

การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออก ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

Detection of Huanglongbing (Greening) in Pomelo Orchards for Export at Wiang Kaen District, Chiang Rai Province

ขวัญดาว ผิวขาว^{1,2} และอังสนา อัครพิศาล¹

Khuandao Piwkhaio^{1,2} and Angsana Akarapisan¹

¹สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202

²ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

¹Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture
Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50202

²Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand 10400

E-mail: khuandao_piwkhaio@yahoo.com

Abstract

Huanglongbing (HLB) or Greening is one of the most serious disease in pomelo cultivation due to its severe destructive and reduction of yield. The object of this study was to study of Huanglongbing (HLB) disease distribution and pathogen in pomelo orchards which were for export at Wiang Kaen District, Chiang Rai Province. Forty samples of pomelo trees were collected for the test of HLB disease from five pomelo orchards. The pomelo leaves showed the symptoms of disease that chlorosis with green vein and blotchy mottling, which finally proved the detection of HLB disease by using PCR (Polymerase Chain Reaction) technique with specific primers A2/J5, designed to amplify *rp/KAJL-rproBC* operon gene, which lies in the ribosomal protein gene of HLB pathogen. The extracted DNA from the infected plant was used to amplify a 703 bp fragment of the *rp/KAJL-rproBC* operon gene. The sequencing analysis of the bacteria ribosomal protein gene among the samples from pomelo, tangerine and lime in an orchard were characterized. The result showed that the causative agent was *Candidatus Liberibacter asiaticus* and 5-10% of pomelo trees in each orchards were found infected.

Keywords: pomelo, Huanglongbing, Greening, PCR

บทคัดย่อ

โรคฮวงลองบิง (Huanglongbing, HLB) หรือกรีนนิ่ง (Greening) เป็นโรคที่สำคัญต่อการปลูกส้มโอก่อให้เกิดความเสียหายและผลผลิตลดลง วัตถุประสงค์

ของการศึกษาเพื่อทราบการแพร่ระบาดของโรคฮวงลองบิงและเชื้อสาเหตุในสวนเกษตรที่ผลิตส้มโอเพื่อการส่งออก ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย โดยการสุ่มตัวอย่างใบส้มโอทั้งหมด จำนวน 40 ต้น จากสวนเกษตรจำนวน 5 สวน พบใบส้มโอที่มีลักษณะอาการใบเหลือง

โดยเส้นกลางใบและเส้นแขนงยังมีสีเขียวพร้อมกับแต้มสีเขียวกระจาย เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) จากการใช้คู่ไพรเมอร์ A2/J5 ชนิดที่จำเพาะกับการขยายยีน *rpKALJL-rproBC* operon ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนของไรโบโซมเชื้อสาเหตุโรค HLB ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบพืชที่แสดงอาการของโรคนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 703 คู่เบส ในบางส่วนของยีน *rpKALJL-rproBC* operon ได้ และจากการหาลำดับเบสบริเวณ ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุที่ได้จากใบส้มโอ รวมทั้งส้มสายน้ำผึ้งและมะนาว ที่ปลูกในบริเวณเดียวกันของสวนเกษตรกร พบว่า เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค HLB คือ เชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยจำนวนต้นที่พบโรค HLB ในสวนส้มโอมีประมาณร้อยละ 5-10 ของจำนวนต้นทั้งหมดในแต่ละสวนที่ทำการตรวจสอบ

คำสำคัญ: ส้มโอ ฮวงหลงบิง กรีนนิ่ง เทคนิคพีซีอาร์

คำนำ

โรคฮวงหลงบิง (Huanglongbing: HLB) หรือโรคกรีนนิ่ง (Greening) มีรายงานว่า พบโรคนี้ครั้งแรกที่ประเทศแอฟริกาใต้ เมื่อ พ.ศ. 2475 สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการสำรวจพบโรคและแมลงพาหะในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2516 (อำไพวรรณ และคณะ, 2542) โรค HLB เป็นกับส้มทุกพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นส้มเขียวหวาน ส้มตรา ส้มโอ มะนาว และมะกรูด (กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร, 2546) มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) ที่อยู่ใน subdivision α -Proteobacteria โดยจะพบเชื้อนี้เจริญอยู่เฉพาะในท่อลำเลียงอาหาร (phloem limited bacteria) และไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม "*Candidatus*" generic name *Liberibacter* (Murray and Schleifer, 1994) การแพร่ระบาดของโรคมีหลายวิธี คือ ติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ กิ่งตอนหรือกิ่งพันธุ์ หรือจากการติดตาทาบกิ่ง

นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยแมลงที่เป็นพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดส้ม หรือเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (psyllid) ซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคในพืชตระกูลส้ม โดยแสดงอาการต้นทรุดโทรม ใบเหลือง มีขนาดเล็กและชี้ตั้งตรง คล้ายอาการขาดธาตุ สังกะสี แมงกานีส และแมกนีเซียม ผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ หรือไม่สามารถให้การผลิตดอกออกผลได้ (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

ก่อนปี 1971 มีรายงานว่า พืชตระกูลส้มส่วนใหญ่ในทวีปเอเชียอ่อนแอต่อโรคฮวงหลงบิงยกเว้นส้มโอ แต่อย่างไรก็ตามในช่วง 10 ปีต่อมา ได้มีการค้นพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงหลงบิงที่เข้าทำลายส้มโอในประเทศไต้หวัน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบการแพร่ระบาดของโรคฮวงหลงบิงในสวนปลูกส้มโอที่ประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย จีนตอนใต้ เวียดนาม ไทย ศรีลังกา บังกลาเทศ และกัมพูชา (Jagoueix *et al.*, 1994)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ส้มเก็บตัวอย่างใบส้มโอจากพื้นที่ปลูกส้มโอเพื่อการส่งออกในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 สวนๆ ละ 8 ต้น ประมาณ 20 ใบต่อต้น สังเกตและบันทึกอาการที่พบ รวมทั้งเก็บตัวอย่างใบพืชตระกูลส้มที่ปลูกบริเวณรอบสวน แล้วนำใบพืชดังกล่าวมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรค

การตรวจเชื้อสาเหตุโรคฮวงหลงบิงโดยวิธี PCR

ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอ (total DNA) จากเส้นกลางใบส้มโอและพืชตระกูลส้มที่แสดงอาการของโรคฮวงหลงบิง โดยวิธี CTAB method ที่ดัดแปลงมาจาก Dellaporta *et al.* (1983) ทำการเพิ่มปริมาณยีน *rpKALJL-rproBC* operon ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยวิธี PCR ด้วย forward primer A2 (5' TATAAAGGT TGACCTTTCGAGTTT 3') และ reverse primer J5 (5' ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA 3') ซึ่ง จะ เพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ribosomal protein (*rpKALJ-proBC operon*) ของเชื้อสาเหตุ ประกอบด้วยสารละลาย ปริมาตรรวม 25 μ l ดังนี้ 1x PCR buffer 2.5 μ l, 0.2 mM dNTPs 1 μ l, 2.5 mM $MgCl_2$ 1.25 μ l, *Taq* DNA polymerase (invitrogen) (0.5 unit/ μ l) 0.1 μ l, 1 μ M primer ชนิดละ 1.25 μ l, DNA ต้นแบบ 1 μ l เติมน้ำกลั่นให้ครบ 25 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง programable thermal controller PTC-100TM (MJ Research) มีขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94^oซ นาน 3 นาที 1 รอบ และ denaturation ที่อุณหภูมิ 92^oซ นาน 45 วินาที ที่อุณหภูมิ 62^oซ นาน 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72^oซ นาน 90 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72^oซ นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel (Ruangwong and Akarapisan, 2006)

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ ของเชื้อสาเหตุ โดยนำ PCR product มาวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาและเก็บตัวอย่างส้มโอจากสวน เกษตรกร จำนวน 5 สวนๆ ละ 8 ตัวอย่าง รวม 40 ตัวอย่าง พบว่า ต้นส้มโอที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงเข้าทำลาย ต้นมีอาการตายของกิ่งจากปลายเข้ามา ใบเหลืองร่วงง่าย (Figure 1) ผลผลิตที่ได้จากต้นที่เป็นโรคมียขนาดเล็กและ รูปทรงบิดเบี้ยวผิดปกติ (Figure 2) และเมื่อเก็บตัวอย่างใบ

ส้มโอมาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR พบว่า ส้มโอที่มีลักษณะอาการใบเหลือง ขนาดเล็ก เส้นกลางใบเขียวชัดเจน (Figure 3) และใบที่มีอาการเหลือง ลักษณะจ้ำสีเขียวกระจายทั่วไป (Figure 4) สามารถเกิด แอบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 703 คู่เบส (Figure 7, lane 4) นอกจากนี้ยังได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ที่ปลูกบริเวณรอบสวนส้มโอของเกษตรกรที่มีลักษณะ อาการคล้ายที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรค ฮวงลองบิง (Figure 5; citrus และ Figure 6; lime) ก็พบว่า สามารถ เกิดแอบดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน (Figure 7, lane 5 (tangerine); lane 6 (lime)) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์บางส่วนในบริเวณยีน ribosomal protein (*rpKALJ-proBC operon*) ของเชื้อสาเหตุจาก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ส้มโอ ส้ม และมะนาว และเมื่อนำไปทำการ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน ฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อสาเหตุมีความเหมือน ถึงร้อยละ 96 กับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Accession Number FJ557239) เช่นเดียวกันกับการ ศึกษาโรคฮวงลองบิงของส้มในเขตภาคเหนือตอนบน 3 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ (Ruangwong and Akarapisan, 2006) และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้มาแปลเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถแปลออกมาเป็นลำดับของ กรดอะมิโนจำนวน 115 amino acid (Figure 8) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบความ เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานใน GenBank พบว่า มีความเหมือนทั้งหมด (ร้อยละ 100) กับลำดับของ กรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Accession Number AAP22421)



Figure 1 Pomelo tree displaying HLB disease-induced stem dieback, yellow shoots and foliar mottling

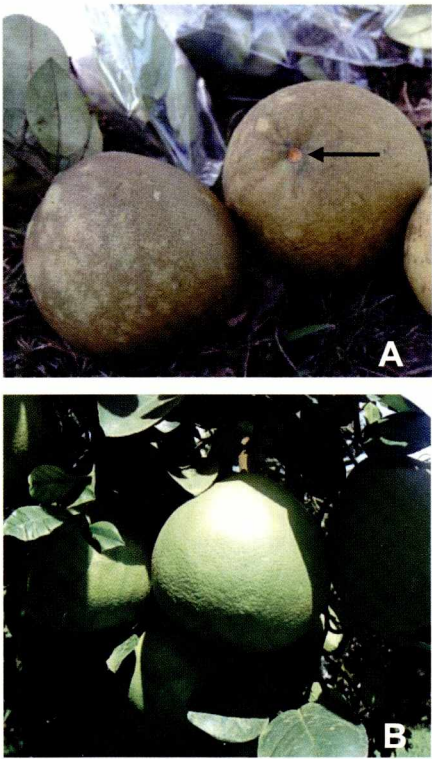


Figure 2 Symptom of HLB
(A) fruits atrophy and redbrown at the peduncular end of fruit axis (Arrow); (B): healthy tree
Note: disease-induced fruit size reduction



Figure 3 Pomelo leaves displaying similar to Zinc-pattern deficiency, which yellowing mottling



Figure 4 Pomelo leaves displaying mottling and blotchy yellowing



Figure 5 Citrus leaves displaying similar to Zinc-pattern deficiency, reduction of leaves and presence of leaf interveinal chlorosis symptoms



Figure 6 Young leaves of lime displaying blotchy mottling symptom.

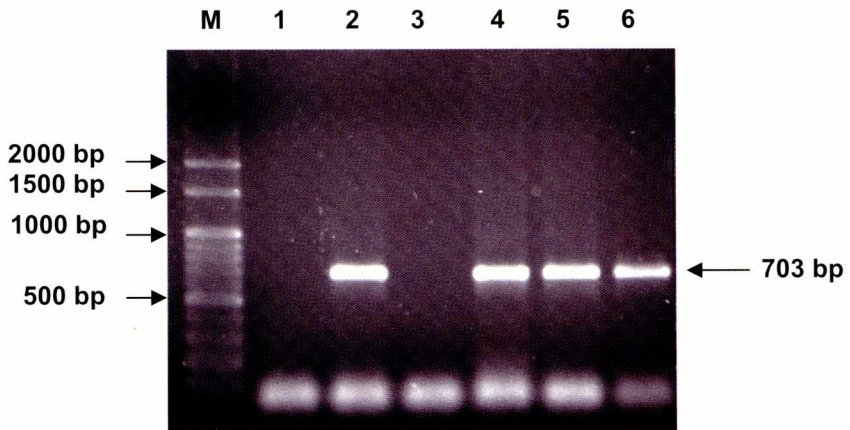


Figure 7 Agarose gel electrophoresis of symptomatic leaf DNA amplified with primers A2 and J5, specific for *Ca. L. asiaticus*. M: 100 pb ladder; lane 1: water; lane 2: extract from HLB-infected citrus (positive control); lane 3: extract from healthy pomelo (negative control); lane: 4-6 extract from HLB-infected plants from orchard; (lane 4: pomelo, lane 5: citrus and lane 6: lime)

```

2   taaaggttgacccttcgagtttctctgtttaatactcttgtagg
   - - - - -
47  ttgttttttgtgtggattcctttttcgcgtatcggatcgcttcttt
   - - - - -
92  tttgtaagggatgcgttaggatttttgttcttcttcgaaatcaag
   - - - - -
137 atatgaaaatattttcttggtatagatataggaaaaggaatgggt
   - - - - -
182 atatttgtcatctggagatgaaagttgaatagacaaggaaagagc
   - - - - - M N R Q G K S
227 gtagaaatttctgaattaagtaagattttttcttcttctggatca
   V E I S E L S K I F S S S G S
272 attgttgttgacattataagggaattagtgttgcgcaaattaaa
   I V V A H Y K G I S V A Q I K
317 gatcttcggaaaaagatgcgggaagctggtggaggtgtaaaagtt
   D L R K K M R E A G G V K V
362 gccaaaaatcgtctcgtcaagattgctatccgtgatactatt
   A K N R L V K I A I R D T S I
407 agaggaatatctgatcttttctgttgggcagtctctaattgtctat
   R G I S D L F V G Q S L I V Y
452 tcggatagtctctgttattgctcctaaaaatttcggttagcttttca
   S D S P V I A P K I S V S F S
497 aatgacaataatgaatttagagttcttgggtggggtgttagagaag
   N D N N E F R V L G G V V E K
542 ggcgtcctt
   G V L

```

Figure 8 Partial nucleotide sequence (normal letter) of the ribosomal protein gene (*rp*/KAJL-*rproBC* operon) and encode amino acid sequence (bold letter) from HLB-pomelo leave

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างส้มโอ จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างใบส้มโอที่มีลักษณะอาการใบเหลือง ขนาดเล็กเส้นกลางใบสีเขียวชัดเจน และใบที่มีลักษณะอาการเหลืองมีจ้ำสีเขียวกระจายทั่วไป สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR แสดงให้เห็นว่า ใบส้มโอที่แสดงลักษณะอาการเช่นนี้เป็นอาการที่เกิดจากโรคฮวงลงบิงเข้าทำลาย โดยพบการแพร่ระบาดประมาณร้อยละ 5-10 ในแต่ละสวนที่ทำการสำรวจ รวมทั้งยังสามารถตรวจพบในพืชตระกูลส้มอื่นๆ ที่ปลูกรอบสวนส้มโอ ได้แก่ ส้มสายน้ำผึ้งและมะนาว และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rp*/KAJL-*rproBC* operon พบว่า มีความเหมือนถึง

ร้อยละ 96 กับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank (Accession Number FJ557239) และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนทั้งหมด (ร้อยละ 100) กับลำดับของกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* GenBank (Accession Number AAP22421) ที่มีรายงาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546. สัม.
จาก <http://thaifarmer.oae.go.th/Agriinfo/crop/gsom/som.html> [16 มิถุนายน 2546].
- อำไพวรรณ ภราดรพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล
วิเชียร กำจายภัย สุพัฒน์ อรรถธรรม และ
นิพนธ์ ทวีชัย. 2527. โรคส้มในประเทศไทย.
โรงพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัดพันธ์พิบลิชซิ่ง,
กรุงเทพฯ. 126 น.
- อำไพวรรณ ภราดรพัฒน์ และปราณี ฮัมเมอร์ลิงค์.
2542. นานาสาระส้มเขียวหวาน. ภาควิชา
โรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 181 น.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983.
A plant DNA miniprep: version II.
Plant Molecular Reporter. 4: 19-20.
- Jagoueix, S., J.M. Bové and M.Garnier. 1994.
The phloem-limited bacterium of greening
is a member of the alpha subdivision of
the proteobacteria. **International Journal
of Systemic Bacteriology**. 44: 379-386.
- Murray, R.G.E. and K.H. Schleifer. 1994.
Taxonomic notes: a proposal for
recording the properties of putative taxa
of procaryotes. **International Journal of
Systematic Bacteriology**. 44: 174-176.
- Ruangwong, O. and A. Akarapisan. 2006.
Detection of *Candidatus Liberibacter
asiaticus* causing citrus Huanglongbing
disease. **Journal of Agricultural
Technology**. 2(1): 111-120.