. Commission Regulation (EU) 37/2010 on pharmalogical active substances and their classification regarding maximum residual limits in foodstuffs of animal origin. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

Anon. (c) 2013. Fact Sheet. Huanglongbing (HLB): Citrus Diseases. http://idtools.org/id/citrus/diseases/factsheet.php?name=Huanglongbing+(HLB)

Anon (d). 2015. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods. Ministry of Health, Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.php

Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Pl. Patho. 88: 7 – 37.

Geddes, A.M. and Gould, I.M. 2010. Ampicillin, Amoxicillin and other Ampicillin-like Penicillins. p. 65-83. In: M. L. Grayson, S. M. Crowe, J. S. McCarthy, J. Mills, J. W. Mouton, S. R. Norrby, D. L. Paterson, M. A. Pfaller (eds.), Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs. Vol.1. CRC Press, Boca Raton.

Grafton-Cardwell, E. 2014. Huanglongbing (HLB or Citrus Greening). Center for Invasive Species Research, University of California Riverside. http://cisr.ucr.edu/citrus_greening.html

Jagoueix, S., Bove, J.M. and Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria.* Inter. J. Sym. Bacteriology. 44:379-386.

Zhang, M., Powell, C. A., Zhou, L., He, Z, Stover, E. and Duan, Y. 2011. Chemical compound effective against the citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in planta. Phytopathology. 101:1097-1103.

Zhang, M., Powell, C. A., Guo Y., Doud, M. S. and Duan, Y. 2012. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and recuing Huanglongbing-affected citrus plants. Phytopathology. 102:567-574.

13. ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบส้มและการตรวจสอบหาเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบส้ม

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส้มด้วยวิธี CTAB buffer โดยตัดตัวอย่างใบส้มที่สุ่มมาจากแปลงทดสอบเฉพาะส่วนของเส้นกลางใบ น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม บดในโกร่งให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na2SO3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

วิธีการตรวจสอบการเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Jagoueix et. al. (1994๗ ด้วยคู่ไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1160 เบส

ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ดังนี้

OI : 5’-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3’

OI2c : 5’-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-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 1 นาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 1 นาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 1 kb 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 มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

การตรวจสอบโรคด้วยวิธีการใช้พืชทดสอบ (Indexing plant)

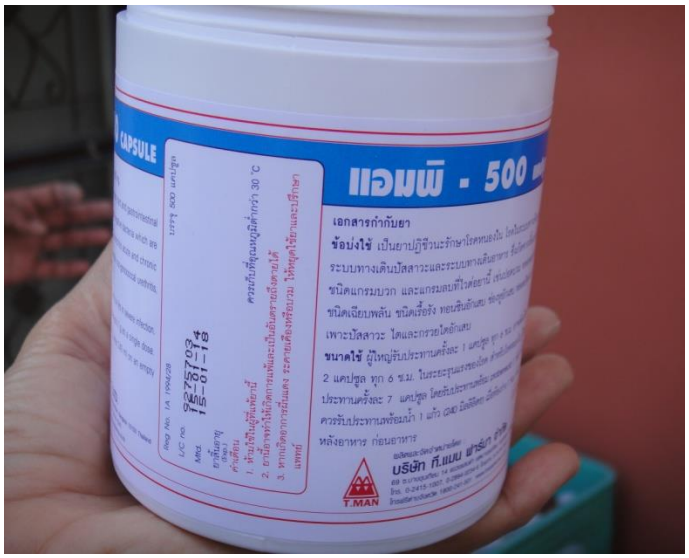
นำตาส้มจากตัวอย่างที่เก็บมาจากสวนเกษตรกรจำนวน 2 ตา และตาจากพันธุ์พืชทดสอบ (ใช้พันธุ์มาดาม ไวนัส) จำนวน 1 ตา ไปติดบนต้นกล้ารัฟเลมอน เปรียบเทียบกับต้นที่ใช้ตาจากต้นส้มปกติ ทำการเก็บรักษาในโรงเรือนกันแมลง ประมาณ 3 – 4 เดือน หากตัวอย่างส้มมีเชื้อโรคกรีนนิ่งติดมา ส่วนใบที่แตกใหม่ของพืชทดสอบ จะแสดงอาการเหลือง ในขณะที่จะไม่พบอาการดังกล่าวจากต้นที่ติดตาโดยใช้ส้มที่ไม่มีเชื้อโรคกรีนนิ่ง (ต้นปกติ)

ภาพที่ 3 สภาพต้นส้มที่ทรุดโทรมเนื่องจากโรคกรีนนิ่ง

ภาพที่ 4 ต้นส้มที่มีผลหลายรุ่น และได้รับการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 20,000 ppm อัตรา 800-1,000 มิลลิลิตร/ต้น

ภาพที่ 5 ผลส้มอายุประมาณ 2 เดือน

ภาพที่ 6 ผลส้มอายุประมาณ 4 เดือน



ภาพที่ 7 สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

ภาพที่ 8 การเตรียมสารปฏิชีวนะ

ภาพที่ 9 การฉีดสารปฏิชีวนะเข้าลำต้นส้ม

ภาพที่ 10 สภาพต้นส้มที่ฟื้นตัวหลังจากได้รับการฉีดสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน