การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

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

ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันติวานิช ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานก้าวหน้า

โรคฮวงลองบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร 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 การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยพืชอาศัย วีธี ELISA วิธี IF และวิธี PCR แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะทราบผลการตรวจสอบ อีกทั้งเชื้อต้องมีปริมาณมากจึงจะสามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ได้พัฒนามาจากวิธี PCR สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย หรือ แม้กระทั่งต้นส้มไม่แสดงอาการของโรค แต่ซึ่จากการการทดลอง พบว่าผลการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่และปรับสภาพอุณหภูมิ

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-01-54

คำนำ

โรคฮวงลองบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม เนื่องจากโรคนี้สามารถเข้าทำลายส้มทุกพื้นที่ที่มีการปลูกส้มทั่วโลก เช่น ประเทศในทวีปเอเชีย อนุทวีปอินเดีย แอฟริกา เอมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus* Liberibacter species ซึ่งมีแมลงเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นพาหะนำโรค (Bové, 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 วิธี 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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Real-time PCR
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
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

ระยะเวลา	ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556
สถานที่	กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สวนส้มของเกษตรกร จากจังหวัดต่างๆใน ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉลียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Ca.* Liberibacter species ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าไพรเมอร์จากลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของเชื้อ *Ca.* Liberibacter species มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Ca.* Liberibacter species จึงได้ทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca.* Liberibacter species ในช่วงนี้ พร้อมทั้งเตรียม

สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca.*Liberibacter species จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส้ม นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR และทดสอบความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งจากการทดลองพบว่าผล Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และปรับสภาพอุณหภูมิ เพื่อให้การตรวจสอบมีความชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการการใช้เทคนิค Real-time PCR นำมาตรวจสอบโรคฮวงลองบิง ซึ่งเชื้อสาเหตุคือ *Ca.* Liberibacter species โดยทำการออกแบบ probe และ primerให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca.* Liberibacter species และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR และทดสอบความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าผล Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่และปรับสภาพอุณหภูมิ ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบมีความชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

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

Bové, 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.