บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

พืชตระกูลส้ม จัดอยู่ใน family Rutaceae มีสมาชิกจำนวน 130 สกุล และ 1,500 ชนิด จะพบได้ในแถบหนาวและแถบกึ่งร้อนของซีกโลกเหนือและใต้ ส่วนใหญ่มีการกระจายอยู่ในประเทศแอฟริกาตอนใต้และออสเตรเลีย พืชในตระกูลนี้มีทั้งไม้ล้มลุก ไม้ยืนต้น และไม้พุ่ม ใบมีทั้งชนิดใบเดี่ยวและใบประกอบ มีลักษณะแบบนิ้วมือและขนนก ส่วนของใบอาจมีการลดรูปเห็นเป็นหนามด้วย ใบมีการเรียงตัวแบบตรงข้ามหรือสลับ ไม่มีหูใบชัด ต่อมน้ำมันที่ส่วนของใบมีลักษณะโปร่งแสง ดอกเป็นชนิดสมบูรณ์เพศและได้สมมาตรกัน มักเกิดเป็นช่อดอก ส่วนของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกกันอย่างเห็นได้ชัด จำนวนกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีจำนวน 3-5 กลีบเท่านั้น กลีบดอกมีลักษณะแยกกัน บริเวณฐานมีเกสรตัวผู้แทรกอยู่ มีจำนวนเท่ากับกลีบดอก หรือเป็นสองเท่าของจำนวนกลีบดอก มักเรียงตัวกันเป็นสองชั้น บางครั้งอาจพบเกสรตัวผู้ลดรูป รังไข่ที่ฐานของเกสรตัวเมียเป็นแบบ superior ovary คือรังไข่จะอยู่เหนือส่วนอื่นของดอก ลักษณะของรังไข่มีพูเห็นเด่นชัด จำนวน 4-5 ช่อง แต่ละช่องมีรังไข่ 1-2 อัน ผลมีหลายแบบทั้ง berry drupe samara และ capsule คัพภะ (ตัวอ่อน) ภายในเมล็ดมีลักษณะเหยียดตรงหรือโค้ง ส่วนของเมล็ดอาจมีเนื้อเยื่อสะสมอาหารหรืออาจไม่มีก็ได้ เนื้อเยื่อของพืชอาจมีน้ำยางที่มีกลิ่นหอมระเหย (สวนส้ม 2000, 2545)

การจัดจำแนกพืชตระกูลนี้สามารถแบ่งได้เป็น 7 ตระกูลย่อย ซึ่งตระกูลย่อยที่สำคัญที่สุดได้แก่ ตระกูลย่อยของส้ม (orange subfamily) ประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นไม้ผลเศรษฐกิจมากมาย เช่น ส้มต่างๆ (*Citrus* spp.) และผลไม้ที่มีคุณค่าในการเป็นต้นตอของไม้ผลเศรษฐกิจ เช่น มะขวิด (Indian woodapple) มะตูม (Indian bale fruit or bale fruit) และส้มสามใบ (trifoliate orange) (สวนส้ม 2000, 2545) สำหรับส้มที่ปลูกกันอยู่ทั่วไปแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มส้มติดเปลือก *(C. sinensis* Oskeck) หรือ orange เช่น ส้มตรา ส้มเกลี้ยง หรือพวก เนเวล วาเลนเซียที่นิยมปลูกกันในเขตอื่นๆ ทั่วโลกเพื่อการรับประทานสดและอุตสาหกรรมน้ำส้ม กลุ่มส้มเปลือกล่อน (mandarin) หรือพวกส้มเขียวหวานและส้มจุก (*C. recticulata* Blanco) เช่น ส้มเขียวหวานบางมด ส้มโชกุน ส้มนัมเบอร์วัน กลุ่มส้มโอ *(C. grandis* L.) และกลุ่มมะนาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(*C. aurantifolia* Swingle) สำหรับการปลูกส้มเพื่อการค้าในประเทศส่วนใหญ่จะเน้นที่กลุ่มส้มเขียวหวานและส้มโอเป็นสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศมีความต้องการสูง แต่การปลูกส้มชนิดอื่นๆ เช่น ส้มตรา ส้มเกลี้ยงและส้มจุกยังคงมีอยู่ในบางพื้นที่ พันธุ์ส้มที่มีการปลูกในบ้านเรา ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ที่ปลูกกันในปัจจุบันมี 3 ชนิดคือ ส้มเขียวหวานแหลมทอง ส้มเขียวหวานชนิดผิวเรียบ หรือส้มบางล่าง หรือส้มบางมด และส้มเขียวหวานเปลือกค่อนข้างหนา หรือส้มบางบน ส้มโชกุนหรือเพชรยะลา หรือส้มสายน้ำผึ้ง เป็นพันธุ์ที่กำลังได้รับความนิยมและเป็นที่รู้จักกันมากขึ้นในปัจจุบัน ส้มฟรีมองต์ ส้มตรา หรือส้มเช้ง ปัจจุบันมีการปลูกไม่มากนัก ส้มเกลี้ยง ทางภาคเหนือเรียกว่าส้มบ่าเกลี้ยง ส้มคิง ส้มจุก และส้มอื่นๆ เช่น ส้มแซ็ทซูม่า (เปรมปรี, 2545)

โรคฮวงลองบิง (huanglongbing: HLB) หรือกรีนนิ่ง (greening) หมายถึงโรคยอดเหลือง (yellow shoot disease) (Timmer *et al*., 2003) ในประเทศฟิลิปปินส์ เรียก leaf mottling ประเทศอินเดีย เรียก decline ประเทศจีน เรียก huanglongbing ประเทศไต้หวัน เรียก likubin ประเทศอินโดนีเซีย เรียก phloem degeneration ประเทศสเปน เรียก Enverdecimiento (CABI and EPPO, 2003) อย่างไรก็ตามจากการประชุมสัมมนา ครั้งที่ 13 Conference of International Organization of Citrus Virologists ได้เปลี่ยนชื่อเรียก citrus greening เป็น huanglongbing (Ohtsu *et al*., 2002) โรค HLB เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงมาก (Garnsey, 1989) เป็นเชื้อที่เข้าทำลายสีเขียวของพืช (จรัญ, 2545) Timmer *et al.* (2003) กล่าวว่าโรค HLB นี้ทำให้เกิดความเสียหายกับต้นส้มประมาณ 60 ล้านต้นในแถบแอฟริกาและเอเชีย มีรายงานว่าพบโรคนี้ครั้งแรกที่ประเทศแอฟริกาใต้ เมื่อ พ.ศ. 2475 สำหรับประเทศไทยได้มีรายงานการสำรวจพบโรคและแมลงพาหะเมื่อ พ.ศ. 2516 (อำไพวรรณและคณะ, 2527) ประเทศไต้หวันพบโรคนี้เข้าทำลายตั้งแต่ปี 1951 (Hong-Ji, 2001) นอกจากนี้ Weinert *et al.* (2004) พบโรคนี้เป็นครั้งแรกใน Timor-Leate (ติมอร์ตะวันออก) และประเทศปาปัวนิวกินีในปี 2004

อำไพวรรณและคณะ (2527) รายงานว่าพบเชื้อจุลินทรีย์คล้ายเชื้อมายโคพลาสมา (mycoplasma – like organism) รูปร่างไม่แน่นอนในเซลล์ท่ออาหาร จึงคาดว่าน่าจะเกิดจากเชื้อดังกล่าว ส่วนการศึกษาของ Hong-Ji และ An-Li (1990) มีรายงานว่าโรค HLB นี้มีเชื้อสาเหตุจาก fastidious bacteria ซึ่งก็ได้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Moll และ Martin (1973) และ Garnier *et al*. (1984) พบว่าเชื้อสาเหตุเป็นแบคทีเรียที่มี peptidoglycan เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) Jagoueix *et al*. (1994) รายงานว่าพบเชื้อนี้เจริญอยู่เฉพาะในท่อลำเลียงอาหาร (phloem limited bacteria) ไม่สามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ Murray และ Schleifer (1994) ได้จัดเชื้อนี้อยู่ใน subdivision α-Proteobacteria ในกลุ่ม "*Candidatus*" generic name Liberobacter

