การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

Detection of *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* using Real-time PCR

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครั่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity *(pthA gene)* ผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว(sensitivity) ในการตรวจ ชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของDNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงปลูกส้มโอที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย ด้วยเทคนิค Real time PCR โดย primer D1/D2 และ primer 2/3 จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า primer ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-02-54

คำนำ

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของพืชตระกูลส้ม สามารถเข้าทำลายต้นส้มได้ในทุกส่วนของต้น และมักพบระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน เมื่อเป็นโรคมากๆจะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วงต้นแคระแกรน ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (=*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถแบ่งกลุ่มตามการแพร่ระบาดในแหล่งต่างๆทั่วโลก (geographic distribution) และตามพืชอาศัย (Host rage) และแบ่งตามคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม CBCD-A (Citrus Bacterial Canker Disease – A) เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุดในเอเชีย แอฟริกา หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และในอเมริกาใต้ เชื้อในกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ที่พบระบาดในประเทศไทยเข้าทำลายพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ปลูก และสามารถแพร่ระบาดไปกับผลส้ม มะนาว และกิ่งพันธุ์ โดยเฉพาะกิ่งพันธุ์ถ้ามีโรคนี้ติดไป จะทำให้เกิดการระบาดไปยังต้นอื่นๆได้ ปัจจุบันได้มีการพยายามส่งออกผลส้มออกไปขายยังต่างประเทศ โดยเฉพาะส้มโอ ทำให้จำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้มิฉะนั้นจะไม่สามารถส่งผลส้มไปขายได้ เพราะเชื้อโรคนี้เป็นเชื้อที่สำคัญทางกักกันพืช ในประเทศอเมริกา ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น มีการตรวจสอบการนำเข้าผลส้มหรือกิ่งพันธุ์ส้มอย่างเข้มงวด ในสวนที่ต้องการส่งออกผลผลิตส้มไปยังต่างประเทศไม่ว่าจะเป็นส้มโอ และส้มเขียวหวาน จำเป็นต้องมีการกำจัดโรคให้หมดไปและต้องตรวจแปลงไม่ให้มีโรคในแปลงปลูก วิธีการที่จะป้องกันกำจัดให้ได้ผลดีจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาเชื้ออย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ การวิธีการตรวจหาเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปจะทำการแยกเชื้อและปลูกเชื้อกลับบนต้นอ่อนส้ม ให้ต้นอ่อนส้มแสดงอาการ ต้องใช้เวลาในการตรวจหาเชื้อ 14-21 วัน ซึ่งใช้เวลานานไม่ทันต่อสถานการณ์ บางครั้งต้นส้มอาจเกิดการระบาดของโรคไปแล้ว ถ้ามีวิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์

Roberts และคณะ (1996) ได้รายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas fragariae* สาเหตุโรค angular leaf spot ของ สตอเบอร์รี โดยใช้ specific primer และ nested PCR พบว่า specific primer RST2และ RST3 จากการ design primer จาก *hrp* gene สามารถตรวจหาเชื้อได้ในระดับ 10^4 -10^5 cfu/ml ในขณะที่ใช้ วิธี nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อได้ถึงระดับต่ำ เพียง 18 cell

Hartung และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อ*Xanthomonas campestris* pv. *citri*โดยวิธีเทคนิค PCR โดยใช้ fragment ขนาด 572 bp EcoRI จาก plasmid DNA ของ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* XC62 ที่เชื่อมต่อกับ pUC9 นำไปหาลำดับเบส และ design primer ได้ primer ขนาด 18 bp จำนวน 7 primer นำมาทดสอบโดยใช้เทคนิคPCR กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* และ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ พบว่า มี 4 primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* และไม่เพิ่มปริมาณในเชื้ออื่นๆ และพบว่า primer 2-3 สามารถ เพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* pathotype A

Hartung และคณะ(1996) ได้ศึกษาการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค Immunocapture และ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axodopodis* pv. *citri* โดยใช้ specific primer ในการเพิ่มปริมาณในส่วนของ plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรีย PCR product ที่ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาโดยวิธี immunocapture โดยใช้ monoclonal

antiserum ในการตรวจสอบพบว่า สามารถตรวจหาเชื้อในใบส้มได้ในปริมาณที่ต่ำได้ โดยมีประสิทธิภาพเพิ่มมากกว่าการใช้ nested PCR อย่างเดียวอยู่ถึง 100 เท่า

ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ได้ศึกษาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้คู่ไพรเมอร์ D1(GGCCTTGATCAAAAGAACCA) และ D2(TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ออกแบบจาก pthA gene ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ ทั้งในระดับดีเอ็นเอ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อโดยความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอ เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ตรวจได้คือ 100 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ X. axonopodis pv. citri สายพันธุ์ canker A

Mavrodieva และคณะ (2004) พัฒนาเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงทีเกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถนำไปใช้เครื่อง RAPID machine ที่สามารถพบพาไปใช้ในแปลงปลูกได้ นำไปใช้ตรวจสอบโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆแผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* 10 CFU/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูง ไม่ต้องใช้สารที่เป็นอันตราย สามารถแสดงผลได้ในเวลาอันรวดเร็ว มาปรับใช้ในการตรวจสอบ ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ลดการระบาดของโรคและสามารถหาทางป้องกันกำจัดได้ทันถ่วงที และสามารถนำไปปรับใช้ในงานกักกันพืชต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

การเตรียม DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทำการเตรียม DNA โดยการแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X.*

axonopodis pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน1 ul ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) จำนวน 100 ul ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ul ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ul ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 $^{\circ}$C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) จำนวน 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 $^{\circ}$C จำนวน 378 ul ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 150 ul ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ul วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ให้ได้ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05 , 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR

การเตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* นำแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เลี้ยงในอาหาร LB medium ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วัดความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วย เครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าดูดซับคลื่นแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ 600 nm สารละลายเชื้อที่ได้นำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ทุกความเข้มข้นของ dilution นำไปตรวจที่ปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 50 ul เขี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร Semi-seletive for Xanthomonas (SX medium) (Schaad, 1988) เก็บไว้ที่ 30 ℃ เป็นเวลา 2 วัน ตรวจจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

การตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเกอร์โดยวิธี Real time PCR ต่อไป

ปฏิกริยา Real time PCR การทดสอบปฏิกริยา Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์กับพืชตระกูลส้ม ทดสอบกับเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ซึ่งเป็นสารละลายผสม(Master mix) ทีมี SYBR green ที่มีสี fluorescent dye เป็นตัวตรวจปฏิกริยา Real time PCR ตัวอย่างจะทำปฏิกริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) ในการทำปฏิกริยาจะต้องมี

ตัวควบคุมลบ(negative control) ใช้น้ำกลั่นแทน DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และตัวควบคุมบวก(positive control) ใช้ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทุกครั้ง

การทดสอบปฏิกริยา Real time PCR ใช้ปริมาณรวมของปฏิกริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 uM primer และ 1 ul DNA ของ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยมีโปรแกรม สำหรับปฏิกิริยา Real time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	94	00:04:00	4.40	none
Amplification	40	94	00:00:15	4.40	none
		58	00:00:15	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
		72	00:05:00	4.40	single
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		72	00:01:00	2.20	none
		97	00:00:00	0.11	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

การทำปฏิกริยา Real time PCR ในขณะที่ทำปฏิกริยาเครื่อง LightCycler® 480 จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกริยา Real time PCR ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า background Cp จึงเป็นใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย และบอกได้ถึงปริมาณของผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยถ้ามีผลผลิตPCRเป้าหมายมาก ค่า Cp จะต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์อันที่สองในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมายเพราะว่าค่า melting curve ช่วยในการตรวจสอบการสร้างผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยผลผลิตPCR เป้าหมายที่ได้จากปฏิกริยา Real time PCR ของแต่ละชนิดแบคทีเรีย ให้ลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature (Tm)) เฉพาะตัวแตกต่างกันไป การวิเคราะห์ค่า Tm จึงสามารถใช้ในการจำแนกผลผลิตPCRที่ไม่ใช่เป้าหมายและ primer-dimer ที่เกิดขึ้น การรายงานผลทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับค่า Cp และ การวิเคราะห์ melting curve

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ทั้ง 3 คู่ ใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *citri* ที่ แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆในประเทศไทยจำนวน 50 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) และ เชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* ได้แก่ แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* (ตารางที่ 1) โดย

ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อแคงเกอร์ (sensitivity) ของ primer โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของส้มโอจากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลตัวอย่างโรค โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm. นำตัวอย่างใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *Xanthomonas* (SX media) โดยนำตัวอย่างโรคแคงเกอร์แต่ละตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28^0 C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

specific primer จากการสืบค้นข้อมูลพบ primer มีรายงานว่าสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer ที่ ออกแบบมาจาก ยีน pathogenicity gene *(pthA gene)* ของแบคทีเรีย *X. axonopodis pv. citri* ซึ่ง *pthA gene* พบเฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียชนิดนี้ในการชักนำให้เกิดโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม (Swarup *et al.*, 1991) โดยยีนนี้จะทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Duan *et al.* 1999) ลำดับเบสของ *pthA gene* ถูกอนุรักษ์ไว้ให้เหมือนกันและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อๆ ไป การเลือกprimer ที่ออกแบบจาก *pthA gene* จะทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์กับพืชตระกูลส้ม ในการทดลองจึงได้เลือก primer จำนวน 4 ชุด ดังนี้

1. primer D1(GGCCTTGATCAAAAGAACCA) และD2(TTGAAGTAGGGGACGGTTTA) จากรายงานของ ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ที่ออกแบบจาก *pthA* gene ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A

2. primer 2(CACGGGTGCAAAAAATCT) และ 3(TGGTGTCGTCGCTTGTAT) จากรายงานของ Hartung *et.al* (1993)

3. primer VM3 (GCATTTGATGACGCCATGAC0 VM4 (TCCCTGATGCCTGGAGGATA) จากรายงานของ Mavrodieva et.al (2004)

นำ ลำดับเบสของ primer ทั้ง 4 ชุดไปสั่งสังเคราะห์ primer จาก หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ

การทดสอบ primer จากการทดสอบ primer ทั้ง 3 คู่ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ primer กับ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต้นแบบ (annealing) ที่ 58 °C พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จาก DNA ต้นแบบ โดยมีการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ พบว่า มีค่า Tm ที่แตกต่างกัน โดย Tm ของคู่ primer D1/D2 primer 2/3 และ primer VM3/VM4 คือ 89.03°C , 87.73 °C และ 88.1 °C ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae, X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* โดยให้ค่า Cp สูงกว่า 35 รอบ และการวิเคราะห์ melting curve พบว่าค่า Tm ที่ได้ของแต่ละชนิดแบคทีเรียไม่ตรงกับค่า Tm ที่ได้จากแบคทีเรีย *X . axonopodis* pv. *citri* (ตารางที่ 2; ภาพที่ 2) ผลการทดสอบพบว่า primer 2/3 ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดที่ 18.54 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูง ถึง 36.343 (ภาพที่ 3) ส่วน primer D1/D2 ให้ค่า Cp ต่ำรองลงมาที่ 19.61 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูงเท่ากับ primer 2/3 (ภาพที่ 4) ในขณะที่ primer VM3/VM4 ให้ค่า Cp สูงที่ 23.33 แต่ให้ค่า SYBR green fluorescence สูงที่สุดที่ 42.329 (ภาพที่ 5)

จากผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์เท่านั้น เนื่องจาก primer ทั้ง 3 คู่ออกแบบมาจาก ยีน *pth A* ที่เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะอาการของจุดแผลตกสะเก็ด ปากแผลแตกออกคล้ายปล่องภูเขาไฟ (Swarup *et al.*, 1991) ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์จะมีอยู่เฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* เท่านั้น (Duan *et al.* 1999) โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 50 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ และแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ซึ่งที่พบในประเทศไทย เป็น สายพันธุ์ canker A (ณัฏฐิมาและวงศ์, 2546) ผลการทดสอบได้ผลเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ (Hartung *et al.*,1993; ณัฏฐิมา และคณะ, 2548 และ Mavrodieva *et al.*,2004)

ผลการทดสอบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ของ primer ทั้ง 3 คู่ พบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจเชื้อ *X .axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 5 พิโคกรัม (ตารางที่ 3) และความเข้มข้นของ เซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ 81 CFU/ml (ตารางที่ 4; ภาพที่ 3 และ 4) ในขณะที่ ความไวในการตรวจของ primer VM3/VM4 ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 500 pg (ตารางที่ 3) และความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ $8.1x10^6$ CFU/ml (ตารางที่ 4; ภาพที่ 5) จากผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และprimer 2/3 มีความไวในการตรวจการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่า primer VM3/VM4 โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ primer VM3/VM4 ยังเกิด primer dimers ที่เกิดจากการจับกันเองของ primer ในหลุมที่มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต่ำๆ โดยทำให้เกิดpeak ในการวิเคราะห์ melting curve จำนวน 2 peak อาจเนื่องจากขนาดของผลผลิต PCR มีขนาดเล็ก ทำให้มีโอกาสที่ primer จะจับกันเองสูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ดี (Chou *et al*. 1992)

