การสำรวจและจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่งในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา
Surveying and Identification Greening like-organism in Thailand by Molecularbiology Technic

นางสาวดารุณี ปุญญพิทักษ์ นางสาวเยาวภา ตันติวานิช
นางสาวบูรณี พั่ววงษ์แพทย์ นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคกรีนนิ่งหรือโรคใบเหลืองต้นโทรมเป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และ มะนาว ต้นส้มที่ได้รับเชื้อแสดงอาการใบเล็กเหลือง ชี้ตั้ง คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ซึ่งการวินิจฉัยโรคด้วยสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ แต่เมื่อนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาโดยเฉพาะ PCR นอกจากจะใช้ในการตรวจสอบโรคแล้วยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อโรคกรีนนิ่งได้อีกด้วย การสำรวจและจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่งจากแหล่งปลูกส้มตามภาคต่างๆในประเทศไทย โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มมือ มะนาว มะนาวสี มะนาวตาฮิติ และ มะกรูด ที่แสดงอาการโรคกรีนนิ่ง จำนวน 98 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบหาเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR ผลปรากฏว่าตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่งจากตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และมะนาว จำนวน 62 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาว จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของพืชตระกูลส้มมาทำการโคลนนิ่ง และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw ตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาวทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม *Candidatus* Liberibacter asiaticus

---

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-33-51

คำนำ

โรคกรีนนิ่งหรือโรคใบเหลืองต้นโทรมเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม กำลังสร้างปัญหาและความเสียหายให้กับหลาย ๆ ประเทศที่ปลูกส้มอย่างมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่อยู่ในแถบทวีปเอเชียมากถึง 16 ประเทศด้วยกัน เช่น จีน ไต้หวัน พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย เนปาล ศรีลังกา บังคลาเทศ ปากีสถาน ซาอุดิอาระเบีย และรวมถึงประเทศไทยด้วย (Garnier and Bove, 1995) เชื้อสาเหตุของโรเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร ซึ่งมีแมลงเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นพาหะนำโรค เป็นโรคที่มีความสำคัญของพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มตรา มะนาว และ มะกรูด ต้นส้มที่ได้รับเชื้อแสดงอาการใบเล็กเหลือง ชี้ตั้ง คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ผลผลิตลดลงไม่มีคุณภาพ และมักจะร่วงก่อนอายุการ เก็บเกี่ยว ต้นส้มจะแสดงอาการทรงกับทรุดอยู่ หลายปีสุดท้ายก็จะตายไปในที่สุด (ไมตรี 2534, 2544) เนื่องจากอาการของโรคคล้ายอาการ ขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคด้วยสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ ดังนั้นการนำเทคนิคทางด้านอนูชีววิทยาโดยเฉพาะ PCR นอกจากจะใช้ในการตรวจสอบโรคแล้วยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อโรคกรีนนิ่งโดยเฉพาะ primer ส่วน 16S rDNA และ 16S/23S intergenic region (Jagoueix *et al*,1994) ปัจจุบันพบว่า เชื้อโรคกรีนนิ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus *Candidatus* Liberibacter africanum และ *Candidatus* Liberibacter americanus (Coletta-Filho *et al*,2004) สำหรับประเทศไทยเชื้อโรค กรีนนิ่งอยู่ในกลุ่ม *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Ohtsu,1998) แต่เนื่องจากพืชตระกูลส้มในประเทศไทยมีความหลากหลาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสำรวจและจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่งภายในประเทศไทยว่าอยู่ในกลุ่ม asiaticus เพียงกลุ่มเดียวหรือไม่ และเพื่อหา strain ของเชื้อโรคกรีนนิ่งในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการหาพันธุ์ต้านทานโรคต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Thermal cycler
2. Gel Documentation UV-transilluminator
3. Gel electrophoresis
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
6. เอ็นไซม์ต่างๆ ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. สืบค้นการจัดจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่ง ซึ่งพบว่า ไพร์เมอร์ในช่วง 16S rDNA และ 16S / 23S rDNA ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่ง จาก strain asiaticus africanum และ americanus จากนั้นสังเคราะห์ไพร์เมอร์จำนวน 2 เส้น

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มชนิดต่าง เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มมือ มะนาว มะนาวสี มะนาวตาฮิติ และมะกรูด ที่แสดงอาการโรคกรีนนิ่งจากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก แพร่ ชัยนาท กาญจนบุรี เพชรบุรี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ตราด จันทบุรี เลย สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ กระบี่ จำนวน 98 ตัวอย่าง

3. สกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1994) และ Nakashima *et al.* (1996) โดยนำเส้นกลางใบของส้มโอ 0.5 กรัม บดในโกร่งกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย 2% CTAB buffer 1 มิลลิลิตร (2% CTAB,1.4M NaCl, 20mM EDTA, 1% Polyvinylpyrrolidone (40,000)) ดูดสารละลายใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนปริมาณ 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าตัวเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดเอาสารละลายส่วนบนที่เป็นของเหลวใสและไม่มีสีเขียวปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่เติมสารละลาย isopropanol 1 เท่า เขย่าให้เข้ากันแล้ว แช่ในตู้เย็น -20 $^{\circ}$C นาน 15-30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เก็บตะกอนที่ได้ คือ ตะกอนดีเอ็นเอ ทำการล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทสารละลายแอลกอฮอล์ทิ้งนำไป ทำให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C

4. ตรวจหาเชื้อโรคกรีนนิ่งและเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ถูกนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ 1.5 % agarose gel ใน 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ นาน 30 นาที นำมาย้อมด้วย 0.1% ethidium bromide 5 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

5. นำ PCR product ที่ได้ไป clone ด้วย pGEM-T easy vector

6. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรคกรีนนิ่งในพืชตระกูลส้ม

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สวนส้มของเกษตรกร จากจังหวัดต่างๆใน ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉลียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและสุ่มเก็บตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มมือ มะนาว มะนาวสี มะนาวตาฮิติ และ มะกรูด ที่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่ง จากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก แพร่ ชัยนาท กาญจนบุรี เพชรบุรี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ตราด จันทบุรี เลย สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ กระบี่ จำนวน 98 ตัวอย่าง แล้วนำมาตรวจสอบหาเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR ผลปรากฏว่า ตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่ง จากตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มเช้ง และตระกูลมะนาว จำนวน 62 ตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาว ที่ตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่ง นำมาโคลนนิ่ง ด้วย pGEM-T easy vector เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้ม โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่แสดงอาการโรคกรีนนิ่ง จากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ จำนวน 98 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่ง จำนวน 62 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาว ที่ตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่ง จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของพืชตระกูลส้มมาทำการโคลนนิ่ง และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw ตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาว ทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม *Candidatus* Liberibacter asiaticus

เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41-47.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2544. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของส้ม. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร การจัดการโรคและแมลงศัตรูส้ม วันที่ 17 ธันวาคม 2544 ณ ห้องประชุม 220 อาคารสุโขทัย สโมสร มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช หน้า 1-18.

Coletta-Filho, H.D., M.L.P.N. Targon, M.A. Takita, J.D. De Negri, J. Jr. Pompeu, M.A. Machado, A.M. do Amaral, and G.W. Muller. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus* Liberibacter asiaticus”) in Brazil. Plant Disease 88: 1382

Garnier, M., N. Danel and J.M. Bove. 1984. The greening organism is a gram negative. In. Proc. 9th Conf. IOCV, Riverside. p.115-124.

Jagoueix, S., J.M. Bove, and M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. Curr. Microbiol. 44: 379-386.

Nakashima, K., M. Prommintara, and Y. Ohtsu. 1996. Detection of 16 Sr DNA of Thai Isolateof Bacterium-like organisms Associated with Greening Disease of Citrus. JIRCAS JournalNo. 3: 1-8.

Ohtsu, Y. Nakashima, K., M. Prommintara and Y. Tomiyasu. 1998. Typical Symptoms of Citrus Greening on Mandarin Trees in Nepal, Supported by Detection and Characterization of Ribosomal DNA of the Causal Organism. Annals of the Phytopathological Society of Japan. Vol. 64, No. 3 p.153-159.