การทดสอบอัตราที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะบางชนิดในการควบคุมโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าและกิ่งตอนส้ม

Optimal Rate of Some Antibiotics in Controlling Greening Disease in Seedlings and Citrus-Marcotting

แสนชัย คำหล้า กาญจนา วาระวิชะนี[1]

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ได้ต้นกล้าส้มจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ส้มจำนวน 35 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางต้นละละประมาณ 0.8- 1 มม. หรือ อายุประมาณ 10 เดือน เมื่อนำไปตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c แล้ว ไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่งทั้ง 35 ต้น จึงนำมาติดตาเชื้อโรคกรีนนิ่งหลังจาก 3 เดือน ตรวจด้วยเทคนิค PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส ทั้ง 35 ตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับทดสอบอัตราที่เหมาะของสารปฏิชีวนะสำหรับใช้ในการกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าหรือกิ่งพันธุ์ส้มในปี 2561

คำหลัก : กิ่งตอนส้ม, สารปฏิชีวนะ, โรคส้ม, โรคกรีนนิ่ง

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-02-00-03-60

คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (Greening disease) มีรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2472 โดย Oberholzer และคณะในประเทศแอฟริกาใต้ จากการศึกษาในระยะต่อมาพบว่าได้เคยมีรายงานการศึกษาโรคกรีนนิ่งในประเทศจีนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2462 โดย Reinking กล่าวว่าพบโรคนี้ครั้งแรกในเขตจังหวัด กวางสี 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, ต่อมาพบการระบาดในประเทศบราซิลและสหรัฐอเมริกาในปี 2004 และ 2005 ตามลำดับ แม้จะมีการศึกษาวิจัยจากทั่วโลกปัญหาโรคกรีนนิ่งก็ยังคงมีเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในปัจจุบัน จึงทำให้ผลผลิตส้มลดลง ขณะเดียวกันก็ทำให้ราคาส้มเพิ่มขึ้นอย่างมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคยังไม่สามารถเลี้ยงบนหาอาหารสังเคราะห์ได้เหมือนแบคทีเรียทั่วไป อาศัยอยู่เฉพาะในท่ออาหารพืช และยังมีแมลงพาหะคือเพลี้ยไก้แจ้ส้ม ทำให้แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้โรคกรีนนิ่งเป็นปัญหาที่ยังไม่ได้รับการแก้ไขหรือมีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพให้การป้องกันกำจัดโรคได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะทรีทต์ตาส้มก่อนนำไปติดบนต้นตอทำให้กิ่งที่แตกออกมาใหม่ปราศจากเชื้อโรคกรีนนิ่ง (Zhang et al.,2012) แต่สำหรับการฉีดสารปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และเตตร้าซัยคลิน เข้าลำต้นส้มที่ให้ผลผลิตแล้วโดยตรง ในระยะแรกต้นส้มจะมีอาการดีขึ้น แต่ในระต่อมาต้นส้มจะแสดงอาการโรคอีกหลังจากการเลิกใช้สารปฏิชีวนะ (Bovè et al., 1980, ไมตรี, 2516, Hong-Ji Su, 2002) ดังนั้นการนำสารปฏิชีวนะมาใช้กับต้นกล้าหรือกิ่งตอนส้มเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาหรือลดความรุนแรงของโรคกรีนนิ่งได้

วิธีการ

1.เตรียมต้นกล้าส้มปลอดโรค

เตรียมต้นกล้าส้มปลอดโรคโดยการเพาะเมล็ดพันธุ์ส้มประมาณ 10-12 เดือน และนำไปตรวจเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันว่าต้นกล้าที่ได้ปลอดจากเชื้อสาเหตุ แล้วจึงใช้เป็นต้นตอสำหรับนำมาติดตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งเป็นระยะเวลา 3 เดือน จึงนำไปทดสอบการทรีทต์ต้นกล้าส้มปลอดโรคด้วยสารปฏิชีวนะ

2.การตรวจสอบสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

นำตัวอย่างก้านใบส้มโอในข้อ 1 มาสกัดสารพันธุกรรมชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (GeneUp™ Plant DNA Kit) และนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยผสมส่วนประกอบปฏิกิริยา ดังนี้ Green master mix (promega®) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, OI (5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ OI2c (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (S. Jagoueix *et. al*,1994), น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7 ไมโครลิตร, ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งค่าต่างๆ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, จำนวน 1 รอบ จากนั้นตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที, จำนวน 30 รอบ, 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการ electropheressis ใน 1.0% Agarose gel

3. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักจาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

