195617

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล 2550: ชีววิทยาและการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โฆสิตรัตน, Ph.D. 136 หน้า

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญพบระบาดทำความเสียหายอย่างกว้างขวางในแหล่งปลูกส้มในประเทศไทย จากการศึกษาลักษณะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 113 สายพันธุ์ พบว่า เป็นแกรมลบ มีหางเดียวที่ส่วนปลาย ใช้ออกซิเจน รูปร่างท่อนตรง ขนาด 0.5x1.7 µm สามารถย่อยแป้ง เจลาติน เคซีน และทวีน80 สร้างเอ็นไซม์ lecithinase สาร acetoin และก๊าซไข่เน่า ไม่รีดิวซ์ไนเทรต ไม่ใช้ arginine และ gluconate ไม่สร้างเอ็นไซม์ urease เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 36°C และที่ความเข้มข้นของ NaCl 3% 5% และ 7% สามารถใช้น้ำตาล arabinose esculin xylose fructose galactose mannose maltose lactose trehalose sucrose glycerol mannitol glycogen dextrin malonate citrate succinate และ ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-methyl D-glucoside raffinose inositol inulin dulcitol gluconate oxalate acetate และ tartrate มีความผันแปรในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ rhamnose salicin และ sorbitol เชื้อทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์บนพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน เลมอน เกรฟฟรุ๊ต และส้มโอ

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ของประเทศไทย ด้วยเทคนิค rep PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX และ ERIC พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อกลุ่ม canker A ยกเว้นเชื้อ 4 สายพันธุ์ที่มาจากส้มโอ จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปี พ.ศ.2547 ที่แตกต่างออกจากกลุ่ม

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ D1 (GGCCTTGA TCAAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ออกแบบจากยีน*pthA* และวิธี one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/pth3R (GGTGAGGGGGCAGGG GGAGA) และD3 (GGTGT GGTGCCTCGATAGAT)/D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT) ซึ่งออกแบบจากยีน*pthA* เช่นกันพบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาเชื้อได้ โดยให้ความไวในการตรวจของดีเอ็นเอของเชื้อที่ 25 และ 0.5 pg/ปฏิกิริยา ตามลำดับและ เซลล์แขวนลอยที่ $8.1x10^2$ และ 9.4 CFU/ปฏิกิริยา ตามลำดับ จากการนำวิธี immunomagnetic separation มาใช้ร่วมกับวิธี one tube nested PCR (IMS-nested PCR) ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้มพบว่า มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ 5.8 เซลล์/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี nested PCR 10 เท่า และจากการนำวิธี IMS-nested PCR ไปทดสอบในการตรวจหาเชื้อจาก 50 ตัวอย่างของพืชตระกูลส้มในแปลงปลูกพบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่นๆ สามารถตรวจหาเชื้อได้ทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ โดยตรวจพบเชื้อถึง 44 ตัวอย่าง (88%) ในขณะที่วิธี nested PCR และ PCR ตรวจได้ 38 ตัวอย่าง (76%) และ 15 ตัวอย่าง (30%) ตามลำดับ

195617

Nuttima Kositcharoenkul 2007: Biology and Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Causing Citrus Canker Disease in Thailand. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program.
Thesis Advisor: Assistant Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 136 pages.

Citrus canker disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri,* is serious diseases of *Citrus* spp. in worldwide including Thailand. Biochemical and physiological characteristic studies of 113 strains of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand isolated strains were performed. *X. axonopodis* pv. *citri* is a rod shaped with 0.5x1.7μm in size, Gram-negative aerobic bacterium, single polar flagellum, utilization of starch, gelatin, casein, tween 80 and esculin hydrolysis positive, lecithinase and hydrogen sulfide production, nitrates not reduced, arginine and gluconate utilization negative, urease negative, growth at 36°C and tolerance NaCl 3% 5% and 7%. They can utilized of arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose maltose, lactose, trehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, malonate, citrate, and succinate but can not utilized L-methyl D-glucoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, oxalate, and acetate. They were varied on the utilization of rhamnose, sorbitol, and salicin. All strains produced typical erumpent bacterial canker lesions on Mexican lime, sweet orange, grapefruit, lemon and pomelo.

The rep PCR with BOX and ERIC primers was used for characterization of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand . The result showed that most of bacterial strains of *X. axonopodis* pv. *citri* from Thailand were grouped with canker A group. However, four strains of *X. axonopodis* pv. *citri* isolated from pomelo at Kanchanaburi province in 2004 were different.

The detection of *X. axonopodis* pv. *citri* was successfully done by using PCR with primers D1(GGCCTTGATCAAAAGAACCA)/D2 (TTGAAGTAGGGGACG GTTTA) and one tube nested PCR with primer Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/ pth3R (GGTGAGGGGGCAGGGGG AGA) and D3(GGTGT GGTGCCTCGATAGAT)/ D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT). All primers were designed from *pthA* gene. The sensitivity of detection by PCR and one tube nested PCR were at the minimum DNA concentration of 25 and 0.5 pg/reaction respectively and the lowest concentration of cell suspension at $8.1x10^2$and 9.4 CFU/reaction respectively. An immunomagnetic separation and nested PCR method (IMS-nested PCR) were developed for detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in the field sample. The results showed that IMS-nested PCR assay had high specificity for *X. axonopodis* pv. *citri*. The sensitivity for detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in plant extract was 5.8 cells/reaction and 10-fold more sensitive than the nested PCR. With 50 samples of naturally infected material, The IMS-nested PCR achieved better results than other PCR techniques. The IMS-nested PCR can detect *X. axonopodis* pv. *citri* in symptomatic and asymptomatic samples and showed positive results in 44 samples (88%), whereas nested PCR and PCR and showed positive results in 38 samples (76%) and 15 samples (30%), respectively.