189291

การศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิง (HLB) ของส้มในพื้นที่ปลูก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ พบอาการของโรคแสดงเริ่มแรกที่ใบยอด ใบมีสีเหลืองซีด เส้นกลางใบและเส้นแขนงมีสีเขียวและบางอาการที่พบคล้ายกับการขาดธาตุสังกะสี เมื่อศึกษาทาง ultrastructure ของใบส้มที่เป็นโรคและเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบเชื้อ fastidious bacteria สาเหตุโรคมีลักษณะกลม รี ภายในบริเวณเซลล์ท่ออาหารและเซลล์ข้างเคียงจากใบที่เป็นโรค แต่ไม่พบในใบส้มปกติ เมื่อตรวจสอบโรคโดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) จากการใช้คู่ไพรเมอร์ OI1/OI2c และ A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1160 bp และ 703 bp จากใบส้มที่เป็นโรค แต่ไม่พบในใบปกติ การทดลองเก็บรักษาใบส้มที่เป็นโรคไว้ใช้แยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุ พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาโดยทำให้แห้งด้วย silica gel สามารถเก็บได้นานกว่า 1 ปี ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน และการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บได้เพียง 20 วันเท่านั้น สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรค HLB โดยปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชที่เป็นโรค ทั้งหมด 5 วิธี แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่าวิธีที่ 3 (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.*, 1999) และวิธีที่ 4 (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al.*, 1983) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจสอบโรค HLB ในขั้นตอนการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุที่พบ ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์ A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp ในทุกตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค และจากการหาลำดับเบสบริเวณ ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุที่ได้จากเชียงใหม่ (HLB-CM) เชียงราย (HLB-CR) และแพร่ (HLB-P) ผลที่ได้พบว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค HLB คือเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus

The study on Huanglongbing (HLB) symptoms of citrus disease in 3 located in citrus orchard, Chiang Mai, Chiang Rai, and Phrae provinces, showed the first symptom begins in one part of the canopy. Leaves were pale yellowing while main vein and veins were green. There was sometime the symptom that resembles zinc deficiency. Studying the ultrastructure of citrus leaf disease and the pathogen under transmission electron microscope (TEM) revealed that fastidious bacteria was round and ellipse formed in the phloem cells or in adjacent phloem cells of diseased leaf but no pathogenic body in healthy leaf. Detection of HLB disease by using PCR (polymerase chain reaction) technique with specific primer OI1/CI2c and A2/J5 produced specific band of 1160 bp and 703 bp, respectively. There were amplified from diseased leaf whereas none of product from healthy citrus plant. The methods for preservation of diseased leaf for DNA extraction were tested. Tissues stored at – 80 °C and dried in silica gel were able to keep for more than 1 year while stored at 4 °C and room temperature were kept for only 3 months and 20 days, respectively. For improve the method of detection HLB disease by developing 5 methods for pathogen DNA extraction from diseased leaves and then by PCR; protocol 3 (modified from method of Hung *et al.*, 1999) and protocol 4 (modified from method of Dellaporta *et al.*, 1983) were most efficiency. In order to identify the pathogen by using primer A2/J5, a unique 703 bp band was observed from all infected plants. The sequencing analysis of the bacteria ribosomal protein gene of samples from Chiang Mai (HLB-CM), Chiang Rai (HLB-CR) and Phrae (HLB-P) were characterized. From these results, it can be summarised that the causal agent of citrus HLB disease is *Candidatus* Liberobacter asiaticus.