

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลงบิง (HLB) และโรคทริสเตซ่า (Tristeza) ในสวนส้มโอ

จากการสำรวจศึกษาสภาพและการจัดการสวนส้มโอจากสวนเกษตรกรที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 สวน พบว่า สภาพแปลงปลูกและการจัดการของแต่ละสวนแตกต่างกัน คือ

สวนที่ 1 สวนนายวรศักดิ์ เรียงยาย เลขที่ 183 ม. 1 ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พื้นที่ปลูก 18 ไร่ ปลูกส้มโอพันธุ์ทองดี อายุต้น 8 ปี รวม 200 ต้น สภาพสวนโดยทั่วไปปลูกปล่อยขาดการดูแล ต้นส้มโอไม่ได้รับการตัดแต่งกิ่งจึงมีการแตกยอดใหม่น้อยมาก สภาพต้นค่อนข้างโทรม บางต้นแสดงอาการใบเหลืองเกือบทั้งต้น (ตาราง 1, ภาพ 1)

สวนที่ 2 สวนนายวัลลภ ใจกล้า เลขที่ 16/1 ม. 5 ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พื้นที่ปลูก 14 ไร่ ปลูกส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวใหญ่ และ พันธุ์ chandler อายุต้น 1-6 ปี รวม 120 ต้น สภาพสวนมีการจัดการค่อนข้างดี มีการตัดแต่งกิ่งเป็นประจำ สภาพสวนค่อนข้างโปร่ง ต้นส้มโอค่อนข้างสูง (ตาราง 1, ภาพ 2)

สวนที่ 3 สวนนายประคอง บุคดี 18/1 ม. 2 ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พื้นที่ปลูก 16 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี และ chandler อายุต้น 7-16 ปี รวม 480 ต้น สภาพโดยทั่วไปมีการจัดการสวนที่ค่อนข้างดี ต้นไม่สูงมากนัก มีการปลูกยางพาราแซมภายในสวน (ตาราง 1, ภาพ 3)

สวนที่ 4 สวนนายสมบัติ บุคดี เลขที่ 31/1 ม. 1 ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พื้นที่ปลูก 2 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี และพันธุ์ chandler รวม 70 ต้น สภาพสวนมีการจัดการที่ดี ตัดแต่งกิ่งเป็นประจำ พบการแตกยอดใหม่มาก สภาพสวนสะอาด โปร่ง (ตาราง 1, ภาพ 4)

สวนที่ 5 สวน ค.ต. วุฒิพงษ์ คำลือ เลขที่ 18/1 ม. 2 ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พื้นที่ปลูก 10 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี รวม 300 ต้น สภาพสวนสภาพโดยทั่วไปมีการจัดการที่ดี พบต้นส้มโอบริเวณยอดที่แตกใบอ่อนของต้นที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสซัดเจน โดยมีอาการ

ใบหงิก งอ ขนาดเล็กกว่าปกติ ใบด่าง โปรงแสง ชืด สภาพโดยทั่วไปมีการจัดการที่ดี ตัดแต่งกิ่งเป็นประจำ สภาพสวนสะอาด ก่อนข้างขึ้น ต้นมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (ตาราง 1, ภาพ 5)

จากการศึกษาและเก็บตัวอย่างใบส้มโอจากสวนเกษตรกรรมส้มโอที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคฮวงหลงบิงเข้าทำลายพบว่าต้นมีอาการตายกิ่งแห้งตายจากปลายเข้ามา อาจเป็นบางกิ่งหรือลุกลามไปกิ่งอื่นทั่วต้น ใบเหลืองร่วงง่าย (ภาพ 6 ก) นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้จากต้นที่เป็นโรค ยังมีขนาดเล็กกว่าปกติ ผลร่วงง่ายและร่วงก่อนสุก นอกจากนี้ยังพบว่าที่ขั้วผลมีสีแดงชัดเจน (ภาพ 6 ข) ในขณะที่ผลผลิตจากต้นไม่เป็นโรคยังคงสภาพปกติ นอกจากนี้ผลผลิตยังมีขนาดเล็กกว่าปกติ รูปร่างบิดเบี้ยวผิดปกติ เมล็ดลีบ (ภาพ 6 ค) ที่ใบยอดแสดงอาการผิดปกติ ใบเหลือง เล็ก ด้านหนา เส้นกลางใบเขียวชัดเจน (ภาพ 7 ก) และใบอาการเหลืองลักษณะเป็นจ้ำๆ แต้มสีเขียวกระจายทั่วใบ (ภาพ 7 ข) นอกจากนี้ยังพบว่า มีพืชตระกูลส้มอื่นๆ ที่ปลูกบริเวณรอบสวนส้มโอของเกษตรกรแสดงอาการคล้ายที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรคฮวงหลงบิง ได้แก่ ส้ม และมะนาว (ภาพ 8) และยังสามารถตรวจสอบโรคจากตัวอย่างของกิ่งพันธุ์ส้มโอที่เกษตรกรนำมาใช้ปลูกโดยเกษตรกรใช้กิ่งพันธุ์ที่ได้จากการตอนกิ่งต้นส้มโอภายในสวนของตนเองเพื่อนำมาปลูกหมุนเวียนอยู่ภายในสวนของตน (ภาพ 9)

และยังพบว่าต้นส้มโอเกือบทุกต้นจากทุกสวน แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย คือ ที่ใบอ่อนเห็นเส้นใบเป็นขีดโปรงแสงสั้นๆ เมื่อส่องดูย้อนแสงพบเห็นได้ชัด ใบโค้งงอ บิด เบี้ยว โคนงอคล้ายรูปถ้วย ใบหนาต้านและชี้ตั้งขึ้น ใบอ่อนมีขนาดเล็กสีเหลืองซีด ขอบสันบางครั้งยอดและใบอ่อนที่แตกออกมาจะเป็นกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้นที่ได้รับการตัดแต่งกิ่งเกิดการแตกยอดใหม่จะสังเกตเห็นอาการ ได้อย่างชัดเจน (ภาพ 10 ก) คือ พบอาการ ใบยอดด่าง (leaf mottling) เส้นใบโปรงแสง (vein clearing) ขอบใบม้วนเข้าคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) (ภาพ 10 ข) นอกจากนี้ยังพบอาการใบด้านหนา หงิก ย่น ใบมัน ใบเรียวยาวและมีสีเขียวเข้มกว่าปกติ (ภาพ 10 ค)

ตาราง 1 การสำรวจสภาพแปลงปลูกและการจัดการดูแลสวนส้มโอของเกษตรกรจำนวน 5 สวน จาก
อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ชื่อสวน	พื้นที่	สภาพสวน
1. นายวรศักดิ์ เรียงชาย 183 ม. 1 ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย	18 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี อายุต้น 8 ปี จำนวน 200 ต้น	หลังเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว สภาพสวนถูกปล่อย ขาดการดูแล ไม่ได้มีการตัดแต่งกิ่ง การแตก ยอดใหม่น้อยมาก สภาพต้นส้มโอก่อนข้าง โทรม บางต้นแสดงอาการใบเหลืองเกือบทั้งต้น พบอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเกือบ ทุกต้น
2. นายवलลภ ใจกล้า 16/1 ม. 5 ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย	14 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี ขาวใหญ่และ chandler อายุต้น 1-6 ปี จำนวน 120 ต้น	การจัดการสวนค่อนข้างดี พบต้นส้มโอแสดง อาการของโรค HLB เล็กน้อย บางต้นพบ อาการโรค HLB ร่วมกับเชื้อไวรัส ทำให้ต้น แสดงอาการใบเหลือง ต่าง ซีด โทรมเกือบทั้ง ต้น
3. นายประคอง บุคดี 18/1 ม. 2 ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย	16 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี และ chandler อายุต้น 7-16 ปี จำนวน 480 ต้น	สภาพสวนจัดการค่อนข้างดี พบต้นส้มโอแสดง อาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส ค่อนข้างมากเกือบทั้งสวน โดยต้นที่แตกยอดใบ ใหม่จะแสดงอาการให้เห็นอย่างชัดเจน ใบมี ขนาดเล็ก หงิก งอ ใบมัน ซีดต่าง และพบอาการ โรค HLB เล็กน้อย
4. นายสมบัติ บุคดี 31/1 ม. 1 ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย	2 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี และ chandler จำนวน 70 ต้น	สภาพสวนมีการจัดการที่ค่อนข้างดี มีการตัด แต่งกิ่งอย่างไรก็ตามพบว่าต้นที่แสดงอาการ คล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเมื่อได้รับการตัด แต่งกิ่ง ยอดที่แตกใหม่มักยังคงแสดงอาการของ โรคอย่างชัดเจน โรค HLB พบไม่มากนัก

ชื่อสวน	พื้นที่	สภาพสวน
5. ด.ต. วุฒิพงษ์ คำลือ 18/1 ม. 2 ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย	10 ไร่ ปลูกพันธุ์ทองดี จำนวน 300 ต้น	สภาพโดยทั่วไปมีการจัดการที่ดี พบต้นส้มโอ บริเวณยอดที่แตกใบอ่อนของต้นที่แสดง อาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสชัดเจน โดยมีอาการใบหงิก งอ ขนาดเล็กกว่าปกติ ใบ ด่างโปร่งแสง ชัด



ภาพ 1 สภาพสวนส้มโอของนาย วรศักดิ์ เรียงยาย ต้นส้มโอค่อนข้างโทรม บางต้นแสดง
อาการใบเหลืองเกือบทั้งต้น



ภาพ 2 สภาพสวนส้มโอของนาย วัลลภ ใจกล้า สวนมีการจัดการค่อนข้างดี มีการตัดแต่งกิ่งเป็นประจำสภาพสวนค่อนข้างโปร่ง ต้นส้มโอค่อนข้างสูง



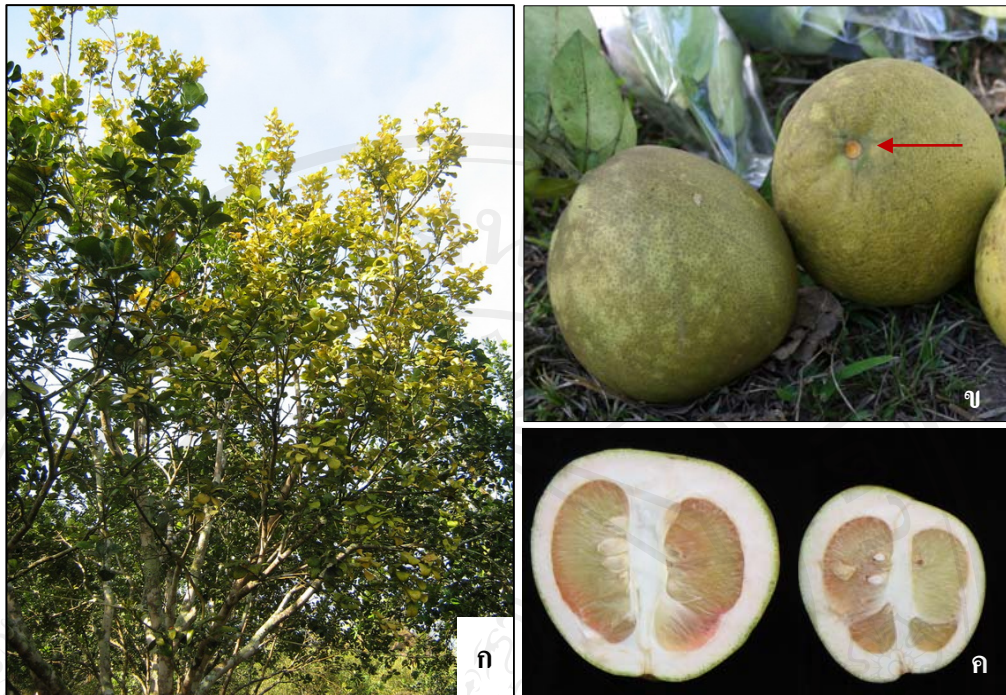
ภาพ 3 สภาพสวนส้มโอ นายประคอง บุคดี โดยทั่วไปมีการจัดการสวนที่ค่อนข้างดี ต้นไม้สูงมากมัก มีปลูกลายพรางแซมภายในสวน



ภาพ 4 สภาพสวน นายสมบัติ บุคดี สวนมีการจัดการที่ดี ตัดแต่งกิ่งเป็นประจำ พบการแตกยอดใหม่มาก สภาพสวนสะอาด โปร่ง



ภาพ 5 สภาพสวน ค.ต. วุฒิพงษ์ คำลือ สวนโดยทั่วไปมีการจัดการที่ดี มีการตัดแต่งกิ่งเป็นประจำ สภาพสะอาด ค่อนข้างขึ้น ต้นมีขนาดค่อนข้างใหญ่



ภาพ 6 ต้นส้มโอแสดงอาการของโรคหวงลองบิง
 ก. ลักษณะกิ่งแห้งตายจากปลายใบเหลืองร่วงง่าย
 ข. ผลร่วงก่อนสุก ที่ขั้วผลมีสีแดงชัดเจน (สรชี้)
 ค. ผลมีขนาดเล็กกว่าปกติ รูปร่างบิดเบี้ยวผิดปกติ เมล็ดลีบ



ภาพ 7 ใบส้มโอแสดงอาการของโรคหวงลองบิง
 ก. อาการใบมีสีเหลือง เล็ก เส้นกลางใบเขียวชัดเจน
 ข. ใบค่างเหลือง ลักษณะง้ำสีเขียวกระจายทั่วใบ



ภาพ 8 อาการของพืชตระกูลส้มที่แสดงอาการผิดปกติ
 ก. ใบส้มสายน้ำผึ้งอาการเหลืองซีด เส้นกลางใบและเส้นแขนงมีสีเขียว
 ข. ใบมะนาวอาการซีด หงิกงอ ต่างเหลืองเป็นจ้ำๆ



ภาพ 9 ลักษณะกิ่งพันธุ์ส้มโอสวนนายสมบัติ บุคดี ที่ได้จากการตอนกิ่งต้นภายในสวน เพื่อนำมาใช้ปลูกหมุนเวียนภายในสวน



ภาพ 10 ต้นส้มโอแสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ก. ต้นส้มโอหลังจกได้รับการตัดแต่งกิ่ง พบใบยอดที่แตกใหม่มังคงแสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายเช่นเดิม

ข. อาการใบยอดค่าง (leaf mottling) เส้นใบโปร่งแสง (vein clearing) ขอบใบม้วนเข้าคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบหงิก ย่น

ค. อาการใบหงิก ย่น ด้านหนากว่าปกติ ใบมัน เรียวยาว ใบมีสีเขียวเข้มกว่าปกติ

2. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลงบิงด้วยวิธี PCR

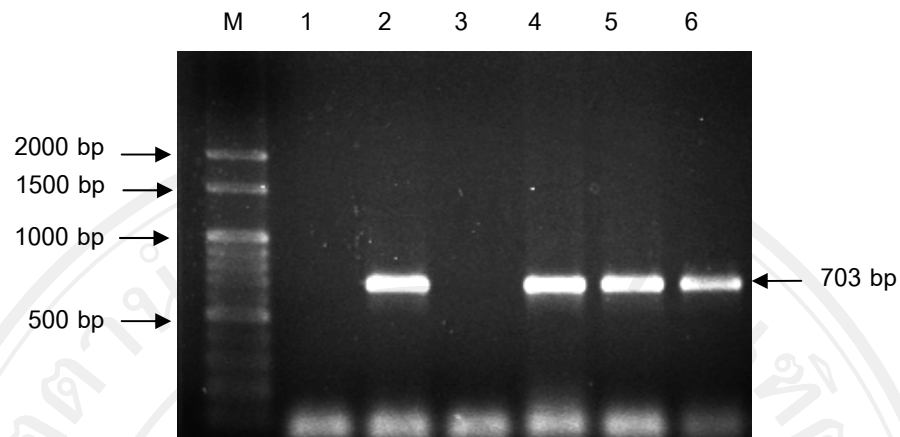
2.1 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลงบิงด้วยวิธี PCR

เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคโดยนำส่วนเส้นกลางใบพืชที่แสดงอาการมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ primer A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 703 bp จากตัวอย่างใบส้มโอส้มสายน้ำผึ้งและมะนาว ที่แสดงอาการของโรค แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในตัวอย่างที่ได้จากใบปกติ (ปลอดโรค) และจากน้ำกลั่นน้ำเชื้อในชุดควบคุม (ภาพ 11)

เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างต้นส้มโอบริเวณเกษตรกรจำนวน 5 สวน สวนละ 8 ต้น รวม 40 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่า ตัวอย่างใบส้มโอบริเวณนายวรศักดิ์ เรียงยาย ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคเพียง 1 ตัวอย่าง ใน 8 ตัวอย่าง และยังตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคในใบส้มสายน้ำผึ้งที่ปลูกบริเวณสวนส้มโอบริเวณอีก 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากสวนนายวัลลภ ใจกล้า ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรค 1 ตัวอย่าง ใน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากสวนนาย ประคอง บุคดี ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรค 1 ตัวอย่าง ใน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากสวนนายสมบัติ บุคดี ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรค 1 ตัวอย่าง ใน 8 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคในมะนาวจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ปลูกในบริเวณสวน และไม่พบเชื้อสาเหตุโรคในทุกตัวอย่าง จากสวนนายวุฒิพงษ์ คำลือ (ตาราง 2)

นอกจากนี้ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการผิดปกติทั้งหมด 9 ตัวอย่าง จากสวนนายสมบัติ บุคดี มาทำการตรวจโรค HLB ด้วยวิธี PCR พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 703 bp จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการผิดปกติ ได้แก่ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการใบเหลือง เล็ก ด้านหนา เส้นกลางใบเขียวและเส้นแขนงยังมีสีเขียว (ภาพ 12 ข-ค, ภาพ 13 แถว 4-5) ตัวอย่างใบส้มโอบริเวณเหลือง ค้างเขียว ด้านหนา เป็นจ้ำๆ สีเขียวกระจาย (ภาพ 12 ง และ ฉ, ภาพ 13 แถว 6 และแถว 11) รวมทั้งตรวจพบจากตัวอย่างใบมะนาวที่แสดงอาการใบเหลือง ค้างเขียว เป็นจ้ำสีเขียวกระจาย (ภาพ 12 ช, ภาพ 13 แถว 9) แต่ไม่พบในตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการใบหดและค่าง เส้นใบโปร่งแสง หัก ขอบใบม้วนเข้า (ภาพ 12 ก, ภาพ 13 แถว 3) จากตัวอย่างใบส้มโอที่มีเพ็ลล์อ่อนสีดำเกาะอยู่ใต้ใบ (ภาพ 12 จ, ภาพ 13 แถว 7) จากตัวอย่างใบมะนาวอาการใบเขียวปกติ (ภาพ 12 ฉ, ภาพ 13 แถว 8) และไม่พบเชื้อสาเหตุโรค HLB จากตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการค่าง ใบด้านหนา เส้นกลางใบและเส้นแขนงเหลืองเข้มอมส้มเข้ม (ภาพ 12 ซ, ภาพ 13 แถว 10)

และเมื่อทำการสุ่มเลือกกิ่งพันธุ์จากสวนเกษตรกรจำนวน 3 ราย ก็คือจากสวนนายวรศักดิ์ เรียงยาย จำนวน 6 ตัวอย่าง จากสวนนายสมบัติ บุคดี จำนวน 12 ตัวอย่างและจากสวนนาย วัลลภ ใจกล้า จำนวน 3 ตัวอย่าง รวม 21 ตัวอย่าง มาทำการตรวจโรค HLB ด้วยวิธี PCR พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างกิ่งพันธุ์ส้มโอบริเวณทุกสวนได้ (ตาราง 3)



ภาพ 11 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primers A2/J5 จากตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการโรค HLB

- | | |
|----------|---|
| แถว M | = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder |
| แถวที่ 1 | = ชุดควบคุม น้ำกลั่น (Negative control) |
| แถวที่ 2 | = ใบส้มสายน้ำผึ้งเป็นโรค (Positive control) |
| แถวที่ 3 | = ใบส้มโพลอดโรคจากกรมวิชาการเกษตร |
| แถวที่ 4 | = ใบส้มโอ |
| แถวที่ 5 | = ใบส้มสายน้ำผึ้ง |
| แถวที่ 6 | = ใบมะนาว |



ภาพ 12 ใบพืชจากสวนนายสมบัติ บุคดี จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการผิดปกติ

ก = ใบส้มโอ อาการใบหดและค่าง เส้นใบโปร่งแสง

ข = ใบส้มโอ ใบเหลือง เล็ก ด้านหนา เส้นกลางใบเขียว

ค = ใบส้มโอ ใบเล็ก เหลือง เส้นกลางใบและเส้นแขนงยังมีสีเขียว

ง = ใบส้มโอ อาการใบเล็ก เหลือง ด้านหนา เป็นจ้ำๆ สีเขียวกระจาย

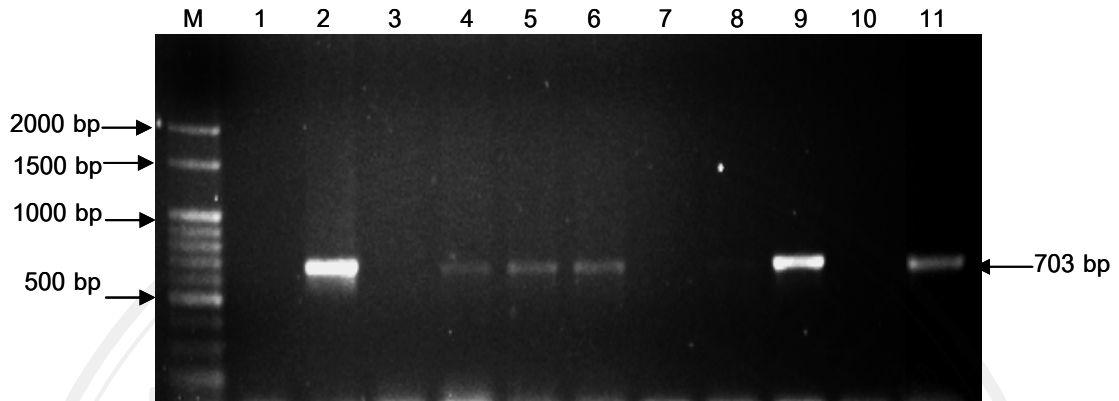
จ = ใบส้มโอที่มีเพ็ลล์อ่อนสีดำเกาะอยู่

ฉ = ใบมะนาว อาการใบเขียวปกติ

ช = ใบมะนาว อาการใบเหลือง ค่างเขียว เป็นจ้ำๆสีเขียวกระจาย

ซ = ใบส้มโอ อาการค่าง ใบด้านหนา เส้นกลางใบและเส้นแขนงเหลืองเข้มอมส้ม

ณ = ใบส้มโอ อาการใบเหลือง ค่างเขียว เป็นจ้ำๆ สีเขียวกระจาย



ภาพ 13 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primers A2/J5 จากตัวอย่างใบส้ม

- | | |
|-----------|---|
| แถว M | = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder |
| แถวที่ 1 | = ชุดควบคุม น้ำกลั่น (Negative control) |
| แถวที่ 2 | = ใบส้มสายน้ำผึ้งเป็นโรค (Positive control) |
| แถวที่ 3 | = ใบส้มโอ อาการใบหดและด่าง เส้นใบโปร่งแสง (ภาพ 12 ก) |
| แถวที่ 4 | = ใบส้มโอ ใบเหลือง เล็ก ด้านหนา เส้นกลางใบเขียว (ภาพ 12 ข) |
| แถวที่ 5 | = ใบส้มโอ ใบเล็กเหลือง เส้นใบยังมีสีเขียว (ภาพ 12 ค) |
| แถวที่ 6 | = ใบส้มโอ ใบเล็ก เหลือง ด้านหนา เป็นจ้ำๆ สีเขียวกระจาย (ภาพ 12 ง) |
| แถวที่ 7 | = ใบส้มโอ ที่มีเพ็ชร์อ่อนสีดำเกาะอยู่ (ภาพ 12 จ) |
| แถวที่ 8 | = ใบมะนาว อาการใบเขียวปกติ (ภาพ 12 ฉ) |
| แถวที่ 9 | = ใบมะนาว อาการใบเหลือง ค้างเขียว เป็นจ้ำสีเขียวกระจาย (ภาพ 12 ช) |
| แถวที่ 10 | = ใบส้มโอ ใบด้านหนา เส้นกลางใบและเส้นแขนงเหลืองเข้ม (ภาพ 12 ซ) |
| แถวที่ 11 | = ใบส้มโอ อาการใบเหลือง ค้างเขียว เป็นจ้ำๆ สีเขียวกระจาย (ภาพ 12 ฌ) |

ตาราง 2 ผลการตรวจสอบโรคสวงลองบิง ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ specific primers A2/J5 จาก ตัวอย่างส้มโอในสวนของเกษตรกรอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 สวน สวนละ 8 ตัวอย่าง

แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง		ผลการตรวจด้วยวิธี PCR
1. สวนนาย วรศักดิ์ เรียงยาย	ส้มโอ	7 ตัวอย่าง	-
	ส้มโอ	1 ตัวอย่าง	+
	ส้มสายน้ำผึ้ง	2 ตัวอย่าง	+
2. สวนนาย วัลลภ ใจกล้า	ส้มโอ	7 ตัวอย่าง	-
	ส้มโอ	1 ตัวอย่าง	+
3. สวนนาย ประคอง บุคดี	ส้มโอ	7 ตัวอย่าง	-
	ส้มโอ	1 ตัวอย่าง	+
4. สวนนายสมบัติ บุคดี	ส้มโอ	7 ตัวอย่าง	-
	ส้มโอ	1 ตัวอย่าง	+
	มะนาว	2 ตัวอย่าง	+
5. สวนนาย วุฒิพงษ์ คำลือ	ส้มโอ	8 ตัวอย่าง	-

+ : ตรวจพบเชื้อสาเหตุ

- : ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุ

ตาราง 3 ผลการตรวจสอบโรคสวงลองบิงด้วยวิธี PCR โดยการใช้ specific primers A2/J5 จาก ตัวอย่างกิ้งพันธุ้ส้มโอในสวนของเกษตรกรอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 3 สวน

แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยวิธี PCR
1. สวนนาย วรศักดิ์ เรียงยาย	6 ตัวอย่าง	-
2. สวนนาย สมบัติ บุคดี	12 ตัวอย่าง	-
3. สวนนาย วัลลภ ใจกล้า	3 ตัวอย่าง	-

- + : ตรวจพบเชื้อสาเหตุ
- : ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุ

2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในบริเวณยีน ribosomal protein (*rplKJL-rproBC* operon) ของเชื้อสาเหตุจาก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ส้มโอ ส้มสายน้ำผึ้ง และมะนาว จากแหล่งปลูกส้มโอสวนนายสมบัติ บุคคี โดยได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขนาด 550 bp ดัง

ภาพ 14

HLB-pomelo	AAGGACGCCCTTCTCTACAACCCACCAAGAACTCTAAATTCATTATGTGTCATTGAAAA	60
HLB-citrus	AAGGACGCCCTTCTCTACAACCCACCAAGAACTCTAAATTCATTATGTGTCATTGAAAA	60
HLB-lime	AAGGACGCCCTTCTCTACAACCCACCAAGAACTCTAAATTCATTATGTGTCATTGAAAA	60

HLB-pomelo	GCTAACCGAAATTTTAGGAGCAATAACAGGACTATCCGAATAGACAATTAGAGACTGCCC	120
HLB-citrus	GCTAACCGAAATTTTAGGAGCAATAACAGGACTATCCGAATAGACAATTAGAGACTGCCC	120
HLB-lime	GCTAACCGAAATTTTAGGAGCAATAACAGGACTATCCGAATAGACAATTAGAGACTGCCC	120

HLB-pomelo	AACGAAAAGATCAGATATTCCTCTAATACTAGTATCACGGATAGCAATCTTGACGAGACG	180
HLB-citrus	AACGAAAAGATCAGATATTCCTCTAATACTAGTATCACGGATAGCAATCTTGACGAGACG	180
HLB-lime	AACGAAAAGATCAGATATTCCTCTAATACTAGTATCACGGATAGCAATCTTGACGAGACG	180

HLB-pomelo	ATTTTTGGCAACTTTTACACCTCCACCAGCTTCCCGCATCTTTTTCCGAAGATCTTTAAT	240
HLB-citrus	ATTTTTGGCAACTTTTACACCTCCACCAGCTTCCCGCATCTTTTTCCGAAGATCTTTAAT	240
HLB-lime	ATTTTTGGCAACTTTTACACCTCCACCAGCTTCCCGCATCTTTTTCCGAAGATCTTTAAT	240

HLB-pomelo	TTGCGCAACACTAATTCCTTTATAATGTGCAACAACAATTGATCCAGAAGAAGAAAAAT	300
HLB-citrus	TTGCGCAACACTAATTCCTTTATAATGTGCAACAACAATTGATCCAGAAGAAGAAAAAT	300
HLB-lime	TTGCGCAACACTAATTCCTTTATAATGTGCAACAACAATTGATCCAGAAGAAGAAAAAT	300

HLB-pomelo	CTTACTTAATTCAGAAATTTCTACGCTCTTTCCTTGTCTATTCAACTTTCATCTCCAGAT	360
HLB-citrus	CTTACTTAATTCAGAAATTTCTACGCTCTTTCCTTGTCTATTCAACTTTCATCTCCAGAT	360
HLB-lime	CTTACTTAATTCAGAAATTTCTACGCTCTTTCCTTGTCTATTCAACTTTCATCTCCAGAT	360

HLB-pomelo	GACAAATATACCCATTCCTTTTCTATATCTATACCAAGAAAATATTTTCATATCTTGAT	420
HLB-citrus	GACAAATATACCCATTCCTTTTCTATATCTATACCAAGAAAATATTTTCATATCTTGAT	420
HLB-lime	GACAAATATACCCATTCCTTTTCTATATCTATACCAAGAAAATATTTTCATATCTTGAT	420

HLB-pomelo	TTCGAAGAAGAACAAAAATCCTAACGCATCCCTTACAAAAAAGAAGCGATCCGATAGCGA	480
HLB-citrus	TTCGAAGAAGAACAAAAATCCTAACGCATCCCTTACAAAAAAGAAGCGATCCGATAGCGA	480
HLB-lime	TTCGAAGAAGAACAAAAATCCTAACGCATCCCTTACAAAAAAGAAGCGATCCGATAGCGA	480

HLB-pomelo	AAAAGGAATCCACACAAAAACAACCTAACAGAGTATTAACAGAGAACTCGAAGGGT	520
HLB-citrus	AAAAGGAATCCACACAAAAACAACCTAACAGAGTATTAACAGAGAACTCGAAGGGT	520
HLB-lime	AAAAGGAATCCACACAAAAACAACCTAACAGAGTATTAACAGAGAACTCGAAGGGT	520

HLB-pomelo	CAACCTTTAT	550
HLB-citrus	CAACCTTTAT	550
HLB-lime	CAACCTTTAT	550

ภาพ 14 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ribosomal protein

(*rplJ*) ระหว่างเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp. สาเหตุโรค จากตัวอย่าง HLB-pomelo (ส้มโอ) HLB-citrus (ส้มสายน้ำผึ้ง) และ HLB-lime (มะนาว)

* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI จากการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม BLAST หรือด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp. ที่มีรายงานไว้ (ภาพ 15) ดังนี้

มีความเหมือนกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยพบว่ามีความเหมือนถึง 96 % กับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ribosomal protein gene (Accession number FJ557239) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศจีน

มีความเหมือนถึง 96 % กับ *Candidatus Liberibacter asiaticus* NusG (*musG*) gene, partial cds; 50S ribosomal subunit protein L11 (*rplK*), 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*), 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*), and 50S ribosomal subunit protein L12 (*rplL*) genes, complete cds; and RpoB (*rpoB*) gene, partial cds. (Accession number EU078703) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส

มีความเหมือนถึง 96 % กับ *Candidatus Liberibacter asiaticus* from Brazil 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*) gene, partial cds; 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*) and 50S ribosomal subunit protein L12 (*rplL*) genes, complete cds; and RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds. (Accession number DQ471904) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส

และมีความเหมือนถึง 96 % กับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolate Cu-c 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*) and 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*) genes, partial cds. (Accession number FJ394022) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศคิวบา

นอกจากนี้พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* ถึง 80 % กับ *Liberibacter africanus* Nelspruit ribosomal protein L10 (*rplJ*) and ribosomal protein L12 (*rplL*) genes, complete cds, and RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds. (Accession number U09675) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส

HLB-pomelo -----ATAAAGGTTGACCCTTC 17
 HLB-citrus -----ATAAAGGTTGACCCTTC 17
 HLB-lime -----ATAAAGGTTGACCCTTC 17
 FJ557239 -----TATAAAGGTTGACCCTTC 18
 DQ471904 -----TATAAAGGTTGACCCTTC 18
 EU078703 TTACGTAAAGCGTGTACTTTGTCATCGCATATGGGATGTGGTATAAAGGTTGACCCTTC 1353
 FJ394022 -----TATAAAGGTTGACCCTTC 18
 U09675 -----ACTATGGGATGTGGTATAAAGGTTGACCCTTC 32
 ***** **

HLB-pomelo GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 77
 HLB-citrus GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 77
 HLB-lime GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 77
 FJ557239 GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 78
 DQ471904 GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 78
 EU078703 GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 1413
 FJ394022 GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 78
 U09675 GAGTTTCTCTGTTAATAACTCTTGTTAGGTTGTTTTTGTGTGGATTCTTTTTTCGCTAT 83
 ***** **

HLB-pomelo CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 137
 HLB-citrus CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 137
 HLB-lime CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 137
 FJ557239 CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 138
 DQ471904 CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 138
 EU078703 CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 1473
 FJ394022 CGGATCGCTTCTTTTTTGTAAAGGATGCGTTAGGATTTTTGTCTTCTTCGAAATCAAGA 138
 U09675 CGA-----TGT-----CTCTATGATTTTTGTTTTT ---AGAGGTATT 117
 ** ** * ** ***** ** * * *

HLB-pomelo TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 196
 HLB-citrus TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 196
 HLB-lime TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 196
 FJ557239 TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 197
 DQ471904 TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 197
 EU078703 TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 1532
 FJ394022 TATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGGA-AAAGGAATGGGTATATTTGTCATCTGG 197
 U09675 CGTAGAAATGTTTTTTTGTGTAGATGAGAAGACGGTTAATTGATTTATCATCGGG 177
 * **** ** * ** ***** ** * ** *

HLB-pomelo AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 256
 HLB-citrus AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 256
 HLB-lime AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 256
 FJ557239 AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 257
 DQ471904 AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 257
 EU078703 AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 1592
 FJ394022 AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 257
 U09675 AGATGAAAGTTGAATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTTT 237
 ***** ** * ** ***** ** * ** ***** **

