

อารมย์ จันทะสอน 2550: การศึกษาและการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus*
Liberibacter asiaticus) ของส้มในประเทศไทย ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์พนธ์ ทวีชัย, Ph.D.
117 หน้า

โรคกรีนนิ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญกับการปลูกส้มทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงและลดผลผลิต โรคนี้เกิดจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้และเจริญเฉพาะในเซลล์ท่ออาหารของพืช การศึกษาลักษณะอาการ โรคกรีนนิ่งเพื่อใช้วินิจฉัยโรค พบลักษณะอาการที่สำคัญ 2 ชนิดคือ ลักษณะอาการชนิดแรกใบมีลักษณะอาการคล้ายขาดธาตุสังกะสี โดยใบแสดงอาการเหลือง เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และมีอาการแต้มเขียว (blotchy mottle) บนพื้นใบสีเหลือง ส่วนลักษณะอาการอีกชนิดหนึ่งคือใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว ใบหนา มีเส้นกลางใบเขียว ใบมักชี้ตั้งขึ้น ลักษณะอาการดังกล่าวจะพบมากใน ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และส้มเซ่งที่ศึกษา การพัฒนาไพรเมอร์ GB และ GE และตัวตรวจสอบ *rplJ*-DIG ในการตรวจเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA dot blot hybridization (DBH) พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ CLA แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับส้มปกติและเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* *Ralstonia solanacearum* และ *Escherichia coli* ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณชิ้น *rplJ* ของเชื้อ CLA ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 513 คู่เบส โดย PCR ทำการโคลนชิ้น *rplJ* และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยขึ้นทะเบียนที่ GenBank หมายเลข DQ852665 เมื่อนำไพรเมอร์และตัวตรวจสอบไปตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างส้มที่แสดงอาการดังกล่าวข้างต้นจากจังหวัดต่างๆ 65 ตัวอย่างเป็นโรค 100% ทั้งสองวิธีการ ทำการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RPLJ ที่มีขนาด 45 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีน GST จากพลาสมิดพาหะและโปรตีน RPLJ จากเชื้อ CLA ที่มีขนาด 27 และ 18 กิโลดาลตัน ตามลำดับในเชื้อ *E. coli* ทำการสกัดโปรตีน GST-RPLJ บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* เพื่อไปผลิตแอนติซีรัมในกระต่ายพันธุ์ New Zealand White ได้แอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์ 1:10,000 โดยสามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีน RPLJ ของเชื้อ CLA ได้น้อยที่สุด 10 นาโนกรัม และมีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CLA โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียและไวรัสของส้มโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) นับเป็นรายงานครั้งแรกของการผลิตแอนติซีรัมจากโปรตีนที่ได้จากยีนของเชื้อโรคกรีนนิ่งส้มที่มีความจำเพาะสูงและการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลเช่นเดียวกับไพรเมอร์และตัวตรวจสอบโดยเทคนิค PCR และ DBH ที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคการตรวจสอบโรคทั้ง 3 วิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งและส้มที่ปลูกในประเทศไทยมีเชื้อ CLA เข้าทำลายอยู่ทุกพื้นที่ปลูกส้มที่ศึกษา

อารมย์ จันทะสอน
ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒๗ / ๕๓. / ๒๕๕๐