การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหา แบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

Using Real time PCR Technique for the Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Causal Agent of Citrus Canker for Certification of Canker Free Orchards

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/]
รุ่งนภา ทองเคร็ง[1/] บุญปิยะธิดา คล่องแคล่ว[2/]
Nuttima Kositcharoenkul[1/] Tippawan Kanhayart[1/] Buranee Puawongphat[1/]
Rungnapha Thong kreng[1/] Boonpiyatida Klongklew[2/]

ABSTRACT

To export pomelo (*Citrus maxima* Merr.) to the European Union (EU), exporter is obliged to follow the International Standards for Phytosanitary Measures No.6 and No.10 (ISPM No. 6 and ISPM No.10) Beside, Guidelines for Surveillance Requirements for the Establishment of Pest Free Places of Production and Pest Free Production Sites must be followed. Canker disease of pomelo caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a quarantine pest of the EU. Therefore, Pomelo orchards certification for canker free is necessary and the effective detection method for *X. citri* subsp. *citri* needs to be developed. This work was to utilize the Real time PCR, the rapid and high accuracy technique, to detect *X. citri* subsp. *citri* for the canker-free certification of pomelo orchards. The primers 2/3 and D1/D2 were designed from avirulence/ pathogenicity gene (pthA gene) of *X. citri* subsp. *citri* which had high specificity and could detect as minimum as 5 picrograms of DNA or 81 CFU/ml of the bacterial cells. The method showed high accuracy of detection of *X. citri* subsp. *citri* in both symptom and symptomless samples. In 2014, this Real time PCR method was used for the establishment of canker-free production sites in pomelo orchards at Wiang Kaen Districts, Chiang Rai Province. From 130 orchards, 84 canker-free production

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงจังหวัดเชียงราย สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

orchards were successfully established. The Real time PCR method developed in this study was eventually accepted by the EU for the pomelo production in Thailand for export to the EU and representing as a model for the canker-free certification of others crops for countries where *X. citri* subsp. *citri* is a quarantine pests

Key words : Canker disease, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, detection, Real time PCR

บทคัดย่อ

การตรวจรับรองแปลงปลูกส้มโอจำเป็นต้องมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ การวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะนำเทคนิค Real time PCR ใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจากยีน avirulence/ pathogenicity (pthA gene) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* มีความไวในการตรวจแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA ที่ระดับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 CFU/ml วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจน และตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จากการนำวิธีการดังกล่าว ไปใช้ตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพ การปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป ในปี พ.ศ. 2557 ที่แปลงปลูกส้มโอ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 103 แปลง ผลการตรวจ พบว่า มีแปลงปลูกส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ผ่านการตรวจรับรอง เพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 84 แปลง เทคนิค Real time PCR เป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ตรวจรับรองการปลอดจากโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป จึงทำให้สามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และวิธีการยังใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อการส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

คำหลัก: โรคแคงเคอร์, *Xanthomonas axonopodic* PV. *citri*, ส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ การตรวจรับรอง

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burn) Merr.] เป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพมากในการส่งออก ประเทศไทยมีนโยบายการส่งออกส้มโอไปขายต่างประเทศ แต่ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการส่งออกส้มโอ คือ ปัญหาเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแคงเคอร์ เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูก (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) เชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์เกิด

จากแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และสหภาพยุโรป (EPPO/CABI, 2005) ดังนั้นการนำเข้าพืชตระกูลส้ม จึงมีกฎหมายและระเบียบควบคุมการนำเข้าอย่างเข้มงวด สหภาพยุโรปเป็นตลาดใหญ่แห่งหนึ่งของโลกมีความต้องการนำเข้าส้มโอ มีกฎระเบียบที่เข้มงวดต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดและเงื่อนไขการนำเข้าผลส้มโอของสหภาพยุโรปตาม Council Directive 2000/29/EU โดยต้องมีการรับรองอย่างเป็นทางการว่าไม่พบโรคแคงเคอร์ ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลส้ม ในแปลงผลิตและพื้นที่ติดต่อใกล้เคียงตั้งแต่เริ่มฤดูกาลผลิตที่แล้วจนถึงฤดูกาลผลิตปัจจุบัน ผลส้มที่เก็บเกี่ยวจากแปลงผลิตต้องไม่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ ผลส้มก่อนส่งออกต้องชุบด้วยสาร sodium orthophenylphenates หรือสารอื่นที่เป็นที่ยอมรับ ต้องแสดงไว้ในใบรับรองตามเงื่อนไขและผลส้มบรรจุกล่องในสถานที่หรือศูนย์การขนส่งที่ลงทะเบียนเพื่อใช้ในการนี้โดยเฉพาะหรือผ่านระบบที่ยอมรับได้ว่าเท่าเทียมกันกับเงื่อนไขที่ได้กำหนดไว้