HLB-pomelo TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 316
 HLB-citrus TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 316
 HLB-lime TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 316
 FJ557239 TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 317
 DQ471904 TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 317
 EU078703 TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 1652
 FJ394022 TCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGCACATTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAATTTAAA 317
 U09675 TCTTCTTCTGGATCAGTTGTTGTTGCACACTATAAGGGAATTAGTGTGCGCAAGATAAAA 297
 ***** ** * ** ***** ** * ** ***** **

HLB-pomelo GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 376
 HLB-citrus GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 376
 HLB-lime GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 376
 FJ557239 GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 377
 DQ471904 GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 377
 EU078703 GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 1712
 FJ394022 GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 377
 U09675 GATCTTCGGA AAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTG TAAAAGTTGCCAAAAATCGTCTC 357
 ***** ** * ** ***** ** * ** ***** **


```

HLB-pomelo      GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 436
HLB-citrus      GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 436
HLB-lime        GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 436
FJ557239       GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 437
DQ471904       GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 437
EU078703       GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 1772
FJ394022       GTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTATTAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAG 437
U09675         GTTAAGATTGCCGTCAGCGATACTAGTTTGAAGGGTGTTCAGATCTTTTGTGGGCAA 417
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

HLB-pomelo      TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 496
HLB-citrus      TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 496
HLB-lime        TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 496
FJ557239       TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 497
DQ471904       TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 497
EU078703       TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 1832
FJ394022       TCTCTAATTGTCTATTCCGATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAATTTCCGTTAGCTTTTCA 497
U09675         TCATTGATTGTTATTCCGTTGACCCATTGTTGCTCCTAAGATTTCTGTGAGCTTTGCG 477
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

HLB-pomelo      AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTT----- 550
HLB-citrus      AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTT----- 550
HLB-lime        AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTT----- 550
FJ557239       AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAAATCAA 551
DQ471904       AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAAATCAA 551
EU078703       AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAAATCAA 1892
FJ394022       AATGACAATAATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAAATCAA 551
U09675         AATGATAATAAACAGTTTGTGGTTCTTGGCGGTATTTTGGAGAAAGATATTCTTGACCAA 537
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

ภาพ 15 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) ระหว่างเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp. สาเหตุโรค จากตัวอย่าง HLB-pomelo (ส้มโอ) HLB-citrus (ส้มสายน้ำผึ้ง) และ HLB-lime (มะนาว) กับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank

Accession No. FJ557239 คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ribosomal protein gene

ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศจีน

มีความเหมือน 96 %

Accession No. EU078703 คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* NusG (*musG*) gene partial cds; 50S ribosomal subunit protein L11 (*rplK*), 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*), 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*), and 50S ribosomal subunit protein L12 (*rplL*) genes, complete cds; and RpoB (*rpoB*) gene, partial cds.

ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส

มีความเหมือน 96 %

- Accession No. DQ471904 คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*) gene, partial cds; 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*) and 50S ribosomal subunit protein L12 (*rplL*) genes, complete cds; and RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds.
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส
 มีความเหมือน 96 %
- Accession No. FJ394022 คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolate Cuc 50S ribosomal subunit protein L1 (*rplA*) and 50S ribosomal subunit protein L10 (*rplJ*) genes, partial cds.
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศคิวบา
 มีความเหมือน 96%
- Accession No. U09675 คือ *Liberibacter africanus* Nelspruit ribosomal protein L10 (*rplJ*) and ribosomal protein L12 (*rplL*) genes complete cds; and RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds.
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส
 มีความเหมือน 80 %

* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถแปลออกมาเป็นลำดับของกรดอะมิโนจำนวน 115 amino acid (ภาพ 16) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานใน GenBank พบว่ามีความเหมือน 100% กับลำดับของกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Accession Number AAP22421) (ภาพ 17)

```

2   taaagggtgacccttcgagtttctctgtttaataactcttgtagg
   - - - - -
47  ttgtttttgtgtggattcctttttcgctatcggatcgcttcttt
   - - - - -
92  tttgtaagggatgctgtaggatttttgttcttcttcgaaatcaag
   - - - - -
137 atatgaaaatattttcttggtatagatataggaaaaggaatgggt
   - - - - -
182 atatttgtcatctggagatgaaagttgaatagacaaggaaagagc
   - - - - - M N R Q G K S
227 gtagaaatttctgaattaagtaagatttttcttcttctggatca
   V E I S E L S K I F S S S G S
272 attggttgtgcacattataaggggaattagtgttgcgcaaattaa
   I V V A H Y K G I S V A Q I K
317 gatcttcggaaaaagatgctgggaagctggtggaggtgtaaaagtt
   D L R K K M R E A G G G V K V
362 gccaaaaatcgtctcgtcaagattgctatccgtgatactagatt
   A K N R L V K I A I R D T S I
407 agaggaatatctgatcttttcggtgggcagtcctctaattgtctat
   R G I S D L F V G Q S L I V Y
452 tcggatagtcctgttattgctcctaaaatttcggtagcttttca
   S D S P V I A P K I S V S F S
497 aatgacaataatgaatttagagttcttggtgggggttagagagaag
   N D N N E F R V L G G V V E K
542 ggcgtcctt
   G V L

```

ภาพ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรปกติ) และการแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน (ตัวอักษรหนา) บางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) ของ HLB-pomelo (ส้มโอ) HLB-citrus (ส้มสายน้ำผึ้ง) HLB-lime (มะนาว)


```

AAR13469 -----MREAGGGVKKVAKNRLVKI 18
2002224D LNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
AAP22421 MNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
ABY25857 MNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
HLB-pomelo MNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
HLB-citrus MNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
HLB-lime MNRQGKSVEISELSKIFSSSGSIVVAHYKGISVAQIKDLRKKMREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
AAA19555 MNRQEKSVSEISELSKIFSSSGSVVVAHYKGISVAQIKDLRKKVREAGGGVKKVAKNRLVKI 60
AAF68452 MNRQEKSVSEISELSKILSSSGSVVVAHYKGISVAQIRTSKEGXREAGGGVKKVXXNRLVKI 60
ABO40218 MKRQEKILEVAELGKIFSSYNSVVAHYKGINVAQIGSLRKKMKEAGGFAKVVKNRLVKV 60
:**** . ** *****:

AAR13469 AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVLNQDSI 78
2002224D AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVLNQDSI 120
AAP22421 AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVLNQDSI 120
ABY25857 AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVLNQDSI 120
HLB-pomelo AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVL----- 120
HLB-citrus AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVL----- 120
HLB-lime AIRDTSIRGISDLFVGQSLIVYSDSPVIAPKISVSFSNDNNEFRVLGGVVEKGVL----- 120
AAA19555 AVSDTSLKGVSDLFVGQSLIVYSVDPVIVAPKISVSFANDNKQFVVLGGILEKDILDQDSI 120
AAF68452 AVRDTSVKEVSDLFVGQSLIVYSVDPVIVAPKISVNFANDNKQFVVLGGVLENDVLDQCSI 120
ABO40218 AIKDTDFQGMSDFFGQSLIVCSKDPVAAPQISVDFAKENDQFKIIGGILDKGILDNDAI 120
*: **.: **: * ***** * .*: **:***.***:*.*: * :*:***:*.*:

```

ภาพ 17 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนบางส่วนของยีน ribosomal protein (*rplJ*) ของ HLB-pomelo (ส้มโอ) HLB-citrus (ส้มสายน้ำผึ้ง) HLB-lime (มะนาว) กับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายกัน

Accession No. AAR13469 คือ 50S ribosomal subunit protein L10 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*)
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศญี่ปุ่น
 มีความเหมือนถึง 100%

Accession No. AAP22421 คือ ribosomal protein (*Candidatus Liberibacter asiaticus*)
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอินเดีย
 มีความเหมือนถึง 100%

Accession No. ABY25857 คือ ribosomal protein L10 [*Candidatus Liberibacter asiaticus*]
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอเมริกา
 มีความเหมือนถึง 100%

Accession No. 2002224D คือ ribosomal protein L10
 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส
 มีความเหมือนถึง 99%

Accession No. AAA19555 คือ ribosomal protein L10 (*Candidatus Liberibacter africanus*)

ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศสมี
ความเหมือน 81%

Accession No. AAF68452 คือ

RplJ (*Candidatus Liberibacter africanus* subsp.
capensis)

ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส
มีความเหมือน 73%

Accession No. ABO40218 คือ

50S ribosomal subunit protein L10

(*Candidatus Liberibacter americanus*)

ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส
มีความเหมือน 61 %

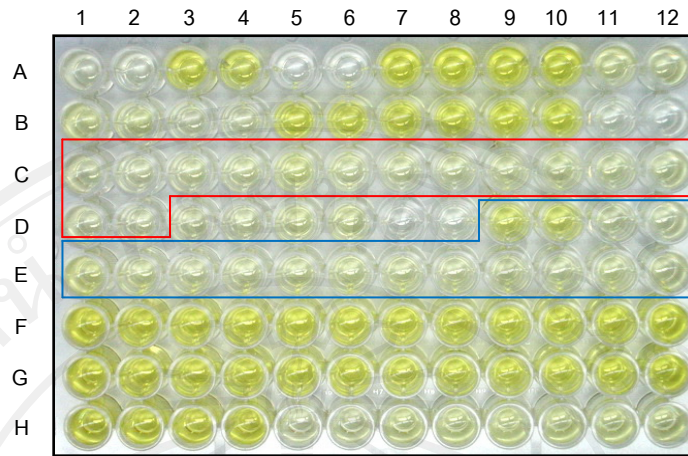
* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า

3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิค ELISA

เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเตซ่าด้วยเทคนิค ELISA โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างมาตรฐานของเชื้อ CTV (บริษัท BIOREBA) โดยอาศัยหลักการการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลุมทดสอบและตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร แล้วมีค่าใกล้เคียงกับ positive แสดงว่าตัวอย่างใบพืชที่นำมาตรวจสอบนั้นมีเชื้อ CTV (*Citrus tristeza virus*) อยู่ และจากการนำตัวอย่างไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร พบว่าใบส้มโอที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส คือ ใบยอดค่าง (leaf mottling) เส้นใบโปร่งใส (vein clearing) ขอบใบม้วนเข้าคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด้านหนา หัก ย่น ใบมัน ใบเรียวยาวและมีสีเขียวเข้มกว่าปกติ จากสวนของเกษตรกรจำนวน 2 สวน เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อ CTV วัดค่า O.D. แล้วพบว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน้อยมากโดยค่าที่อ่านได้ต่ำกว่าการยอมรับให้เป็นปฏิกิริยาแบบบวก (positive) คือได้ค่า O.D. อยู่ระหว่าง 0.138 ถึง 1.781 เมื่อเทียบกับ positive ซึ่งต้องมีค่า 2.240 ถึง 2.969 เหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดในส้มสายน้ำผึ้งที่แสดงค่า O.D. อยู่ระหว่าง 2.889 ถึง 3.414 (ภาพ 18 , ตาราง 4)



ภาพ 18 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในใบส้มโดยวิธี ELISA

- แถว A1-A2 = Blank; extraction buffer
- แถว A3-A4 = Positive control CTV (infected citrus)
- แถว A5-A6 = Negative control (Healthy citrus)
- แถว C1-C12 = ตัวอย่างส้มโอ (สวนนายสมบัติ)
- แถว D1-D2 = ตัวอย่างส้มโอ (สวนนายสมบัติ)
- แถว D3-D6 = ตัวอย่างมะนาว (สวนนายสมบัติ)
- แถว D7-D8 = เพลี้ยอ่อน (สวนนายสมบัติ)
- แถว D9-D12 = ตัวอย่างส้มโอ (สวน ค.ต. วุฒิพงษ์)
- แถว E1-E12 = ตัวอย่างส้มโอ (สวนค.ต. วุฒิพงษ์)
- แถว F1-F12 = ตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง จากอำเภอฝาง
- แถว G1-G12 = ตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง จากอำเภอฝาง
- แถว H1-H4 = ตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง จากอำเภอฝาง
- แถว H5-H6 = ตัวอย่างส้มโอ จากอำเภอฝาง
- แถว H7-H12 = ตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง จากอำเภอฝาง

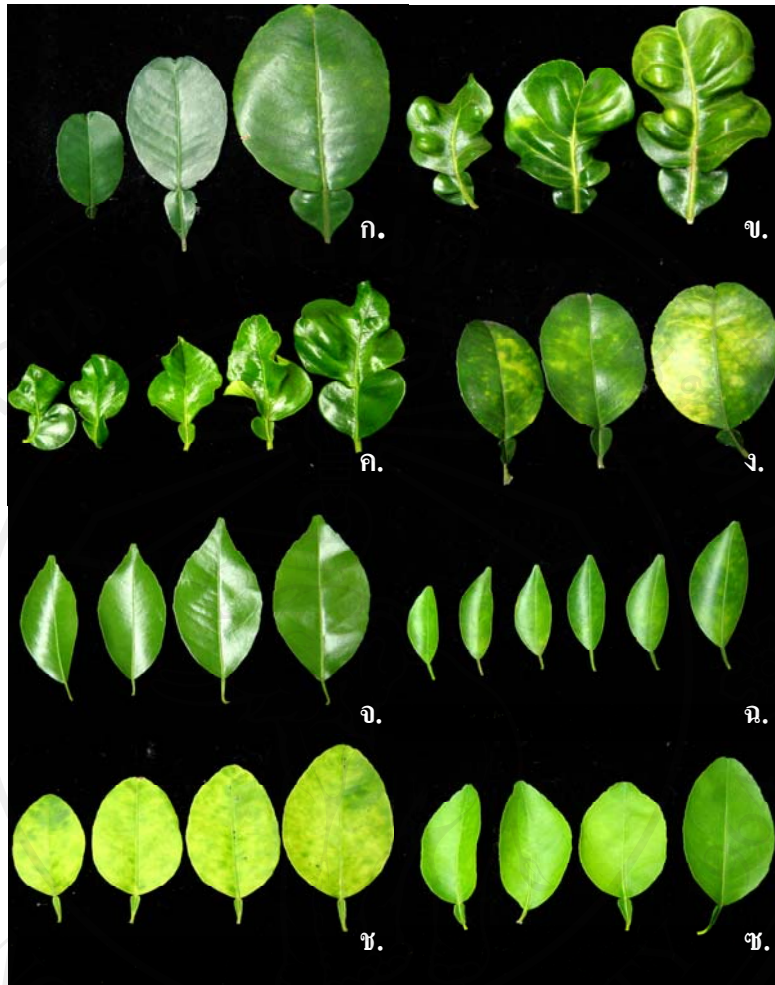
ตาราง 4 ผลการอ่านค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader

	1	2	3	4	5	6
A	0.034	0.034	2.969	2.240	-0.218	-0.216
B	0.485	0.474	0.119	0.133	3.514	3.346
C	0.214	0.175	0.266	0.254	0.630	0.195
D	0.180	0.173	0.219	0.222	0.420	0.420
E	0.612	0.309	0.197	0.211	0.283	0.296
F	3.189	3.414	3.327	3.414	3.164	3.148
G	3.224	3.224	3.369	3.224	3.369	3.166
H	2.889	3.134	3.134	3.110	0.147	0.200

	7	8	9	10	11	12
A	3.114	3.114	3.084	2.969	0.384	0.199
B	3.346	3.395	3.451	3.514	-0.104	-0.210
C	0.215	0.288	0.220	0.267	0.251	0.180
D	-0.178	-0.115	1.873	1.781	0.197	0.138
E	0.290	0.207	0.248	0.149	0.292	0.221
F	3.189	3.387	3.189	3.062	3.207	3.189
G	2.901	3.036	3.140	3.140	3.166	3.140
H	0.453	0.445	0.542	0.466	0.462	0.435

3.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยวิธี RT-PCR

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าในพืชตระกูลส้ม โดยทำการเลือกตัวอย่างใบพืช ได้แก่ ส้มโอ ส้ม และ มะนาวที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส โดยวิธีการสกัด double-strand RNA และเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเมื่อใช้ forward primer AR18F และ reverse primer AR18R สามารถพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 511 bp จากตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งและมะนาวที่แสดงอาการใบเล็ก เรียว ค้าง เป็นแฉับสีเขียวกระจายทั่วไป (ภาพ 19 ฉ, ภาพ 20 แถว 7 และ ภาพ 19 ช, ภาพ 20 แถว 8 ตามลำดับ) แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ในตัวอย่างใบส้มโอจากกิ่งตอนสวนนายวรศักดิ์ เรียงยาว ที่แสดงอาการใบหงิก ย่น ด้าน หน้า ขอบใบม้วนเข้า เส้นกลางใบแตก (ภาพ 19 ข, ภาพ 20 แถว 3) ตัวอย่างใบส้มโอจากสวนนายสมบัติ บุคดี อาการใบหงิก ค้าง โปร่งแสง ของใบม้วนเข้า (ภาพ 19 ค, ภาพ 20 แถว 4) ตัวอย่างใบส้มโอจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อาการค้าง เป็นแฉับเหลืองๆ กระจายทั่วไป (ภาพ 19 ง, ภาพ 20 แถว 5) และจากตัวอย่างใบส้มเขียวหวานและมะนาว ใบปกติ จากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพ 19 จ, ภาพ 20 แถว 6 และ ภาพ 19 ช, ภาพ 20 แถว 9 ตามลำดับ)



ภาพ 19 ใบพืชที่นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยวิธี RT-PCR

ก = ใบส้ม โอปกติ จากต้นของกรมวิชาการเกษตร

ข = ใบส้มโอบจากกิ่งตอนสวนนายวรศักดิ์ เรียงยาว จังหวัดเชียงราย อากาศแห้ง เส้นกลางใบแตก

ค = ใบส้มโอบจากสวนนายสมบัติ บุคดี ใบหงิก เส้นใบโปร่งแสง ขอบใบม้วน

ง = ใบส้มโอบจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อากาศต่าง
เป็นแฉ่มเหลืองๆ กระจายทั่วใบ

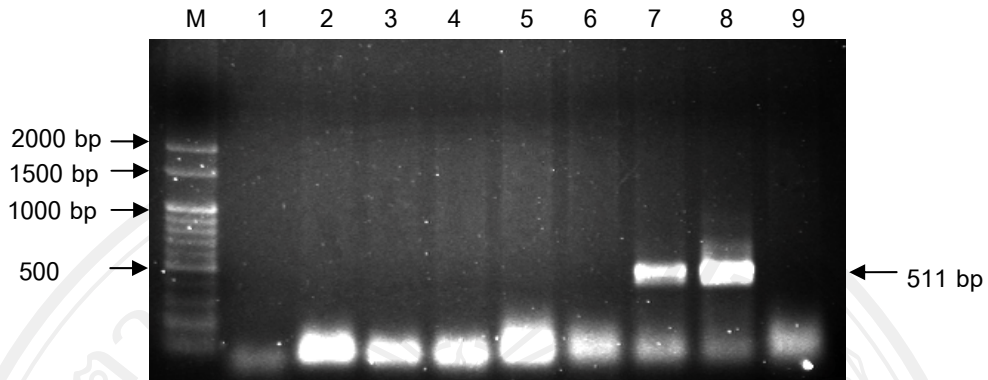
จ = ใบส้มเขียวหวานปกติจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ฉ = ใบส้มสายน้ำผึ้งจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อาการใบเล็ก เรียว ต่าง

ช = ใบมะนาวจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อากาศใบต่าง เหลือง เป็นจ้ำๆ แฉ่มสีเหลืองกระจาย

ซ = ใบมะนาวปกติจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



ภาพ 20 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primers AR18F/AR18R โดยวิธี RT-PCR

- แถว M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder
- แถวที่ 1 = น้ำกลั่น
- แถวที่ 2 = ใบส้มโอจากต้นของกรมวิชาการเกษตร (ภาพ 19 ก)
- แถวที่ 3 = ใบส้มโอจากกิ่งตอนสวนนายวรศักดิ์ เรียงยาว จังหวัดเชียงราย อากาศแห้ง เส้นกลางใบแตก (ภาพ 19 ข)
- แถวที่ 4 = ใบส้มโอจากสวนนายสมบัติ บุคดี อากาศใบหงิก ต่าง โปร่งแสง (ภาพ 19 ค)
- แถวที่ 5 = ใบส้มโอจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อากาศต่าง เป็นแฉับเหลืองๆ กระจายทั่วใบ (ภาพ 19 ง)
- แถวที่ 6 = ใบส้มเขียวหวานปกติจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพ 19 จ)
- แถวที่ 7 = ใบส้มสายน้ำผึ้งจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใบเล็ก ต่าง แฉับสีเหลืองกระจายทั่วใบ (ภาพ 19 ฉ)
- แถวที่ 8 = ใบมะนาว จากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใบเหลือง แฉับสีเหลืองกระจายทั่วใบ (ภาพ 19 ช)
- แถวที่ 9 = ใบมะนาวปกติจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพ 19 ซ)