บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอาการของโรคฮวงลองบิง HLB ในสวนส้ม จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ พบว่าอาการของโรคมีความคล้ายคลึงกัน อาการที่พบคือเริ่มแรกแสดงที่ใบยอดหรือใบอ่อน ใบมีสีเหลืองซีด เส้นกลางใบและเส้นแขนงอาจมีสีเขียว หรืออาจมีสีเขียวเฉพาะเส้นกลางใบ ซึ่งตรงกับรายงานของ Ohtsu *et al.* (1995) ที่ทำการทดลองติดตาที่เป็นโรคกับต้นปกติ (กลุ่มแมนดาริน) พบว่าหลังปลูกเชื้อแล้ว 26-35 วัน ใบยอดใต้บริเวณที่ทำการติดตาแสดงอาการใบเหลือง นอกจากนี้จากการศึกษายังพบอาการใบมีสีเหลืองซีด เส้นกลางใบและเส้นแขนงมีสีเขียว หรือมีสีเขียวเฉพาะเส้นกลางใบ และพบว่าใบที่แตกใหม่มีลักษณะหนากว่าปกติ ใบเรียวยาว มีขนาดเล็ก ปลายใบจะมีลักษณะตั้งขึ้น และอาจโค้งงอ ขณะเดียวกันพบว่าอาการที่พบนี้คล้ายกับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ผลจะมีขนาดเล็กและร่วงก่อนสุก และหากอาการรุนแรงจะมีอาการลุกลามทั่วต้น ทำให้ต้นโทรมและยืนต้นตาย ตรงกับการรายงานของ Garnsey *et al.* (1989) Hong-Ji (2001) CABI and EPPO (2003) และ CAB International (2002)

ในการศึกษาทาง ultrastructure ของใบส้มที่เป็นโรคและเชื้อสาเหตุภายในเซลล์ของใบส้มนั้น พบเชื้อ fastidious bacteria ที่เป็นสาเหตุโรค มีลักษณะกลม รี ภายในบริเวณเซลล์ท่ออาหารและบริเวณเซลล์ข้างเคียง ของใบที่เป็นโรคแต่ไม่พบลักษณะของเชื้อแบคทีเรียในใบส้มปกติ ผลดังกล่าวตรงกับรายงานของ Aubert *et al.* (1990) ที่ศึกษาในแพงพวย ฝอยทองและส้มโอ และ Ohtsu *et al.* (2002) ที่ตรวจสอบในแพงพวย การตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์นี้ สามารถยืนยันได้ว่ามีเชื้อสาเหตุดังกล่าวอยู่ภายในท่ออาหาร (Hong-Ji, 2001 และ Ohtsu *et al.*, 2002)

การเก็บรักษาตัวอย่างใบส้มที่เป็นโรคโดยการเปรียบเทียบ 4 วิธี พบว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และวิธีการทำให้แห้งด้วยการเก็บใน silica gel สามารถเก็บได้นานกว่า 1 ปี โดยที่ยังสามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้ เมื่อตรวจดูสีของใบและลักษณะของใบพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก การเก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาพที่เย็นจัด ทำให้สามารถรักษาสภาพเซลล์ต่าง ๆ ของพืช รวมถึงเซลล์ของเชื้อสาเหตุให้คงสภาพ ไม่เกิดการเน่า ช่วยชะลอระยะเวลาการย่อยสลายของเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้สามารถเก็บได้นานและยังคงตรวจพบเชื้อสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ และการทำให้ตัวอย่างแห้งด้วย silica gel นั้นเป็นการดึงน้ำออกจากเซลล์ จึงทำให้ตัวอย่างแห้ง ทำให้คงสภาพของเซลล์ได้ และชะลอการย่อยสลายของเซลล์ จึงทำให้สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นานและยังคงตรวจพบเชื้อสาเหตุได้เช่นกัน ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ 3 เดือน และการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บได้เพียง 20 วันเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการย่อยสลายและการเน่าของใบขึ้น ดังนั้นเซลล์ต่าง ๆ ของพืชรวมไปถึงเซลล์ของเชื้อสาเหตุเกิดการย่อยสลายไป จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุได้ ซึ่งตรงกับ Jagoueix *et al.* (1996) ที่กล่าวว่าตัวอย่างใบที่เกิดการเน่าสลายหรือเกิดการเน่าเปื่อยลง จะไม่สามารถนำมาตรวจสอบโรคด้วยวิธี PCR ได้ ถึงแม้จะใช้ primer ทั้ง universal primer หรือ specific primer และกล่าวว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไว้นานกว่า 3 สัปดาห์นั้น เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี PCR จะมีผลต่อการทำปฏิกิริยาโดยทำให้ความไวของปฏิกิริยาลดลงได้ การจะเลือกเก็บรักษาตัวอย่างด้วยวิธีใดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ หากนำไปใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค ถ้านำมาตรวจโรคทันที หรือภายในเวลา 3 เดือนสามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) จะเป็นวิธีที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่สามารถเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้ทันทีก็สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ไม่ควรเกิน 20 วัน เพราะตัวอย่างจะเน่าและไม่สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้ ส่วนการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาตัวอย่างโดยทำให้แห้งด้วยการเก็บใน silica gel นั้นเหมาะสมกับงานที่ใช้เพื่อการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรค หรือการเก็บเพื่อรักษาตัวอย่างโรคไว้

การตรวจสอบโรคโดยเทคนิค PCR ที่ใช้ specific primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S ribosomal DNA gene (rDNA) ด้วย primer OI1/OI2c และ primer ที่แยกความความแตกต่างของเชื้อสาเหตุคือ primer A2/J5 ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ribosomal protein (*rpl*AJ) ของเชื้อสาเหตุ โดยทำการตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากสวนส้มใน 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ พบว่า 42 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุของโรคได้ถึง 31 ตัวอย่าง และ 11 ตัวอย่างไม่พบเชื้อสาเหตุ ซึ่งการใช้ทั้งสอง primer ให้ผลตรงกัน ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุของโรค HLB นั้น บางตัวอย่างแสดงอาการคล้ายขาดธาตุอาหาร โดยมีอาการคล้ายคลึงกับโรค ดังนั้นเทคนิค PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้วินิจฉัยและตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรค HLB ของส้มได้ ซึ่ง นิพนธ์ (2540) กล่าวว่าการใช้เทคนิค PCR ในทางโรคพืชนอกจากนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อหรือจำแนกเชื้อแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ ซึ่งวิธีการวินิจฉัยทำได้ง่าย และรวดเร็ว แม่นยำ เหมือนกับการวินิจฉัยด้วยวิธีอื่น ๆ

ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและตรวจสอบโรคได้นำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจสอบ เนื่องจากไม่สามารถทำการแยกเชื้อสาเหตุจากใบที่แสดงอาการได้ กล่าวคือเชื้อสาเหตุไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ ในการทดลองเป็นการพัฒนาวิธีการแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สาเหตุจากใบที่เป็นโรค โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 5 วิธี และในการทดลองได้ทำการดัดแปลงขั้นตอนการสกัดบางส่วนจากที่มีรายงานไว้ ในการทดลองได้ใช้ตัวอย่างใบที่แสดงอาการในกลุ่มเดียวกัน และใช้ปริมาณเส้นกลางใบเริ่มต้นเท่ากันคือ 0.5 กรัม และมีการตรวจสอบก่อนว่ากลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ศึกษาเป็นโรค HLB เมื่อนำดีเอ็นเอ (total DNA) ที่สกัดได้ในแต่ละวิธีมาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยอิเล็คโตรโฟรีซีส พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากทุกวิธีมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ และเมื่อนำดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่ามีอัตราส่วนของค่า OD260/OD280 ของทั้ง 5 วิธีอยู่ในช่วง 0.9-1.4 และจากการรายงานของพงชัย (2544) กล่าวว่าสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนของ OD260/OD280 เท่ากับ 1.8 ถ้าได้ค่ามากกว่าแสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปน และถ้ามีค่าต่ำกว่าแสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อน ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองแสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีนั้นสันนิษฐานว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่บ้าง เนื่องจากการทดลองไม่ได้ใช้ฟีนอลในการตกตะกอน โดยพบว่าวิธีที่ 5 มีความบริสุทธิ์ต่ำที่สุด นอกจากนี้เมื่อทำการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่าวิธีที่ 3 จะให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากที่สุด

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละวิธีมาตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุหรือไม่ โดยตรวจสอบด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ primer OI1/OI2c และ A2/J5 โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นเท่ากัน 100 นาโนกรัม พบว่าวิธีที่ 3 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.* (1999) วิธีที่ 4 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) และวิธีที่ 5 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakashima *et al.* (1995) เกิดแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 1160 bp จากการใช้ primer OI1/OI2c และ 703 bp จากการใช้ primer A2/J5 โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวจากวิธีที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ 3 4 และ 5 สามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุได้ ส่วนวิธีที่ 1 และ 2 ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996) นั้นไม่สามารถแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 วิธีที่เหลือ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่พบจากการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสนั้นเป็นดีเอ็นเอของพืช อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอของแต่ละวิธีนั้นก็มีดีเอ็นเอของพืชปนเปื้อนมาด้วยทั้งสิ้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอของวิธีที่ 3 4 และ 5 พบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งสองขนาดที่ได้จากวิธีสกัดที่ 3 และ 4 มีความเข้มมากกว่าวิธีที่ 5 ทั้งนี้อาจเนื่องจากความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอหรือปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุที่สกัดได้น้อยในวิธีนี้ ซึ่งก็จะมีผลต่อการทำปฏิกิริยา PCR ได้ ซึ่งพบว่าวิธีที่ 5 มีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอค่อนข้างต่ำด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่าวิธีสกัดที่ 3 และ 4 ให้ผลที่ดี และมีประสิทธิภาพมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการสกัดของวิธีที่ 3 และ 4 พบว่าวิธีที่ 3 ใช้เวลาน้อยกว่า คือใช้เวลาประมาณ 1.5-2 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีที่ 4 ใช้เวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดของวิธีที่ 4 มีขั้นตอนการเตรียมที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ยุ่งยากกว่า ใช้สารเคมีมากกว่า และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีที่ 3 (ภาคผนวก) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ 3 ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.* (1999) เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และเป็นวิธีที่สามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุได้ สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรค HLB เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคได้

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบคู่ primer ที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR คือ primer OI1/OI2c ที่เป็น specific primer ซึ่งจำเพาะกับบริเวณ 16S ribosomal DNA gene (rDNA) และ primer A2/J5 ที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิด โดยจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ribosomal protein (*rpl*AJ) ของเชื้อสาเหตุ เมื่อใช้ความเข้มข้นที่เท่ากันพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ primer A2/J5 มีความเข้มมากกว่า และบางครั้งพบว่าในตัวอย่างเดียวกันการใช้ primer A2/J5 ในการตรวจสอบสามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของเชื้อสาเหตุได้ แต่ primer OI1/OI2c เกิดแถบจำเพาะไม่ชัดเจนซึ่งก็ได้ผลสอดคล้องกับงานทดลองของ Hocquellet *et al.* (1999b) ได้เปรียบเทียบการใช้ primer A2/J5 และ OI1/OI2c/AO1 พบว่าการใช้คู่ primer A2/J5 มีความไวในการทำปฏิกิริยามากกว่า โดยมีข้อสันนิษฐานว่าว่าอาจเนื่องจากตำแหน่งบน ดีเอ็นเอเป้าหมายของการใช้ primer A2/J5 มีขนาดเล็กกว่าและโอกาสเกิดการย่อยสลายของดีเอ็นเอน้อยกว่า

ดังนั้นในการวินิจฉัยและตรวจสอบโรค HLB ของส้มโดยใช้เทคนิค PCR สามารถสรุปขั้นตอนการตรวจสอบที่ทำได้รวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดแยกดีเอ็นเอ (2 ชั่วโมง)

ตัดเส้นกลางใบที่ต้องการตรวจสอบมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น เติม DNA extraction buffer จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย CTAB และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที จึงตกตะกอนด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24 :1) (ขั้นตอนนี้ทำ 2 ครั้ง) จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย isopropanol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 การทำปฏิกิริยา PCR (3 ชั่วโมง)

ใช้ primer A2/J5 โดยประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังนี้ 0.2 mM dNTPs , 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$, primer A2 และ J5 ความเข้มข้นอย่างละ 1.0 µM, 0.5 Unit *Taq* DNA polymerase, น้ำกลั่น และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 µl

โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วเข้าสู่วงรอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ผล (1 ชั่วโมง)

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis บน 1% agarose gel

ในการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุโรคที่พบในแหล่งที่นำมาศึกษา คือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ โดยใช้ primer A2/J5 ในการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 703 bp ในทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับ Hocquellet *et al.* (1999b) ที่รายงานว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp ที่ได้จากการใช้ primer A2/J5 เป็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสบางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) จากตัวอย่างโรคที่พบจากเชียงใหม่ (HLB-CM) เชียงราย (HLB-CR) และแพร่ (HLB-P) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสามตัวอย่างมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อนำไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนถึง 100% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Liberobacter asiaticus (ribosomal protein gene) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอินเดีย กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Liberobacter asiaticus (*tuf*B-*sec*E-*nus*G-*rpl*KAJL-*rpo*B gene cluster) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศญี่ปุ่น และกับ Liberobacter asiaticus (ribosomal protein and RNA polymerase (*rpl*KAJL-*rpo*B) gene cluster) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส ซึ่งพบว่านิวคลีโอไทด์ทั้งสามที่มีความเหมือนนี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

africanus ด้วยแต่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่า โดยมีความเหมือน 75% กับ Liberobacter africanus Nelspruit ที่ได้ศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส และมีความเหมือน 70% กับ Liberobacter africanus subsp. capensis ที่ศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศสจากการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าทั้งสามตัวอย่างที่เป็นตัวแทนนี้มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในชนิด asiaticus มากกว่าชนิด africanus นอกจากนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสามตัวอย่างที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของยีน *rplJ* ที่มีรหัสการสร้างโปรตีน 50S ribosomal subunit protein L10

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่ามีการเริ่มต้นการแปลรหัสบนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 171 เป็นต้นไป ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1-170 ไม่มีการแปรเป็นกรดอะมิโนจึงสันนิษฐานว่าเป็นส่วนของ intron (non-coding sequence) นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน 50S ribosomal subunit protein L10 โดยพบว่ารหัสเริ่มต้นของแปลเป็นโปรตีนดังกล่าวบนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TTG ที่แปลเป็นกรดอะมิโน Methionine (M) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนเริ่มต้นของการสร้างโปรตีน โดยปกติลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นรหัสที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน Leucine (L) ขณะเดียวกันรหัสเริ่มต้น (start codon) ของการแปลเป็นกรดอะมิโนคือ AUG ซึ่ง Kozak (1983) และ Wang *et al.* (2003) รายงานว่าสามารถพบรหัสเริ่มต้นเป็น GUG และ UUG ได้ในแบคทีเรียและ Archeae นอกจากนี้ Spiers และ Bergquist (1992) พบว่า CUG เป็นรหัสเริ่มต้นของการสร้างเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus สูง โดยพบว่ามีความเหมือนถึง 100% กับลำดับกรดอะมิโนของ ribosomal protein L10 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส กับลำดับกรดอะมิโนของ ribosomal protein ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอินเดีย ขณะเดียวกันมีความเหมือนถึง 99% กับ ribosomal protein L10) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส และมีความเหมือนถึง 80% กับ 50S ribosomal subunit protein L10 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter africanus เช่นกันโดยพบว่ามีความเหมือน 80% และ 74% กับ ribosomal protein L10 และ RplJ ตามลำดับ ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส จากผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวยังคงพบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus สูงเช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลของการจำแนกชนิดด้วย primer A2/J5 และจากการทำ sequence จึงกล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค HLB ที่เข้าทำลายต้นส้มใน 3 จังหวัดที่ทำการศึกษา (เชียงใหม่ เชียงราย และแพร่) คือ เชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberobacter asiaticus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved