

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 ตันตวานิช ณีฎฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

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* เมื่อสัมผัสเชื้อ *Ca. Liberibacter* เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบต่างใบต่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนา และหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม เนื่องจากอาการของโรครมีความหลากหลาย และมีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงลองบิงจึงมีความสำคัญ เป็นการตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่ง เพื่อจะได้หาแนวทางป้องกันกำจัดไม่ให้แพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้น การทดลองนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค Real time PCR โดยดำเนินสังเคราะห์ probe และ primer 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* จากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Kit (Qiagen) ทำการทดสอบ probe ที่ได้สังเคราะห์ไว้ทั้ง 3probe ใช้ในการตรวจเชื้อ *Ca. Liberibacter species* อยู่ในระหว่างการทดสอบprobe ในการตรวจเชื้อ *Ca. Liberibacter specie*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-01-54

คำนำ

โรคฮวงหลงบิง (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 พบโรคฮวงหลงบิงเมื่อ พ.ศ. 2516 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สันนิษฐานว่าน่าจะถูกนำเข้ามาจากประเทศจีน โดยการลักลอบนำเข้าพันธุ์ส้มต่างๆ จากประเทศจีน (ไมตรี, 2548) เมื่อส้มถูกเชื้อ *Ca. Liberibacter* เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบต่าง ใบต่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนาและหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม (ไมตรี, 2548; Nakashima *et al.*, 1998; Ohutsu *et al.*, 1998; Bove, 2006; Li *et al.*, 2007) เนื่องจากอาการของโรคมืดความหลากหลาย และมีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงหลงบิง มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยพืชอาศัย วิธี ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) วิธี IF (Immunofluorescence test) และวิธี PCR (Polymerase chain reaction) แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาต้องใช้ระยะเวลาอันยาวนานกว่าจะทราบผลการตรวจสอบ 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 PCR เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species*

2. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species*

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

2. สกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบสับด้วย CTAB buffer

3. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้ข้อมูลในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา

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* จากตัวอย่างโรคหวงลองบิง ที่เก็บจากแปลงปลูก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคหวงลองบิงจำนวน 10 % จากตัวอย่างทั้งหมดในแปลงปลูก

7. การใช้วิธี Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคหวงลองบิง ในแปลงปลูก

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
สวนส้มของเกษตรกร จากจังหวัดต่างๆใน ภาคเหนือ ภาคกลาง
ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 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 ดำเนินการสังเคราะห์ probe และ primer ที่ออกแบบมาจาก 16S rDNA sequence -ของ *Ca. Liberibacter species* สาเหตุโรคหวงลองบิง (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* จากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคกรีนนิง โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Kit

(Qiagen) ทำการทดสอบ probe ที่ได้สังเคราะห์ไว้ทั้ง 3probe ใช้ในการตรวจเชื้อ *Ca. Liberibacter species* อยู่ในระหว่างการทดสอบprobe ในการตรวจเชื้อ *Ca. Liberibacter specie*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการการใช้เทคนิค Real-time PCR นำมาตรวจสอบโรคฮวงลองบิง ซึ่งเชื้อสาเหตุคือ *Ca. Liberibacter species* โดยทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca. Liberibacter species* และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR และทดสอบความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR อยู่ในระหว่างการดำเนินการทดสอบ

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* associated with citrus huanglongbing. *J. Microbiol. Methods.* 66: 104-115.
- Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “*Candidatus Liberibacter species*” associated 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.