จากการสำรวจและติดตามการเกิดโรคแคงเคอร์ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร พบว่า แหล่งปลูกส้มโอที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย เป็นแหล่งปลูกส้มโอขนาดใหญ่ ไม่พบการระบาดของโรคแคงเคอร์บนพันธุ์ทองดี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้องการของตลาดยุโรป จึงได้ดำเนินตรวจเพื่อการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures; ISPM) ฉบับที่ 6 (ISPM NO. 6) เรื่อง การเฝ้าระวังและติดตามศัตรูพืช และฉบับที่ 10 (ISPM NO. 10) เรื่อง ข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช พัฒนาระบบการตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์ที่เป็นที่ยอมรับของประเทศผู้นำเข้า ต้องมีการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอ มีการติดตามเฝ้าระวังการเกิดโรคในแหล่งผลิตเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูก ทำให้ประเทศไทยจะสามารถส่งออกส้มโอไปจำหน่ายยังสหภาพยุโรปได้ โดยมีการระบุข้อความเพิ่มเติมในใบรับรองปลอดศัตรูพืช “Pomelo in this consignment has been inspected and treated under control of DOA Thailand according to EU 2000/29/EC annex 4A1 articles 16.2 c1, 16.3 A, 16.4 A, 16.5 C” ซึ่งหัวใจสำคัญ คือวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ที่ถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ มีรายงานการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการ

ตรวจสอบเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* (Hartung *et. al*, 1993, Hartung *et. al*, 1996, ณัฏฐิมา และคณะ, 2548) และมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอ เพื่อตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์และเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต แต่เนื่องจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ต้องนำผลผลิต PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel eletrophoresis แล้วย้อมด้วยสาร ethidium bromide ตรวจภายใต้แสง UV ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR และสาร ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็งที่มีอันตราย Mavrodieva *et al.* (2004) ได้พัฒนาเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเคอร์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถตรวจสอบจากใบส้มเป็นโรคที่มีจุดแผลขนาดเล็ก โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* 10 CFU/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1912 ในพิพิธภัณฑ์เก็บตัวอย่างโรคพืช

การศึกษานี้เป็นการนำเอาเทคนิค Real time PCR มาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์ และเฝ้าระวังติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียม DNA ของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri*

การสกัด genomic DNA ของแบคทีเรีย ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยแตะแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* อายุ 48 ชม. ด้วยลูป จำนวนหนึ่งลูป ละลายใน 1 ไมโครลิตร (μl) ของ resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) จำนวน 100 μl ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น เติม 500 μl ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติม 250 ul ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °ซ ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติม chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) จำนวน 500 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบนใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นในตู้เย็น -20 °ซ จำนวน 378 μl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 150 μl ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 μl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง

spectrophotometer และปรับความเข้มข้น DNA ให้ได้ 50, 5, 1 (ng)/ul 500, 50, 5, 1 (pg)/ul และ 100 (fg)/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR

2. การเตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri*

นำแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* อายุ 48 ชม. มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 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 นำไปตรวจหาปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 50 ul เกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร Semi-selective for Xanthomonas (SX medium) (Schaad, 1988) เก็บไว้ที่ 30 °ซ เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

3. การตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

สืบค้นข้อมูล primer ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดี และมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์ ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR ต่อไป

3.1 การทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ทดสอบกับเครื่อง LightCycler 480 โดยใช้ LightCycler 480 SYBR green I master ซึ่งเป็นสารละลายผสม (Master mix) ที่มี SYBR green มีสี fluorescent dye เป็นตัวตรวจปฏิกิริยา Real time PCR ตัวอย่างจะทำปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) ในการทำปฏิกิริยาจะต้องมี ตัวควบคุมลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นแทน DNA ของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* และตัวควบคุมบวก (positive control) ใช้ DNA ของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ทุกครั้ง ในการทดสอบใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ 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. citri* subsp. *citri* โดยมีโปรแกรม สำหรับปฏิกิริยา Real time PCR ดังแสดงใน Table 1

