

มณฑิกานธิ์ สงบจิต 2550: การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชติดา เล็กสมบูรณ์, วท.ค. 79 หน้า

การใช้ PCR ในตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) สาเหตุโรค แคงเกอร์ส้มโอ และ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนึ่งส้มโอเมื่อใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 (5'-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3')/(5'-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3') และไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 (5'-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3')/(5'-CAAGTTGCCTCGG-AGCTATC-3') ตรวจสอบดีเอ็นเอเชื้อ Xac พันธุ์ Xci33 (สายพันธุ์จากส้มโอ) Xci12 (สายพันธุ์จาก มะนาว) Xci21 (สายพันธุ์จากส้มสายน้ำผึ้ง) และ Xci42 (สายพันธุ์จากมะกรูด) พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 197 bp จากทั้ง 4 สายพันธุ์ ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 สามารถตรวจเชื้อ Xac สายพันธุ์ Xci33 เมื่อผสมกับดีเอ็นเอพืช ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเชื้อเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม /ไมโครลิตร เมื่อใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และ ไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 ตรวจเชื้อในใบส้มโอ พบว่าสามารถ ตรวจเชื้อที่ระยะเวลา 5 และ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $10^6 - 10^8$ cfu/ml ใน ห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง ตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะที่ใบเริ่มแสดงอาการเกิดจุดดำน้ำบริเวณ ที่ทำการปลูกเชื้อ

การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus L. asiaticus* ด้วย PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ribosomal protein gene โดยใช้ไพรเมอร์ A2/J5 (5'-TATAAAGGTTGACCT TTCGAGTTT-3')/(5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายในส้มโอ 2 พันธุ์ คือ ทองดี และขาวน้ำผึ้ง และพบใน ส้มโชกุน และส้มซ่า ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่าพบโรครินนึ่ง ระบาดในสวนส้มโอ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม

Monthikarn Sa-ngopchit 2007: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Pummelo using the Polymerase Chain Reaction. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Chalida Leksomboon, Ph.D. 79 pages.

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac) causing pummelo canker and *Candidatus* Liberibacter asiaticus causing pummelo greening disease. Primers J-pth1/J-pth2 (5'-CTTCAACTCAA CGCCGGAC-3')/ (5'-CATCGCGCTGTTCCGGAG-3') and J-RXg/J-RXc2 (5'-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3') / (5'-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3') were used to amplify target sequences in DNAs extracted of Xac strain Xci33 (pummelo strain), Xci12 (lime strain), Xci21 (tangerine orange strain), and Xci42 (leech lime strain). The expected 197 bp amplification product was produced with DNAs of the 4 strains. The primer J-pth1/J-pth2 could detect Xac strain Xci33 from amended DNA of pummelo leaf at the minimum level of 0.1 ng of Xci33 DNA. The primers J-pth1/J-pth2 and J-RXg/J-RXc2 were used for detection of artificially inoculated leaf at a level of 10^6 - 10^8 cfu/ml of test sensitivity threshold. The results obtained were positive in samples with symptom first appear on the leaf surface as pin-point oily spots at 5 and 14 day after inoculation in laboratory (detached leaf) and field, respectively.

Detection of *Candidatus* L. asiaticus was done by PCR base on amplification of the ribosomal protein gene of the pathogen using primer A2/J5 (5'-TATAAAGGTTGACCTTT CGAGTTT-3') / (5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'). An amplified product of the expected size was observed from two pummelo cultivars (Thong dee and Kao nam peung) Som Chokun, and Som Sha. This result confirmed the presence of greening disease in a pummelo orchard located in Amphur Nakhon Chaisi, Nakhon Pathom province.