ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	**การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความสัมพันธ์กับโรคพุ่มแจ้ของลำไยโดยเทคนิคเซาท์เทอร์นบลอทไฮบริไดเซชันและโพลีเมอเรสเชนรีเอ็คชัน**
ชื่อผู้เขียน	**นายเมธาสิทธิ์ คนการ**
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	**สาขาวิชาโรคพืช**

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชชา สอาดสุด	**ประธานกรรมการ**
อาจารย์ ดร. วรวรรณ ชาลีพรหม	**กรรมการ**
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย	**กรรมการ**
อาจารย์ ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

การใช้เทคนิค Dot-Blot Hybridization ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพุ่มไม้กวาดของลำไยโดยใช้ดีเอ็นเอตัวติดตามซึ่งมีความจำเพาะกับส่วนของลำดับเบสที่มีส่วนอนุรักษ์สูงบริเวณ 16 S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา จากตัวอย่างพืช 250 ตัวอย่างที่เป็นโรคทั้งในสภาพธรรมชาติและในเรือนทดลอง พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณบนแผ่น nitrocellulose ในทุกตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบยกเว้นดีเอ็นเอจากพืชชุดควบคุม จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ คือลำไยปกติ ลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด แพงพวยที่ผ่านการเสียบยอดจากลำไยที่เป็นโรค ฝอยทอง (*Cuscuta campestris*) ปกติ และที่ใช้เป็นสะพานเชื่อมระหว่างลำไยเป็นโรคและแพงพวยปกติ ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจสอบกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไป คือ R16F2/R2 และ fU5 /rU3 ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับเบสพื้นฐานของเชื้อไฟโตพลาสมา ผลการตรวจสอบไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา จากนั้นใช้เทคนิค Nested PCR ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาของลำไยที่เป็นโรคโดยใช้ไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไป คือ R16F1/R16RO เป็นไพรเมอร์คู่แรก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตามด้วยไพรเมอร์คู่ที่ สอง

คือ R16F2/R16R2 พบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบการใช้เทคนิค PCR ในปัจจุบันยังไม่สามารถใช้ตรวจสอบสาเหตุโรคพุ่มไม้กวาดในลำไยและยังไม่สามารถสรุปว่าโรคดังกล่าวเกิดจากเชื้อ และมีขบวนการเกิดโรคได้

จากการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในตัวอย่างพืช โดยใช้เทคนิค sequential polyacrymide gel electrophoresis (sPAGE) ไม่พบ viroid –like RNA band อยู่บริเวณเหนือตำแหน่ง 7 S RNA ในตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ นอกจากนั้นยังได้ใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ viroid ของ พืชในกลุ่มต่างๆ จำนวน 6 คู่ เมื่อตรวจหา viroid จากลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด โดยใช้วิธี RT-PCR ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 bp จากตัวอย่างลำไยโรคพุ่มไม้กวาด และขนาด 300 และ 400 bp จากแพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่เป็นโรคจาก DNA specific CEVd primer ซึ่งแตกต่างจากที่มีผู้รายงานไว้ในต่างประเทศ 370 bp การศึกษาครั้งนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อไวรอยด์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพุ่มไม้กวาดในลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Thesis Title	**Detection of Phytoplasma Associated with Longan Witches' Broom by Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Techniques.**
Author	**Mr. Maythasith Konkarn**
M.S.	**Plant Pathology**

Examining Committee

Assistant Professor Dr. Vicha Sardsud	**Chairman**
Lecturer Dr. Worawan Chaleeprom	**Member**
Assistant Professor Dr. Pranee Leechanachai	**Member**
Lecturer Dr. Uraporn Sardsud	**Member**

Abstract

Dot-Blot Hybridization was applied to detect the causal agents of longan witches' broom disease. The DNA probe specific to conserved region of 16S rDNA genomic sequence of phytoplasma was used to detect phytoplasma in 250 samples of longan which showed witches' broom disease from the orchards and green house. The signal from all sample was not detected on nitrocellulose membrane, except the positive control. The nucleic acid extracted from plant tissues sample were used as template for PCR assays with the 2 pairs of universal primers R16F2/R2 and fU5/rU3. They were designed to have specificity to the nucleotide sequence of 16 S rDNA of the phytoplasmas. The plant extracted samples were collected from healthy, witches' broom longan , healthy periwinkle (*Vinca rosea*) plant connected by dodder (*Cuscuta campestris*) to a witches broom longan, healthy periwinkle, dodder used for transmission the pathogen from witches' broom to healthy longan. No phytoplasma DNA was detected in all sample. The nested PCR with two pairs of universal primers, R16F1 and R16RO for the first PCR amplification and R16F2/R16R2 primer for the second PCR, was used to

detect the phytoplasma in longan withes' broom. No DNA band were observed from all samples. Both PCR techniques were unable to detect the causal agent of longan witches' broom. Therefore it should still be considered as a disease of unknown etiology.

Sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) was used to detect the viroid in plant samples. In addition, detection of viroid single strand RNA was also performed by using RT-PCR with 6 primers directed against various kinds of known plant viroids . Only the specific primer for the citrus exocortis viroid (CEVd) which could amplify the DNA band about 480 bp from longan witches' broom and 300 and 400 bp from periwinkle transmitted. These DNA band were different from these reported earlier 370 bp. From this study, the plant sample showed many bands which were not related to CEVd. Therefore, it should still be not considerated as viroid associated with longan witches' broom.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University