ในขณะที่ทำปฏิกิริยา เครื่อง LightCycler® 480 จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการ

Table 1 Programs for Real time PCR reaction

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

สะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า background ค่า Cp ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบปริมาณของผลผลิต PCR เป้าหมาย ถ้ามีผลผลิต PCR เป้าหมายมาก ค่า Cp จะต่ำ และใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ตัวที่สองในการตรวจสอบผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา Real time PCR ของแบคทีเรียแต่ละชนิด มีลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature (Tm)) เฉพาะตัวแตกต่างกัน การรายงานผลทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับค่า Cp และ การวิเคราะห์ melting curve

3.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ทั้ง 3 คู่ ใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *X citri* subsp. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 50 ไอโซเลท และ เชื้อในกลุ่ม Xanthomonas ได้แก่ แบคทีเรีย *X citri* subsp. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris และ X. oryzae* pv. *oryzae* โดยความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 CFU/ml ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การทดสอบความไวในการตรวจจับเชื้อแคงเคอร์ ของ primer โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 ng ถึง 100 fg และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่

ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-10^8 CFU/ml ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

4. ทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

เก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลโรคแคงเคอร์จากตัวอย่างใบส้มโอ โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm. นำตัวอย่างใส่ หลอด microtube ที่เติมด้วย 100 μl ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microtube นำส่วนน้ำใส 2 μl ของตัวอย่าง เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เปรียบเทียบกับการใช้วิธี standard PCR ด้วย primer D1/D2 (ณัฏฐิมา และคณะ 2548) และ primer 2/3 (Hartung *et. al*, 1993) นำทุกตัวอย่างมาแยกเชื้อบนอาหาร semi-selective for Xanthomonas (SX medium) โดยนำตัวอย่างโรคแคงเคอร์ตัวอย่างละ 50 μl ไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร SX medium ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ํซ นาน 72 ชม. ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

5. การทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

เก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงปลูกของเกษตรกร ที่มีการระบาดของโรคแคงเคอร์ โดยเก็บตัวอย่างใบของส้มโอ ที่แสดงอาการของโรค และตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรค รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมด้วยสารละลาย PBS 25 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชม. จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนของตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS จำนวน 500 μl นำ 2 μl ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR โดยใช้primer 2/3 ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และนำทุกตัวอย่างทำการตรวจเชื้อบนอาหาร SX medium

6. การตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

การตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ตามประกาศของกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลส้มโอไปสหภาพยุโรป พ.ศ. 2556 (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2550) การตรวจรับรองแหล่ง

ผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ เพื่อส่งไปสหภาพยุโรป ในปี 2557 มีเกษตรกรผู้ประสงค์จะขอใบสำคัญแสดงการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ สำหรับการส่งออกไปสหภาพยุโรป มีจำนวน 93 ราย รวม 103 แปลง เจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย ได้สุ่มเก็บตัวอย่างกิ่งส้มโอ จำนวน 2 ครั้ง คือ ในเดือนมีนาคม และเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 โดยสุ่มเก็บจำนวน 3 กิ่ง/ต้น จำนวน 25 ต้น/สวน แล้วนำตัวอย่างมาตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ดำเนินการโดยนำตัวอย่างใบส้มโอ ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มล เติมด้วยสารละลาย PBS buffer ปริมาณ 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชม.เพื่อให้แบคทีเรียที่ติดอยู่ภายนอกใบส้มโอถูกล้างออกมา และทำการตรวจตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 5

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. citri* subsp. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

จากการสืบค้นข้อมูลพบ primer ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดี และมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย X. ตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* จึงคัดเลือก primer ที่ออกแบบมาจาก ยีน pathogenicity gene (pthA gene) ของแบคทีเรีย X. ตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ซึ่งมี pthA gene พบเฉพาะในแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่ชักนำให้เกิดโรคแคงเคอร์ในพืชตระกูลส้ม (Swarup *et al.*, 1991) โดยยีนนี้จะทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Duan *et al.* 1999) ลำดับเบสของ pthA gene จะถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อ ๆ ไป การเลือก primer ที่ออกแบบจาก pthA gene ทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ในการทดลองจึงได้เลือก primer จำนวน 3 ชุด ดังนี้

1. primer D1(GGCCTTGATCA AAAGAACCA) และD2(TTGAAGTAGGGG AC GGTTTA) จากรายงานของ ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ที่ออกแบบจาก pthA gene ของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X citri* subsp. *citri* สายพันธุ์ canker A

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

3. primer VM3 (GCATTTGATGAC GCCATGAC0 VM4 (TCCCTGATGCCT GGAG GATA) จากรายงานของ Mavrodieva *et al.* (2004)

1.1 การทดสอบ primer จากการทดสอบ primer ทั้ง 3 คู่ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ primer กับ DNA ของแบคทีเรีย

X. citri subsp. *citri* ต้นแบบ (annealing) ที่ 58 °ซ 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 °ซ, 87.73 °ซ และ 88.1 °ซ ตามลำดับ (Figure 1)

1.2 ความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบ และเซลล์แบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท (Table 2) โดย primer 2/3 ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดที่ 18.54 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูง ถึง 36.343 (Figure 2a) ส่วน primer D1/D2 ให้ค่า Cp ต่ำรองลงมาที่ 19.61 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูงเท่ากับ primer 2/3 (Figure 2b) ในขณะที่ primer VM3/VM4 ให้ค่า Cp สูงที่ 23.33 และให้ค่า SYBR green fluorescence สูงที่สุดที่ 42.329 (Figure 2c) แต่ primer ทั้ง 3 คู่ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบ และเซลล์แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris*

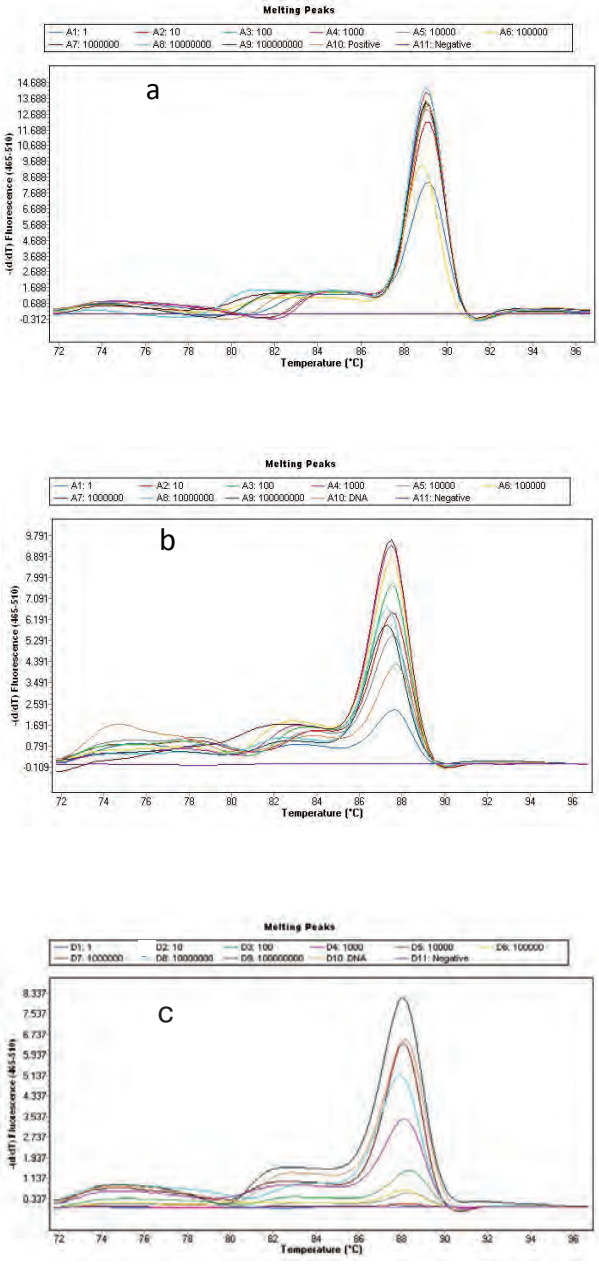

Figure 1 Analysis melting curve of PCR product from 3 pairs of primer with different Tm.

a. Tm of PCR product from primer D1/D2 of 89.03 °C

b. Tm of PCR product from primer 2/3 of 87.73 °C

c. Tm of PCR product from primer VM3/VM4 of 88.1 °C

และ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยให้ค่า Cp สูงกว่า 35 รอบ (Figure 3)

จากผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จากต้นแบบของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 50 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแบคทีเรียกลุ่ม Xanthomonas อื่น ๆ และแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ canker A (ณัฏฐิมาและวงศ์, 2546) ผลการทดสอบได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Hartung *et al*., 1993; ณัฏฐิมา และคณะ, 2548 และ Mavrodieva *et al*., 2004

ผลการทดสอบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ของ primer ทั้ง 3 คู่ พบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 5 pg และความไวในการตรวจของ primer VM3/VM4 ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 500 pg (Table 3) ขณะที่ primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ 81 81 และ 8.1×10^6 CFU/ml ตามลำดับ (Table 4) จากการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และprimer 2/3 มีความไวในการตรวจการตรวจแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ได้ดีกว่า primer VM3/VM4 โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ primer VM3/VM4 ยังเกิด primer dimers ที่เกิดจากการจับกันเองของ primer ในหลุมที่มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ต่ำ ๆ โดยทำให้เกิด peak ในการวิเคราะห์ melting curve จำนวน 2 peak อาจเนื่องจากขนาดของผลผลิต PCR มีขนาด

Table 2 The specificity of primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 for detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. using Real time PCR

Bacterial name	Cp Value by Real time PCR		
	Primer D1/D2	**Primer 2/3**	**Primer VM3/VM4**
X. axonopodis citri subsp. *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

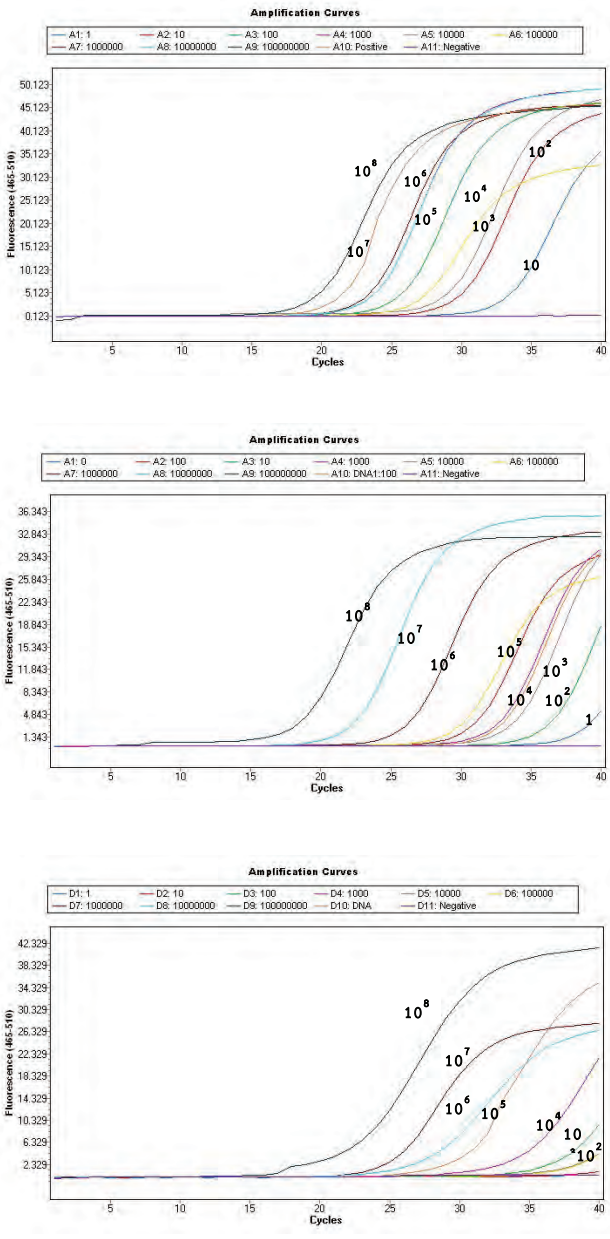

Figure 2 The sensitivity of primer D1/D2(a), primer 2/3(b) and primer VM3/VM4(c) for detection of *Xanthomonas citri* pv. *citri* suspension using Real time PCR.

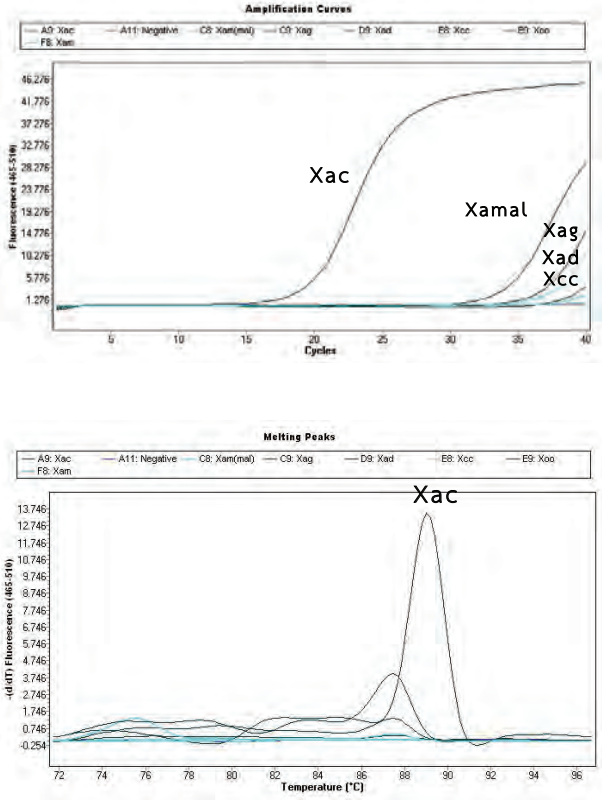

Figure 3 The result of specificity using primer D1/D2 detected *Xanthomonas citri* subsp *citri* (Xac) and *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xamal), *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xcg), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* (Xad), *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), *X campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

Table 3 The specificity of primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 for DNA detection on *Xanthomonas citri* subsp. *citri.* using Real time PCR

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	-	-	-

Table 4 The sensitivity of primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 for detection of suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri.* using Real time PCR

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	-

เล็ก primer มีโอกาสจับกันเองสูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ดี (Chou *et al.* 1992) จากผลการทดลองการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน ทั้งความเฉพาะเจาะจงและความไว

2. ทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

ผลการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* จากตัวอย่างใบส้มโอที่เป็นโรคแคงเคอร์ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 พบว่าเทคนิค Real time PCR สามารถตรวจพบ

Table 5 The detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in pomelo canker disease using Real time PCR compared to Standard PCR with primers D1/D2 and primer 2/3 and selective media for Xanthomonas (SX medium)

Sample	Real time PCR		Standard PCR		SX medium
	Primer D1/D2 Cp	Primer 2/3 Cp	Primer D1/D2	Primer 2/3	
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 (+)	+	+	+

โรคแคงเคอร์ทั้ง 10 ตัวอย่าง (Table 5) เช่นเดียวกับการตรวจหาด้วยวิธี standard PCR ที่ตรวจพบโรคแคงเคอร์ได้ 10 ตัวอย่างเช่นกัน และการแยกเชื้อด้วยอาหาร SX พบว่า โคโลนีของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* เจริญในอาหาร ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง แต่การตรวจสอบโดยเทคนิค Real time PCR ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2-3 ชม. โดยสามารถดูผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง จากหน้าจอของเครื่อง Real time โดยไม่ต้องรอเสร็จสิ้นปฏิกิริยา และการตรวจด้วยอาหาร SX medium ต้องใช้เวลา 3-4 วัน จึงจะทราบผลว่าตัวอย่างใดปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ดังนั้นการใช้เทคนิค Real time PCR จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็ว ปลอดภัย และประหยัดเวลา

3. การทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

จากตัวอย่าง ส้มโอที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ จำนวน 24 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการจำนวน 26 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* พบว่าเทคนิค Real time PCR โดยใช้ primer 2/3 สามารถตรวจพบเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* จำนวน 44 จาก 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% โดยเทคนิค Real time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่างได้ เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดแยกหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้ 38 ตัวอย่าง (Table 6) และพบว่าตัวอย่างที่แยกเชื้อได้ทั้งหมด เป็นตัวอย่าง

Table 6 The efficacy of using Real time PCR methods for the detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from Pomelo in the Orchards.