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ ผลการทดสอบปฏิกริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างส้มโอที่สงสัยว่าเป็นโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาแปลงปลูกส้มโอ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วย primer D1/D2 cและ primer 2/3 พบว่าสามารถตรวจพบโรคแคงเกอร์จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) เช่นเดียวกับการตรวจเชื้อด้วยอาหาร SX ที่พบโคโลนีของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เจริญในอาหาร จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) แต่การตรวจด้วยอาหาร SX ต้องใช้เวลา 3-4 วัน จึงจะทราบผลว่าตัวอย่างใดปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* แต่การตรวจสอบโดยเทคนิค Real time PCR ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยเห็นผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง หน้าจอของเครื่อง Real time ไม่ต้องรอเสร็จสิ้นปฏิกริยา และไม่ต้องนำไปทำ electrophoresis ใน แผ่น agrarose gel และย้อมด้วย ethedium bromide เหมือนกับ conventional PCR ซึ่ง ethedium bromide เป็นสารอันตรายที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ การใช้เทคนิค Real time PCR ทำให้ปลอดภัย เป็นการประหยัดเวลาและสามารถหาทางป้องกันกำจัดได้ทันท่วงที ทำให้ลดการระบาดของโรคและยังสามารถนำไปใช้ในงานตรวจรับรองสินค้าเพื่อการส่งออกได้ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity *(pthA gene)* มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว(sensitivity) ในการตรวจ ชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ

DNA เท่ากับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 CFU/ml นำไปทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเกอร์จากแปลงปลูกส้มโอ ที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 เล่มที่2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.หน้า 932 – 948.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช ปีที่19 ฉบับที่1-2 หน้า 35-46.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J., and Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number mplifications.Nucleic Acids Research. Apr 11, 1992; 20(7)1717

Duan, Y.P., A.L. Castaneda, G. Zhao, and D.W. Gabriel. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. Mol. Plant Microbe Interact. 12: 556-560.

Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P .1993. Detection of Xanthomonas campestris pv. citri by the polymerase chain reaction method. Appl Environ Microbiol ;59:1143-8

Hartung, J. S., Pruvost, O. P ,Villemot I.,and Alvarez, A. 1996. Rapid and colorimetric detection of Xanthomonas axonopodis p.v. citri by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. Phytopathology 86:95-101.

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

Picher, D. G., N. A. Saunders, and R. Owen. 1989. Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156.

Roberts ,P. R., Jone,J. B., Chandler,C. K., Stall,R. E. and Berger, R. D.1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primer and nested polymerase chain reaction . Plant Dis. 80 :1283-1288.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed. American Phytopathological Society , St. Paul , Minnesota.

Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from Xanthomonas citri enables strains from several pathovars of X. campestris to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*				
873	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
950	ส้มฟรีมองต์	เชียงใหม่	2532	1
956	มะนาวไข่	มุกดาหาร	2532	1
967	มะกรูด	ชลบุรี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
1047	ส้มโอ	ปทุมธานี	2533	1
1049	มะนาว	นนทบุรี	2533	1
1055	มะกรูด	นนทบุรี	2533	1
1095	ส้มโอ	เชียงราย	2534	1
1110	ส้มโอ	พัทลุง	2534	1
1123	ส้มโอ	นครพนม	2534	1
1189	ส้มโอ	พิจิตร	2535	1
1582	ส้มโอ	เชียงราย	2544	1
1584	ส้มโอ	พิษณุโลก	2544	1
1588	ส้มโอ	ชลบุรี	2545	1
1619	ส้มเขียวหวาน	จันทบุรี	2545	1
1623	มะนาว	ปทุมธานี	2545	1
1627	ส้มโอ	พิจิตร	2546	1
1628	ส้ม	ชุมพร	2546	1
1629	มะนาว	ตาก	2546	1
1632	ส้มโอ	กำแพงเพชร	2546	1
1720	ส้มตรา	เชียงราย	2547	1
1754	ส้มโอ	สกลนคร	2547	1
1767	ส้มโอ	ตราด	2547	1
1782	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1783	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1784	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1788	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1791	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1805	ส้มโอ	ปัตตานี	2547	1
1814	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1816	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1819	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
1823	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1825	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1826	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1830	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1831	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1832	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1833	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1834	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1841	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1843	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1855	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1856	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1880	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1886	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
1887	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
X. axonopodis pv. *malvacearum*				
1232	ฝ้าย	ปราจีนบุรี	2536	1
X. axonopodis pv. *glycines*				
1330	ถั่วเหลือง	สุโขทัย	2537	1
X. axonopodis pv. *vesicatoria*				
1726	พริก	ลำปาง	2547	1
X. axonopodis pv. *differenbachiae*				
1058	หน้าวัว	กรุงเทพฯ	2534	1
X. campestris pv. *campestris*				
1104	ผักกาดเขียว	สงขลา	2534	1
X. oryzae pv. *oryzae*				
TB0003	ข้าว	นครพนม	2543	1
X. axonopodis pv. *manihotis*				
1682	มันสำปะหลัง	ระยอง	2546	1