สามารถจัดกลุ่มของเชื้อสาเหตุได้ ดังนี้

Bacteria; Proteobacteria;
Alphaproteobacteria;
Rhizobiales;
Rhizobiaceae;
Candidatus Liberobacter

เชื้อสาเหตุมี 2 สายพันธุ์ คือ *Candidatus* Liberobacter asiaticum พบในแถบเอเชีย และ *Candidatus* Liberobacter africanum พบในแถบแอฟริกาใต้ อย่างไรก็ตามจากกฎของ *International Code of Nomenclature of Bacteria* เชื้อสาเหตุทั้งสองได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Candidatus* Liberobacter asiaticus และ *Candidatus* Liberobacter africanus (Garnier *et al*., 2000)

การแพร่ระบาดของโรคมีหลายวิธี คือ ติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ กิ่งตอน หรือกิ่งพันธุ์ หรือจากการติดตาทาบกิ่ง นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยแมลงที่เป็นพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดส้ม หรือเพลี้ยไก่แจ้ (psylla) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Diaphorina citri* พบในเอเชีย และ *Trioza erytreae* พบในแอฟริกาใต้ และแมลงพาหะนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังรุ่นลูกได้ (Garnsey, 1989) แมลงพาหะ *D. citri* เมื่อได้รับเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus ภายใน 15-30 นาที ขณะดูดกินอาหารจากต้นที่เป็นโรค ทำให้มีเชื้ออยู่ภายในตัวได้ตลอดชีวิต และประมาณ 21 วันหลังจากได้รับเชื้อแล้วแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นอื่นๆ ได้ ขณะเดียวกันตัวอ่อนในระยะวัย 4 หรือ 5 สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ (CAB Internatioal, 2002) Hung *et al.* (2004) รายงานว่าไม่สามารถตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุ *Candidatus* Liberobacter asiaticus ภายในไข่หรือในช่วงผลิตลูกหลานได้

อาการของโรค HLB พบว่าใบจะมีสีเหลืองซีด หรือมีด่างสีเขียว บางใบเส้นกลางใบยังคงมีสีเขียว ต้นที่เป็นโรครุนแรง ใบจะมีขนาดเล็กลง เรียวยาว ใบมีสีเหลืองซีด ใบหนากว่าปกติ ใบอาจร่วงก่อนแก่ อาจมีอาการเพียงบางกิ่ง หรือเป็นทั้งต้น นอกจากนี้กิ่งอาจแห้งตายจากยอดลงมา ผลมีขนาดเล็กลง มีรสเปรี้ยว เปลือกผลมีสีซีดจางและอาจร่วงก่อนสุก เมล็ดลีบ ไม่สมบูรณ์ เมื่ออาการลุกลามไปทั่วต้นในที่สุดต้นจะโทรม และตายในที่สุด นอกจากนี้บางครั้งอาจพบว่ามีอาการเกิดร่วมกับอาการของโรคทริสเตซ่า (Garnsey, 1989) และอาการของโรคพบว่าคล้ายกับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสีจึงทำให้เกิดความสับสนได้ (Timmer *et al*., 2003) การป้องกันกำจัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ เลือกส่วนขยายพันธุ์ที่ได้ทดสอบว่าปลอดโรคหรือเลือกจากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ ขุดถอนทำลายต้นที่เป็นโรคและควรเผาทำลายเพราะอาจเป็นแหล่งสะสมโรคได้ และป้องกันกำจัดแมลงพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดส้ม หรือเพลี้ยไก่แจ้ โดยการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดแมลง (กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร, 2546) Hung *et al.* (2001) รายงานว่าการควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้นกล้าปลอดโรคและการควบคุมแมลงพาหะเป็นวิธีควบคุมได้ดีที่สุด การกำจัดแหล่งของเชื้อสาเหตุ รวมทั้งต้นส้มที่เป็นโรคและพืชอาศัยอื่นๆ เป็นวิธีที่สำคัญที่สุดในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคในแปลง

Teixeira *et al.* (2004) รายงานว่าพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ในมลรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล โดยการตรวจสอบได้ใช้วิธี PCR ที่ศึกษาในบริเวณ 16S rDNA การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวใช้ primer GB1 (5'-AAGTCGAGTACGCAAGTACT-3') และ GB3 (5'-CTATATTTGCCATCATTAAGTTG-3') และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1027 bp ซึ่งขนาดที่ได้มีความแตกต่างจากเชื้อสาเหตุทั้งสองสายพันธุ์ที่เคยมีรายงาน จึงได้ให้ชื่อเชื้อที่พบนี้ว่า *Candidatus* Liberobacter americanus และพบว่ามีแมลงพาหะ คือ *D. citri*

สำหรับพืชอาศัย (alternant host) ของเชื้อนี้ Garnier และ Bove (1983) รายงานว่าสามารถทำการถ่ายทอดโรคจากฝอยทอง (*Cuscuta campestris*) ไปยังแพงพวย (*Catharanthus roseus*) ได้ นอกจากนี้ Hung *et al.* (2001) รายงานว่า Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) จัดเป็นพืชอาศัยอีกชนิดหนึ่งของเชื้อสาเหตุนี้

Garnier *et al.* (2000) รายงานว่าต้นเกาลัด (Chestnut : *Calodendrum capense*) ที่พบในประเทศแอฟริกาใต้ ที่จัดเป็นพืชในกลุ่ม ornamental rutaceous tree อยู่ในวงศ์ Rutaceae เช่นเดียวกับพืชตระกูลส้ม พบว่ามีอาการใบด่าง (leaf mottle) เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีทาง serology และจากการทำ sequence บริเวณ 16S rDNA บริเวณ intergenic 16S/23S rDNA และบริเวณ ribosomal protein gene ของ β-operon และเมื่อนำผลที่ได้ไปทำ Phylogenetic tree พบว่าเชื้อ liberobacter นั้นมีความแตกต่างจากทั้งสองสายพันธุ์แต่พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Candidatus* Liberobacter africanus มากกว่า จึงให้ชื่อเชื้อที่พบในต้นเกาลัดนี้ว่า *Candidatus* Liberobacter africanus subsp. capensis

การตรวจวินิจฉัยโรคทำได้หลายวิธี ได้แก่ ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) ใช้วิธี enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) (Hung *et al.*, 1999) วิธี DNA – DNA hybridization และวิธี polymerase chain reaction (PCR) (Timmer *et al.*, 2003) นอกจากนี้ McClean (1970) และ Huang (1979) กล่าวว่าการตรวจหา greening fastidious bacterium ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อสาเหตุมีปริมาณน้อยและมีการกระจายไม่สม่ำเสมอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในต้นส้ม อย่างไรก็ตาม Hung *et al.* (1999) รายงานว่าวิธีการตรวจและวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพและแม่นยำสูงคือวิธี PCR

การศึกษาแบคทีเรียเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการตรวจสอบ

Hong-Ji and An-Li (1990) ทำการศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อสาเหตุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope: EM) โดยนำใบที่แสดงอาการมาตัดเอาเส้นกลางใบ และตัดให้มีขนาด 2 ถึง 3 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลาย 2% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นทำ post fixation ใน 1% osmium tetraoxide แล้วจึง dehydrate ด้วย ethanol จากนั้นนำไปแช่ใน propylene ใน สารละลายผสมระหว่าง priopylene oxide และ LX 112 แล้ว embedded ใน LX 112 substrate จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้บาง (ultrathin sections) ด้วยเครื่อง LKB ultra microtome III Norva ย้อมชิ้นตัวอย่างด้วย uranyl acetate และ lead citrate ตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (JEM 100 CX II) จากการศึกษาพบลักษณะของ fastidious bacteria ในบริเวณ sieve tubes โดยจะพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากในช่วงฤดูร้อน และมีปริมาณน้อยในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง พบเชื้อสาเหตุมีลักษณะ pleomorphic ซึ่งถ้าอยู่ในช่วง growing form จะมีรูปร่างแบบ flexible elongated rods (100-250 x 500-2500 นาโนเมตร) ถ้าอยู่ในช่วง mature form จะมีรูปร่างแบบ rigid rods (350-550 x 600-1500 นาโนเมตร) ถ้าอยู่ในช่วง old form จะมีรูปร่างแบบ spherical bodies (700-800 นาโนเมตร) เชื้อสาเหตุเพิ่มจำนวนด้วยวิธี budding และ binary fission เป็นบางครั้ง นอกจากนี้พบว่าช่วง large mature bodies ประกอบด้วย multiple-layer จำนวน 4 ชั้น โดยชั้นผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้น unit envelop 2 ชั้น และ infolded cytoplasmic membrane 2 ชั้น

Jagoueix *et al.* (1994) ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุ โดยศึกษาจากดีเอ็นเอบริเวณ 16S ribosomal DNAs (rDNAs) ของเชื้อสาเหตุที่พบในเอเชียและแอฟริกา ในการศึกษาสายพันธุ์ของแอฟริกา นำใบแพงพวยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bc1*I เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี PCR ส่วนสายพันธุ์ของเอเชียเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี PCR จากการทำ specific monoclonal antibody ที่เคลือบบนหลอด PCR จากนั้นนำ 16S rDNA ที่ได้มา clone และ sequence และนำ sequence ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ sequence ของ 16S rDNA ใน GenBank พบว่าทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ใน subdivision α-Proteobacteria และให้ชื่อว่า liberobacter ขณะเดียวกัน Murray and Schleifer (1994) ได้จัดเชื้อแบคทีเรียนี้อยู่ใน "*Candidatus*" generic name Liberobacter

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Nakashima *et al.* (1995) ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุบริเวณ 16S rDNA ในการศึกษาใช้ตัวอย่างใบส้มจากจังหวัดนครปฐม นำมาศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุภายใต้กล้อง EM พบเชื้อสาเหตุภายใน sieve element แต่มีจำนวนไม่มาก พบว่าเชื้อสาเหตุมี 1 เซลล์ มีผนังเซลล์หนาประมาณ 25 นาโนเมตร มีรูปร่างแบบ filamentous forms มีความกว้างประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตรและยาวประมาณ 1.0-1.2 ไมโครเมตร ส่วนขั้นตอนการพัฒนาวิธีการตรวจสอบได้แบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) การทดลองที่ 2 ใช้วิธี dip solution โดยในขั้นแรกตัดเส้นกลางใบให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนแล้วนำไปทดสอบในขั้นต่อไป ส่วนการทดลองที่ 3 เป็นการตรวจสอบขั้นตอนการสกัดของการทดลองที่ 1 ว่าทุกขั้นตอนมีความจำเป็นหรือไม่ พบว่าในขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ไม่จำเป็น แต่ขั้นตอนการตกตะกอนด้วย chloroform และ isoamyl alcohol มีความสำคัญ และได้สรุปวิธีการสกัดแยกดีเอ็นเอได้ภายใน 20 นาที ดังนี้ ตัดเส้นกลางใบส้มจากใบที่แสดงอาการมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก ใส่ในหลอดจากนั้นเติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่านาน 5 นาที เติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายใสทิ้ง ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ก็จะได้ดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุที่ต้องการ