Sample	Total sample tested (number)	Real time PCR[1/]	Isolation SX media[2/]
1. Sample with disease symptoms	24	24 [3/]	24
2. Sample without disease symptoms	26	20	14
Total	50	44	38

[1/] Detection by Real time PCR

[2/] Detection of *X. axonopodis citri* subsp. *citri* on SX medium

[3/] Detected *X. axonopodis* pv. *citri* samples

เดียวกันกับที่ตรวจพบจากเทคนิค Real time PCR และตัวอย่างที่ตรวจด้วยเทคนิค Real time PCR แล้วไม่พบก็ไม่สามารถแยกเชื้อบนอาหาร SX medium ได้เช่นกัน

จากผลทดลองพบว่าการแยกหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้จำนวนน้อยกว่าการตรวจหาเชื้อโดยเทคนิค Real time PCR เนื่องมาจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดที่ไปลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* โดยพบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* บนอาหาร SX medium (plating efficiency) อยู่ที่ 54.4 % แต่เทคนิค Real time PCR นั้นมีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ของเชื้อที่อยู่ในระยะ VBNC และเซลล์ที่ตายได้ (Wolf *et al*., 2000) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* สูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ

4. การตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

ผลการตรวจตัวอย่างส้มโอทั้ง 103 แปลง พบแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ จำนวน 19 แปลง โดยตรวจพบในเดือน มีนาคม ปี พ.ศ. 2557 จำนวน 11 แปลง และตรวจพบเพิ่มในเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2557 จำนวน 8 แปลง (Table 7) ทุกตัวอย่างที่ตรวจพบสามารถแยกหาเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* บนอาหาร SX medium ได้ ยกเว้นตัวอย่างที่มีค่า Cp 35 ซึ่งมีปริมาณเชื้อน้อยมาก ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารได้ แปลงปลูกส้มโอที่มีการตรวจ

Table 7 Result of Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker for certification of canker free orchards

Location	No. of Orchards	Detection in March 2014		Detection in June 2014	
		pass	not pass	pass	not pass
Laikgown Weingkhen district Chiang Rai Province	43	40	3	36	7
Muangyai Weingkhen district Chiang Rai Province	60	52	8	48	12
Total	103	92	11	84	19

พบเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ตั้งแต่ครั้งแรกในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557 จะถูกตัดออกไป ไม่มีการตรวจแปลง และสุ่มตัวอย่างมาตรวจละเอียดในห้องปฏิบัติการอีก ครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน ผลจากการตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง ทำให้ในปี พ.ศ. 2557 สามารถรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ได้จำนวน 84 แปลง ออกใบรับรองสุขอนามัยพืชไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 19 ฉบับ ปริมาณ 208,440 กก. รวมเป็นรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอใน อ.เวียงแก่น คิดเป็นมูลค่า 3,126,600 บาท และไม่พบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง (ข้อมูลจากด่านตรวจพืชเชียงของ) จากการดำเนินงานจะเห็นได้ว่าวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อการส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และสามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomomnas citri* subsp. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity (pthA gene) มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไวในการตรวจ ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA ในระดับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 CFU/ml นำไปทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. citri*

subsp. *citri* จากตัวอย่างใบส้มโอที่เป็นโรคแคงเคอร์จากแปลงปลูกที่ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบแบคทีเรียทุกตัวอย่าง วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจน และตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ วิธีการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR เป็นวิธีตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ มีความไว และความเฉพาะเจาะจง สามารถนำไปใช้จริงในการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอของแปลงปลูกเพื่อการส่งออกไปยังสหภาพยุโรป ในปี พ.ศ. 2557 สามารถนำวิธีการไปใช้ตรวจรับรองแปลงปลูกส้มโอทั้งหมด 84 แปลง โดยผลผลิตส้มโอที่ส่งไปไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับ ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรปและวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช 2550. คู่มือการตรวจรับรองส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์เพื่อการส่งออกไปสหภาพยุโรป สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 28 หน้า

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. citri สาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.หน้า 932 – 948.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการ พาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. *วารสารโรคพืช ปีที่ 19 ฉบับที่ 1-2* 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 Res.* 20(7)1717-1723.

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.

Ghezzi, J.I. and T.R. Steck. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. FEMS *Microbiol. Ecol.* 30 : 203-208.

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.

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43 : 93-100.

Oliver, J.D. 2000. *The public health significance of viable but nonculturable bacteria*, p. 277-299. In R.R. Colwell and D.J.Grimes (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. American Society for Microbiology Press, Washington,D.C.

Ordax, M.E., Marco-Noales, M.M. Lopez and E.G. Biosca. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against Copper : Induction of the Viable-but-Non culturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 : 3482-3488.

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.

Wolf, J.M., S.G.C. Vriend, P. Kastelein, E.H. Nijhuis, P.J. van Bekkum and J.W.L. van Vuurde. 2000. Immuno fluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. *Euro. J. Plant Pathol.* 106: 123–133.