1/ หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 ในการตรวจแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Real time PCR

รายชื่อเชื้อ	ค่า Cp ของการตรวจโดยวิธี Real time PCR		
	Primer D1/D2	Primer 2/3	Primer VM3/VM4
X. axonopodis pv. *citri* (50) [1/]	19.61	18.56	23.33
X. axonopodis pv. *malvacearum*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *glycines*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *vesicatoria*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *differenbachiae*	>35	>35	>35
X. campestris pv. *campestris*	>35	>35	>35
X. oryzae pv. *oryzae*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *manihotis*	>35	>35	>35

ตารางที่ 3 ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4

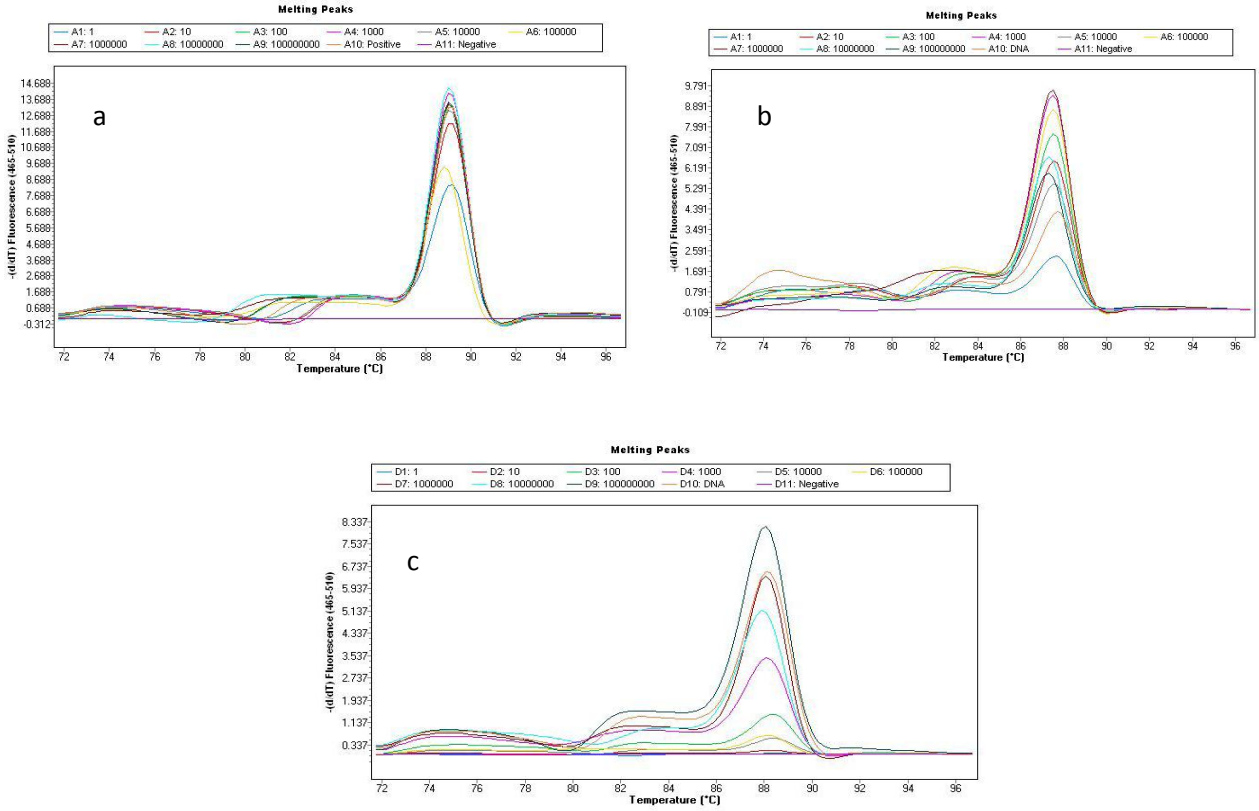
DNA concentration	primers D1/D2	primers 2/3	Primers VM3/VM4
	Cp	Cp	Cp
50 ng	**20.92**	**22.22**	**28.46**
5 ng	**23.08**	**26.00**	**31.65**
1 ng	**25.58**	**29.67**	**32.75**
500 pg	**26.76**	**30.67**	**33.19**
50 pg	**29.02**	**32.36**	**>35**
5 pg	**33.06**	**33.88**	**>35**
1 pg	**>35**	**>35**	**-**
100 fg	**-**	**-**	**-**

ตารางที่ 4 ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเซลล์ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4

Bacterial cells	CFU/ ml	primers D1/D2	primers 2/3	Primers VM3/VM4
		Cp	Cp	Cp
O.D. 0.1 $_{600\ nm.}$	$8.1x10^{8}$	**19.25**	**18.73**	**23.33**
10^{-1}	$8.1x10^{7}$	**23.47**	**22.31**	**25.02**
10^{-2}	$8.1x10^{6}$	**25.15**	**26.09**	**28.17**
10^{-3}	$8.1x10^{5}$	**25.68**	**26.73**	**>35**
10^{-4}	$8.1x10^{4}$	**26.72**	**29.71**	**>35**
10^{-5}	$8.1x10^{3}$	**30.09**	**30.15**	**>35**
10^{-6}	$8.1x10^{2}$	**30.18**	**32.19**	**>35**
10^{-7}	81	**31.61**	**33.63**	**>35**
10^{-8}	8	**35**	**35**	**-**

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างส้มโอที่สงสัยว่าเป็นโรคแคงเกอร์ ด้วยเทคนิค PCR โดย ไพรเมอร์ D1/D2 และการแยกเชื้อด้วยอาหารเฉพาะ Selective for Xanthomonas (SX media)

Sample	Real time PCR		SX media
	Primer D1/D2	Primer 2/3	
	Cp	Cp	
1	29 (+)	28 (+)	+
2	21.65 (+)	20.65 (+)	+
3	29 (+)	28 (+)	+
4	27.08 (+)	26.60 (+)	+
5	33 (+)	32.04 (+)	+
6	34 (+)	33.65 (+)	+
7	20.4 (+)	19.56 (+)	+
8	30 (+)	28 (+)	+
9	29.5 (+)	28 (+)	+
10	28.6 (+)	27 (+)	+

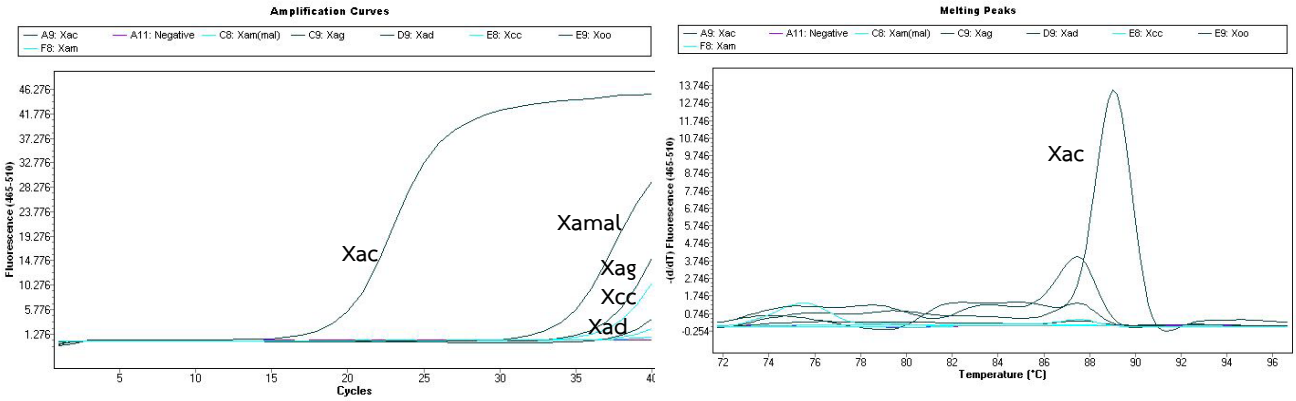


ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ พบว่า มีค่า Tm ที่แตกต่างกัน ดังนี้

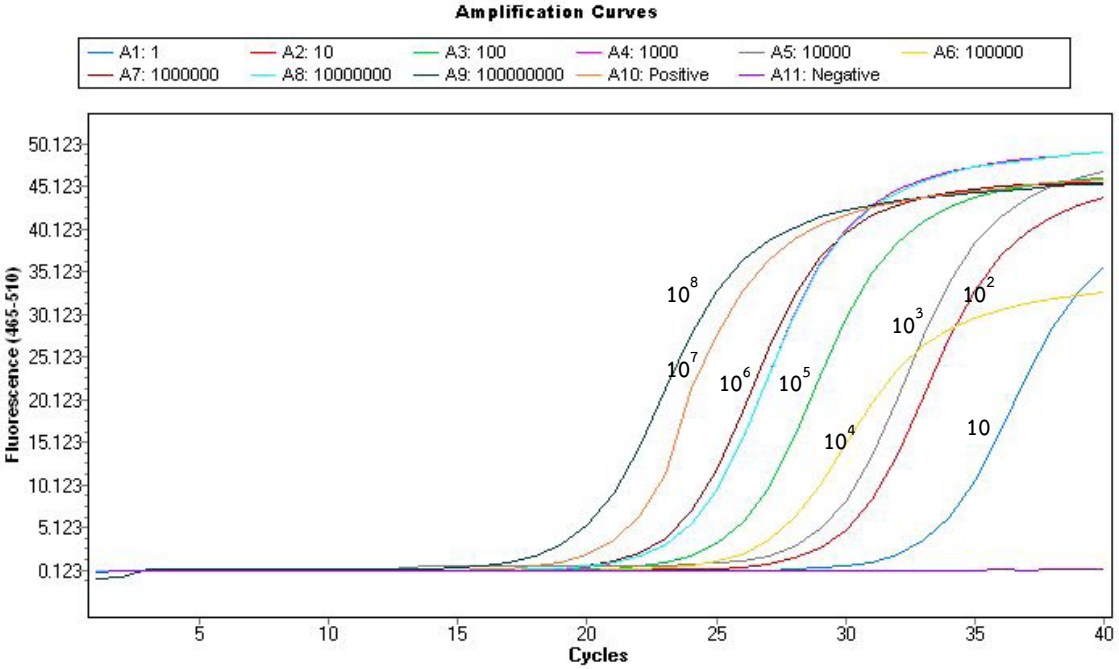
a. Tm ของผลผลิต PCR ของคู่ primer D1/D2 คือ 89.03°C

b. Tm ของผลผลิต PCR ของ primer 2/3 คือ 87.73 °C

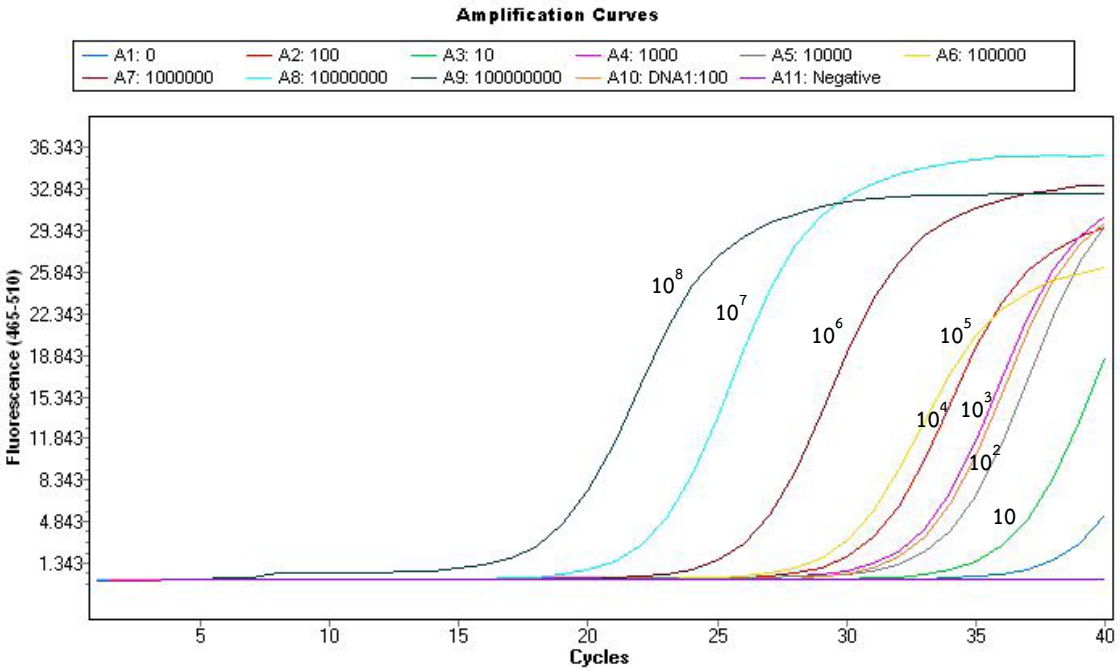
c. Tm ของผลผลิต PCR ของ primer VM3/VM4 คือ 88.1 °C



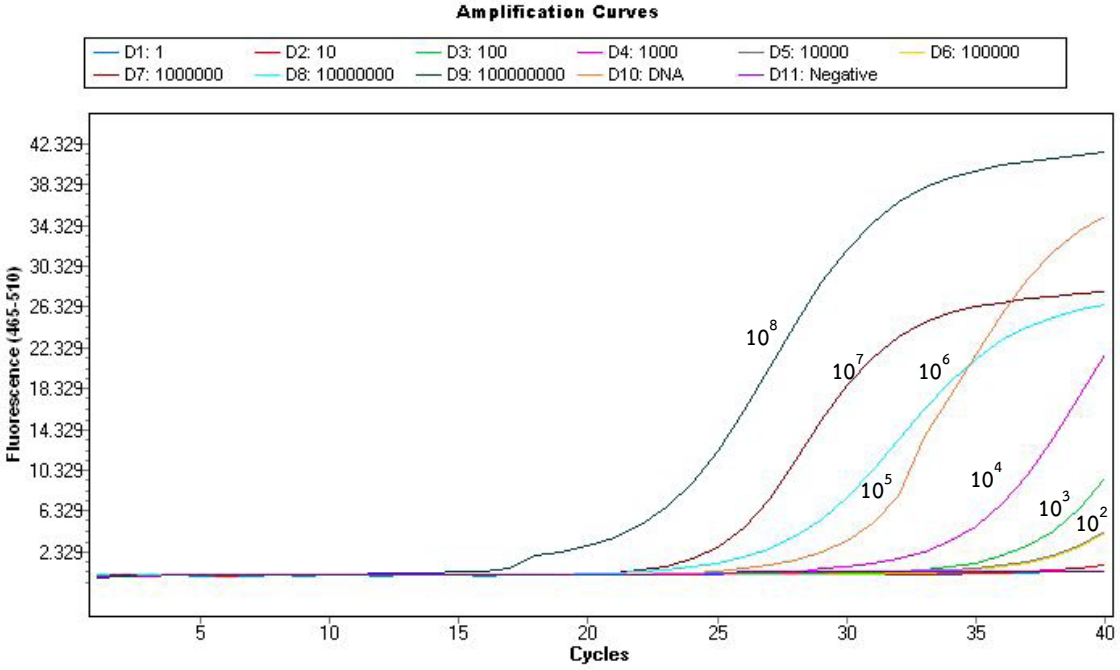
ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer D1/D2 กับ แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) และ เชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* ได้แก่ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xamal), *X. axonopodis* pv. *glycines*(Xcg), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*(Xav), *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae*(Xad), *X. axonopodis* pv. *manihotis*(Xam), *X campestris* pv. *campestris* (Xcc) และ *X. oryzae* pv.*oryzae*(Xoo)



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของ primer D1/D2 ในการตรวจหาเซลล์ของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิคReal time PCR



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของ primer 2/3 ในการตรวจหาเซลล์ของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิคReal time PCR



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของ primer VM3/VM4 ในการตรวจหาเซลล์ของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิคReal time PCR