วิทยานิพนธ์

การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction

DETECTION OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) AND *Candidatus* Liberibacter asiaticus IN PUMMELO USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION

นางสาวมณฑิกานธิ์ สงบจิต

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction

Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Pummelo using the Polymerase Chain Reaction

นามผู้วิจัย นางสาวมณฑิกานธิ์ สงบจิต

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ด.)

กรรมการ .....

(อาจารย์ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, Dr.sc.agr.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์กวิศร์ วานิชกุล, Dr.agr.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction

Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Pummelo using the Polymerase Chain Reaction

โดย

นางสาวมณฑิกานธิ์ สงบจิต

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2550

มณฑิกานธิ์ สงบจิต 2550: การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ด. 79 หน้า

การใช้ PCR ในตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโอเมื่อใช้ไพรเมอร์ 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 (สายพันธุ์จากมะนาว) Xci21(สายพันธุ์จากส้มสายน้ำผึ้ง) และ Xci42 (สายพันธุ์จากมะกรูด) พบแถบดีเอ็นเอขนาด 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 พบว่าสามารถตรวจเชื้อที่ระยะเวลา 5 และ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^6 - 10^8 cfu/ml ในห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง ตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะที่ใบเริ่มแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อ

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 ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่าพบโรคกรีนนิ่งระบาดในสวนส้มโอ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

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′-CTTCAACTCAAA CGCCGGAC-3′)/ (5′-CATCGCGCTGTTCGGGAG-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 Ampher Nakhon Chaisi, Nakhon Pathom province.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์ ประธานกรรมการ ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล กรรมการสาขาวิชาเอก รองศาสตราจารย์กวิศร์ วานิชกุล กรรมการวิชารอง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษา ตลอดการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืชที่ได้อบรมสั่งสอนประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือให้ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ และทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ 2549

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อังสนา อัครพิศาล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเจ้าของสวนส้ม ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวรัญญา อริยสุระ และนายรักพงษ์ วานิชเสถียร ในการช่วยเหลือและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อนพี่และน้องทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดช่วงระยะการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้องที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

งานวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ ได้รับงบประมาณจากโครงการวิจัย การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุ โรคพืชของส้มโอ ทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2547-2548

มณฑิกานธิ์ สงบจิต

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	35
ผล	35
วิจารณ์	50
สรุป	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ด้วย Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ A2/J5 จากตัวอย่างส้มโอพันธุ์ทองดีขาวน้ำผึ้ง และส้มชนิดอื่น ได้แก่ ส้มซ่า ส้มเช้ง และส้มโชกุน จากสวนส้มโอ ในเขต อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม 45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แถบดีเอ็นเอจากการตรวจด้วย PCR ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์Xci33 (ส้มโอ), Xci12(มะนาว), Xci42(มะกรูด), Xci21(ส้มสายน้ำผึ้ง) และ XCV1-2 (มะเขือเทศ) โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis	36
2	การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ปริมาณ ต่างๆ โดยเจือจางด้วย TE buffer ในระดับความเข้มข้นที่ลดลงทีละ 1 เท่าตัวเป็นลำดับจาก 18.19 นาโนกรัม จนถึงระดับต่ำสุด 0.62 พิคโคกรัม โดยใช้ไพรเมอร์ J- pth1/ J-pth2 ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis	37
3	การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ปริมาณ 90.95, 2, 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 นาโนกรัม ผสมกับดีเอ็นเอของพืช โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2	38
4	การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการเข้าทำลายส้มโอในสภาพห้องปฏิบัติการด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และไพรเมอร์ J-RXg/J-RXc2 ที่ปริมาณเชื้อต่างกัน (10^6-10^8 cfu/ml) หลังการปลูกเชื้อบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเป็น เวลา 5 วัน ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis	39
5	การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการเข้าทำลายส้มโอในสภาพห้องปฏิบัติการด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 หลังการปลูกเชื้อที่ปริมาณต่างกัน (10^6-10^8 cfu/ml) และใช้น้ำหนักใบพืชในการตรวจ 0.2 และ 0.3 กรัม ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis	39
6	อาการของโรคแคงเกอร์หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำ detached leaf และปลูกเชื้อโดยวิธีการทำแผลด้วยเข็มฉีดยา	40
7	ลักษณะอาการของแผลบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง หลังปลูกเชื้อ 10 วัน ที่ระดับความ เข้มข้นของเชื้อ 10^8cfu/ml ด้วยวิธีฉีดพ่น ในสภาพแปลงทดลอง	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

8 การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เข้าทำลายพืชในแปลงทดลอง ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 cfu/ml หลังการปลูกเชื้อที่เวลาต่างกัน คือ 10 12 14 และ 17 วัน ตรวจผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis 42

9 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *pth* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv.*citri* สายพันธุ์ Xci33 ระหว่าง *Xanthomonas citri* PthA (pthA), *Xanthomonas citri* apl3 gene, *Xanthomonas citri* apl2 gene และ *Xanthomonas citri* apl1 gene กับที่มีรายงานไว้ใน GenBank 43

10 ลักษณะใบของส้มโอ ที่เก็บจากสวนเกษตรกร อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม มีสีของแผ่นใบไม่สม่ำเสมอ คล้ายกับอาการขาดธาตุสังกะสี 44

11 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง จากตัวอย่างส้ม ของสวนใน จ. นครปฐม ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A2/J5 ตรวจผลด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis 46

12 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งจากสวนส้มโอใน อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม กับที่มีรายงานไว้ใน GenBank 49

การตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ในส้มโอด้วย Polymerase Chain Reaction

Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Pummelo using the Polymerase Chain Reaction

คำนำ

ส้มโอ เป็นไม้ผล จัดอยู่ในวงศ์ (family) Rutaceae ชื่อสามัญ pummelo หรือชื่อสามัญอื่นว่า pompelmoes shaddock และ forbiddenfruit ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus maxima* (Burm) Merr. บางทีก็เรียก *Citrus grandis* (L.) Osbeck ส้มโอเป็นไม้ผลที่กำลังได้รับความสนใจจากผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักในอเมริกา และ ฟิลิปปินส์ในชื่อ Bangkok pummelo มาเลเซียในชื่อ Siamese pummelo (ไพโรจน์, 2546) เพราะส้มโอของประเทศไทยมีลักษณะรสชาติดีกว่าส้มโอของประเทศผู้ส่งออกรายอื่นประทับใจผู้บริโภคชาวต่างประเทศทั่วโลก รัฐบาลจึงมีนโยบายสนับสนุนและขยายพื้นที่ปลูกส้มโอเพิ่มขึ้น โดยได้บรรจุไว้เป็นพืชหนึ่งในแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติเพื่อสนองการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก (จุฑามาศ, 2547) อีกทั้งส้มโอมีลักษณะที่ดีคือ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สามารถเก็บไว้ได้นาน เปลือกหนา ทนทานต่อการขนส่ง คุณภาพของส้มไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อถึงปลายทาง จึงมีแนวโน้มการส่งออกสูงขึ้นในปี 2542-2543 แต่ปัญหาโรคและแมลงมีผลกระทบต่อการส่งออกจึงทำให้ยอดการส่งออกลดลงในปี 2547 ปริมาณการส่งออก 7,313 ตัน มูลค่า 102.039 ล้านบาท ในปี 2548 ปริมาณการส่งออก 6,593 ตัน มูลค่า 99.673 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

จากการสำรวจสวนส้มโอของเกษตรกรพบโรคที่เป็นปัญหาหลักมี 2 โรค คือ โรคแคงเกอร์ และโรคกรีนนิ่ง ซึ่งมีผลต่อการผลิตส้มโอ และเป็นข้อจำกัดในการส่งออกส้มโอของประเทศไทย

โรคแคงเกอร์ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) (Vauterin *et al*., 1995) ขณะนี้พบการระบาดอยู่ในประเทศต่างๆ มากกว่า 30 ประเทศ ทั้งในทวีปเอเชีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรอินเดีย อเมริกาใต้ และประเทศสหรัฐอเมริกา โรคนี้จัดเป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งที่มีผลต่อการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะในยุโรป ขณะนี้

กรมวิชาการเกษตร โดยกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชได้เร่งรัดพัฒนาระบบการตรวจสอบรับรองสวนส้มโอปลอดโรคแคงเกอร์ ที่ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย เพื่อให้สามารถส่งออกผลส้มโอโดยเฉพาะพันธุ์ทองดี ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดยุโรป

โรคกรีนนิ่ง หรือโรคใบเหลืองต้นโทรม เกิดจากเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus กำลังสร้างปัญหาและความเสียหายให้กับหลายๆประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่อยู่ในแถบทวีปเอเชียมากถึง 16 ประเทศด้วยกัน เช่น จีน ไต้หวัน พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย เนปาล ศรีลังกา บังคลาเทศ ปากีสถาน ซาอุดีอาระเบีย และรวมถึงประเทศไทยด้วย โรคกรีนนิ่งเป็นโรคที่มีการแสดงอาการของโรคค่อนข้างช้า เมื่อแสดงอาการจะทำให้ต้นทรุดโทรม อายุการให้ผลผลิตสั้นไม่คุ้มกับการลงทุน ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และยังไม่มีวิธีที่ดีในการรักษา อีกทั้งโรคกรีนนิ่งมีลักษณะอาการของโรคเหมือนหรือคล้ายคลึงมากกับโรคใบแก้วหรืออาการใบแก้วของส้ม ซึ่งเกิดเนื่องจากการขาดธาตุสังกะสี จนแยกความแตกต่างได้ยากหรือไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ การวินิจฉัยจึงไม่สามารถอาศัยการสังเกตจากอาการของโรคเพียงประการเดียว จึงต้องอาศัยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพช่วยในการวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วเพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อ

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ (สุรินทร์, 2545) PCR นี้นำมาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้หลายชนิด และยังมีการออกแบบไพรเมอร์ สามารถใช้สำหรับจำแนกและตรวจสอบเชื้อสาเหตุที่เกิดจากแบคทีเรีย (Schaad *et al*., 2001) และใช้สำหรับการตรวจสอบเพื่อกักกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในพืชหลายๆชนิด ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความรวดเร็วแม่นยำสูงในการตรวจและวินิจฉัยโรค ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำ PCR มาใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์และกรีนนิ่ง เพื่อได้วิธีที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการตรวจเชื้อก่อนการทำให้พืชแสดงอาการของโรคขยายลุกลาม ซึ่งจะช่วยให้ป้องกันการแพร่กระจายของโรคได้ ช่วยลดความเสี่ยงในการนำต้นที่เป็นโรคมาใช้ขยายพันธุ์ และเพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดการโรค ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารควบคุมโรค ช่วยลดค่าใช้จ่ายและปัญหาสารเคมีตกค้างในธรรมชาติจากการใช้สารเคมีมากเกินไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) สาเหตุของโรคแคงเกอร์ส้มโอและ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ส้มโอในเขตจังหวัดนครปฐม ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)

2 . เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Hasse ในการเข้าทำลายส้มโอ

การตรวจเอกสาร

ส้มโอมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ทางหมู่เกาะมาลายู และหมู่เกาะ โปลินีเซีย ต่อมาได้ขยายไปตามแหล่งต่างๆ ตามแถบมาลายู หมู่เกาะอินเดียตะวันตก จีนตอนใต้ ญี่ปุ่นตอนใต้ ฟิลิปปินส์ เปอร์เซีย อินโดนีเซีย ชวา ปาเลสไตน์ และสหรัฐอเมริกา (ปัญญา, 2541) สำหรับประเทศไทยนั้นสันนิษฐานว่าส้มโอเข้ามาพร้อมกับการเข้ามาของพ่อค้าจีนจากฝั่งทะเลจีนใต้ และน่าจะมาทางเรือลงไปแพร่พันธุ์ทางใต้แถบอาณาจักรศรีวิชัย (รวมภาคใต้ของไทยและมลายู) จากนั้นจึงมาแพร่พันธุ์ทางภาคกลางแถบลุ่มน้ำเจ้าพระยาในพุทธศตวรรษที่ 17 จนโด่งดังไปทั่วโลกในทุกวันนี้

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ส้มโอจัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีทรงต้นสูงประมาณ 6-10 เมตร ถ้าปลูกในที่เหมาะสมและมีอายุมาก อาจสูงถึง 15 เมตร (จุฑามาศ, 2547) ส้มกิ่งตอนส่วนมากจะสูง 5-8 เมตร (ไพโรจน์, 2545) ทรงต้นโปร่ง ลำต้นใหญ่กิ่งใหญ่ กิ่งก้านสาขาที่แตกจะห้อยลงเป็นทรงพุ่มสวยงาม บางครั้งมีหนามตามลำต้น ยิ่งถ้าปลูกด้วยเมล็ดจะมีหนามแข็งยาว 1-5 เซนติเมตร

ใบ ส้มโอมีใบเป็นรูปไข่ หรือรูปโล่ ยาว 4-5 นิ้ว กว้าง 2-12 เซนติเมตร แบ่งออกเป็น 2 ตอน ตอนแรกเรียกตัวใบ ตอนก้านใบเรียกหูใบ (จุฑามาศ, 2547) ลักษณะของปลายใบกลม หรือแหลมป้านบริเวณปลายสุดของใบจะเป็นรอยเว้าเล็กน้อย ส่วนของฐานใบมน จัดเป็นใบขนาดใหญ่ ก้านใบประกอบด้วยปีกขนาดใหญ่ รูปทรงคล้ายรูปหัวใจกลับ หรือรูปไข่หัวกลับค่อนข้างยาว สีของใบด้านบนเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างเป็นสีเขียวอ่อนมีขนอ่อนปกคลุม เส้นใบนูนเด่นชัด (บรรณ, 2541)

ดอก ส้มโอออกดอกตรงปลายกิ่ง เกิดบริเวณซอกใบ ลักษณะเป็นช่อ จัดเป็นชนิดดอกเดี่ยว แต่ละช่อมีจำนวน 2-10 ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกค่อนข้างใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-7 เซนติเมตร ส่วนประกอบของดอกมีชั้นกลีบเลี้ยงอยู่นอกสุดจำนวน 4-5 กลีบ ในลักษณะเชื่อมติดกัน ถัดเข้าไปเป็นชั้นของกลีบดอกมีจำนวน 4-5 กลีบ (จุฑามาศ, 2547) กลีบเลี้ยงสั้นสีเขียวกลีบดอกยาว 3-3.5 เซนติเมตร สีขาวครีม (ไพโรจน์, 2545) ต่อเข้าไปเป็นชั้นเกสรตัวผู้ประมาณ 20-25 อัน และชั้นในสุดเป็นเกสรตัวเมีย เป็นที่อยู่ของรังไข่ซึ่งมี 11-16 ช่อง เมื่อดอกบานมีกลิ่นหอม ในฤดูที่ออกดอกมากที่สุดอยู่ในระหว่างกลางเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์

(ภาคกลาง) และอีกครั้งหนึ่งระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน ระยะจากผลิดอกถึงดอกบาน ใช้เวลา 25-30 วัน และจากดอกบานถึงผลแก่ราว 180-210 วัน

ผล มีขนาดปานกลางถึงใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-18 เซนติเมตร สูง 14-18 เซนติเมตร ทรงผลมีหลายแบบ เช่น กลมมน กลมแป้น กลมสูงมีจุกคล้ายผลสาลี่ สีผลขณะที่ยังอ่อน มีสีเขียว มีขนละเอียด พอแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง และเป็นสีทอง มีต่อมน้ำมันตามผิว เปลือกหนา 2-2.5 เซนติเมตร สีเปลือกด้านในเป็นสีขาวหรือสีชมพูตามชนิดของพันธุ์ เนื้อมีลักษณะเป็นเส้นอวบยาวรัดรวมตัวกันอยู่เรียกว่า กุ้ง (จุฑามาศ, 2547) เนื้อผลมีสีเหลืองอ่อนอมเขียวหรือชมพู (บรรณ, 2541) ภายในประกอบ ด้วยน้ำมีรสหวานอมเปรี้ยว หรือเปรี้ยว ภายในผลแบ่งออกเป็นช่องหรือกลีบ 12-14 กลีบ ตรงกลางมีแกนแข็งแต่บางผลไม่มี เป็นโพรงกลวงกลางผล ปริมาณผลในต้นหนึ่งๆ มีตั้งแต่ 40-50 ผลต่อต้น

เมล็ด ค่อนข้างใหญ่ แบน เปลือกย่น ร่องเมล็ดลึก มีสีขาวอมเหลือง อยู่รวมกันตรงกลางผลรอบๆ แกน บางผลไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ หนึ่งเมล็ดสามารถเพาะได้เป็นกล้าเพียงต้นเดียวเท่านั้น (จุฑามาศ, 2547) จำนวนเมล็ดในแต่ละผลจะแตกต่างตามพันธุ์และตามฤดูที่ดอกบาน (ไพโรจน์, 2545)

2. การแบ่งส้มโอตามแหล่งปลูก สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่

2.1 กลุ่มไทย (Thailand group) มีแหล่งปลูกสำคัญในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร ชัยนาท พิจิตร ปราจีนบุรี ตราด ชุมพร และสงขลา ได้แก่ พันธุ์ขาวแป้น ขาวพวง ขาวหอม ขาวทองดี ขาวจีบ ทับทิม ขาวใหญ่ ขาวพ้อม ขาวแก้ว ขาวน้ำผึ้ง ขาวแตงกวา บางขุนนนท์ มรกต แดงทับทิมกรุ่น น้ำตาลทราย หอมใบเตย ท่าข่อย ปัตตาเวีย หอมหาดใหญ่ สายน้ำผึ้ง และเจ้าเสวย (พายัพ, 2544) พันธุ์เหล่านี้มีสีเนื้อแตกต่างกันออกไป

2.1.1 สามารถจัดกลุ่มตาม ลักษณะของสีเนื้อ (color of flesh) ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

ก. สีครีมอ่อน เช่น พันธุ์ขาวพวง ขุนนนท์ ขาวจีบ ขาวใหญ่
ข. สีครีมแก่ เช่น พันธุ์ขาวแป้น ขาวหอม
ค. สีชมพูแก่ เช่น พันธุ์แดงทับทิม
ง. สีชมพูอ่อน เช่น พันธุ์ขาวทองดี มรกต (จุฑามาศ, 2547)

2.1.2 สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะของทรงผลส้มโอ ที่เห็นชัดเจน ได้เป็น 2 กลุ่ม

ก. กลุ่มไม่มีจุก ผลทรงกลมแบน หรือเกือบกลม ได้แก่ พันธุ์ขาวทองดี ขาวแป้น ขาวหอม (ท่าข่อย) ขาวใหญ่ ปัตตาเวีย ฯลฯ

ข. กลุ่มมีจุกผลทรงสูง ได้แก่พันธุ์ขาวพวง ขาวจีบ ฯลฯ (ปัญญา, 2541)

2.2 กลุ่มจีน (Chinese group) เป็นกลุ่มของส้มโอที่ปลูกในแถบจีนตอนใต้ กวางสี กวางตุ้ง ฟูเกี้ยน ไต้หวัน และแหล่งปลูกใหญ่ของญี่ปุ่น ได้แก่พันธุ์ Sha Tin, Yau Song, Ma Yau, Mato Butan, Shanyuan

2.3 กลุ่มอินโดนีเซีย (Indonesian group) ส้มโอกลุ่มนี้จะรวมถึงส้มโอที่ปลูกในมาเลเซีย และอินเดีย ได้แก่ พันธุ์ Pandan Wangi Pedan Bener, Seeloompang, Bali Merah, Deleema Merch, Deleema Kopjor, Banpeiyu

แหล่งปลูกส้มโอที่สำคัญของประเทศไทยในเขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร ปราจีนบุรี ตราด สมุทรสงคราม นครนายก และ ชัยนาท ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ อุทัยธานี น่าน และลำปาง ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตรัง ชุมพร สงขลา ระนอง และปัตตานี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ อุบลราชธานี เลย หนองคาย และนครพนม (พายัพ, 2544)

3. การแบ่งส้มโอตามพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า สามารถแบ่งได้ดังนี้ คือ

3.1 พันธุ์การค้าหลัก มี 6 พันธุ์ คือ ขาวพวง ขาวแป้น ขาวทองดี บางขุนนนท์ ขาวใหญ่ และขาวหอม

3.2 พันธุ์การค้าเฉพาะแห่ง มี 6 พันธุ์ ได้แก่ ปัตตาเวีย ขาวแตงกวา ขาวแก้ว กรุ่น ท่าข่อย และ ขาวน้ำผึ้ง แต่พันธุ์ที่ปลูกกันอย่างแพร่หลาย และเป็นที่ต้องการของตลาดมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ ขาวพวง ขาวทองดี และขาวแป้น

ก. พันธุ์ขาวพวง ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลม ทรงสูงเล็กน้อย มีจุกสูง มีกีบที่จุก ด้านก้นผลเว้าเล็กน้อย ผิวเรียบ มีสีเขียวอมเหลือง ต่อมน้ำมันที่ผิวเปลือกค่อนข้างใหญ่ อยู่ห่างกันพอสมควร เปลือกหนาปานกลาง ผลหนึ่งมีกลีบผล ประมาณ 12-14 กลีบ แยกออกจากกันได้ง่าย กุ้ง (เนื้อ) มีสีขาวอมเหลือง ค่อนข้างแข็งเบียดกันอยู่อย่างหลวม มีน้ำมากแต่ไม่แฉะน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว มีเมล็ดไม่มาก เป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ในเทศกาลไหว้พระจันทร์ เนื่องจากมีรูปทรง ผลสวย (ทรงผลมีสกุล) จึงสามารถส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ ในช่วงเทศกาลไหว้พระจันทร์ได้ปีละเป็นจำนวนมาก

ข. พันธุ์ขาวทองดีหรือทองดี ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลมแป้น ไม่มีจุก ต้นขั้วผล จีบเล็กน้อย ก้นผลเรียบถึง เว้าเล็กน้อย ผิวเรียบมีสีเขียวเข้ม ต่อมน้ำมันละเอียดอยู่ชิดกัน เปลือกค่อนข้างบาง ด้านในของเปลือกมีสีชมพูเรื่อๆ ผลหนึ่ง มีกลีบผลประมาณ 14-16 กลีบ ผนังกลีบมีสีชมพูอ่อน กุ้งมี สีชมพูเบียดกันแน่น นิ่ม ฉ่ำน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดมี ขนาดเล็ก เป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภคโดยทั่วไปและส่งไปจำหน่าย ยังต่างประเทศ

ค. พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ผลมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ทรงผลกลมสูง แต่ไม่มีจุกเด่นชัดเหมือนพันธุ์ขาวพวง ด้านก้นผลเรียบ ต่อมน้ำมันที่ผิวเปลือกมีขนาดใหญ่อยู่กันห่างๆ ผิวเปลือกมีสีเขียวเข้ม เปลือกค่อนข้างหนา ผลหนึ่งมีกลีบผลประมาณ 11-12 กลีบ แยกออกจากกันง่าย กุ้งมีสีขาวอมเหลือง ขนาดกุ้งค่อนข้างใหญ่ เบียดกันแน่น มีน้ำมากแต่ไม่แฉะ รสหวานอมเปรี้ยว สามารถแกะเนื้อออกมาได้ง่าย เมล็ดมีขนาดใหญ่ แต่มีเมล็ดไม่มากนัก เป็นที่นิยมบริโภค (ทวีศักดิ์, 2549)

ง. พันธุ์ขาวแป้น ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลมแป้น หัวไม่มีจุกแต่มีจีบเล็กน้อย ด้านก้นผลเรียบ ผิวเรียบมีสีเขียวอมเหลือง มีขนอ่อนนุ่มเล็กน้อย ต่อมน้ำมันค่อนข้างใหญ่ อยู่ห่างๆ กัน เปลือกสีขาวหนาประมาณ 2 เซนติเมตร เปลือกติดกับเนื้อผลแน่นแกะยาก ผลหนึ่งมีกลีบผลประมาณ 12-13 กลีบ เยื่อหุ้มกลีบสีขาวหนาและเหนียว กุ้งสีขาวเบียดกันแน่นปานกลาง รสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดมี ขนาดเล็ก และส่วนมากเมล็ดลีบ นิยมบริโภคโดยทั่วไปภายในประเทศ (จุฑามาศ, 2547)

4. โรคที่สำคัญ

4.1 โรคแคงเกอร์

โรคแคงเกอร์ เป็นโรคที่สำคัญมากของพืชตระกูลส้ม ทั้ง ส้มโอ มะนาว มะกรูด และส้มอื่นๆ มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Vauterin *et al*., 1995) [Syn. *X. campestris* pv. *citri* (Dye *et al*., 1980) และ *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* (Schaad *et al*., 2005)] พบการระบาดอยู่ในประเทศต่างๆ มากกว่า 30 ประเทศ ทั้งในทวีปเอเชีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรอินเดีย อเมริกาใต้ และประเทศสหรัฐอเมริกา (Das, 2003) โรคนี้จัดเป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งที่มีผลต่อการค้าระหว่างประเทศ (อรพรรณและจุมพล, 2548) มีแหล่งกำเนิดอยู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศอินเดีย และ ชวา (อินโดนีเซีย) เพราะพบแผลของโรคแคงเกอร์บนใบส้ม herbarium ที่เก็บไว้ที่ Herbaria of the Royal Botanic Gardens ในประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็นตัวอย่างของส้ม (*Citrus medica*) ที่เก็บมาจากประเทศอินเดียในปี 1827-1831 และส้ม (*C. aurantifolia*) จากประเทศ อินโดนีเซียในปี 1842-1844 (Fawcett and Jenkins, 1933) ในปี ค.ศ. 1915 Hasse ได้ตั้งชื่อว่า *Pseudomonas citri* ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อมาเป็น *Phytomonas citri* ภายหลังการประชุม The Committee on Nomenclature of the Society of American Bacteriologist หลังจากนั้น Dowson ได้จัดหมวดหมู่ของเชื้อใหม่และเปลี่ยนชื่อเป็น *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson ในปี ค. ศ. 1980 Dye และคณะ อาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาได้จัดหมวดหมู่ของเชื้อใหม่และเปลี่ยนชื่อว่า *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Vauterin *et al*. (1995) ได้ใช้ข้อมูลพื้นฐานจาก DNA- DNA hybridization และใช้ BIOLOG microplates เสนอชื่อ species ใหม่ใน genus *Xanthomonas* ว่า *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Stall (1988) และ Goto (1992) ได้มีการแบ่งกลุ่มของเชื้อสาเหตุตามตำแหน่งที่พบการแพร่ระบาด (geographical distribution) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคที่แตกต่างกันบนพืชอาศัย โดยแบ่งเชื้อออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ

1. A strain (Cancrosis A, Canker A, True canker) เชื้อสาเหตุ คือ *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) แหล่งกำเนิดอยู่ในเอเชียซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงพบการแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน แถบมหาสมุทรอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และญี่ปุ่น (Gottwald and Graham, 2000) สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลส้มได้ทุกสายพันธุ์ (*Citrus* spp.)

2. B strain (Cancrosis B, False canker) เชื้อสาเหตุ คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* แหล่งกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้จะเข้าทำลายเลมอน [*Citrus limon* (L.) Burm f.] เม็กซิกันไลม์ [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] เซาออเรน (*C. aurantium*) และส้มโอ (*Citrus maxima*) พันธุ์อ่อนแอ (Anonymous, 2005) ซึ่งจะพบการแพร่ระบาดเฉพาะในประเทศอาร์เจนตินา, อุรุกวัยและปารากวัย ลักษณะอาการของแผลที่เกิดขึ้นบนผล ใบ และกิ่งเหมือนกับ A strain แต่มีขนาดเล็กกว่าและเจริญบนอาหารได้ช้ากว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง B และ A strain ด้วยเทคนิค เซรุ่มวิทยา (serologiy) แต่ไม่สามารถแยก C strain ได้ (Gottwald and Graham, 2000)

3. C strain (Cancrosis C) คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* พบการแพร่ระบาดที่ Sao Paulo state ในประเทศบราซิล จะเข้าทำลาย เม็กซิกันไลม์ (Gottwald, 2000)

ปี 1984 พบโรคใหม่ คือ citrus bacterial spot ที่ฟลอริดา เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas* ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จึงตั้งชื่อว่า *Xanthomonas axonopodis* pv. C*itrumelo* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม E (canker E) (Gottwald and Graham, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับ canker D (citrus bacteriosis) ที่พบที่ Colima ในประเทศเม็กซิโก (Rodriquez *et al*., 1985)

ปี 1986 ใน Oman พบ เชื้อ *Xanthomonas* ทำให้เกิดแผลลักษณะคล้าย A strain แต่จะเข้าทำลายเฉพาะ เม็กซิกันไลม์ จึงเรียกว่า A* พบการแพร่ระบาดใน ซาอุดิอาระเบีย ไอแลนด์ และอินเดีย (Verniere *et al*., 1998; Mohammadi *et al*., 2001)

Norman *et al*. (2005) ได้จัดจำแนกเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์ทั่วโลกไว้ 5 กลุ่ม โดยใช้วิธี DNA- DNA relatedness เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S -23S intergenic spacer regions และวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) คือ กลุ่ม A จัดอยู่ใน pathovar *citri* กลุ่ม B C และ D จัดอยู่ใน pathovar *aurantifolii* กลุ่ม E จัดอยู่ใน pathovar *citrumelo* ซึ่งอยู่ใน species เดียวกันคือ *X. campestris* หรือ *X. axonopodis*

ปัฐวิภา (2544) ได้ทำการศึกษาจัดกลุ่มของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* สายพันธุ์ในประเทศไทยด้วยวิธี RAPD พบว่า *X. campestris* pv. *citri* สายพันธุ์ในประเทศไทย เหมือนกับ

X. campestris pv. *citri* type A สายพันธุ์มาตรฐานจากญี่ปุ่น และพบว่าวิธีทางชีวเคมีและสรีรวิทยาไม่สามารถแบ่งแยก *X. campestris* ในระดับ pathovar ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ วิธี RAPD สามารถแยก *X. campestris* pv. *citri* ในระดับ pathovar ออกจากกันได้

4.1.1 ลักษณะของเชื้อ

เชื้อสาเหตุเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (rod shaped) เซลล์เดียว มีขนาด 1.5-2.0 x 0.5-0.75 ไมโครมิเตอร์ มีแฟลกเจลลา 1 เส้น (single polar flagellum)ใช้ในการเคลื่อนที่ จัดเป็น obligately aerobic จีโนมมีขนาด 5 Mbp เพิ่มปริมาณโดยการแบ่งเซลล์ทุกๆ 20-30 นาที เชื้อผลิต xanthomonadin ลักษณะโคโลนีมีสีเหลืองกลมนูน ผิวเรียบเป็นมันเยิ้ม และขอบเรียบ อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 35-39 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 27-30 องศาเซลเซียส ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตมาก จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีพบว่า สามารถย่อยแป้ง aesculin casein และ gelatin สร้างเอนไซม์ tyrosinase และ catalase แต่ไม่สร้าง urease และสารอินโดล (indole) สร้างแก๊สไข่เน่า (hydrogen sulfide) ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ (Goto, 1992) สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล arabinose glucose mannose galactose และ trehalose (Anonymous, 2005) เกิดตะกอนในนมไม่ทำให้เกิด acetyl methylcarbinol สามารถใช้ citrate ใน Koser's citrate broth ได้

เชื้อจะเข้าสู่เนื้อเยื่อของพืช โดยทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่นปากใบ และทางบาดแผล สามารถเข้าทำลายพืชได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อจะพัฒนาให้เกิดแผล คือ 10^2- 10^3 cells ml^{-1} ทางบาดแผลและ 10^4-10^5 cells ml^{-1} ทางปากใบ (Zubrzycki and Diamante, 1987) อาการเริ่มแรกที่จะปรากฏเป็นแผลที่ใบใช้เวลาประมาณ 4-7 วัน หลังจากการปลูกเชื้อภายในอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส และมีความชื้น (Koizumi, 1985) ถ้ามีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การแสดงอาการของโรคจะใช้เวลามากกว่า 60 วัน (Goto, 1992) ช่วงที่พืชอ่อนแอต่อการเข้าทำลาย คือ ช่วงใบอายุประมาณ 20-30 วันหลังจากการขึ้นน้ำ ผลอ่อนอายุประมาณ 90-120 วัน และส้มที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี (เปรมปรี, 2544; Graham *et al*., 1992)

เมื่อแผลบนใบ ลำต้น และผล ได้รับความชื้นจะทำให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในนั้นเพิ่มปริมาณเป็นเท่าตัว แล้วก็จะปล่อย extracellular polysaccharide matrix ออกมาสามารถแพร่กระจายเข้าทำลายต้นปกติได้ โดยอาศัยฝน (Pruvost *et al*., 2002) ลมฝนเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ (Timmer *et al*., 1991) เชื้อประมาณ 10^5-10^8 cfu/ml จะถูกชะไปกับน้ำฝน

(Stall *et al*., 1980) ความชื้นที่อยู่บนผิวพืชเป็นเวลา 20 นาที จะช่วยให้เชื้อประสบความสำเร็จในการเข้าทำลายพืช (Ramakrishnan, 1954) ความเร็วลมอยู่ในช่วง 8 m/sec (18 mph) ทำให้เกิดการแพร่กระจายเกิดโรคที่รุนแรงได้ (Kuhara, 1978) Stall *et al*. (1982) กล่าวถึงประเทศอาเจนตินา มีรายงานว่าลมสามารถพัดพาส่วน inoculum ของเชื้อสาเหตุไปได้ไกลจากต้นที่เป็นโรคเป็นระยะทาง 32 เมตร หรืออาจเข้าสู่ปากใบ หรือบาดแผลของพืชโดยอาศัยแมลง ติดไปกับเศษดิน การตัดแต่งกิ่งก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดบาดแผล และเชื้อเข้าทำลายได้ เชื้อสามารถแพร่กระจายเป็นระยะทางไกลไม่ต่ำกว่า 7 ไมล์โดยอาศัยพายุเฮอร์ริเคน และ ทอร์นาโด (Gottwald *et al*., 2001) หรือติดไปกับส่วนขยายพันธุ์

การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียมีข้อจำกัดโดย จะอยู่ได้เพียง 1-2 วันในดิน และ 1-2 เดือน ในเศษซากพืชที่ตกลงดินแล้วก็จะถูกย่อยสลายไป อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้หลายปีโดยอาศัยอยู่บนกิ่งไม้แห้งที่ไม่ได้ตกลงบนผิวดิน ooze ของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวพืช ถ้าถูกแสงแดดโดยตรงจะแห้งตายภายในไม่กี่ชั่วโมง (Graham *et al*., 2000) เชื้อสาเหตุสามารถรอดชีวิตอยู่บนใบที่เข้าทำลายได้นานมากกว่า 6 เดือน ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนาน 52 วัน และดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อนาน 9 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตได้ 11-12 วัน

Rao and Hingorani (1963) พบว่าเชื้อสาเหตุสามารถรอดชีวิตได้นานถึง 6 เดือน บนใบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย และ76 เดือน บนกิ่งที่ถูกเข้าทำลาย (Chakravarti *et al*., 1966) แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดอยู่บนผิวพืชได้แต่มีปริมาณต่ำไม่สามารถทำให้พืชแสดงอาการได้ หรืออาจอยู่ร่วมกับหญ้า และดิน (Leite and Mohan, 1984) เชื้อสาเหตุจะตายภายใน 24-72 ชั่วโมง เมื่ออยู่บนผิวโลหะ พลาสติก ผ้า และไม้ ทั้งกลางแดดและในที่ร่ม (Graham *et al*., 2000)

4.1.2 ลักษณะอาการ

โรคแคงเกอร์ เกิดได้กับทุกส่วนของพืชตระกูลส้ม ทั้งบนใบ กิ่ง และผล ขนาดของแผลแตกต่างกันไปตามความรุนแรงของโรคและชนิดของพืช เมื่อโรคระบาดรุนแรง ใบร่วง ต้นทรุดโทรม และผลผลิตลดลง อาการที่พบบนใบ ระยะแรกเป็นจุดแผลกลมเท่าหัวเข็มหมุด (pin-point spots) ใสและฉ่ำน้ำ (water-soak) ต่อมาจุดแผลขยายใหญ่ขึ้นมีลักษณะนูน รอบๆ แผลเนื้อใบมีสีเขียวซีดกว่าเนื้อใบปกติ เกิดเป็นวงสีเหลืองล้อมรอบแผล (halo) ปรากฏทั้งสองด้านของใบหลังจากนั้นแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มยุบตัวลง แตกเป็นสะเก็ดขรุขระแข็ง ตรงกลางบุ๋มลงไปเล็กน้อย แผลจะเริ่มปรากฏบนใบต้องใช้เวลาอย่างต่ำ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) คนึงนิตย์ (2527) ทำการศึกษาพบว่าในส้มโอ ลักษณะแผลพบเป็นจุดแผลสะเก็ดสีน้ำตาลค่อนข้างกลมทั้งสองด้านของใบ ขอบใบแผลยกสูงขึ้นเป็นขอบ กลางแผลยุบต่ำลง ขอบแผลสีเข้มกว่ากลางแผล มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 มิลลิเมตร ขนาดของแผลที่พัฒนาเต็มที่แล้วในส้มโอจะมีขนาดใหญ่กว่าในพืชตระกูลส้มชนิดอื่นๆ

อาการที่กิ่ง แผลขยายลุกลามไปรอบกิ่ง หรือกระจายไปตามความยาวของกิ่ง รูปร่างลักษณะแผลไม่แน่นอน และไม่มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ อาการบนผลมี ลักษณะคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดบนใบ ผลที่เป็นโรคมีโอกาสแตกได้ง่ายเมื่อได้รับน้ำไม่สม่ำเสมอ ทำให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

4.1.3 การตรวจสอบ

การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุสามารถทำได้หลายวิธี เช่นทางสรีรวิทยา และทางชีวเคมี (Schaad *et al*., 2001) วิธีพื้นฐานที่ใช้แยกเชื้อสาเหตุคือการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น KCB (kasugamycin-cephalexin-bravo) ซึ่งเป็นอาหารประเภท semi-selective ใช้สำหรับแยก Xac จากส่วนของพืช (Graham and Gottwald, 1900) แบคทีเรียจะสร้างโคโลนีสีเหลือง จึงใช้แยกความแตกต่างโดยดูจากสีของโคโลนี ซึ่งใช้แยก genus ของ Xanthomonas (Graham *et al*., 1990) อาจยืนยันผลโดยใช้พืชทดสอบ (pathogenicity tests) เช่น Duncan grapefruit, Valencia sweet orange และ Mexican lime แผลบนใบจะพัฒนาในช่วง 7-14 วัน หลังปลูกเชื้อ (Anonymous, 2005) วิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการวินิจฉัย เช่น ปฏิกิริยาต่อการเข้าทำลายของ bacteriophage (Civerolo,1984) fatty acid profile (Vauterin *et al*., 1991) การศึกษาทางเซรุ่มวิทยา ด้วย indirect ELISA โดยตรวจสอบด้วย monoclonal antibodies (Alvarez *et al*., 1991) plasmid DNA analysis genomic DNA fingerprinting

(Broadbent *et al*., 1992) isozymic profile (Kubicek *et al*., 1989) DNA- DNA homology (Egel *et al*., 1991) RFLP (restriction fragment length polymorphism) และ PCR (polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อความรวดเร็วและแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุทั้งเชื้อบริสุทธิ์ และเชื้อที่สกัดจากแผลบนใบหรือผล (Cubero *et al*., 2001)

Hartung *et al*. (1993) ได้ทำการตรวจเชื้อ Xac โดยใช้ PCR พบว่าสามารถตรวจได้เฉพาะ A strains ด้วยไพรเมอร์ 2 (5′-CACGGGTGCAAAAAATCT-3′) และ 3 (5′-TGGTGT CGTCGCTTGTAT-3′) โดยเพิ่มปริมาณได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 222 bp และสามารถใช้กับการตรวจเชื้อสาเหตุจากชิ้นส่วนของพืช

Cubero and Graham (2001) ได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจและจำแนกความแตกต่างของ pathotype ของเชื้อ *Xanthomonas* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้ม โดยไพรเมอร์ J-pth1 (5′-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3′) และ J-pth2 (5′-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3′) จำเพาะกับบริเวณยีน *pthA* ของ A B และ C strains เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 197 bp และไพรเมอร์ J-Rxg (5′-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3′) และ J-RXc2 (5′-CAAGTTGCCTCGG-AGCTATC-3′) จำเพาะกับบริเวณยีน internally transcriber spacer (ITS) ระหว่างยีน 16S และ 23S โดยสามารถนำมา ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์ ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ณัฏฐิมา (2549) ใช้เทคนิค single closed tube nested PCR พัฒนาสำหรับใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยใช้คู่ external primers และคู่ internal primer ที่มี annealing temperature ที่แตกต่างกันและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 154 bp ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสของยีน *pthA* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อที่เข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 5 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยที่ตรวจได้คือ 10^2 cfu/ml

4.1.4 การป้องกันและควบคุม

อันดับแรกของการป้องกันโรคแคงเกอร์ คือการไม่นำเชื้อสาเหตุเข้ามาใน พื้นที่โดยเฉพาะส่วนขยายพันธุ์ก่อนนำเข้าต้องมีการตรวจอย่างเข้มงวด ถ้าภายในพื้นที่นั้นมีการระบาดของโรคต้องกำจัดแหล่งสะสมของเชื้อโดยการเผาทำลาย การลดความรุนแรงของโรคทำได้โดยการใช้พันธุ์ส้มที่ต้านทานโรค ในประเทศอินเดียพบส้ม (*C. latifolia*) พันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ (Kishun and Chand, 1987) ตลอดจนมีการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ เช่น RHR-L-49 (Sai Sarbati) (Desai *et al*., 1999) Tenali (Madhavi *et al*., 2000) ALH-77 (lime x lemon hybrid) (Prasad *et al*., 1997) การใช้ต้นตอที่อ่อนแอ เช่น *Poncitrus trifoliata* จะทำให้ต้นส้มอ่อนแอต่อโรคมากกว่าการใช้ต้นตอที่ต้านทาน เช่น rough lemon (*C. jambhiri*) การควบคุมกำจัดหนอนชอนใบ (*Phyllocnistis citrella*) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งช่วยลดความรุนแรงของโรค เพราะรอยแผลที่เกิดจากการกัดกินชอนไชระหว่างผิวใบ ทำให้โรคแคงเกอร์เข้าทำลายใบได้ง่ายขึ้น ญี่ปุ่นควบคุมโดยใช้พืชกำบัง (windbreaks) (Koizumi *et al*., 1996) การปลูกพืชกำบังลมล้อมรอบ และระหว่างแถวจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อในระยะใกล้ จากการพัดพาของลมฝน และยังช่วยลดอันตรายของใบจากการปะทะของลม (Timmer *et al*., 2000) การใช้สารเคมีร่วมกับการตัดแต่งกิ่งซึ่งมีการรายงานไว้โดย Patel and Desai (1970) ว่าการตัดแต่งกิ่งทุกๆ ปีระหว่างช่วงเดือน พ.ย.- ธ.ค. ร่วมกับการฉีดพ่น Bordeaux mixture(1%) 3-4 ครั้งต่อปี สามารถลดการเกิดโรคได้ การตัดแต่งกิ่ง 2 ครั้ง ร่วมกับการฉีดพ่น copper oxychloride ปริมาตร 500 ppm หรือ Bordeaux mixture (1%) 4 ครั้ง ก็สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุได้ (Kishun and Chand, 1987)

แสงมณีและคณะ (2545) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารที่ใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ โดยฉีดพ่นสารทดลองทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 3 เดือน ในส้มโอที่อ่อนแอต่อโรค คือพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าสารทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ใบเป็นโรคลดลงได้แก่ สารประกอบที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคแคงเกอร์ได้เท่าเทียมหรือดีกว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนชีวภัณฑ์บาซิลลัส ซับทีลิส ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่ชัดเจนโดยเฉพาะในสภาพการเกิดโรครุนแรงจะไม่สามารถควบคุมโรคได้ ส่วนสารเบสท์ช้อยส์ (สารอินทรีย์บำรุงพืชทางใบ) ไม่สามารถสร้างความแข็งแรงให้กับต้นพืชได้ในระดับที่จะทนทานต่อการเกิดโรค และยังมีสารเคมีตัวอื่นๆ ที่มีผลในการควบคุมเชื้อสาเหตุ เช่น Ultrasulphur (Nirvan, 1961) ผสม sodium arsenate ร่วมกับ copper sulphate (Patel and Padhya, 1964) และ Blitox ร่วมกับ nickel chloride (Ram *et al*., 1972)

สารประกอบทองแดง (copper) สามารถลดจำนวนเชื้อสาเหตุที่อยู่บนผิวใบและสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคกับพันธุ์ส้มที่อ่อนแอได้ (Stall *et al*., 1980) ควรฉีดพ่นสารประกอบทองแดงในช่วงที่ผลมีขนาด 2.0-6.0 mm คือในช่วง 90-120 วัน หลังกลีบดอกร่วง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Graham *et al*., 1992; Timer *et al*., 2000) แต่การใช้สารประกอบทองแดงเป็นเวลานานติดต่อกันทำให้เชื้อสาเหตุต้านทานต่อสารประกอบทองแดง (Rinaldi and Leite, 2000) และมีการสะสมในดินเป็นพิษต่อพืช และสิ่งแวดล้อม (Alva *et al*., 1995) ได้มีการใช้การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน [Induced Systemic Resistance (ISR)] ทำให้พืชเกิดความต้านทานทางกายภาพ และทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ หรือสิ่งไม่มีชีวิต เช่น benzothiadiazoles, salicylic acid และ harpin protein (Kessmann *et al*., 1994) โดยช่วยลดความเสี่ยงไม่ให้เชื้อสาเหตุเกิดการดื้อยา (Tally *et al*., 1999) หรือใช้การควบคุมด้วยชีววิธี biological control ด้วย *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas fluorescence* ที่แยกได้จากแบคทีเรียที่อยู่บนผิวส้ม (phylloplane) ซึ่งมีรายงานว่าเป็น antagonistic ของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในห้องปฏิบัติการ (Kalita *et al*., 1996)

Sawant *et al*. (1985) รายงานว่าที่อาเจนตินา ใช้ antibiotics ในการควบคุมเชื้อสาเหตุ ส่วน Krishna and Nema (1983)ใช้ Streptocycline ร่วมกับ Bordeaux mixture Kale *et al*. (1988) ได้ทดลองใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน 7 ชนิดในแปลงทดลอง พบว่าสารเคมีที่ใช้ควบคุม เชื้อสาเหตุ ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ Paushamycin ร่วมกับ Blitox ประสิทธิภาพรองลงมา คือ Bordeaux mixture Rangaswami *et al*. (1959) ใช้ streptomycin sulphate ปริมาตร 500-1000 ppm ฉีดพ่นร่วมกับ 1% glycerine มีผลยับยั้งเชื้อสาเหตุบนต้น acid lime Balaraman and Purushotman (1981) การฉีดพ่น streptomycin sulphate ปริมาตร 1000 ppm 6 ครั้ง ร่วมกับการตัดแต่งกิ่ง 2 ครั้ง ลดการเกิดโรคบนต้น acid lime ได้

4.2 โรคกรีนนิ่ง

โรคกรีนนิ่ง มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ในจีนเรียก yellow shoot (huanglongbing) ในไต้หวันเรียก likubin (decline) ในอินเดียเรียก dieback ในฟิลิปปินส์เรียก leaf mottle อินโดนีเซียเรียก vein phloem degeneration ในแอฟริกาใต้และไทยเรียกโรคกรีนนิ่ง (da Graca, 1991) ส่วนในสเปนเรียก Enverdecimiento (Anonymous, 2003) ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนเรียกชื่อโรคนี้ว่า huanglongbing ในภาษาจีนมีความหมายว่า อาการยอดเหลือง (Chung and Brlansky, 2007) สาเหตุของโรคเป็นแบคทีเรียแกรมลบจำพวก fastidious bacteria (Su, 2001) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้ยังไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้จึงทำให้ไม่สามารถพิสูจน์โรคตามหลักของ Koch's postulation ได้ครบถ้วนแต่จะพบเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในส่วนของท่ออาหาร (phloem-limited) ของพืชที่เป็นโรคเท่านั้น ปัจจุบันนักวิจัยส้มทั่วโลกสรุปว่าโรคนี้น่าจะมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนและสามารถแบ่งโรคกรีนนิ่ง ตามลักษณะที่มีอุณหภูมิเป็นตัวกำหนดอาการได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่กรีนนิ่งสายพันธุ์แอฟริกา (African strain) เป็นชนิดที่ไม่ทนต่ออากาศร้อน ต้นส้มแสดงอาการได้ดี เมื่ออุณหภูมิ ระหว่าง 22-24 องศาเซลเซียส จัดเป็น heat-sensitive form และกรีนนิ่งสายพันธุ์เอเชีย (Asian strain) ซึ่งทนต่ออากาศร้อนและอากาศเย็นทำให้ต้นส้มแสดงอาการได้ เมื่ออุณหภูมิระหว่าง 22-38 องศาเซลเซียส จัดเป็น heat – tolerant form (da Graca, 1991)

Chung and Brlansky (2007) รายงานว่าเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง คือ *Candidatus* Liberibacter อยู่ Phylum Proteobacteria ใน alpha-subdivision Proteobacteria โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากยีน ribosomal DNA (rDNA) มี 3 species ได้แก่ *Candidatus* L. africanus เป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งที่พบในแอฟริกา *Candidatus* L. asiaticus เป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งที่พบในเอเชีย (da Graca, 1991; Planet *et al*., 1995) และพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ในมลรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล คือ *Candidatus* L. americanus (Teixeira *et al*., 2005b) นอกจากนี้ในแอฟริกาใต้ มีรายงานว่าพบอาการใบด่างบนต้นเกาลัด (Chestnut : *Calodendrum capense*) ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับส้ม เมื่อนำไปตรวจสอบ ด้วยวิธีทาง serology และจากการทำ sequence บริเวณ 16S rDNA บริเวณ intergenic 16S/23S rDNA และบริเวณ ribosomal protein gene ของ ß-operon พบว่ามีความแตกต่างกัน แต่ใกล้เคียง *Candidatus* L. africanus จึงตั้งชื่อเชื้อที่พบในต้นเกาลัดนี้ว่า *Candidatus* L. africanus subsp. capensis (Garnier *et al*., 2000)

Jagoueix *et al*. (1997) ได้ศึกษาพบว่าเชื้อสาเหตุที่พบในเอเชียมีแมลงพาหะคือเพลี้ยกระโดดส้ม หรือเพลี้ยไก่แจ้ (Psyllideae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Diphorina citri* โดยพบเชื้อในส่วนของท่ออาหารของพืชอาศัยในส่วน hemolymph และ salivary glands ของแมลงพาหะ และมี oligonucleotide sequence complementary ต่อบริเวณที่เฉพาะบนสาย 16S rRNA คือ (5′-GCGCGT ATGCAATACGAGCGGCA-3′) ส่วนเชื้อสาเหตุที่พบในแอฟริกาใต้ ถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยไก่แจ้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trioza eryteae* และมี oligonucleotide เฉพาะบนสาย 16S rRNA คือ (5′- GCG CGTATTTTATACGAGCGGCA-3′) และ *Candidatus* L. americanus พบว่ามี *D. citri* เป็นแมลงพาหะ (Teixeira *et al*., 2005a) แมลงพาหะ *D. citri* เมื่อได้รับเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ภายใน 15-30 นาที ขณะดูดกินอาหารจากต้นที่เป็นโรคทำให้มีเชื้ออยู่ภายในตัวได้ตลอดชีวิต และประมาณ 21 วัน หลังจากได้รับเชื้อแล้วแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นอื่นๆ (Anonymous, 2002) และแมลงพาหะนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังรุ่นลูกได้ (Gernsey, 1989) การเคลื่อนย้ายของเชื้อกรีนนิ่งจากปลายยอดลงมาตามกิ่งถัดๆ ลงไปจะใช้ระยะทาง 30-50 ซม. ภายในระยะเวลา 12 เดือน หากเป็นเมืองร้อนจะเคลื่อนตัวได้เร็วกว่านี้อย่างน้อย 2 เท่า (พันธ์ศักดิ์ และวิภาดา, 2547)

4.2.1 ลักษณะของเชื้อ

ในช่วงที่เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ (mature form) มีรูปร่างเป็นท่อน (rigid rods) ขนาดความกว้างประมาณ 350-550 นาโนเมตร และยาวประมาณ 600-1500 นาโนเมตร ถ้าอยู่ในช่วงเซลล์ที่กำลังเจริญเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ (growing forms) จะมีรูปร่าง เป็นท่อนยาวคดเคี้ยว (flexible elongated rods) มีขนาดความกว้างประมาณ 100-250 นาโนเมตร และยาวประมาณ 500-2,500 นาโนเมตร ในขณะที่เซลล์ที่มีอายุมาก (old form) จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 700-800 นาโนเมตร (Su, 2001)

4.2.2 ลักษณะอาการ

เริ่มแรกที่สังเกตพบได้ คือ จะเริ่มแสดงอาการเหลืองจากกิ่งใดกิ่งหนึ่งก่อนแล้วจึงลุกลามไปทั่วต้น (Caitlin, 2004) เนื้อใบระยะแรกจะมีสีซีดกว่าเส้นใบ บางครั้งพบใบด่างเป็นจ้ำ ต่อมาใบที่แตกออกมาใหม่เรียวเล็กและตั้งขึ้น เนื้อใบเหลืองแต่เส้นใบยังคงเขียว คล้ายอาการขาดธาตุอาหารเช่น สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม และแร่ธาตุที่จำเป็นอื่นๆ ของพืชที่ช่วยสังเคราะห์แสง (จรัญ, 2545) สำหรับต้นที่เป็นโรครุนแรงใบจะมีขนาดเล็กเรียวยาว หนากว่าปกติ และตั้งชี้ขึ้น

(ไมตรี, 2545) ส่วนกิ่งที่แตกใหม่จากกิ่งเป็นโรคมักจะมีหนามแหลมแข็งและแก่เร็วกว่าปกติ การแตกกิ่งทึบและเบียดดันแน่นเป็นกระจุก กิ่งมักเป็นเหลี่ยมผอมๆ ไม่สมบูรณ์ มักจะบ้าดอก ออกดอกอยู่ตลอดแต่มักเป็นดอกเล็กๆ ไม่สมบูรณ์ และร่วงหล่นง่าย (พันธ์ศักดิ์และวิภาดา, 2547) ผลส้มมีการพัฒนาไม่เต็มที่ทำให้ขนาดเล็กลง ผลเบี้ยว และมีรสขม (McClean, 1970) ผลร่วงก่อนกำหนด ผลด้านที่ถูกแดดเป็นสีเขียวไม่เปลี่ยนสี ซึ่งเป็นที่มาของชื่อกรีนนิ่ง พบเมล็ดลีบในผลส้มที่เป็นโรครุนแรง นอกจากนั้นอาการด่างยังคล้ายกับโรคที่เกิดจาก *Spiroplasma citri* และ citrus tristeza closterovirus (CTV) แต่โรคกรีนนิ่งจะไม่แสดงอาการเหี่ยว (Anonymous, 2002)

4.2.3 การตรวจสอบ

ในระยะแรกการตรวจและวินิจฉัยโรคในแปลงจากลักษณะอาการบนใบ และผลแต่ลักษณะอาการของโรคคล้ายกับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสีจึงทำให้เกิดความสับสนได้ หากมีการพ่นสังกะสีซัลเฟต ในระยะใบอ่อน-ใบเพสลาดติดต่อกัน 2-3 ครั้ง (เดือนละ 2-3 ครั้ง) แล้วยังปรากฏว่าใบชุดนั้นยังมีอาการใบเหลืองลาย เรียวเล็กและโค้งงอเมื่อแก่เต็มที่แล้วก็เป็นเครื่องยืนยันได้ว่าใบชุดนั้นติดโรคกรีนนิ่งแล้ว และอยู่ในขั้นรุนแรงด้วยเพราะหากเป็นอาการขาดธาตุสังกะสีใบชุดนี้จะไม่มีอาการใบลายเมื่อแก่แต่จะมีสีเขียวเข้มสมบูรณ์ขึ้นหลังการพ่นธาตุสังกะสีอย่างเพียงพอ (พันธ์ศักดิ์และวิภาดา, 2547)

โครงการเอฟเอโอ และยูเอ็นดีพี (FAO/UNDP) ได้ส่งผู้เชี่ยวชาญด้านโรคกรีนนิ่ง คือ Dr.R.E.Schwarz เป็นบุคคลที่ทำงานทางด้านโรคกรีนนิ่งในประเทศอัฟริกาใต้ และเป็นผู้คิดค้นวิธีการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยวิธีบีเอฟที (Bark fluorescent test) มาช่วยงานด้านศึกษาและสำรวจโรคกรีนนิ่งของส้มในประเทศไทย สรุปผลการสำรวจและตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง ปี พ.ศ.2515-2516 แหล่งปลูกส้มทั่วไปในประเทศโดยวิธีบีเอฟที พบบริเวณที่มีโรคแพร่ระบาดมากคือ จ. เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ น่าน และจันทบุรี ส่วนที่พบน้อยหรือไม่พบเลยคือแหล่งปลูกภาคใต้ และพื้นที่ภาคกลาง ต.ทุ่งครุ อ.ราษฎร์บูรณะ กรุงเทพฯ และสวนส้มอุตสาหะ รังสิตคลอง 5 อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี (ไมตรี, 2548)

Anonymoue (2003) ใช้ indicator plants ทดสอบการเกิดโรค ซึ่งนิยมใช้ส้มพันธุ์ Orlando tangelo และ Sweet orange โดยใช้ต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ดแล้วติดตาจากกิ่งที่สงสัยว่าเป็นโรค เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในสายพันธุ์ *Candidatus* Liberibacter africanus และ 32 องศาเซลเซียส ในสายพันธุ์ *Candidatus* Liberibacter asiaticus อาการจะแสดงให้เห็นหลังจาก

4-5 เดือน และตรวจสอบเชื้อในส่วน sieve tubes ของท่ออาหารจากเส้นกลางใบโดยดูใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Su and An-Li (1990) ศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อสาเหตุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope: EM) พบลักษณะของ fastidious bacteria ในบริเวณ sieve tubes โดยจะพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากในช่วงฤดูร้อน และมีปริมาณน้อยในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง เชื้อสาเหตุยากที่จะตรวจสอบเพราะระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำ และการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอในพืชอาศัย (Su and Chang, 1974) ดังนั้นจึงยากที่จะวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultra-thin section) indicator plants และ enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) ด้วย polyclonal หรือ monoclonal antibodies

Jagoueix *et al*. (1996) ตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ด้วย PCR และทำการเปรียบเทียบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ universal primer fD1/rP1 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของโปรคาริโอต จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ส่วนไพรเมอร์ OI1/OI2c เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16Sr DNA ของ *Candidatus* L. asiaticus และไพรเมอร์ OI2c/OAI เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16Sr DNA ของ *Candidatus* L. africanus ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1600 bp ทั้งคู่ นอกจากนี้ยังได้แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสองชนิดนี้ โดยการย่อยผลผลิตของ PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* พบว่า *Candidatus* L. asiaticus เมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ 520 506 และ130 bp ส่วน *Candidatus* L. africanus เมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 640 และ 520 bp

Hung *et al*. (1999) ทำการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งด้วย PCR โดยใช้เวลาเพียง 6 ชั่วโมง คือ ขั้นตอนที่ 1 คือการสกัด nucleic acids ใช้เวลา 3 ชั่วโมง โดยนำเส้นกลางใบส้มประมาณ 250 มิลลิกรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วผสมลงใน DNA extraction buffer บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมด้วย NaCl และ CTAB แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จึงทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24 :1) ตามด้วย chloroform/isoamyl alcohol/phenol (25 :24 :1) ขั้นตอนที่ 2 การทำ PCR ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ด้วยไพรเมอร์ 226-primer pair ซึ่งเฉพาะเจาะจงต่อ *Candidatus* L. asiaticus และขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ใช้ เวลา 1 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอิเล็คโตรโฟรีซีส บน 1.4 % agarose gel ใช้ความต่างศักดิ์ 100V นาน 30-40 นาที แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide นาน 5 นาที ในการทดลองได้ใช้ตัวอย่างส้มที่ได้จากแหล่งต่างๆ ในแถบเอเชีย ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้เวลาในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

Hocquellet *et al*. (1999) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุและแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง โดยเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของ ribosomal protein gene ของ B-operon ด้วย PCR ซึ่งในการสกัดดีเอ็นเอใช้ 2 วิธีคือ สกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB (cyltrimethylammonium bromide) วิธีที่ 2 สกัดโดยใช้ wizard extracts ด้วยไพรเมอร์ A2/J5 ซึ่งไพรเมอร์ A2 เข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ 3' – end ของยีน *rplA* ส่วนไพรเมอร์ J5 เข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ 3' – end ของยีน *rpJ* ในส่วน ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุพบว่าไพรเมอร์ทั้งสองมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุและสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์ได้ โดยพบว่า *Candidatus* L. asiaticus เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 703 bp และ *Candidatus* L. africanus เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 669 bp บน 2% agarose gel นอกจากนี้ได้ทำ Southern hybridization เพื่อยืนยันผลอีกครั้งกับแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย oligonucleotide probe DJ โดยจะเข้าจับระหว่างยีน *rplA- rpJ* ของเชื้อสาเหตุทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

รัตนา และ Helen (2537) ใช้เทคนิคอิมมูโนบรอททิงค์ (Immunoblotting) โดยแอนติเซรัมผลิตจากเชื้อกรีนนิ่งสายพันธุ์อาฟริกา ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถนำมาใช้ตรวจหาเชื้อกรีนนิ่งสายพันธุ์ที่ปรากฏในประเทศไทย การตรวจหาเชื้อทำในน้ำคั้น ซึ่งสกัดจากเส้นกลางใบของต้นส้มที่สงสัยอาจติดเชื้อกรีนนิ่งในพื้นที่ปลูกส้มทั่วประเทศไทย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอนติเซรัมที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อกรีนนิ่งสายพันธุ์ไทย เพราะในการตรวจหาโรคกรีนนิ่งจากส้ม 5 ชนิด พบการติดเชื้อในส้มเขียวหวาน 130/190 ตัวอย่าง ส้มโชกุน 21/23 ตัวอย่าง ส้มจุก 30/139 ตัวอย่าง ส้มโอ 12/27 ตัวอย่าง และส้มจี๊ด 9/9 ตัวอย่าง ในขณะที่ใช้แอนติเซรัมชนิดเดียวกันตรวจน้ำคั้นสกัดจากต้นปกติของส้มทั้งห้าชนิดได้ผลลบทุกครั้ง และยังมีการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตรวจซ้ำในตัวอย่างส้มที่ให้ผลบวกต่อแอนติเซรัม พบจุลินทรีย์คล้ายเชื้อกรีนนิ่งในท่ออาหารของส้มเหล่านั้น พร้อมทั้งยืนยันการปรากฏของเชื้อกรีนนิ่งในตัวอย่างเหล่านั้นอีกครั้งโดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ (*Diaphorina citri* Kuwayama) ถ่ายทอดเชื้อไปยังพืชทดสอบปรากฏผลว่ากรีนนิ่งถูกถ่ายทอดจากส้มจุก 4/4 ต้น และจากต้นส้มโชกุน 6/6 ต้น

อรอุมา (2548) ได้ศึกษาการวินิจฉัยและตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคฮวงลองบิงของส้มในพื้นที่ปลูก 3 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ศึกษาทาง ultrastructure ของใบส้มที่เป็นโรค และเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบเชื้อ fastidious bacteria ลักษณะกลม รี ภายในบริเวณเซลล์ท่ออาหารเซลล์ข้างเคียงจากใบที่เป็นโรค เมื่อใช้ PCR จากการใช้คู่ไพรเมอร์ OI1/OI2c และ A2/J5

พบแถบขนาด 1160 bp และ 703 bp จากการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกรีนนิ่ง คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Teixeira *et al*. (2005) ตรวจสอบเชื้อสาเหตุ huanglongbing ในประเทศบราซิล พบว่าการตรวจสอบด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (OA1C OI1)/OI2c เฉพาะเจาะจงกับส่วน 16S rDNA เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1160 bp ซึ่ง เหมาะกับการตรวจสอบ *Candidatus* L. africanus และ *Candidatus* L. asiaticus ส่วนไพรเมอร์ GB1/GB3 เหมาะกับการตรวจสอบ *Candidatus* L. americanus เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1027 bp

4.2.4 การป้องกันและควบคุม

ควบคุมการแพร่ระบาดของโรคโดยไม่นำส่วนขยายพันธุ์ที่เป็นโรคไปยังพื้นที่ที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค กำจัดแหล่งสะสมโรคโดยกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคทิ้ง นักวิชาการสถาบันค้นคว้าไม้ผล (Institute de Researcher sur les Fruit et Agrumes) แนะนำให้เผาทำลายต้นส้มที่เป็นโรคให้หมด แล้วปลูกส้มทดแทนใหม่โดยใช้ต้นตอท่อนพันธุ์ดีที่ปราศจากโรค (เปรมปรี, 2538) หรือเลือกปลูกส้มพันธุ์ที่ต้านทาน เพราะในแต่ละพันธุ์ความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกัน ส้มพันธุ์ Mexican lime, trifoliate orange และ trifoliate orange hybrids มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อมากกว่าพันธุ์อื่น จะแสดงอาการเพียงใบด่างเท่านั้น และต้องมีการควบคุมปริมาณแมลงพาหะ เช่น การควบคุมในแถบแอฟริกาใต้ จะใช้ต้นส้มปลอดโรค ร่วมกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะ หรือใช้การควบคุมแมลงพาหะโดยชีววิธี ด้วยการใช้ ตัวเบียนซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติของศัตรูส้มอันเป็นพาหะของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง คือ แตนเบียน *Tamarixia radiate* เป็นแตนเบียนภายนอกเข้าทำลายตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3-5 โดยตัวเมีย 1 ตัว สามารถทำลายตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มได้ 31-214 ตัว เฉลี่ย 133 ตัว (Tang and Huang, 1991) เคยมีการใช้แตนเบียนชนิดนี้ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นผลสำเร็จที่หมู่เกาะรียูเนียนในแอฟริกาใต้ และมีการใช้ *Diaphorencyrtus aligarhensis* ซึ่งเป็นแตนเบียนภายใน เข้าทำลายตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 2-4 ตัวเมีย 1 ตัว สามารถทำลายตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มได้ 87-184 ตัว เฉลี่ย 144 ตัว (Tang and Huang, 1991)

การเลือกพื้นที่ปลูกควรห่างจากแหล่งระบาดของโรคอย่างน้อย 5-10 กิโลเมตร และควรเริ่มต้นปลูกด้วยกิ่งติดตาปลอดโรคที่ได้จากแหล่งผลิตที่เชื่อถือได้ ได้รับการรับรองจากกรมวิชาการเกษตร และเน้นการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่แจ้ในช่วงแตกใบอ่อนทุกครั้ง หากเลือกพื้นที่ปลอดโรคไม่ได้จำเป็นต้องปลูกในแหล่งที่มีการระบาดของโรคอาจใช้กิ่งตอนที่ได้จากต้นที่ไม่มี

อาการของโรค หรือกิ่งติดตา (พันธ์ศักดิ์และวิภาดา, 2547) โดยเฉพาะการติดตาพบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมีน้อยกว่า 50% เพราะการกระจายตัวของเชื้อไม่สม่ำเสมอ (Michael, 2007) หลังปลูกไปแล้ว 3-6 เดือนต้นใดแสดงอาการแกร็นไม่แตกยอดใหม่ให้ทำลาย (พันธ์ศักดิ์และวิภาดา 2547) การควบคุมแมลงพาหะ นับว่าเป็นสิ่งจำเป็นความสำเร็จในการควบคุมแมลงขึ้นอยู่กับความรู้ในอุปนิสัยของแมลง การฉีดพ่นสารเคมีเพื่อกำจัดปริมาณแมลงพาหะ และไม่ทำลายแมลงศัตรูของพาหะ (กรมวิชาการเกษตร, 2542)

ในไต้หวันมีการควบคุมโดยสร้างพันธุ์ปลอดโรค ควบคุมแมลงพาหะ กำจัดแหล่ง inoculum ของโรค และกำจัด alternative hosts ของแมลงพาหะ Asian citrus psyllids คือ common jasmin orange (Murraya paniculata var paniculata) curry leaf (Murraya euchrestifolia) wood apple (Limonia acidissima) และ Chinese box orange (Severinia buxifolia) ทั้งหมดอยู่ใน family Rutaceae

การจัดการในประเทศบราซิล จะใช้วิธีการตรวจอย่างละเอียด 4-6 ครั้งต่อปี เมื่อพบต้นที่เป็นโรคต้องทำลายภายใน 15 วัน และควบคุมแมลงโดยใช้การฉีดพ่นสารเคมีหลายชนิดสลับกัน (Michael, 2007)

5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มโมเลกุลของดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆ เท่าในหลอดทดลอง ผลทำให้ได้ยีนจำเพาะในปริมาณมาก (อุไรวรรณ, 2545) ซึ่งขบวนการนี้เลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ผู้คิดค้น PCR คือ Karry Mullis

หลักการของ PCR คือ ดีเอ็นเอสามารถจับคู่กันได้เพราะมีเบสคู่สม ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอชิ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวกดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP dCTP dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบเดิม ดังนั้นก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น (อังสนา, 2546) PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

5.1 Denaturation การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันใช้อุณหภูมิ ประมาณ 94 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอแม่แบบ จะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติคือในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคสช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

5.2 Annealing การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบใช้อุณหภูมิประมาณ 40-62 องศาเซลเซียส เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่าไพรเมอร์เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกันในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถที่จะเริ่มจากศูนย์ได้ เนื่องจากเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำ นิวคลีโอไทด์ตัวต่อมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอ็นไซม์ที่มีชื่อว่าไพรเมสเป็นตัวสร้าง RNA ไพรเมอร์ขึ้น

5.3 Extension การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ อุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับ การทำงานของ Taq ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Anonymous, 2007) จากขั้นตอนที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่จำนวนที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่หนึ่งถึงขั้นที่สามหมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย (พิสสวรรณ, 2540) โดยมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ)

ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphase: dNTPs) ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP dTTP ส่วนไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและที่มีคุณภาพไม่ดีนัก แต่ถ้าใช้คุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาและมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อปฏิกิริยา และเอ็นไซม์ เลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) ชนิดที่ใช้กันมากคือ *Taq* polymerase (สุรินทร์, 2545)

การแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารละลายต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็คโตรโฟรีซิส (electrophoresis) การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อิเล็คโตรโฟรีซิส เป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับโพลีอะครีลาไมด์ การทำอิเล็คโตรโฟรีซิสมักทำในแนวราบ (สุรินทร์, 2545)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. มีดผ่าตัด
3. Vortex
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง
6. UV-illuminator
7. โกร่งบดตัวอย่างพืช
8. เครื่อง rotary shaker
9. เครื่อง Electrophoresis
10. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ
11. เครื่อง Spectrophotometer
12. ไมโครทิวป์ ขนาด 0.2 และ 1.5 ml
13. เครื่อง Programable Thermal Controller

วิธีการ

1. การตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ

1.1 การศึกษาวิธีการใช้ PCR ในการตรวจเชื้อ

1.1.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อ Xac สายพันธุ์ Xci33 บน nutrient glucose agar (NGA) plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ลักษณะกลมนูนสีเหลือง เป็นมันเยิ้ม นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยวิธี detached leaf โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเอียง NA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 48 ชั่วโมง เตรียม cell

suspension โดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml) นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนใบพืช ซึ่งทำแผล โดยใช้เข็มฉีดยา บ่มไว้ในกล่อง เพื่อตรวจอาการโรคที่เกิดขึ้น หลังการปลูกเชื้อ 3-7 วัน

1.1.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอเชื้อสาเหตุโรค

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Xac โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YP (Bacto-yeast extract 10 กรัม, Bacto-peptone 20 กรัม เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 1,000 มิลลิลิตร) บ่มไว้บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวใสทิ้ง ทำซ้ำเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง เติม TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอน เติม extraction buffer 1 (50mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1%SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 0.6 เท่า ของสารละลายส่วนบนที่ได้ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน15 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนด้วย TE buffer 80 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.1.3 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* จากใบพืช

ก. การสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 1 ดัดแปลงวิธีจาก Das (2004)

นำใบส้มโอมาตัดตรงบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อไว้ ขนาด 1-2 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 45 จุด น้ำหนักประมาณ 0.30 กรัม แล้วบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่แช่เย็นกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด นำใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม extraction buffer 2 (100 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% N-Lauroylsacosine) ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5

นาที เก็บส่วนใสประมาณ 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติม 5M NaCl 100 ไมโครลิตร และ 10% CTAB 100 ไมโครลิตร ใน 0.7 M NaCl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol ในอัตรา 24 :1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนประมาณ 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ และ เติม chloroform : isoamyl alcohol : phenol ในอัตรา 25:24:1 จากนั้นดูดสารละลายใสประมาณ 600 ไมโครลิตร แล้วเติมด้วย isopropanol 360 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอแล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol และทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย TE buffer 80 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ข. การสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 2 ดัดแปลงวิธีจาก Llop *et al*. (1999)

นำใบส้มโอมาตัดตรงบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อไว้ ขนาด 1-2 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 45 จุด น้ำหนักประมาณ 0.30 กรัม แล้วนำมาสับเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงใน flask เติม PBS buffer ให้ท่วมใบพืช บ่มไว้บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที กรองเก็บส่วนใส ประมาณ 1,500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บตะกอน แล้วเติมด้วย PBS (NaCl 8 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, KCl 0.2 g) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตะกอนเติมด้วย extraction buffer3 (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 2% PVP) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าบนเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บตะกอน ทำให้แห้งในที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 80 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส นำวิธีที่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้มาใช้ในการทดลองต่อไป

1.1.4 การทำ PCR

ก. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย universal primer ของเชื้อ *Xanthomonas* ที่จำเพาะกับบริเวณ *pth* gene ด้วย forward primer J-pth1 (5′-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3′) และ reverse primer J-pth2 (5′-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3′) สามารถตรวจสอบ *Xanthomonas* spp. ได้ทั้ง 3 type (Cubero and Graham, 2001)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	11.85	-
10XPCR buffer	2.50	1X
100mM dNTPs	2.00	0.6 มิลลิโมลาร์
primer mix	1.50	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5.00	undiluted extracted DNA
25mM $MgCl_2$	2.00	2 มิลลิโมลาร์
Tag DNA polymerase	0.15	0.5 Unit

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	นาน	2 นาที	
2. deneturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	นาน	1 นาที	จำนวน 30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	55 องศาเซลเซียส	นาน	2 นาที	
extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	นาน	3 นาที	
3. final extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	นาน	10 นาที	

ข. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับบริเวณ rDNA ของ Xac ด้วย forward primer J-Rxg (5′-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3′) และ reverse primer J-RXc2 (5′-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3′) (Cubero and Graham, 2001)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	11.85	-
10XPCR buffer	2.50	1X
100mM dNTPs	2.00	0.6 มิลลิโมลาร์
primer mix	1.50	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5.00	undiluted extracted DNA
25mM $MgCl_2$	2.00	2 มิลลิโมลาร์
Tag DNA polymerase	0.15	0.5 Unit

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับข้อ ก.

ค. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส

นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสโดยใช้เจลอะกาโรส 2% ใน TBE buffer (0.5X TBE 1 ลิตร: 54g Tris base, 27.5g boric acid, 20 ml 0.5M EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ Xac

1.2.1 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อ Xac ที่สกัดได้ ในข้อ 1.1.2 มาคำนวณความเข้มข้นด้วย โปรแกรม Image J ได้ค่าเท่ากับ 18.19 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย TE buffer ในระดับความเข้มข้นลดลงทีละ 1 เท่าตัวเป็นลำดับจาก 18.19 นาโนกรัม จนถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.62 พิคโคกรัม นำดีเอ็นเอมาทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ Xac โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2

1.2.2 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อที่ผสมกับดีเอ็นเอพืช

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อ Xac ที่สกัดได้ ในข้อ 1.1.2 ผสมกับดีเอ็นเอพืชแล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ Xac ในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อต่างกัน 6 ระดับ คือ 90.95, 2 , 1 , 0.5, 0.1, และ 0.05 ng โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) ในการเข้าทำลายส้มโอ

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อที่เข้าทำลายพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงเชื้อ Xac สายพันธุ์ Xci33 บนอาหาร NGA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 48-72 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml) และเจือจาง cell suspension ครั้งละ 10 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10^7 และ 10^6 cfu/ml จากนั้นปลูกเชื้อลงบนใบส้มโอที่ล้างด้วย Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หยด cell suspension ปริมาตร 2

ไมโครลิตร ลงบนใบพืชซึ่งทำแผลโดยใช้เข็มฉีดยา บ่มไว้ในกล่องที่มีความชื้น หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3 4 5 6 และ 7 วัน นำไปสกัดดีเอ็นเอ ตามขั้นตอนในข้อ 1.1.3(ก.) โดยใช้น้ำหนักของใบส้มโอที่ปลูกเชื้อต่างกัน 2 ระดับ คือ 0.20 กรัม และ 0.30 กรัม แล้วนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อที่เข้าทำลายพืชในสภาพแปลงทดลอง

เลี้ยงเชื้อ Xac สายพันธุ์ Xci33 บนอาหาร NGA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 48-72 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้เข็มฉีดยาทำแผลบนใบ ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ปลูกในแปลงทดลองเป็นจำนวน 4 จุดต่อใบจากนั้นฉีดพ่นด้วย cell suspension ของเชื้อ คลุมด้วยพลาสติก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างมาตรวจด้วย PCR ที่ระยะเวลา 4 6 8 10 12 14 และ17 วัน หลังปลูกเชื้อ แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส

3. การตรวจเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโอ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบพืช

ตัดเส้นกลางใบของส้มจากใบที่เป็นโรค (ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างโรคจากผู้ช่วยศาสตร์ตราจารย์อังสนา อัครพิศาล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) นำมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่แช่เย็นกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดย ดัดแปลงวิธีจาก Das (2004) เช่นเดียวกับข้อ 1.1.3(ก) จากนั้นเติม extraction buffer 2 (100 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl , 1% N-Lauroylsacosine) ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใสประมาณ 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ เติม 5M NaCl 100 ไมโครลิตร และ 10% CTAB 100 ไมโครลิตร ใน 0.7 M NaCl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนประมาณ 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ และ เติม

chloroform : isoamyl alcohol : phenol (25:24:1) จากนั้นดูดสารละลายใสประมาณ 600 ไมโครลิตร แล้วเติมด้วย isopropanol 360 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอแล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol และทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer 80 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การทำ PCR

3.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ A2/J5

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับ บริเวณยีน 16S ribosomal protein ใน *rp*/KAJL-*rpo*BC operon ของเชื้อ *Candidates* L. asiaticus ด้วย forward primer A2 (5′-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3′) และ reverseprimer J5 (5′-ACAAAAGCAG-AAATAGCACGAACAA-3′) (Hocguellet *et al*., 1999)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	11.85	-
10XPCR buffer	2.50	1X
100mM dNTPs	2.00	0.6 มิลลิโมลาร์
primer mix	1.50	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5.00	undiluted extracted DNA
25mM$MgCl_2$	2.00	2 มิลลิโมลาร์
Tag DNA polymerase	0.15	0.5 Unit

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที	
2. deneturation	ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที	
3. final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	

3.2.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส

นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรส 1.5% ใน TBE buffer (0.5X TBE 1 ลิตร: 54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 ml 0.5M EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-45 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

4. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งจากสวนส้มโอในจังหวัดนครปฐม

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม โดยทำการสุ่มเก็บต้นละ 4 ตัวอย่าง โดยเก็บจากส้มโอพันธุ์ทองดี 4 ต้น พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง 2 ต้น และเนื่องจากสวนที่ทำการเก็บตัวอย่างมีการปลูกส้มชนิดอื่นปะปนด้วย และมีการแสดงอาการผิดปกติ จึงทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจเพื่อประโยชน์ในการจัดการสวนต่อไป โดยการเก็บตัวอย่างจากส้มโชกุนจำนวน 1 ต้น ส้มซ่า 1 ต้น และส้มเช้ง 1 ต้น ต้นละ 4 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง

4.2 การตรวจเชื้อด้วย PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับข้อ 1.1.3(ก.) และใช้ไพรเมอร์ A2/J5 ทำ PCR และตรวจผลตามวิธีการในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ A411 อาคารศูนย์เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ระยะเวลาดำเนินการทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2550 รวมเวลาทั้งสิ้น 2 ปี

ผลและวิจารณ์

ผล

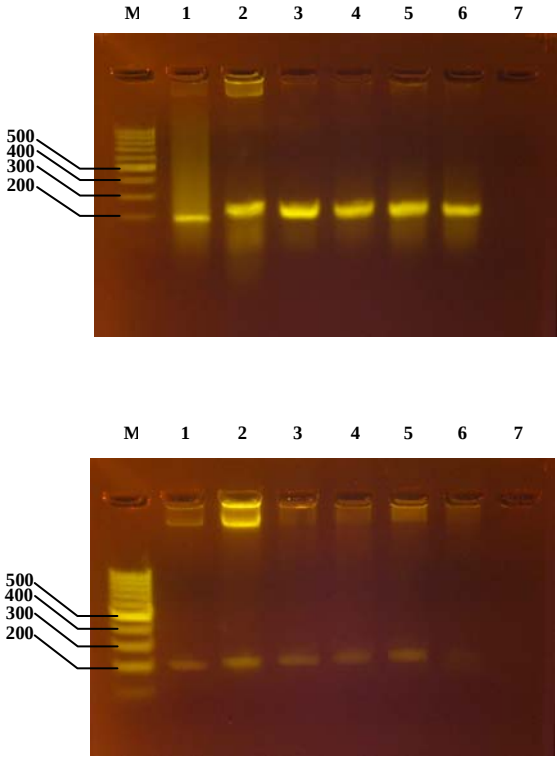
1. การตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ

1.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอเชื้อสาเหตุ

การสกัดแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อ Xac โดยใช้ extraction buffer 1 และวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยคำนวณความเข้มข้นด้วยโปรแกรม Image J ได้ค่าเท่ากับ 18.19 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Xac จากใบพืช ด้วยการสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 1 ดัดแปลงวิธีจาก Das (2004) เมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส บน 1% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอชัดเจนกว่าการสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 2 ดัดแปลงวิธีจาก Llop *et al*, (1999) เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดจากทั้ง 2 วิธี มาเพิ่มปริมาณด้วย PCR พบว่ามีเพียงวิธีที่ 1 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วย PCR ได้

1.2 การศึกษาวิธีการใช้ PCR ในการตรวจสอบเชื้อ

จากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ Xac สายพันธุ์ Xci33 โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และ J-Rxg/J-RXc2 พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 197 bp เมื่อทำปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับเชื้อ Xac สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ Xci12 (มะนาว) Xci21 (ส้มสายน้ำผึ้ง) Xci42 (มะกรูด) และเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xcv) สายพันธุ์ XCV1-2 เชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 197 bp เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ Xac ทุกสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และ J-Rxg/J-RXc2 (ภาพที่ 1 ก. และ ข.) และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 197 bp เมื่อทดสอบดีเอ็นเอของเชื้อ Xcv สายพันธุ์ XCV1-2 โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/Jpth2 (ภาพที่ 1 ก.) และไม่พบแถบดีเอ็นเอของ เชื้อ Xcv เมื่อใช้ไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2 (ภาพที่ 1 ข.)



ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอจากวิธี PCR ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* สายพันธุ์ Xci33 (ส้มโอ), Xci12 (มะนาว), Xci42 (มะกรูด), Xci21 (ส้มสายน้ำผึ้ง) และ XCV1-2 (มะเขือเทศ) ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis

ก. ผลของ PCR ด้วยไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2: M= Marker (100 bp); Lane1=Xci33; Lane2= Xci33; Lane3= Xci12; Lane4= Xci42; Lane5= Xci21; Lane6= XCV1-2 และ Lane7= น้ำ

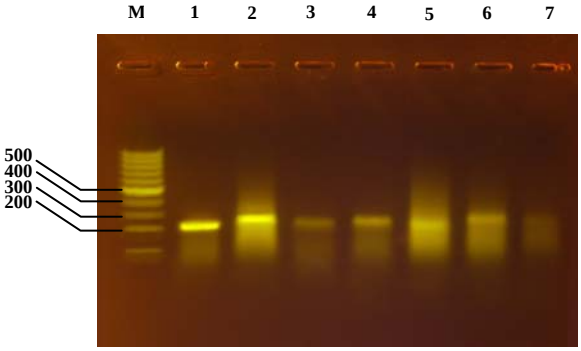
ข. ผลของ PCR ด้วยไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2: M= Marker (100 bp); Lane1= Xci33; Lane2= Xci33; Lane3= Xci12; Lane4= Xci42; Lane5= Xci21; Lane6= XCV1-2 และ Lane7= น้ำ

1.3 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์

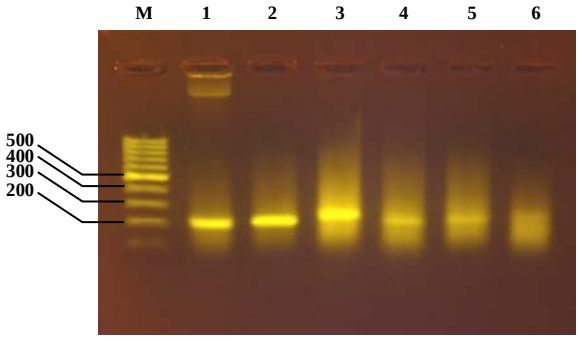
เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วย PCR หลังจากนำมาเจือจางด้วย TE buffer ในระดับความเข้มข้นที่ลดลงทีละ 1 เท่าตัวเป็นลำดับจาก 18.19 นาโนกรัม จนถึงระดับต่ำสุดคือ 0.62 พิคโคกรัม ด้วยไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจได้เท่ากับ 1.25 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร (ภาพที่ 2)

1.4 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในพืช

ตรวจสอบแบคทีเรีย Xac ด้วย PCR เมื่อผสมดีเอ็นเอของเชื้อกับดีเอ็นเอพืชในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อต่างกัน 6 ระดับ คือ 90.95, 2, 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 นาโนกรัม โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจได้เท่ากับ 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ปริมาณต่างๆ โดยเจือจางด้วย TE buffer ในระดับความเข้มข้นที่ลดลงทีละ 1 เท่าตัว เป็นลำดับจาก 18.19 นาโนกรัม จนถึงระดับต่ำสุด 0.62 พิคโคกรัม ด้วยไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2: M= Marker (100 bp); Lane1= 0.04 ng; Lane2= 0.02 ng; Lane3= 10 pg; Lane4= 5 pg; Lane5= 2.5 pg; Lane6= 1.25 pg และLane7= 0.62 pg ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis

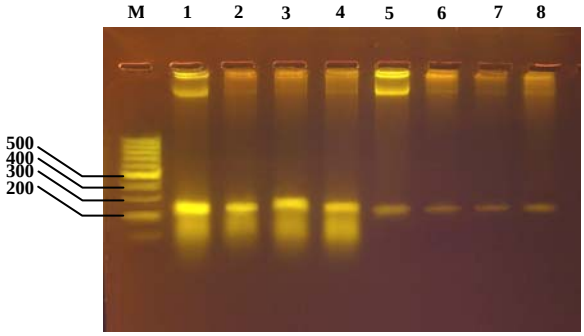


ภาพที่ 3 การทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ปริมาณ (90.95, 2, 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 ng) ผสมกับดีเอ็นเอของพืช โดยใช้ ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2: M= Marker (100 bp); Lane1= 90.95 ng; Lane2=2 ng; Lane3= 1 ng; Lane4= 0.5 ng; Lane5= 0.1 ng และ Lane6= 0.05 ng ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis

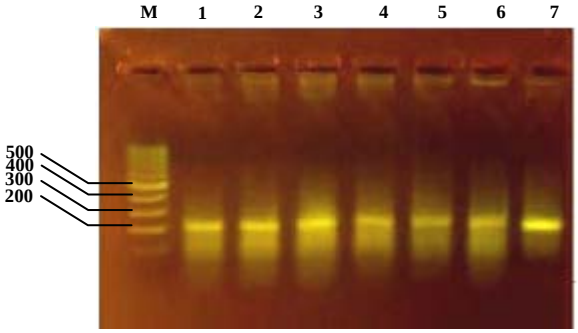
2. การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจหาเชื้อ Xac ที่เข้าทำลายส้มโอ

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ Xac ที่เข้าทำลายพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ

ตรวจสอบการเข้าทำลายส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ด้วย PCR โดยการปลูกเชื้อบนใบส้มโอด้วยเชื้อ Xac ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่างกัน 3 ระดับ คือ 10^6 10^7 และ10^8 cfu/ml ทำการตรวจผลที่เวลาต่างกัน คือ 3 4 5 6 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 ไพรเมอร์ ได้ทุกระดับความเข้มข้นของเชื้อ คือ 10^6 10^7และ10^8 cfu/ml หลังปลูกเชื้อลงบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นระยะที่ใบเริ่มแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 6) โดยสามารถตรวจสอบได้ทั้งที่ใช้น้ำหนักใบ 0.20 และ 0.30 กรัม (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการเข้าทำลายส้มโอในสภาพห้องปฏิบัติการด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 (Lane1-4) และไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2 (Lane5-8) ที่ปริมาณเชื้อต่างกัน (10^6-10^8 cfu/ml) หลังการปลูกเชื้อบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เป็นเวลา 5 วัน M= Marker (100 bp); Lane1= Xci33; Lane2= 10^8cfu/ml; Lane3= 10^7cfu/ml และ Lane4= 10^6 cfu/ml Lane5= Xci33; Lane6= 10^8 cfu/ml; Lane7= 10^7 cfu/ml และ Lane8= 10^6 cfu/ml ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 5 การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการเข้าทำลายส้มโอในสภาพห้องปฏิบัติการด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 หลังการปลูกเชื้อที่ปริมาณต่างกัน (10^6-10^8 cfu/ml) และใช้น้ำหนักใบพืชในการตรวจ 0.2 และ 0.3 กรัม : M= Marker (100 bp); Lane1= 10^8 cfu/ml $^{-1}$/0.3 กรัม; Lane2= 10^8 cfu/ml $^{-1}$/0.2 กรัม; Lane3= 10^7 cfu/ml $^{-1}$/0.3 กรัม; Lane4 = 10^7 cfu/ml $^{-1}$/0.2 กรัม; Lane5= 10^6 cfu/ml $^{-1}$/0.3 กรัม; Lane6= 10^6 cfu/ml $^{-1}$/0.2 กรัม และ Lane7= Xci33; ตรวจผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis

ภาพที่ 6 อาการของโรคแคงเกอร์หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำ detached leaf และปลูกเชื้อโดยวิธีการทำแผลด้วยเข็มฉีดยา

ก. ระดับความเข้มข้นของเชื้อ คือ 10^8 cfu/ml

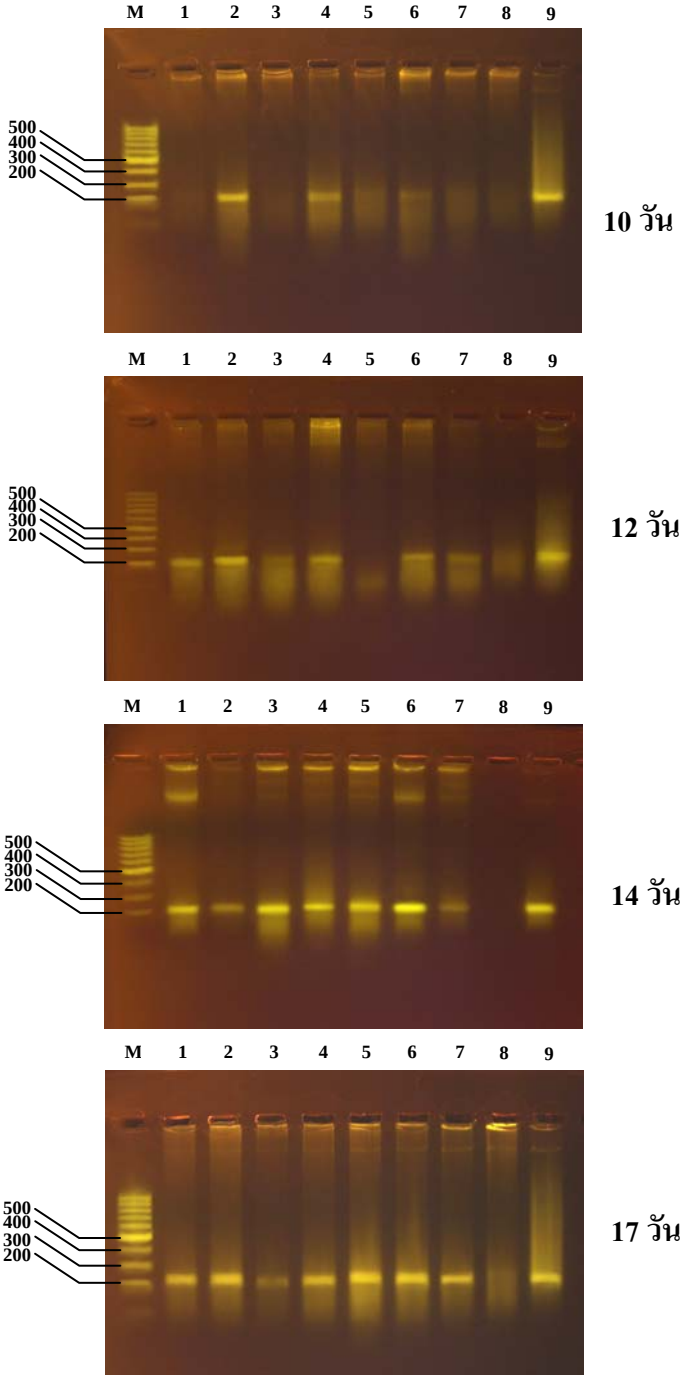
ข. ระดับความเข้มข้นของเชื้อ คือ 10^7 cfu/ml

ค. ระดับความเข้มข้นของเชื้อ คือ 10^6 cfu/ml

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจเชื้อ Xac ที่เข้าทำลายพืชในแปลงทดลอง

ตรวจสอบการเข้าทำลายส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ด้วย PCR โดยทำการปลูกเชื้อระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^8cfu/ml ด้วยวิธีฉีดพ่น ทำการตรวจผลที่เวลาต่างกัน คือ 4 6 8 10 12 14 และ 17 วัน หลังการปลูกเชื้อ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ Xac ในส้มโอ 2 ต้น จากตัวอย่างทั้งหมด 7 ต้น หลังปลูกเชื้อ 10 วัน สามารถตรวจพบเชื้อ 5 ต้น หลังปลูกเชื้อ 12 วัน และพบว่าที่ 14 และ 17 วัน หลังการปลูกเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุได้ทั้ง 7 ต้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 8) โดยเริ่มสังเกตอาการโรคได้ครั้งแรกที่ระยะเวลา 10 วัน หลังการปลูกเชื้อบนใบของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 ลักษณะอาการของแผลบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง หลังปลูกเชื้อ 10 วัน ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^8cfu/ml ด้วยวิธีฉีดพ่น ในสภาพแปลงทดลอง



ภาพที่ 8 การตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เข้าทำลายพืชในแปลงทดลอง ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 cfu/ml หลังการปลูกเชื้อที่เวลาต่างกัน คือ 10 12 14 และ 17 วัน ตรวจผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis เมื่อ M= Marker (100 bp); Lane1-7 ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งจำนวน 7 ต้น ที่ทำการปลูกเชื้อ Lane8= พืชปกติ และ Lane9= Xci33

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Xanthomonas citri* PthA (pthA) gene, complete cds (Accession number U28802.1) *Xanthomonas citri* apl3 gene, complete cds (Accession number AB021365.1) *Xanthomonas citri* apl2 gene, complete cds (Accession number AB021364.1) และ *Xanthomonas citri* apl1 gene, complete cds (Accession number AB021363.1) พบความเหมือนกันถึง 100%(querycoverage) 99%(maxident) ที่มีรายงานไว้

```
Xci33              CTTCAACTCAAACGCCGGACCAGGCGACTTTGCATGCATTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG 60
gb|U28802.1|       CTTCAACTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG 3734
dbj|AB021365.1|    CTTCAACTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG 4098
dbj|AB021364.1|    CTTCAACTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG 3282
dbj|AB021363.1|    CTTCAACTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATGCATTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG 3486

Xci33              ACCTTGATGCGCCCAGCCCAACGCACGAGGGAGATCAGAGGCGGGCAAGCAGCCGTAAAC 120
gb|U28802.1|       ACCTTGATGCGCCCAGCCCAACGCACGAGGGAGATCAGAGGCGGGCAAGCAGCCGTAAAC 3794
dbj|AB021365.1|    ACCTTGATGCGCCCAGCCCAACGCACGAGGGAGATCAGAGGCGGGCAAGCAGCCGTAAAC 4158
dbj|AB021364.1|    ACCTTGATGCGCCCAGCCCAACGCACGAGGGAGATCAGAGGCGGGCAAGCAGCCGTAAAC 3342
dbj|AB021363.1|    ACCTTGATGCGCCCAGCCCAACGCACGAGGGAGATCAGAGGCGGGCAAGCAGCCGTAAAC 3546

Xci33              GGTCCCGATCGGATCGTGCTGTCACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCG 180
gb|U28802.1|       GGTCCCGATCGGATCGTGCTGTCACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCG 3854
dbj|AB021365.1|    GGTCCCGATCGGATCGTGCTGTCACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCG 4218
dbj|AB021364.1|    GGTCCCGATCGGATCGTGCTGTCACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCG 3402
dbj|AB021363.1|    GGTCCCGATCGGATCGTGCTGTCACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCG 3606

Xci33              181  CTCCCGAACAGCGCGATG 198
gb|U28802.1|       3855 CTCCCGAACAGCGCGATG 3872  gb|U28802.1|     Xanthomonas citri PthA (pthA)
dbj|AB021365.1|    4219 CTCCCGAACAGCGCGATG 4236  dbj|AB021365.1|  Xanthomonas citri apl3 gene
dbj|AB021364.1|    3403 CTCCCGAACAGCGCGATG 3420  dbj|AB021364.1|  Xanthomonas citri apl2 gene
dbj|AB021363.1|    3607 CTCCCGAACAGCGCGATG 3624  dbj|AB021363.1|  Xanthomonas citri apl1 gene
```

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *pth* ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci33 ระหว่าง *Xanthomonas citri* PthA, (*Xanthomonas citri* apl3 gene, *Xanthomonas citri* apl2 gene และ *Xanthomonas citri* apl1 gene กับที่มีรายงานไว้ใน GenBank

3. การตรวจเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งจากสวนส้มโอในจังหวัดนครปฐม

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากสวนเกษตรกร อ. นครชัยศรี จ.นครปฐม โดยเก็บจากต้นและกิ่งที่มีลักษณะอาการสีใบไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 10 ก. และ ข.) เพื่อทำการตรวจการติดเชื้อ เก็บตัวอย่างจากส้มโอพันธุ์ทองดี 4 ต้น พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง 2 ต้น ส้มโชกุน 1 ต้น ส้มซ่า 1 ต้น และส้มเช้ง 1 ต้น โดยเก็บ 4 ตัวอย่าง ต่อ 1 ต้น ทำการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง

ก.

ข.

ภาพที่ 10 ลักษณะใบของส้มโอ ที่เก็บจากสวนเกษตรกร อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม มีสีของแผ่นใบไม่สม่ำเสมอ คล้ายกับอาการขาดธาตุสังกะสี

3.2 การตรวจเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus โรคกรีนนิ่งด้วย PCR

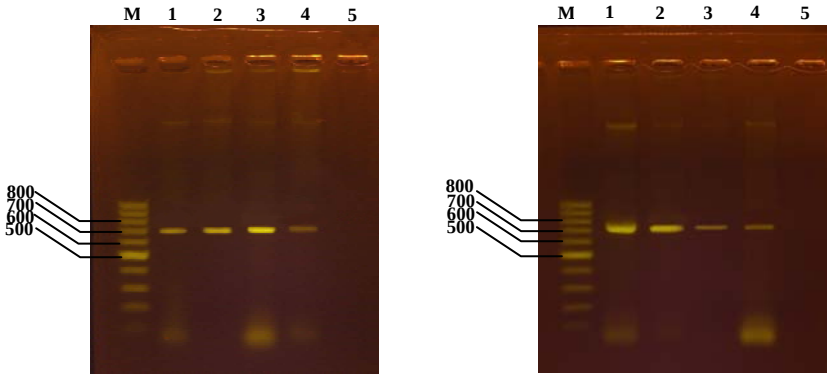
จากการเก็บตัวอย่างใบส้มโอ และส้มพันธุ์ต่างๆ จากสวนส้มโอ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม จำนวน 9 ต้น ต้นละ 4 ตัวอย่าง รวม 36 ตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย PCR ใช้ไพรเมอร์ A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ positive control (ภาพที่ 11) และในส้มโอพันธุ์ทองดี 4 ต้น รวม 16 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อสาเหตุ 2 ต้น รวม 3 ตัวอย่าง ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง 2 ต้น รวม 8 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อสาเหตุ 2 ต้น รวม 2 ตัวอย่าง ส้มโชกุน 1 ต้น 4 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อสาเหตุ 1 ตัวอย่าง ส้มซ่า 1 ต้น 4 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อสาเหตุ 2 ตัวอย่าง แต่ตรวจไม่พบใน ส้มเช้ง ทั้ง 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ด้วย Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ A2/J5 จากตัวอย่างส้มโอพันธุ์ทองดี ขาวน้ำผึ้ง และส้มชนิดอื่นได้แก่ ส้มซ่า ส้มเช้ง และส้มโชกุน จากสวนส้มโอ ในเขต อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม

		ผลการตรวจหาเชื้อด้วย PCR			
		กิ่งที่1	กิ่งที่2	กิ่งที่3	กิ่งที่4
ตัวอย่าง	พืชตรวจสอบ				
1	ส้มโอพันธุ์ทองดี	-	-	-	-
2	ส้มโอพันธุ์ทองดี	-	-	-	+
3	ส้มโอพันธุ์ทองดี	+	+	-	-
4	ส้มโอพันธุ์ทองดี	-	-	-	-
5	ส้มซ่า	-	+	+	-
6	ส้มโชกุน	-	-	-	+
7	ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	-	-	-	+
8	ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	-	+	-	-
9	ส้มเช้ง	-	-	-	-

+ = ตรวจพบเชื้อสาเหตุ

- = ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุ



ก. ข.

ภาพที่ 11 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง จากตัวอย่างส้ม ของสวนใน จ. นครปฐม ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A2/J5

ก. M= Marker (100 bp); Lane1= ส้มโอพันธุ์ทองดี; Lane2= ส้มโชกุน; Lane3= ส้มโอพันธุ์ทองดี; Lane4= positive control; Lane5= น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตรวจผลด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

ข. M= Marker (100 bp); Lane1= ส้มซ่า; Lane2 และ 3= ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง; Lane4= positive control; Lane5= น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตรวจผลด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI จากการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB gene (Accession number AY342001.1) *Candidatus* Liberibacter asiaticus ribosomal protein gene, partial cds (Accession number DQ157277.1) *Candidatus* Liberibacter asiaticus ribosomal protein gene, partial cds (Accession number DQ157276.1) *Candidatus* Liberibacter asiaticus RplJ protein gene, partial cds (Accession number DQ303211.1) *Candidatus* Liberibacter asiaticus ribosomal protein gene, partial cds (Accession number AY266352.1) และ Liberibacter asiaticus ribosomal protein and RNA polymerase (rplKAJL-rpoB) (Accession number M94319.1) พบความเหมือนกันถึง 98%(querycoverage) 93%(maxident) ที่มีรายงานไว้ใน GenBank

```
Greening              TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTCTTCTGTTTAAATACTCCTTGCTTAAGTTGGTTTT  60
gb|AY342001.1|        TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT  - AATACT –CTTG –TT –AGTT - GTTTT  3354
gb|DQ157277.1|        TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT  - AATACT –CTTG –TT –AGTT - GTTTT  54
gb|DQ157276.1|        TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT  - AATACT –CTTG –TT –AGTT - GTTTT  54
gb|DQ303211.1|        TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT  - AATACT –CTTG –TT –AGTT - GTTTT  54
gb|AY266352.1|        TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT  - AATACT –CTTG –TT –AGTT - GTTTT  54
gb|M94319.1|          TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTTC -TCTGTTT –  AATACT -CTTG  -TT –AGTT - GTTTT  1452

Greening              TAATGTGTGGATTCCCTTTTTCCGCTATCCGGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  120
gb|AY342001.1|        T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  3408
gb|DQ157277.1|        T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  108
gb|DQ157276.1|        T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  108
gb|DQ303211.1|        T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  108
gb|AY266352.1|        T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  108
gb|M94319.1|          T- - TGTGTGGATT – CCTTTTT -CGCTAT-C -GGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGT  1506

Greening              TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  180
gb|AY342001.1|        TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  3468
gb|DQ157277.1|        TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  168
gb|DQ157276.1|        TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  168
gb|DQ303211.1|        TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  168
gb|AY266352.1|        TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  168
gb|M94319.1|          TAGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAG  1566

Greening              GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  240
gb|AY342001.1|        GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  3528
gb|DQ157277.1|        GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  228
gb|DQ157276.1|        GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  228
gb|DQ303211.1|        GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  228
gb|AY266352.1|        GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  228
gb|M94319.1|          GAAAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGGAGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCG  1626

Greening              TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  300
gb|AY342001.1|        TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  3588
gb|DQ157277.1|        TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  288
gb|DQ157276.1|        TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  288
gb|DQ303211.1|        TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  288
gb|AY266352.1|        TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  288
gb|M94319.1|          TAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTTTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATT  1686
```

```
Greening          ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 360
gb|AY342001.1|    ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 3648
gb|DQ157277.1|    ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 348
gb|DQ157276.1|    ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 348
gb|DQ303211.1|    ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 348
gb|AY266352.1|    ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 348
gb|M94319.1|      ATAAGGGAATTAGTGTTGCGCAAATTAAAGATCTTCGGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTG 1746

Greening          GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 420
gb|AY342001.1|    GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 3708
gb|DQ157277.1|    GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 408
gb|DQ157276.1|    GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 408
gb|DQ303211.1|    GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 408
gb|AY266352.1|    GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 408
gb|M94319.1|      GAGGTGTAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTA 1806

Greening          GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 480
gb|AY342001.1|    GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 3768
gb|DQ157277.1|    GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 468
gb|DQ157276.1|    GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 468
gb|DQ303211.1|    GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 468
gb|AY266352.1|    GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 468
gb|M94319.1|      GAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGGATAGTCCTGTTA 1866

Greening          TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 540
gb|AY342001.1|    TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 3828
gb|DQ157277.1|    TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 528
gb|DQ157276.1|    TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 528
gb|DQ303211.1|    TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 528
gb|AY266352.1|    TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 528
gb|M94319.1|      TTGCTCCTAAAATTTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTG 1926

Greening          GGGGTTGTAGAGAAAGGCCGTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAAATTGCTTCTTTAC 599
gb|AY342001.1|    GGG-TTGTAGAGAAGGGC – GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA -TTGCTTCTTTAC 3885
gb|DQ157277.1|    GGG-TTGTAGAGAAGGGC – GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA -TTGCTTCTTTAC 585
gb|DQ157276.1|    GGG-TTGTAGAGAAGGGC – GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA -TTGCTTCTTTAC 585
gb|DQ303211.1|    GGG-TTGTAGAGAAGGGC – GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA -TTGCTTCTTTAC 585
gb|AY266352.1|    GGG-TTGTAGAGAAGGGC- GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA -TTGCTTCTTTAC 585
gb|M94319.1|      GGG-TTGTAGAGAAGGGC- GTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAA - TTGCTTCTTTAC 1983
```

```
Greening          CCGATCTTTGAGGGTATTTCGAGCTGGTATCCATAAGGTGCTTATCCCAATCCTAAAGGC  659
gb|AY342001.1|    CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  3937
gb|DQ157277.1|    CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  637
gb|DQ157276.1|    CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  637
gb|DQ303211.1|    CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  637
gb|AY266352.1|    CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  637
gb|M94319.1|      CCGATCTT- GAGGGTATT- CGAGCTGGTATC- ATAAG – TGCT -ATCC-AATC – TAATG -C  2035

Greening          AACCTAGGATTGGGTTAAGACCTTCTTTGGGTTACCGCCCACCAGAACTCCAAAGTTTGG  719
gb|AY342001.1|    AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG -T–AC –GCC -AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  3981
gb|DQ157277.1|    AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG –T -AC –GCC –AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  681
gb|DQ157276.1|    AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG –T -AC –GCC –AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  681
gb|DQ303211.1|    AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG –T -AC- GCC –AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  681
gb|AY266352.1|    AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG -T-AC –GCC –AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  681
gb|M94319.1|      AAC- TAG- ATTGG- TTA - GAC- TTCTT –GG -T-AC –GCC –AC –AGA - CTC- AA -GTT- G-  2079

Greening          TTCGGGGCTATTTC  733
gb|AY342001.1|    TTCGTG-CTATTTC  3994
gb|DQ157277.1|    TTCGTG-CTATTTC  694
gb|DQ157276.1|    TTCGTG-CTATTTC  694
gb|DQ303211.1|    TTCGTG-CTATTTC  694
gb|AY266352.1|    TTCGTG-CTATTTC  694
gb|M94319.1|      TTCGTG-CTATTTC  2092
```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งจากสวนส้มโอในเขต อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม กับที่มีรายงานไว้ใน GenBank

วิจารณ์

การวินิจฉัยและตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากพืชนั้นจำเป็นต้องอาศัยวิธีที่สะดวก รวดเร็วเชื่อถือได้ โดยมีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ และมีความเฉพาะเจาะจง (specificity) ต่อแบคทีเรียเชื้อสาเหตุ วิธีการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยทั่วไปแล้วจะต้องแยกเชื้อสาเหตุจากชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (pathogenicity test) ซึ่งในขั้นตอนการแยกเชื้อสาเหตุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อจากลักษณะโคโลนีที่ปรากฏแต่ก็มีโอกาสผิดพลาดได้สูง ในการวินิจฉัยและตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ มีการพัฒนาอาหารคัดเลือกกึ่งจำเพาะ (semiselective medium) เช่น KCB (kasugamycin-cephalexin-bravo) ที่ใช้แยก *X. axonopodis* pv. *citri* จากชิ้นส่วนของพืช (Graham and Gottwald, 1990) อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อโดยใช้อาหารก็ยังมีข้อจำกัดด้านเวลา และการทดสอบการเกิดโรคอาจมีข้อผิดพลาดจากปัจจัยภายนอก เช่น สภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องใช้แรงงาน สถานที่ และเวลาในการเตรียมพืชทดสอบ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการตรวจแยกเชื้ออย่างแพร่หลาย การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส PCR (Polymerase chain reaction) นับเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมาก อีกทั้งยังใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและยืนยันผลที่แน่นอนได้ เพราะลักษณะอาการของโรคอาจคล้ายกัน โรคแคงเกอร์ของส้มพบว่ามีโรคอื่นๆที่แสดงอาการคล้ายกัน เช่น Alternaria leaf and fruit spot Citrus bacterial spot (CBS) Sour orange scab Greasy spot Melanose และ Cercospora leaf spot (Schubert and Greg, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจส่วนของพืชที่ยังไม่ได้แสดงอาการได้ โดยเลือกไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง จัดว่าเป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่สับสนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ เช่น Immunofluorescence (IF) สามารถใช้ได้แต่มีข้อจำกัดเพราะไม่มี antibodies ที่ขายเป็นการค้า การใช้ Monoclonal antibodies สำหรับเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เหมาะจะใช้ตรวจเชื้อบริสุทธิ์มากกว่า และความไว ในการตรวจสอบเชื้อต่ำกว่า PCR (Anonymous, 2005)

จากการทดลองตรวจสอบเชื้อ Xac โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี ที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพในการทำ PCR การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 1 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Das (2004) โดยทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ทำซ้ำอีกรอบโดยใช้ chloroform/isoamyl alcohol/phenol (25:24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol แล้ว

ตรวจสอบด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ได้ผลผลิต 197 bp และพบว่ามีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.25 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร และเมื่อทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อเมื่อผสมกับดีเอ็นเอพืชโดยการปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อด้วยการผสมดีเอ็นเอพืชปกติ พบว่าสามารถตรวจได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 2 ตามวิธีของ Llop *et al*. (1999) พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วย PCR ถ้าหากสามารถพัฒนาวิธีการนี้มาใช้ได้จะเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่สะดวกและไม่มีการใช้สารที่มีความเป็นพิษ เนื่องจาก PCR เป็นเทคนิคสำคัญที่นำมาใช้สำหรับวินิจฉัยพืชที่เป็นโรค การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืช แต่ก็มีปัจจัยอีกหลายๆ อย่าง ที่เป็นตัวยับยั้ง การเพิ่มปริมาณด้วย PCR เช่น องค์ประกอบของพืชเป็นตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีโอไทด์ proteins IgG, EPS, phenol, Zn^{2+}, Ca^{2+}, EDTA, และ heparin (Wilson, 1997) รงควัตถุจากพืช และ Cu^{2+} จากสารเคมีในกลุ่มคอปเปอร์ที่ใช้ในการควบคุมโรคซึ่งสามารถทำให้ผลเป็น false negatives นอกจากนี้ยังพบว่า phenolic compound เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ PCR และยังมีองค์ประกอบอื่นๆ เป็นตัวยับยั้งหลังจากที่เซลล์แตก การที่จะขจัดปัญหาการยับยั้ง PCR นั้นต้องใช้วิธี Bio-PCR (Biological and enzymatic amplification) คือการพัฒนานำเอาสารละลายเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ (selective medium) เพื่อกำจัด inhibitor และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุที่มีชีวิตให้มากขึ้นก่อนจากนั้นจึงล้างเอาเซลล์ของเชื้อทุกชนิดที่เจริญบนอาหารใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบด้วย PCR จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคนั้น โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอก่อน (Wang *et al*., 1999) การเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะลดปัญหาการยับยั้งของปฏิกิริยา PCR จากการทดลองเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอ ระหว่างวิธีที่ 1 ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Das (2004) วิธีที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีของ Llop *et al.* (1999) พบว่าวิธีที่ 1 มีประสิทธิภาพดีกว่าเพราะ ในวิธีที่ 1 มีการใช้สารฟีนอลในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ฟีนอลทำหน้าที่กำจัดโปรตีนออกจากสารละลายกรดนิวคลีอิค สุรินทร์ (2545) รายงานว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ทำให้สะอาดปราศจากสิ่งเจือปน เป็นที่นิยมใช้มากที่สุดคือการสกัดด้วยฟีนอล แต่การสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 2 Pablo *et al*. (1999) พัฒนาขึ้นเพื่อลดปัญหาการยับยั้งปฏิกิริยา PCR เพิ่มความไวในการตรวจสอบ และลดการใช้สารที่เป็นพิษในการสกัดดีเอ็นเอ

Hartung *et al*. (1993) ได้ตรวจสอบเชื้อ *X. campestnis* pv. *citri* strains XC62 โดยสกัดดีเอ็นเอด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol แล้วตรวจสอบด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 (5′-CACGGGTGCAAAAAATCT-3′) และไพรเมอร์ 3 (5′-TGGTGTCGTCGCTTG-

TAT 3′) ได้ผลผลิต 222 bp พบว่ามีความไว ในการตรวจสอบเชื้อที่เข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 25 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยของ strains XC63 ที่ตรวจได้ คือ 10 หน่วยโคโลนี/10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์นี้นิยมใช้ตรวจเชื้อ Xac จากชิ้นส่วนของพืช

Cubero and Graham (2001) ตรวจสอบ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วย PCR ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย chloroform/isoamyl alcohol/phenol (25:24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol แล้วตรวจสอบด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1 (5′-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3′) และ J-pth2 (5′-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3′) ได้ผลผลิต 197 bp จากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* type B และ C strains จำนวน 58 strains ตรวจได้ 57 strains มีเพียง strain เดียวเท่านั้นคือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (strain X64) ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ผลผลิตที่ได้ 197 bp เป็นส่วนของยีน *pth* ซึ่งจะพบใน family *Xanthomonas* เป็นยีนที่เกี่ยวของกับ avirulence-pathogenicity แต่มีความไวต่ำเมื่อตรวจกับชิ้นส่วนของพืช ส่วนไพรเมอร์ J-RXg /J-RXc2 จะเฉพาะเจาะจงต่อส่วนดีเอ็นเอของ *X axonopodis* pv. *citri* โดยไพรเมอร์ J-RXg (5′-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3′) จะเฉพาะต่อส่วนดีเอ็นเอของ *Xanthomonas* ทุก strains ในส่วนปลายด้าน 3′ end ของ J-RXc2 (5′-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3′) จะจำเพาะต่อส่วนดีเอ็นเอของ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่านั้น ผลผลิตที่ได้คือ 179 bp เหมาะที่จะใช้ตรวจกับเชื้อบริสุทธิ์

ณัฏฐิมา (2549) ซึ่งใช้เทคนิค single closed tube nested PCR ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในการตรวจสอบเชื้อที่เข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 5 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของ cell suspension ที่ตรวจได้คือ 10^2 หน่วยโคโลนี/ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ external primer pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/pth3R (GGTGAGGGGGCAGGGGGaGA) และ internal primer D_3 (GGTGTGGTGCCTCGATAGAT)/ D_4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT) ได้ผลผลิต 154 bp

เมื่อตรวจการเข้าทำลายส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งโดยการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี serial dilution โดยการปลูกเชื้อ Xac ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 10^7 และ 10^8 cfu/ml ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่ทำแผลด้วยเข็มฉีดยา เมื่อครบกำหนด 3 4 5 6 และ7 วันหลังปลูกเชื้อนำไปสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีที่ 1 ดัดแปลงวิธีจาก Das (2004) พบว่า PCR สามารถตรวจสอบเชื้อ Xac ได้หลังการปลูกเชื้อ 5 วัน โดยพืชแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำรอบแผลที่ทำการปลูกเชื้อ แม้ว่า PCR จะตรวจได้เมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ แต่ก็ช่วยตรวจได้รวดเร็วและแม่นยำกว่าวิธีการแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อทำการตรวจเชื้อในสภาพแปลงหลังการปลูกเชื้อพบว่า PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ 10 วัน

หลังการปลูกเชื้อ และได้ทำการแยกเชื้อโดยวิธี serial dilution plating บนอาหาร Nutrient glucose agar พบว่าไม่สามารถตรวจเชื้อบนอาหารได้เนื่องจากเชื้อ saprophyte ที่ผิวใบพืชเจริญเต็มหน้าอาหารในเวลา 24 ชั่วโมง

โรคกรีนนิ่งเป็นอีกโรคหนึ่งที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่วินิจฉัยตรวจสอบได้ยาก เพราะไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ การตรวจสอบกรีนนิ่ง เดิมใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมีข้อจำกัดคือใช้เวลานาน อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และต้องใช้เวลาในเตรียมตัวอย่าง ต่อมามีการนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา (serological) มาใช้ในการตรวจสอบแต่ไม่พัฒนามากนักเพราะยากที่จะผลิต specific antibodies จากแบคทีเรียที่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารได้ (uncultivated organism) มีความผันแปรของ antigen ในการจับกับตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อสาเหตุได้ (Wang *et al*., 2006) มีการพัฒนา DNA probes ขึ้นมา 2 ชนิดเพื่อตรวจ *Candidatus* L. africanus และ *Candidatus* L. asiaticus แต่ความไวของเทคนิค dot-blot hybridization PCR ใกล้เคียงกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Li and Levy, 2006) มีการนำ PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อ เช่น การใช้ ไพรเมอร์ OI1/OA1/OI2C ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วน 16S rDNA หรือใช้ ไพรเมอร์ A2/J5 ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วน ribosomal protein gene ซึ่ง PCR เป็นเทคนิคที่ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง ในการตรวจเชื้อ Liberobacter เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง species (Timmer *et al.*, 2000) ต่อมา National Plant Germplasm and Biotechnology Laboratory (NPGBL) ได้มีการพัฒนาเครื่อง Real-time PCR (qPCR)ใช้ plant cytochrome oxidase (COX) เป็น primer-probe เพื่อเพิ่มความเร็วในการตรวจสอบและมีความไวสูง อีกทั้งช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนได้ และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้ออื่น หรือ endophytes ที่อยู่บริเวณผิวพืช ถึงแม้ว่าการใช้เครื่อง Real-time PCR ในการตรวจสอบเชื้อจะมีประสิทธิภาพมาก (Li and Levy, 2007) แต่ก็มีข้อจำกัดที่ราคาของ Taqman probe และเครื่อง Real-time PCR นั้นแพงมาก เมื่อเทียบกับเครื่อง Thermal cycler ทั่วไป

การทดลองนี้ได้ใช้ PCR มาทำการตรวจเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว และแม่นยำในการตรวจอีกทั้งมีค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยทำการตรวจสอบส้มโอจากสวน อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม ซึ่งเป็นแหล่งปลูกส้มโอที่สำคัญแหล่งหนึ่ง โดยเก็บตัวอย่างใบส้มโอและส้มพันธุ์ต่างๆที่มีอาการใบด่าง จำนวน 9 ต้น ต้นละ 4 ตัวอย่าง รวม 36 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 1 ดัดแปลงวิธีจาก Das (2004) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย PCR ใช้ไพรเมอร์ A2/J5 พบว่ามีการติดเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ส้มโอพันธุ์ทองดี 2 ต้น จำนวน 3 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 4 ต้น จำนวน 16 ตัวอย่าง ในส้มโอพันธุ์ขาวทองดี 2 ต้น จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 2 ต้น จำนวน 8 ตัวอย่าง ในส้มโชกุน 1 ต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 1

ต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง ส้มซ่า 1 ต้น จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 1 ต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าในตัวอย่างที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมาก พืชจะแสดงอาการผิดปกติอย่างชัดเจน ยอดเรียวเล็กลง สีของแผ่นใบเป็นสีเหลืองในขณะที่เส้นกลางใบยังมีสีเขียวอยู่ ใบแก่พบลักษณะใบด่างเป็นจ้ำกระจายทั่วแผ่นใบ มีลักษณะหยาบแข็งและม้วนงอลง จากการทดลองนี้ ได้ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งในสวนของเกษตรกรที่สงสัยว่ามีโรคระบาดอยู่ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถบอกประสิทธิภาพในการตรวจผลได้ เนื่องจากไม่ทราบจำนวนต้นที่เป็นโรคอย่างแท้จริง จึงควรทำการทดลองเปรียบเทียบโดยใช้ไพรเมอร์และวิธีสกัดต่างๆ ที่มีรายงานการตรวจเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยการใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ดังนี้ ในประเทศ Bhutan มีรายงานการใช้ ไพรเมอร์ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งจากส้ม mandarin ซึ่งใช้การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี DNeasy Plant Mini Kit พบแถบดีเอ็นเอ 700 bp ยืนยันผลโดยการนำผลผลิตของ PCR ที่ได้โคลนในเวคเตอร์ pGEM-T easy ซึ่งได้ 703 นิวคลีโอไทด์ (Ahlawat and Baranwal, 2003) Hong *et al*. (2002) ใช้ ไพรเมอร์ A5/J5 และไพรเมอร์ OA1-OI1 และ OI2c ตรวจสอบส้มพันธุ์ต่างๆ 15 พันธุ์ ที่เก็บจาก Tien giang Dong thap Vinh long และ Can tho สกัดดีเอ็นเอด้วย Wizard extraction พบว่าตรวจได้ ทั้ง 2 ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ A2/J5 ตรวจได้ 11 ตัวอย่าง และไพรเมอร์ OA1-OI1 และ OI2c ตรวจได้ 10 ตัวอย่าง Truc and Hong (2004) ใช้ ไพรเมอร์ A2/J5 ตรวจสอบส้มโอ, sweet orange, mandarin และ lemon ที่เก็บจาก Tan Phu Thanh ทั้งหมด 24 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอด้วย Wizard extraction พบว่ามีการติดเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ทั้ง 24 ตัวอย่าง Wang *et al*. (2006) ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งด้วย PCR ในประเทศจีนโดยเก็บใบที่แสดงอาการของโรคในลักษณะต่างๆ รวมทั้งใบที่ไม่แสดงอาการรวม 443 ตัวอย่าง สกัดด้วย modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ใช้ไพรเมอร์ LAA2/LAJ5 (ซึ่งเป็น ไพรเมอร์เดียวกันกับไพรเมอร์ A2/J5) ผลคือสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้ 113 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นใบที่แสดงอาการใบด่าง (mottled leaf) พื้นที่ใบที่แสดงอาการด่างคิดเป็น 96.50% ของส้มโอ(*Citrus maxina*) และ sweet orange (*Citrus sinensis*) varieties Hamlin Valencia และ Pineapple จากการตรวจวินิจฉัยอาการของโรคกรีนนิ่งทั้งหมด 330 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจได้เพียง 43 ตัวอย่างเท่านั้น ได้แก่ อาการใบเหลืองหรือเส้นกลางใบเป็นสีเหลือง จาก 205 ตัวอย่าง ตรวจได้ 28 ตัวอย่าง (13.66%) อาการคล้ายขาดธาตุสังกะสี (zinc deficiency) จาก 48 ตัวอย่าง ตรวจได้ 11 ตัวอย่าง (22.90%) อาการใบเล็กเหลือง (yellowing small leaves) จาก 16 ตัวอย่าง ตรวจได้ 2 ตัวอย่าง (12.50%) แต่พบว่าตรวจใบที่ยังไม่แสดงอาการ (symptomless leaves) จาก 61 ตัวอย่าง ตรวจได้ 2 ตัวอย่าง (3.28%) Hocquellet *et al*. (1999) ตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus และ *Candidatus* L. africanus ด้วยไพรเมอร์ A2/J5 ใน sweet orange พบว่ามีความแตกต่างกันทาง geographical strains ทั้ง 2 สายพันธุ์ เพราะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 650 bp ใน *Candidatus* L. africanus สายพันธุ์ Nelspruit, South Africa และ Mauritius 23 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ประมาณ 700 bp ใน *Candidatus* L. asiaticus ใน อินเดีย (Poona) จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย Mauritius strain 79 Nepal Reunion ไต้หวัน เวียดนาม และ จ. นครปฐม ในประเทศไทย เมื่อนำผลผลิตที่ได้จาก PCR ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนส่วน β-operon ของ *Candidatus* L. ทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่า *Candidatus* L. africanus สายพันธุ์ Nelspruit ได้แถบขนาด 669 bp และ *Candidatus* L. asiaticus สายพันธุ์ Poona ได้แถบขนาด 703 bp นอกจากนี้ยังมีการนำไพรเมอร์อื่นๆ มาใช้ในการตรวจ เช่น Jagoueix *et al*. (1996) ตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งด้วย PCR และทำการเปรียบเทียบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ universal primer fD1/rP1 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ส่วนไพรเมอร์ OI1/OI2c, OI2c/ OA1 และ OI2c/OI1/OAI ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1160 bp แต่พบว่าไพรเมอร์ OI2c/OA1 จะเกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะกับ *Candidatus* L. asiaticus นอกจากนี้ยังได้แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสองชนิดนี้ โดยการย่อย ผลของผลิต PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* พบว่า *Candidatus* L. asiaticus เมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ 520 506 และ 130 bp ส่วน *Candidatus* L. africanus ตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 640 และ 520 bp นอกจากนี้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันยังมีผลต่อผลผลิต PCR จากการทดลอง Nakashima *et al*. (1995) ได้สรุปวิธีการสกัดแยกดีเอ็นเอได้ภายใน 20 นาที โดยตัดเส้นกลางใบที่แสดงอาการเป็นชิ้นเล็กๆ เติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า 5 นาที เติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหญ่ เติมสารละลาย isopropanal ปริมาตร 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ นาน 5 นาที เก็บตะกอนละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร Jagoueix *et al*. (1996) เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี วิธีที่ 1 สกัดด้วย NaCl และวิธีที่ 2 สกัดด้วย Wizard miniprep DNA purification resin พบว่าวิธีที่ 1 สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ผลไม่คงที่ ส่วนวิธีที่ 2 จะให้ผลคงที่และดีกว่า อรอุมา (2548) เปรียบเทียบวิธีสกัด 5 วิธี 1 คือ วิธีที่ 1 การสกัดด้วย NaCl ดัดแปลงจาก Jagoueix *et al*. (1996) วิธีที่ 2 ดัดแปลงจาก Jagoueix *et al*. (1996) สกัดด้วย TE buffer ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol วิธีที่ 3 ดัดแปลงจาก Hung *et al*.(1999) สกัดโดยใช้ DNA extraction buffer, NaCl และ CTAB ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 2 ครั้ง แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol วิธีที่ 4 ดัดแปลงจาก Dellaporta *et al*. (1983) โดยแช่ตัวอย่างและบดด้วย grinding buffer จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย chloroform/isoamyl alcohol(24:1) แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol วิธีที่ 5 ดัดแปลงจาก Nakashima *et al*. (1995) สกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยอิเล็คโตรโฟรีซีส พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้

ในแต่ละวิธีมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ และเมื่อนำดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่ามีอัตราส่วนของค่า OD260/OD280 ของทั้ง 5 วิธี อยู่ในช่วง 0.9-1.4 แสดงให้เห็นว่าทุกวิธีที่ใช้มีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่บ้าง เนื่องจากไม่ได้ใช้ฟีนอลในการตกตะกอน เมื่อคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอพบว่าวิธีที่ 3 ให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากที่สุด ในการทดลองนี้วิธีการสกัดคล้ายวิธีที่ 3 ของ อรอุมา ต่างกันที่หลังจากทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) แล้วทำซ้ำอีกรอบโดยใช้ chloroform/isoamyl alcohol/phenol (25:24:1) พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ A2/J5 สามารถตรวจเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างที่เก็บมาจาก อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม เมื่อนำผลผลิตที่ได้จาก PCR ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของส่วน β- operons พบว่ามีความเหมือนกับ *Candidatus* Liberibacter asiaticus (DQ157277.1) ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ถึง 98% (querycoverage) 93%(maxident) และพบความเหมือนกับ *Candidatus* Liberibacter africanus (U09675.1) 56% (querycoverage) 81%(maxident) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Candidatus* Liberibacter ที่ตรวจพบใน อ. นครชัยศรี จ. นครปฐมเป็นเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus เนื่องจาก DNA homology ของจีโนมมีแนวโน้ม สูงกว่า 70% ซึ่งเป็นระดับต่างสปีชีส์ของเชื้อ (Wayne *et al*.,1987) อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบโดยใช้ ไพรเมอร์อื่นร่วมด้วยเพื่อยืนยันโดยเฉพาะในตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ เช่นไพรเมอร์ OI1/OI2c ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16Sr DNA ของ *Candidatus* L. asiaticus เท่านั้น และถ้าต้องการจะตรวจเชื้อสาเหตุในระดับปริมาณเชื้อที่ต่ำได้ควรเลือกใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งได้ 20 นาโนกรัม จากเส้นกลางใบที่แสดงอาการ จากการสกัดดีเอ็น เอด้วย standard extraction method อัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อต่อดีเอ็นเอของพืช 1:1000 และพบว่าจำนวนเชื้อที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบของส้ม sweet orange ที่แสดงอาการประมาณ 2.5×10^{7} เซลล์/กรัมใน *Candidatus* L. asiaticus และ 2.0×10^{6} เซลล์/กรัมใน *Candidatus* L. americanus (Li and Levy, 2007) Li *et al*. (2006) ใช้ Real-time PCR ด้วยวิธีการ TaqMan โดยการใช้ primer probe ชุด HLBaspr และ HLBampr มีความไวมากสามารตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อจากเนื้อเยื่อของเส้นกลางใบได้ 20 นาโนกรัม ของพืชที่อยู่ใน greenhouse และ 500 นาโนกรัม ของพืชที่อยู่ในแปลงทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับ PCR โดย Hong *et al*. (2002) ทดสอบความแตกต่างของอัตราส่วน ระหว่างใบที่เป็นโรคและใบปกติ 5 ระดับของเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus คือ 1:0 1:1 1:10 และ 1:100 ด้วยไพรเมอร์ A2/J5 พบว่าสามารถตรวจได้ 1:100 ส่วน และตัวอย่างใบที่ตรวจพบเชื้อแสดงอาการใบด่าง

PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจและวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการวินิจฉัยโรคโดยดูจากอาการเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำได้ เนื่องจากส้มแต่ละชนิดจะแสดงอาการได้มากน้อยต่างกัน สายพันธุ์ของส้มมีผลต่อการแสดงออกของอาการของโรค จากรายงาน

Su (2001) เชื้อกรีนนิ่งสายพันธุ์เอเชียที่แยกได้จาก ส้ม mandarin ชักนำให้เกิดอาการรุนแรงกับส้ม mandarin และ ส้ม sweet orange แต่จะชักนำให้เกิดอาการได้น้อยในส้มโอ เมื่อแยกเชื้อสาเหตุจากส้มโอที่แสดงอาการรุนแรง ชักนำให้เกิดอาการรุนแรงกับส้มโอ แต่จะชักนำให้เกิดอาการได้น้อยใน ส้ม mandarin และ ส้ม sweet orange แต่บาง isolate ที่แยกได้จากส้มโอก็ทำให้เกิดอาการรุนแรงทั้ง ส้มโอ ส้ม mandarin และ ส้ม sweet orange จากการทดลองนี้ซึ่งทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างส้มโอ และส้มสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งไม่สามารถตรวจ และวินิจฉัยโรคจากอาการที่พืชแสดงได้ เมื่อนำมาตรวจด้วย PCR จึงสามารถยืนยันผลได้ว่ามีการระบาดของโรคกรีนนิ่งในสวนส้มโอที่ทำการทดลอง การตรวจวินิจฉัยการเป็นโรคของต้นส้มตลอดจนพืชอาศัยของโรค การควบคุมแมลงพาหะจัดเป็นวิถีทางที่มีประสิทธิภาพ และส่งผลดีต่อการควบคุมและกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เทคนิคการตรวจสอบโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ที่ทันสมัย รวดเร็ว มีความแม่นยำและนิยมในหลายๆ ประเทศในปัจจุบัน คือการใช้ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลและด้านพันธุกรรมเป็นพื้นฐาน

ผลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์และโรคกรีนนิ่งได้ โดยใช้ PCR เพื่อตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อสาเหตุที่แท้จริง และหาแนวทางในการป้องกันที่ถูกต้องเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค

สรุป

การตรวจเชื้อ Xac จากตัวอย่างส้มโอ ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ซึ่งเป็น universal primer มีความจำเพาะกับบริเวณยีน *pth* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 197 bp เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าเชื้อสายพันธุ์ Xci33 มีความเหมือนกับเชื้อ Xac ที่มีรายงานไว้ 100% ส่วนไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2 ซึ่งเป็น specific primer ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับบริเวณ rDNA ของ Xac เท่านั้น พบแถบดีเอ็นเอขนาด 197 bp ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มน้อยกว่าการเพิ่มปริมาณด้วย ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 เมื่อทดสอบทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xac สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ Xci12 (มะนาว) Xci21 (ส้มสายน้ำผึ้ง) Xci42 (มะกรูด) และเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xcv) สายพันธุ์ XCV1-2 เชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 197 bp เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ Xac ทุกสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และ J-Rxg/J-RXc2 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 197 bp เมื่อทดสอบดีเอ็นเอของเชื้อ Xcv สายพันธุ์ XCV1-2 โดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 และไม่พบแถบดีเอ็นเอของ เชื้อ Xcv เมื่อใช้ไพรเมอร์ J-Rxg/J-RXc2

เมื่อทดสอบความไวของ PCR ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเชื้อที่สามารถตรวจได้เท่ากับ 1.25 พิคโคกรัม/ไมโครลิตร และสามารถตรวจระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อผสมกับดีเอ็นเอพืชปกติ และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม /ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ทั้ง 2 สามารถตรวจเชื้อในระดับความเข้มข้น 10^6 10^7และ10^8 cfu/ml หลังปลูกเชื้อลงบนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เป็นเวลา 5 วัน ในห้องปฏิบัติการ ทั้งที่ใช้น้ำหนักใบ 0.20 และ0.30 กรัม ซึ่งเป็นระยะที่ใบเริ่มแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อ สำหรับในแปลงทดลอง เมื่อทำการปลูกเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8cfu/ml โดยการฉีดพ่น เมื่อตรวจเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์ J-pth1/J-pth2 สามารถตรวจเชื้อได้ในระยะเวลา 10 วัน หลังการปลูกเชื้อ ซึ่งเป็นระยะที่ใบแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อเช่นกัน โดยตรวจพบเชื้อ Xac ในส้มโอ 3 ต้น จากตัวอย่างทั้งหมด 7 ต้น หลังปลูกเชื้อ 10 วัน สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุเพิ่มขึ้นเป็น 6 ต้น หลังปลูกเชื้อ 12 วัน และวันหลังการปลูกเชื้อ 14 และ 17 วัน สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุได้ทั้ง 7 ต้นที่ทำการทดลอง

จากการตรวจหาเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus สาเหตุของโรคกรีนนิ่งในสวนส้มโอ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม จำนวน 36 ตัวอย่าง ด้วย PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุในส้มโอพันธุ์ทองดี 2 ต้น จำนวน 3 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 4 ต้น จำนวน 16 ตัวอย่าง ในส้มโอพันธุ์ขาวทองดี 2 ต้น จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 2 ต้น จำนวน 8 ตัวอย่าง ในส้มโชกุน 1 ต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 1 ต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง ส้มซ่า 1 ต้น จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บ 1 ต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในสวนส้มโอ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม มีความเหมือนกับเชื้อ *Candidatus* L. asiaticus ที่มีรายงานไว้ 98%

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2542. **เอกสารแนะนำการปลูกส้มปลอดโรค**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พระธรรมขันต์, ขอนแก่น.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **โรคแคงเกอร์ของส้มโอ**. กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.

คนึงนิตย์ เหรียญวรากร. 2527. **โรคของส้มโอและการผลิตพันธุ์ส้มโอให้ปราศจากโรค.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จรัญ รุ่งจิตร. 2545. **การผลิตกิ่งพันธุ์ส้มเขียวหวานปลอดโรคกรีนนิ่ง.** แหล่งที่มา: http:// www. geocities.com/psplant/ps_seminar_Jaran.htm, 15 กรกฎาคม 2548.

จุฑามาศ อ่อนวิมล. 2547. **สวนส้ม**. สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น, กรุงเทพฯ.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2549. **การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยเทคนิค Single closed tube nested PCR**. แหล่งที่มา: http://www.scisoc.or./th/stt/32/sec_f/paper/stt32_F_F0049.pdf, 25 ธันวาคม 2549.

ทวีศักดิ์ ด้วงทอง. 2549. **ส้มโอไม้ผลเศรษฐกิจ**. แหล่งที่มา: http://web.ku.ac.th/agri/somo2/so1.htm, 25 ธันวาคม 2549.

บรรณ บูรณะชนบท. 2541. **สวนส้มโอ.** พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, นนทบุรี.

ปัญญา ธยามานนท์. 2541. **เรื่องส้มโอ.** เอกสารวิชาการที่ 21 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ปัฐวิภา สงกุมาร. 2544. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2538. **รวมกลยุทธ์ส้ม.** เคหการเกษตร, กรุงเทพฯ.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2544. **คู่มือการลงทุนทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ**. ฐานการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

พันธ์ศักดิ์ แก่นหอม และวิภาดา แสงสร้อย. 2547. โรคกรีนนิ่งผลร่วงใบในส้มเกี่ยวพันกันอย่างไรสังเกตได้อย่างไร และแก้ไขอย่างไร. **เคหะการเกษตร** 28(4): 183-188.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2540. เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 22-27 หน้า. *ใน* **เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการอณูชีววิทยาทางโรคพืช เรื่อง การตรวจและวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค Hybridization และ PCR**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

พายัพ ยังปักษ์. 2544. ข้อมูลจำเพาะ. **เมืองไม้ผล** 157(8): 81-82.

ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์. 2545. **ผลไม้ไทยๆ**. สหมิตรพรินติ้ง, กรุงเทพฯ.

ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์. 2546. **หลายเรื่อง-หลากรสไม้ผลไทย.** เคหการเษตร, กรุงเทพฯ.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2545. **โรคใบเหลืองต้นโทรม หรือ โรคกรีนนิ่งของส้ม**. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพ ฯ.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2548. โรคกรีนนิ่งหรือโรคใบเหลืองต้นโทรม. **เคหการเกษตร** 29(11): 26-135 น.

รัตนา สดุดี และ Helen Garnett. 2537. การตรวจหาเชื้อกรีนนิ่งแบคทีเรียในส้มโดยเทคนิคอิมมูโนบรอททิงค์. **ว. สงขลานครินทร์ (ว.ทท.)** 16: 291-300.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. **ปริมาณและมูลค่าสินค้าเกษตรกรรมส่งออก พ.ศ. 2547-2548.** แหล่งที่มา: http: / /www.oae.go.th/statistic/export/QVExp.xls, 18 มกราคม 2550.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

แสงมณี ชิงดวง บูรณี พั่ววงศ์แพทย์ และสุชาติ วิจิตรานนท์. 2545. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดในการควบคุมโรคแคงเกอร์ ของส้มโอที่ จ. พิจิตร **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา** 12(1): 41-42.

อรอุมา เรืองวงษ์. 2548. **การวินิจฉัยและตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberobacter spp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคฮวงลองบิงของส้ม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรพรรณ วิเศษสังข์ และ จุมพล สาระนาค. 2548. โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม. **เคหการเกษตร** 29(8): 206-208.

อุไรวรรณ จิจารณกุล. 2545. **ดีเอ็นเอเทคโนโลยี**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม, กรุงเทพฯ.

Ahlawat, Y. S. and V. K. Baranwal. 2003. **First Report of Citrus Greening Disease and Associated Bacterium "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" from Bhutan**. Available Source http:// www.apsnet.org/pd/searchnotes/2003/0218-01N.asp, April 28, 2003

Alva, A. K., J. H. Graham and C. A. Anderson. 1995. Soil pH and copper effects on young 'Hamlin' orange trees. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 59: 481-487.

Alvarez, A. M., A. A. Benedict, C. Y. Mizumoto, L. W. Pollard and E. L. Civerolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c. citrumelo* with monoclonal antibodies. **Phytopathology** 81: 857-865.

Anonymous. 2002. **Crop Protection Compendium, Global Module**, 4th edition. CAB International Wallingford, UK.

Anonymous. 2003. **Citrus greening bacterium**. Data sheets on Quarantine Pests. Paris. 1-6 p.

Anonymous. 2005. ***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. OEPP/EPPO, Bulletin. Paris. 289-294.

Anonymous. 2007. **Molecular biology**. Available Source http://th.wikipedia.org/wiki/htm, January 10, 2007

Balaraman, K. and R. Purushotman. 1981. Control of citrus canker on acid lime. **South Indian Hort**. 29: 175-177.

Broadbent, P., P. C. Fahy, M. R. Gillings, J. K. Bradley, and D. Barnes. 1992. Asiatic citrus canker detected in a pummelo orchard in northern Australia. **Plant Dis.** 76: 824-829.

Caitlin, J. 2004. **Citrus Industry Biosecurity Plan Pest Risk Review**. Available Source http://www.planthealthaustralia.com.au/citrus/threat_id/threat_id_pdfs/huanglongbing.pdf, April 20, 2004

Chakravarti, B. P., S. Porwal and M. Rangarajan. 1966. Studies on citrus canker in Rajasthan. I. Disease incidence and survival of the pathogen. Labdev. **J.Sci. Tech.** 4: 262-265.

Chung, K. R. and R. H. Brlansky. 2007. **Citrus Diseases Exotic to Florida: Huanglongbing (Citrus Greening).** Available Source http://edis.ifas.ufl.edu/PP133 htm, January 10, 2007

Civerolo, E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. **J. Rio Grande Valley Hortic. Soc.** 37: 127-146.

Cubero, J and J. H. Graham. 2001. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 1257-64.

_____ , _____ and T. R. Gottwald. 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2849-2852.

da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. **Ann. Rev. Phytopathol.** 29: 109-135.

Das, A. K. 2003. Citrus canker – A Review. **J. Appl. Hort.** 5: 52-60.

_____ . 2004. Rapid detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. **Current Science.** 87(9): 1183-1185.

Desai, V. T., S. A. Ranpise, C. V. Pujari and S. B. Raijadhav. 1999. pp. 38-41. *In* **"Saisarbati" promising acid lime cultivar for western Maharashtra**. Proc. Natl. Symp. Citric. Nagpur, Maharashtra.

Dye, D. W., J. F. Bradbury, M. Goto, A. C Hayword, R. A. Lelliot and M. N. Schroth. 1980. International standards for naming pathovers for phytopathogenic bacteria and a list of pathover names and pathotype strains. **Rev. Plant Pathol.** 53: 153-168.

Egel, D. S., J. H. Graham and R. E. Stall. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2724-2730.

Fawcett, H. S. and A. E. Jenkins. 1933. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology** 23: 820-824.

Garnier, M., S. Jagoueix-Eveillard, P. R. Cronje, H. F. Le Roux and J. M. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, Calodendrum capense, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of " *Candidatus* Liberibacter africanus subsp. capensis". **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 2119-2125.

Gernsey, S. M. 1989. Greening, pp. 41-42. *In* J. O. Whiteside, S. M. Garnsey and L. W. Timmer, eds. **compendium of Citrus Disease. APS PRESS**. The American Phytophotological Socity, USA.

Goto, M. 1992. Citrus canker, pp. 170-280. *In* J .Kumar, H.S. Chaube, U.S. Singh and A. N. Mukhopadhyay, eds. **Plant Diseases of International Importance. Volume III. Diseases of Fruit Crops.** Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

Gottwald, T. R. 2000. **Citrus canker**. Available Source http: //www.apsnet.org/education/ lessons PlantPath/CitrusCanker/pathbio.htm, January 10, 2000

_____ and J. H. Graham. 2000. Canker, pp. 5-8. *In* L. W. Timmer, S. M. Garnsey and J. H. Graham, eds. **Compendium of Citrus Diseases** 2nd edn. APS Press. St. Paul, MN.

_____ , G. Hughes, J. H. Graham, X. Sun and T. Riley. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology** 91: 30-34.

Graham, J. H. and T. R. Gottwald. 1990. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology** 80: 190-196.

Graham , J. H., S. Hartung, R. E. Stall and A. R. Chase. 1990. Pathological,restriction – fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. **Phytopathology** 80: 820-836.

_____ , T. R. Gottwald, T. D. Riley and M. A. Bruce. 1992. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. **Phytopathology** 82: 452-457.

_____, _____, _____ , J. Cubero and D. L. Drouillard. 2000. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri (Xcc)* on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). **Proc. Intn. Citrus canker Res. Workshop.** Pierce, Florida.

Hartung, J. S., J. F. Daniel and O. P. Pruvost. 1993. Detection of *Xanthomonas campestnis* pv. *citri* Polymerase Chain Reaction Method. **Appl. Envin. Microbiol.** 12: 1143-1148.

Hocquellet, A., P. Toorawa, J. M. Bove and M. Garnier. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β-operon. **Mole. Cell. Probes** 13: 373-9.

Hong, L.T.T., T.N.T. Nguyen, and T. N. Nguyen. 2002. **Investigation on some factors affectedPCR result in citrus Huanglongbin detection.** Available Source http://www. Sofri.ac.vn/ English/research-program/2000/PCR. pdf, July 22,2002

Hung, T. H., M. L. Wu and H. J. Su. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. **Phytopathology** 147: 599-604.

Jagoueix, S., J. M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR detection of the two *'Candidatus'* Liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Mole. Cell. Probes** 10: 43-50.

Jagoueix, S., J. M. Bove and M. Garnier. 1997. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of " *Candidatus* Liberobacter asiaticum" and *Candidatus*. Liberobacter africanum the two species associated with citrus huanglongding (greening) disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 224-227.

Kale, K. B., J. G. Raut and G. B. Ohekar. 1988. Efficacy of fungicides and antibiotics against acid lime canker. **Pesticid.** 22: 26-27.

Kalita, P., L. C. Bora and K. N. Bhagabati. 1996. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopath.** 49: 234-237.

Kessmann, H., T. Stauv, C. Hoffmann, T. Maetzke and J. Herzog. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Ann. Rev. Phytopathol.** 32:439-459.

Kishun, R. and J. N. Chand. 1987. Studies on germplasm resistance and chemical control of citrus canker. **Indian J. Hort.** 44: 126-132.

Koizumi, M. 1985. Citrus canker: the world situation, pp. 2-7. *In* L. W. Timmer, ed. **Citrus Canker: An International Perspective.** University of Florida, Lake Alfred.

Koizumi, M., E. Kimijima, T. Tsukamoto, M. Togawa and S. Masui. 1996. Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. **Proc. Intn. Soc. Citric.** 1: 340-344.

Krishna, A., and A. G. Nema. 1983. Evaluation of chemicals for control of citrus canker. **Indian Phytopath.** 36: 348-350.

Kubicek, Q. B., E. L. Civerolo, M. R. Bonde, J. S. Hartung and G. L. Peterson. 1989. Isozyme analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri.* **Phytopathology** 79: 297-300.

Kuhara, S. 1978. Present epidemic status and control of citrus canker disease *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. in Japan. **Rev**. **Plant Prot. Res.** 11: 132-142.

Leite, R. P. and S. K. Mohan. 1984. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in soil and in association with some gramineous plants. **Proc. Intn. Soc. Citric**. 2: 365-368.

Li, W., 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.

_____ , and L. Levy. 2007. **Development of Real-Time PCR and Validation of Conventional PCR Assays for Detection Identification of *Candidatus* Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing (Citrus Greening Disease)**. Available Source http: //cphst.aphis.usda.gov/ annualreports/files/ MDB AnnualReport 2005. pdf, April 1, 2007

Llop, P., P. Caruso, J. Cubero, C. Morente and M. M. Lopez. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Methods** 37: 23-31.

Madhavi, M., K. V. Seshadri, G. Subbi Reddy, M.R.S. Reddy, K. Gopal and R. Rao. 2000. Citrus canker, pp. 977-981. *In* S. P. Ghosh and Shyam Singh, eds. **Tenali acid lime - a high yielding canker resistant acid lime clone**. Nagpur, Maharashtra.

McClean, A.P.D. 1970. Greening disease of sweet orange: its transmission in propagative parts and distribution in partially disease trees. **Phytophylactica** 2: 263-8.

Michael, I. 2007. **A short primer on Huanglongbing**. Available Source http://www .flcitrusmutual.com/content/docs/issues/canker/SG_presentation.pdf. htm, January 10, 2007

Mohammadi, M., M. R. Mirzaee and H. Rahimian. 2001. Physiological and Biochemical Characteristics of Iranian Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv.citri, the causal agent of citrus bacterial canker disease. **Phytopathology** 149: 65-75.

Nakashima, K., M. Promintara, Y. Ohtsu and T. Kano. 1995. Detection of 16S rDNA of Thai Isolate of bacterium-like organisms associated with greening disease of citrus. **Annuals of the Phytopathological Society of Japan Abstract** 61(6): 610-612.

Nirvan, R. S. 1961. Citrus canker and its control. **Hort. Adv.** 5: 171-175.

Norman, W.A.S., E. Postnikovaa, H.G.B. Lacy, A. Sechlera, I. Agarkovac, E. Paul, A. Stromberg , K. Verlyn, B. Stromberg and K. A. Vidaver. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones,1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp.nov. nom. rev.; and ‘‘var. *fuscans*’’ of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied. Microbiology** 28: 494-518.

Patel, M. K. and A. C. Padhya. 1964. Sodium arsenite, copper sulphate spray for the control of citrus canker. **Curr. Sci.** 33: 87-88.

Patel, R. S. and M. V. Desai. 1970. Control of citrus canker. **Indian J. Hort.** 27: 93-98.

Planet, P., S. Jagouxie, JM. Bove and M. Garnier. 1995. Detection and characterization of the African citrus greening liberobacter by amplification, cloning and sequencing of the rplKAJL-ropBC operon. **Current Microbiology** 30: 137-41.

Prasad, M.B.N.V., R. Singh, A. Rekha and R. Chand. 1997. Evaluation of lemon cultivars and acid lime x lemon hybrids for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Scientia Hort.** 71: 367-272.

Pruvost, O., C. Boher, C. Brocherieux, M. Nicole and F. Chiroleu. 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under subtropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology** 92: 336-346.

Ram, G., R. S. Nirvan and M. L. Saxena. 1972. Control of citrus canker. **Prog. Hort**. 12: 240-243.

Ramakrishnan, T. S. 1954. **Common Diseases of Citrus in Madras State.** Govt. of Madras publication, Madras.

Rangaswami, G., R. R. Rao and A. R. Lakshaman. 1959. Studies on control of citrus canker with streptomycin. **Phytopathology** 49: 224-226.

Rinaldi, D.A.M.F. and R. P. Leite. 2000. Adaptation *of Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. **Proc. Int. Soc. Citric.** 2: 1064-1069.

Rodriquez, G. S., J. G. Garza- Lopez, J. J. Stapleton and E. L. Civerolo. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. **Plant Dis.** 69: 808-810.

Rao, Y. P. and M. K. Hingorani. 1963. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. **Indian Phytopath.** 16: 362-364.

Sawant, D. M., A. G. Ghawte, J. V. Jadhav and K. G. Chaudhari. 1985. Control of citrus canker in acid lime. **Maharashtra J. Hort.** 2: 55-58.

Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** 2nd ed. APS Press, St Paul (US).

——— , W., E. Postnikova, G. Lacy, A. J. Sechler, I. Agarkova, P. Stromberg, V. Strombuer and A. Vidaver. 2005. Reclassification of *Xanthomonas* species pathogenic on citrus. **Systematic and Applied Microbiology** 28: 494-518.

Schubert, T. and C. Greg. 2007. **Citrus Canker.** Available Source http://www. citrusbmp. ifas.ufl.edu/Canker/Canker%20%20Schubert_files/frame.htm, January 15, 2007

Stall, R. E. 1988. Canker, pp. 6-7. *In* J. O. Whiteside, ed. **Compendium of Citrus Diseases.** American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA

——— , G. M. Marco and B. J. Canteros. 1982. Inportance of mesophyll in mature-leaf resistance to cancrosis of citrus. **Phytopathology** 72: 1097-1100.

——— , J. W. Miller, G. M. Marco and B. I. Canteros de Echenique. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cancrosis of citrus in Argentina. **Proc. Fl. State Hort. Soc.** 93: 10-14.

Su, H. J. 2001. **Citrus Greening Disease**. Available Source http: // www.agnet.org/ Library/ th/2001002/, March 13, 2001

Su, H. J. and H. An-Li. 1990. The nature of Likubin organism, life cycle morphology and possible strains, pp. 106-110. *In* B. Aubert, S. Tontyaporn and D. Buangsuwon, eds**. Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region.** February 4-10, 1990. Chiang Mai, Thailand.

Su, H. J. and S. C. Chang. 1974. Electron microscopical study on the heat and tetracycline responses, and ultra-structure of the pathogen complex causing citrus likubin disease, pp 628-629. *In* Proc.8th **Int. Cong Electron Microscopy** Vol 2 Int. Cong. Electron Microscopy Canberra, Australia.

Tang, Y. Q. and Z. P. Huang. 1991. Study on Biology of Two Primary Parasites of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera : Psyllidae), pp. 91-98. *In* K. Chung and S. B. Osman, eds. **Proceeding of the 6th Internationnal Asia Pacific Workshop of Integrated Citrus Health Management.** Kuala Lampur, Malaysia.

Tally, A., M. Oostendorp, K. Lawton, T. Staub and B**.** Bassi. 1999. Commercial: development of elicitors of induced resitance to pathogens, pp. 357-370. *In* A. A. Agrawal, S. Tuzun and E. Bent, eds. **Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agricutlure**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN

Teixeira , D. A., S. Eveillard, E. C. Martins, W. C. Jesus, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard and J. M. Bove. 2005a. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Mole Cell. Probes** 19: 173-9.

Teixeira, C. Saillard, S. Eveillard, J. L. Danet, da Costa PI, A. J. Ayres and J. Bove. 2005b. '*Candidatus* Liberibacter americanus' associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1857-62.

Teixeira, D.D.C., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W.C.D.J. Juniora, P. T. Yamamotoa, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard and J. M. Bove´. 2005. Citrus Huanglongbing in Sa˜o Paulo State, Brazil: PCR detection of the'*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Mole Cell. Probes** 19: 173-179.

Timmer, L. W., T. R. Gottwald and S. E. Zitko. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. **Plant Dis**. 75: 192-195.

Timmer, L. W., S. M. Garnsey and J. H. Grahameds. 2000. **Compendium of Citrus Diseases.** 2nd ed. Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.

Truc, N.T.N. and L.T.T. Hong. 2004**. Investigation on the present status of citrus Huanglongbin Disease at Tan Phu Thanh village.** Available Source http: // www. ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/ workshop/pro01/ B6-ntnt-investigation. pdf, April 20, 2004

Vauterin, L., P. Yang, B. Hoste, M. Vancanneyt, E. L. Civerolo, J. Swings and K. Kersters. 1991. Differentiation of *Xanthomonas* cam-pestris pv. citri strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis and DNA-DNA hybridization. **Int. J. Sys. Bacteriol.** 41: 535-542.

——, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **Int. J. Sys. Bacteriol.** 45: 472-489.

Verniere, C., J. S. Hartung, O. P. Pruvost, E. L. Civerlo, A. M. Alvarez, P. Maestri and J. Luisetti. 1998. Characterization of phenothyically distinct strains of *Xanthononas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology** 104: 477-487.

Wang, Z. K., J. C. Comstock, E. Hatziloukas and N. W. Schaad. 1999. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi-selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathol.** 48: 245-52.

Wang, Z. Y., Yin. H. Hu, Q. Yuan, G. Peng and Y. Xia. 2006. Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing. **Plant Pathol.** 55: 630-638.

Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Truper. 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 37: 463-464.

Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol** 63: 3741-51.

Zubrzycki, H. M. and D. Z. A. Diamante. 1987. Relationship between the amount of inoculum and the infection caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on citrus seedlings through natural infections in the field, pp. 379-382. *In* W. S. Montengro and C. S. Moreira, eds. **Proceeding of the Fifth congress of the international Society of Citriculture.** Proc. Int. Soc. Citric. Sao Paulo, Brazil.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ต้องเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

5 M NaCl (50 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร NaCl มาจำนวน 14.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

0.5 M EDTA pH8.0 (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร disodium ethylenediamine tetraacetate.2H_2O (EDTA) มาจำนวน 18.612 กรัม ละลายในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1 M Tris-HCl pH8.0 (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร Tris-HCl มาจำนวน 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

TE Buffer (500 มิลลิลิตร)

ตวงสาร 1 M Tris-HCl pH8.0 (stock solution) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับสาร 0.5 M EDTA pH8.0 (stock solution) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Chloroform/isoamyl alcohol (24 :1)(100 มิลลิลิตร)

ตวงสาร Chloroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ผสมกับสาร isoamyl alcohol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10% SDS (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร electrophoresis grade SDS มาจำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

70% Ethanol (475 มิลลิลิตร)

ตวง ethanol 95% ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร

10% CTABใน 0.7 M NaCl (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร NaCl มาจำนวน 0.82 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร เติมสาร CTAB ปริมาตร 10 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

DNA extraction buffer (20 มิลลิลิตร)

สารละลาย DNA extraction buffer 1 ประกอบด้วยสาร ต่างๆ ดังนี้

Stock solution	**volume**	**final concentration**
10% SDS	2 มิลลิลิตร	1% SDS
5.0 M NaCl	1 มิลลิลิตร	150 M NaCl
0.5 M EDTA (pH8.0)	0.6 มิลลิลิตร	50 mM EDTA(pH8.0)
1.0 M Tris-HCl (pH8.0)	2 มิลลิลิตร	50 mM Tris-HCl (pH8.0)

ขั้นตอนการเตรียม ดูดสารละลาย 1.0 M Tris-HCl (pH8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA (pH8.0) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร 5.0 M NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ10% SDS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 20 มิลลิลิตร

สารละลาย DNA extraction buffer 2 ประกอบด้วยสาร ต่างๆ ดังนี้

Stock solution	**volume**	**final concentration**
5.0 M NaCl	1 มิลลิลิตร	250 mM NaCl
0.5 M EDTA (pH8.0)	4 มิลลิลิตร	100 m MEDTA(pH8.0)
1.0 M Tris-HCl (pH8.0)	2 มิลลิลิตร	100 mM Tris-HCl (pH8.0)
10% N-lauroylsarcosine	2 มิลลิลิตร	1% N-lauroylsarcosine

ขั้นตอนการเตรียม ดูดสารละลาย 1.0 M Tris-HCl (pH8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA (pH8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 5.0 M NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ10% N-lauroylsacosine ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 20 มิลลิลิตร

สารละลาย DNA extraction buffer 3 ประกอบด้วยสาร ต่างๆ ดังนี้

Stock solution	**volume**	**final concentration**
40% PVP	1 มิลลิลิตร	2% PVP
10% SDS	1 มิลลิลิตร	0.5% SDS
5.0 M NaCl	1 มิลลิลิตร	250 mM NaCl
0.5 M EDTA (pH8.0)	1 มิลลิลิตร	25 mM EDTA(pH8.0)
1.0 M Tris-HCl (pH7.5)	4 มิลลิลิตร	4 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม ดูดสารละลาย 1.0 M Tris-HCl (pH8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA (pH8.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 5.0 M NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 10% SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 40% PVP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายสำหรับ gel electrophoresis

5X TBE (1 ลิตร)

Tris base	54.0 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5 M EDTA	20.0 มิลลิลิตร

ชั่งสาร Tris base และ Boric acid มาละลายในน้ำกลั่นนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม EDTA pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

1.5% อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรสเจล 0.24 กรัม ละลายใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้สักครู่จึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ค่อยๆ ดึงหวีออก ย้ายแผ่นเจลใส่ในเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส แล้วเติม TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล

2.5% อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรสเจล 0.34 กรัม ละลายใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้สักครู่จึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1ชั่วโมง ค่อยๆ ดึงหวีออก ย้ายแผ่นเจลใส่ในเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส แล้วเติม TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวมณฑิกานธิ์ สงบจิต
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 28 กรกฎาคม 2524
สถานที่เกิด	สระบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์-เกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปีการศึกษา 2547
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ 2549 ทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2547-2548 จากโครงการ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชของส้มโอ