Jagoueix *et al.* (1996) ทำการศึกษาบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR และได้ให้ชื่อเชื้อสาเหตุว่า *Liberobacter asiaticum* และ *Liberobacter africanum* การตรวจหาเชื้อสาเหตุทั้งสองด้วยวิธี PCR นั้น ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 สกัดด้วย NaCl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 g จากนั้นนำเอาสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจาง 10 และ 100 เท่า หรือหลังจากการปั่นเหวี่ยงที่ 100 g แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g จากนั้นเก็บตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว วิธีที่ 2 สกัดด้วย Wizard miniprep DNA purification resin แล้วนำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธีPCR และทำการเปรียบเทียบ primer ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ universal primer fD1/rP1 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของ โปรคาริโอต primer OI1/OI2c ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของ *Candidatus* Liberobacter asiaticus และ primer OAI ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของ *Candidatus* Liberobacter africanus จากการทดลองการเปรียบเทียบวิธีการสกัด พบว่าวิธีที่ 1 สามารถสกัดดีเอ็นเอได้แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ผลไม่คงที่ ส่วนวิธีที่ 2 จะให้ผลคงที่และดีกว่า ส่วนการเปรียบเทียบ primer พบว่า universal primer fD1/rP1 จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ส่วน primer OI1/OI2c, OI2c/ OAI และ OI2c/OI1/OAI ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1160 bp แต่พบว่า primer OI2c/ OAI จะเกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะกับ *Candidatus* Liberobacter africanus นอกจากนี้ ได้ทำการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสองชนิดนี้โดยการย่อย amplicons ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I พบว่า *Candidatus* Liberobacter asiaticus เมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 520 bp, 506 bp และ 130 bp ส่วน *Candidatus* Liberobacter africanus เมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 640 bp และ 520 bp

Jagoueix *et al.* (1997) ทำการศึกษาเปรียบเทียบบริเวณ 16S/23S intergenic spacer regions จาก rRNA operon ของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus strain Poona (อินเดีย), strain Fuzhou (จีน) และ *Candidatus* Liberobacter africanus strain Nelspruit (แอฟริกาใต้) ในการทำปฏิกิริยา PCR ใช้ primer OI2 และ 23S1 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว พบแถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp บน 0.7% agarose gel จากทั้งสามตัวอย่าง จากนั้นนำไป clone และ sequence พบว่า *Candidatus* Liberobacter asiaticus strain Poona และ strain Fuzhou มี intergenic spacer regions เหมือนกัน โดยมีขนาด 595 bp ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน isoleucine tRNA ($tRNA^{Ile}$) และ alanine tRNA ($tRNA^{Ala}$) โดยพบว่าสองตำแหน่งนี้อยู่ห่างกัน 11 nucleotiles ส่วน *Candidatus* Liberobacter africanus strain Nelspruit มี intergenic spacer regions ขนาด 498 bp และพบว่ามีกรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียวคือ $tRNA^{Ala}$ นอกจากนี้พบว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้มีระดับของ homology ของ 16S/23S intergenic spacer regions เป็น 79.46%

Hocquellet *et al.* (1997) ทำการผลิต non-radioactive probes เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticum และ *Candidatus* Liberobacter africanum โดยนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ ß operon ; ln 2.6 และ AS 1.7 ของ *Candidatus* Liberobacter asiaticum และ *Candidatus* Liberobacter africanum ตามลำดับ นำมาใช้ผลิต non-radioactive probes ด้วยวิธี digoxygenin (DIG)-labelled probes ซึ่ง labeled probes ที่ได้เรียกว่า ln 1.7-DIG และ AS 1.7-DIG โดยเปรียบเทียบกับการทำ hybridized กับ radioactive ^{32}P ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ศึกษาได้จากบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย พบว่า ln 1.7-DIG มีความไวในการตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticum มากกว่า ^{32}P ส่วน AS 1.7-DIG ที่ทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter africanum พบว่าให้ผลเหมือนกับการใช้ ^{32}P

