

อารมย์ จันทะสอน 2550: การศึกษาและการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (*Candidatus*
Liberibacter asiaticus) ของส้มในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์พนธ์ ทวีชัย, Ph.D.
117 หน้า

โรครินนิ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญกับการปลูกส้มทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงและลดผลผลิต โรคนี้เกิดจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้และเจริญอยู่เฉพาะในเซลล์ท่ออาหารของพืช การศึกษาลักษณะอาการโรครินนิ่งเพื่อใช้วินิจฉัยโรค พบลักษณะอาการที่สำคัญ 2 ชนิดคือ ลักษณะอาการชนิดแรกใบมีลักษณะอาการคล้ายขาดธาตุสังกะสี โดยใบแสดงอาการเหลือง เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และมีอาการแต้มเขียว (blotchy mottle) บนพื้นใบสีเหลือง ส่วนลักษณะอาการอีกชนิดหนึ่งคือใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว ใบหนา มีเส้นกลางใบเขียว ใบมักชี้ตั้งขึ้น ลักษณะอาการดังกล่าวจะพบมากใน ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และส้มเซ่งที่ศึกษา การพัฒนาไพรเมอร์ GB และ GE และตัวตรวจสอบ *rpIJ*-DIG ในการตรวจเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA dot blot hybridization (DBH) พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ CLA แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับส้มปกติและเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* *Ralstonia solanacearum* และ *Escherichia coli* ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rpIJ* ของเชื้อ CLA ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 513 คู่เบส โดย PCR ทำการโคลนยีน *rpIJ* 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) นับเป็นรายงานครั้งแรกของการผลิตแอนติซีรัมจากโปรตีนที่ได้จากยีนของเชื้อโรครินนิ่งส้มที่มีความจำเพาะสูงและการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลเช่นเดียวกับไพรเมอร์และตัวตรวจสอบโดยเทคนิค PCR และ DBH ที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคการตรวจสอบโรคทั้ง 3 วิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อวินิจฉัยโรครินนิ่งและส้มที่ปลูกในประเทศไทยมีเชื้อ CLA เข้าทำลายอยู่ทุกพื้นที่ปลูกส้มที่ศึกษา

Arom Jantasorn 2007: Investigation and Detection on Causal Agent of Citrus Greening
(*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Thailand. Master of Science (Agriculture), Major Field:
Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Niphone
Thaveechai, Ph.D. 117 pages

Citrus greening disease is an important disease in citrus cultivation worldwide including Thailand since it cause severe destruction and yield losses. The causal agent is known as *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) and uncultured on synthetic medium, phloem – restricted bacterium. Symptomatological study for diagnosis of the greening disease indicated two typical symptoms in which the first type shows Zn-deficiency like symptom, yellowing of new leaves, and molting with blotchy of fully expanded leaves whereas the other shows reduced, narrow and thick leaves along with green midrib surrounding by yellow area and pointed upright. These symptoms were frequently observed in mandarin, pomelo and sweet orange. Development of GB and GE primers and *rplJ*-DIG probes for detection of citrus greening with polymerase chain reaction (PCR) and DNA dot blot hybridization (DBH) demonstrated that they were specifically reacted with CLA but negative reacted with healthy citrus and bacteria; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. Designed primers could amplify 513 bp fragment of *rplJ* gene of CLA by PCR. The *rplJ* gene was cloned and sequenced and further deposited to GenBank as accession number DQ852665. Detection of citrus showing typical symptoms as above from different growing provinces for 65 samples found that there were 100% positive for both methods. Synthesis of recombinant protein GST-RPLJ of 45 KDa which consisted of GST protein from plasmid vector and RPLJ protein of CLA at the size of 27 and 18 KDa, respectively was done in *E. coli*. Purification of GST-RPLJ from *E. coli* was carried out for antiserum production in New Zealand White rabbit. Antiserum titer was 1:10,000 which was sensitive to detect as low as 10 ng RPLJ protein of CLA and was highly specific to CLA but negative reaction with bacteria and virus pathogen of citrus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). It is the first report for antiserum production from protein antigen of gene from citrus greening pathogen which provided highly specific and detection by ELISA gave equally the same results from developed primers and probes for PCR and DBH techniques. Results from this study demonstrated that all three developed detection methods could be used for diagnosis of citrus greening and citrus grown in Thailand was infected by CLA in all investigated growing areas.

Student's signature

Thesis Advisor's signature