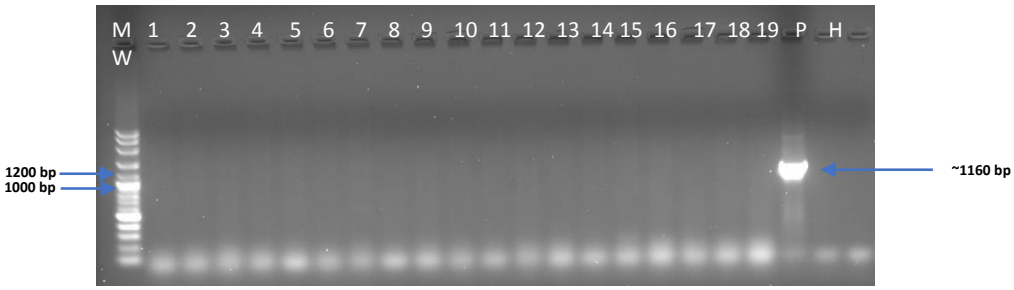
1.เตรียมต้นกล้าส้มปลอดโรค

ได้ต้นกล้าส้มปลอดโรคจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ส้มจำนวน 35 ต้น โดยแต่ละต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางละประมาณ 0.8- 1 มม. (อายุประมาณ 10 เดือน) **(ภาพที่ 1)** และนำไปตรวจด้วยเทคนิค PCR แล้วจึงนำไปใช้ในการทดสอบการทรีทต์ต้นกล้าส้มปลอดโรคด้วยสารปฏิชีวนะ ต่อไป

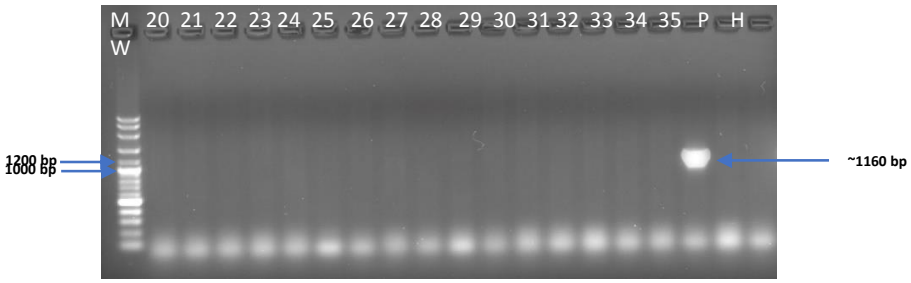
ภาพที่ 1 ต้นกล้าส้มปลอดโรคที่เพาะเมล็ดพันธุ์เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.8- 1 มม. หรือ อายุประมาณ 10 เดือน

2.การตรวจสอบสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

นำใบส้มทั้ง 35 ต้น มาตรวจหาเชื้อโรคกรีนนิ่ง ด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c ผลการตรวจ พบว่า ส้มที่ต้องการทดสอบทั้ง 35 ต้น ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส **(ภาพที่ 2 ก และ ข)** จึงสามารถใช้เป็นต้นตอสำหรับนำมาติดตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งได้ และหลังจากติดตาเป็นระยะเวลา 3 เดือน นำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR ครั้งเพื่อยืนยันว่าต้นกล้าส้มทั้ง 35 ได้รับเชื้อโรคกรีนนิ่งจากวิธีการติดตา แล้วจึงนำไปทดสอบการทรีทต์ต้นกล้าส้มปลอดโรคด้วยสารปฏิชีวนะ ปี 2561 ต่อไป



ภาพที่ 2 ก แสดงผลการตรวจต้นกล้าส้มที่ 1-19 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส



ภาพที่ 2 ข แสดงผลการตรวจต้นกล้าส้มที่ 20-35 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส

ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้ต้นกล้าส้มปลอดโรคจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ส้มจำนวน 35 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางต้นละละประมาณ 0.8- 1 มม. หรือ อายุประมาณ 10 เดือน เมื่อนำไปตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c แล้ว ไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่งทั้ง 35 ต้น จึงนำมาติดตาเชื้อโรคกรีนนิ่งหลังจาก 3 เดือน ตรวจด้วยเทคนิค PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส ทั้ง 35 ตัวอย่าง ซึ่งไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c มีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เพื่อหาเชื้อโรคกรีนนิ่งจะตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1160 เบส ซึ่งจะไม่พบในแถบดีเอ็นเอนี้ในพืชปกติ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สรุปผลปี 2560 ได้ต้นกล้าส้มปลอดโรคจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ส้มจำนวน 35 ต้น ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่ง เมื่อติดตาเชื้อโรคกรีนนิ่งแล้ว 3 เดือน ตรวจด้วยเทคนิค PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1160 เบส ทั้ง 35 ต้น ทั้งนี้ ในปี 2561 จะนำต้นกล้าที่ได้ทั้ง 35 ต้นไปทดสอบการทรีทต์สารปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ แอมพิซิลิน (Ampicillin) และเตตร้าซัยคลิน (Tetracycline) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 3 ระดับ (500 , 1,500, 10,000 ppm) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) รวม 7 ทรีทต์เมนต์ ๆ ละ 5 ซ้ำ เพื่อให้ทราบอัตราที่เหมาะของสารปฏิชีวนะสำหรับใช้ในการกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าหรือกิ่งพันธุ์ส้มได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์.2548.เอกสารวิชาการ โรคทรุดโทรมของส้มและแนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย.กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพหมานคร 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.

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.