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Hocquellet *et al.* (1999a) ได้ศึกษายีนในบริเวณ 16S rDNA และ *β*-operon (*rpl*KAJL-*rpo*BC) ของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticum และ *Candidatus* Liberobacter africanum ด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ใช้ primer ที่มีขนาด 10-mer จำนวน 102 คู่ ที่มี GC content 60% หรือ 70% และพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ ที่น่าสนใจ จากนั้นนำไป clone และ sequence พบว่ามีเพียง 6 clone ที่เป็นส่วนหนึ่งของ Liberobacter genome และพบว่าเป็นองค์ประกอบของ 4 ยีน จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว โดยยีนที่พบ ได้แก่ *nus*G, *pgm*, *omp* และ hypothetical protein gene

Hocquellet *et al.* (1999b) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุและแยกความแตกต่างระหว่าง Liberobacter species โดยการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของ ribosomal protein gene ของ *β*-operon ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการสกัดดีเอ็นเอใช้ 2 วิธีคือ สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Cyltrimethylammonium bromide) method โดยใช้เส้นกลางใบส้ม 2 กรัม และวิธีที่ 2 สกัดโดยใช้ wizard extracts 50 µl ใช้เส้นกลางใบส้ม 0.1–0.3 กรัม ส่วนในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีPCRใช้ primer A2 และ primer J5 ซึ่ง primer A2 เข้าไปจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ 3’-end ของ *rpl*A gene ส่วน primer J5 เข้าไปจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ 3’-end ของ *rplJ* gene ในส่วนของ ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุ พบว่า primer ทั้งสองนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุและสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 ชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุได้ โดยพบว่า *Candidatus* Liberobacter africanus เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 669 bp และ *Candidatus* Liberobacter asiaticus เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp บน 2% agarose gel นอกจากนี้ได้ทำ Southern hybridization เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้งกับแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย oligonucleotide probe DJ โดยจะเข้าไปจับระหว่าง *rpl*A-*rplJ* genes ของเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดได้ นอกจากนี้ได้ทดลองถึงความไวของ primer พบว่ายังสามารถตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดได้แม้นมีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 0.01 นาโนกรัม

Hung *et al.* (1999) ทำการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งโดยใช้วิธี PCR พบว่าใช้เวลาภายใน 6 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 การสกัด nucleic acids ใช้เวลา 3 ชั่วโมง โดยนำเส้นกลางใบส้มประมาณ 250 มิลลิกรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วผสมลงใน DNA extraction buffer บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย CTAB แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงสกัดด้วย chloroform/isoamyl alcohol ตามด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol ขั้นตอนที่ 2 การทำ PCR ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ด้วย primer 226-primer pair และขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลา 1 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย eletrophoresis บน 1.4% agarose gel ใช้ความต่างศักดิ์ 100 V นาน 30–40 นาที แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide นาน 5 นาที ในการทดลองได้ใช้ตัวอย่างส้มที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ในแถบเอเชีย ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้เวลาในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

Ohtsu *et al.* (2002) ทำการปรับปรุงวิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberobacter asiaticus และทำการผลิต antiserum ต่อเชื้อสาเหตุดังกล่าว ซึ่งการผลิต antiserum ใช้แพงพวย (*Catharantus roseum* L.) มาติดตา ด้วยตาที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus (Thai isolate: นครปฐม) จากนั้นทำการ purified เชื้อสาเหตุด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Lee และ Davis (1983) และนำ partial purification ที่ได้มาผลิต antiserum และทำ microprecipitin test และพบว่า antiserum diluted ที่ 1/16 นั้นเกิดปฏิกิริยากับ partial purification จากตัวอย่างของพังพวย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพืชปกติ หรือกับ rough lemon ที่เป็นโรคทริสเตซ่า นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุภายใต้กล้อง EM พบเชื้อสาเหตุบริเวณ sieve elements โดยมีลักษณะกลม และมีความหนาของชั้นห่อหุ้ม 25 นาโนเมตร

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzyme gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีน (gene) หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*In vitro* DNA replication) (อังสนา, 2546)

หลักการของเทคนิค PCR โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติของดีเอ็นเอที่ว่า โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอสามารถจับคู่กันได้เพราะมีเบสคู่สมกัน (complementary) ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอชิ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบเดิม ดังนั้นก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น (อังสนา, 2546) โดย PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ primer 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ขั้นแรกเรียกว่า denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92–

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

95 องศาเซลเซียส ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ primer สายสั้นๆ (14–30 mer) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้ช่วงอุณหภูมิ 37─60 องศาเซลเซียส ขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5’ ของ primer ตามข้อมูลของต้นแบบดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 72–75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่จำนวนที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่หนึ่งถึงขั้นที่สามหมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณ (amplify) ดีเอ็นเอได้มากมาย (พิสสวรรณ, 2540)

ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่าง ๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ดีออกซีนิวคลีโอ-ไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphase: dNTPs) ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP dTTP ส่วน primer ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและที่มีคุณภาพไม่ดีนัก แต่ถ้าใช้คุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาและมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อปฏิกิริยา และเอนไซม์ เลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) ชนิดที่ใช้กันมากคือ *Taq* polymerase (สุรินทร์, 2545)

การแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารละลายต่าง ๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับโพลีอะครีลาไมด์ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักทำในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

การหาลำดับเบสมี 2 วิธี คือวิธีทางเคมีและวิธีทางเอนไซม์ หลักการของทั้งสองวิธีคือทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียง 1 เบส โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดที่ตำแหน่งที่มีเบสจำเพาะ หรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสจำเพาะทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) พัฒนาขึ้นในปี 1977 โดย Maxam และ Gilbert ใช้ปฏิกิริยาที่จำเพาะสำหรับเลือกตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบสใดเบสหนึ่งหรือสองเบส โดยทำลายเบสเหล่านั้นออกจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ออกภายหลัง

การหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic sequencing) เป็นวิธีของ Sanger *et al.* (1977) ใช้เอนไซม์ DNA polymerase I สร้างสายดีเอ็นเอคู่สมขึ้นมา การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ primer ในการเริ่มต้น แล้วจึงค่อยต่อเบสเข้าไปทางปลาย 3’ ของ primer การต่อสายนิวคลีโอไทด์จาก primer นี้จะหยุดที่เบสจำเพาะแต่ละเบสโดยเติมสาร 2’, 3’- ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ลงไป การต่อสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ต้องอาศัย primer หรือท่อนดีเอ็นเอที่มีปลาย 3’ เป็นหมู่ไฮดรอกซี ซึ่งวิธีนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า dideoxy chain terminating method (สุรินทร์, 2545)

การหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์ได้มีการดัดแปลงไปมากมายเพื่อให้สามารถอ่านลำดับเบสได้มากขึ้นในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง มีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) อ่านลำดับเบส และบันทึกผลโดยคอมพิวเตอร์ (สุรินทร์, 2543)

การหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัตินี้ ใช้ primer และ ddNTPs ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) การอ่านผลจะใช้แสงเลเซอร์ในการอ่าน และสำหรับลำดับเบสที่มีความยาวมากสามารถอ่านผลได้ด้วยวิธีนี้ นอกจากนี้ข้อดีของการอ่านลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติไม่เพียงแต่อ่านผลได้เร็วและแสดงผลการอ่านทางคอมพิวเตอร์แล้ว ยังเป็นการหลีกเลี่ยงความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการอ่านผลด้วยวิธี manual (Dale and Schantz, 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved