

การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter species* สาเหตุโรควงลงบิง (กรีนนิง)  
ด้วยเทคนิค Real-time PCR

Detection *Candidatus Liberibacter species* cause of Huanglongbing (Greening)  
disease by Real-time PCR

ดร.ณิ บุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันติวานิช ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### รายงานก้าวหน้า

โรควงลงบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรครีนนิง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus Liberibacter species* เมื่อสัมผัสเชื้อ *Ca. Liberibacter* เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบต่างใบต่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนา และหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม เนื่องจากอาการของโรคมีความหลากหลาย และมีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรควงลงบิง มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยพีชออสัย วิธี ELISA วิธี IF และวิธี PCR แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะทราบผลการตรวจสอบ อีกทั้งเชื้อต้องมีปริมาณมากจึงจะสามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ได้พัฒนามาจากวิธี PCR สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็วถูกต้องแม่นยำ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย หรือ แม้กระทั่งต้นส้มไม่แสดงอาการของโรค แต่ซีจากการทดลอง พบว่าผลการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่และปรับสภาพอุณหภูมิ

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-01-54



## คำนำ

โรคฮวงหลงบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม เนื่องจากโรคนี้สามารถเข้าทำลายส้มทุกพื้นที่ที่มีการปลูกส้มทั่วโลก เช่น ประเทศในทวีปเอเชีย อนุทวีปอินเดีย แอฟริกา อเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus Liberibacter species* ซึ่งมีแมลงเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นพาหะนำโรค (Bové, 2006; Li *et al.*, 2007; Tatineni *et al.*, 2008) สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่า พบโรคฮวงหลงบิงเมื่อ พ.ศ. 2516 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สันนิษฐานว่าน่าจะถูกนำเข้าจากประเทศจีน โดยการลักลอบนำเข้าพันธุ์ส้มต่างๆ จากประเทศจีน (ไมตรี, 2548) เมื่อส้มถูกเชื้อ *Ca. Liberibacter* เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบต่าง ใบต่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนาและหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม (ไมตรี, 2548; Nakashima *et al.*, 1998; Ohutsu *et al.*, 1998; Bove, 2006; Li *et al.*, 2007) เนื่องจากอาการของโรคมีความหลากหลาย และมีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงหลงบิง มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยพีชอาศัย วิธี ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) วิธี IF (Immuno fluorescence test) และวิธี PCR (Polymerase chain reaction) แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาต้องใช้ระยะเวลาอันกว่าจะทราบผลการตรวจสอบ อีกทั้งเชื้อต้องมีปริมาณมากจึงจะสามารถตรวจสอบได้ ส่วนวิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่ได้พัฒนามาจากวิธี PCR สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย หรือ แม้กระทั่งต้นส้มไม่แสดงอาการของโรค ทำให้สามารถกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็วและลดการแพร่ระบาดของโรค

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Real-time PCR
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
4. เอ็นไซม์ต่างๆ ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

## วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species* ด้วยเทคนิค Real-time PCR เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species*
2. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species* จากนั้นทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca. Liberibacter species*
3. สกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบส้มด้วย CTAB buffer
4. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้ข้อมูลในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา
5. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve
6. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจเชื้อ *Ca. Liberibacter species*
7. ทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Ca. Liberibacter species* จากตัวอย่างโรคฮวงลงบิง ที่เก็บจากแปลงปลูก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคฮวงลงบิงจำนวน 10 % จากตัวอย่างส้มทั้งหมดในแปลงปลูก
8. การใช้วิธี Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคฮวงลงบิง ในแปลงปลูก

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช  
สวนส้มของเกษตรกร จากจังหวัดต่างๆใน ภาคเหนือ ภาคกลาง  
ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Ca. Liberibacter species* ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าไพรเมอร์จากลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของเชื้อ *Ca. Liberibacter species* มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Ca. Liberibacter species* จึงได้ทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca. Liberibacter species* ในช่วงนี้ พร้อมทั้งเตรียม

สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อ *Ca.Liberibacter* species จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส้ม นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR และทดสอบความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งจากการทดลองพบว่าผล Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และปรับสภาพอุณหภูมิ เพื่อให้การตรวจสอบมีความชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการการใช้เทคนิค Real-time PCR นำมาตรวจสอบโรคฮวงลองบิง ซึ่งเชื้อสาเหตุคือ *Ca. Liberibacter* species โดยทำการออกแบบ probe และ primer ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ *Ca. Liberibacter* species และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR และทดสอบความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าผล Real-time PCR ที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองยังไม่แน่นอน และไม่ชัดเจน คาดว่าต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่และปรับสภาพอุณหภูมิ ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบมีความชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

### เอกสารอ้างอิง

- ไมตรี พรหมมินทร์. 2548. เอกสารวิชาการ โรคทรุดโทรมของส้มและแนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 88 น.
- Bove', J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Patho.* 88: 7-37.
- Li, W. B., 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.
- Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "*Candidatus* Liberibacter species" associated with citrus huanglongbing. *Plant Dis.* 91: 51-58.
- Nakashima, K., M. Prommintara and Y. Ohtsu. 1998. Detection of citrus greening organism in citrus plants and psylla diaphorina citri in Thailand. *Annals of the Phytopathological Society of Japan.* Vol. 64, No. 3 p.153-159.
- 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.

Tatineni, S. U.S. Shankar, S. Gowda, C. J. Robertson, W.D. Dawson, T. Iwannami and N. Wang. 2008. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real- time PCR. Phytopathology. 98: 592-599.