ผ่องพรรณ ทรงวัฒนา: การผลิตแอนติเซรุ่มเพื่อตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* และ การหายีนต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวไทยลูกผสม M33 (ANTISERUM PRODUCTION FOR *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* DETECTION AND IDENTIFICATION OF CANKER RESISTANCE GENE ANALOGS IN THAI HYBRID LIME M33 อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 82 หน้า.

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของมะนาวในประเทศไทย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาว 3 พันธุ์ ได้แก่มะนาวลูกผสม M33 มะนาวแป้น และมะนาวน้ำหอมพบว่า มะนาวพันธุ์น้ำหอม และM33 มีความต้านทานมากกว่าพันธุ์แป้น เชื้อไอโซเลตที่ก่อโรคทั้งหมดสามารถตรวจสอบได้ด้วยคู่ไพเมอร์จำเพาะXAC01 และ XAC02 ด้วยวิธี PCR ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของเชื้อก่อโรครุนแรง (ไอโซเลต BP104 และ BP210) พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC) (AE008923.1) 99 % การทดลองนี้ได้นำเชื้อไอโซเลต BP210 ไปผลิตแอนติเซรุ่มในกระต่าย จากการทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มที่เจือจาง 1:4,000 หรือน้อยกว่า พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจสอบเชื้อXAC (BP210) ที่มีชีวิตในระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml และเชื้อตายที่ความเข้มข้น10^5 CFU/ml อย่างไรก็ตาม แอนติเซรุ่มที่ความเข้มข้น 1:2,000 เหมาะสมต่อการตรวจสอบเชื้อ XAC มากที่สุด โดยเกิด cross-reaction กับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* เพียงชนิดเดียว จากการตรวจสอบเชื้อ XAC ที่ปลูกเชื้อบนใบมะนาวด้วยแอนติเซรุ่มความเข้มข้น 1:2,000 พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อได้ในวันที่4 หลังการปลูกเชื้อความเข้มข้น 10^5, 10^4 และ 10^3CFU/ml ซึ่งพบอาการของโรคบนใบที่ถูกปลูกเชื้อแล้ว ดังนั้นแอนติเซรุ่มที่ผลิตจึงไม่เหมาะสมต่อการตรวจสอบเชื้อ XAC บนใบก่อนการแสดงอาการของโรค

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคในพืชนั้นมีความสำคัญต่อการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีความต้านทานในอนาคตได้ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องต่อความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวลูกผสม M33 เปรียบเทียบกับมะนาวพันธุ์พ่อและแม่ โดยเริ่มศึกษาในกลุ่มยีน Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ จากการประเมินระดับความต้านทานของM33 เทียบกับมะนาวแป้น และมะนาวน้ำหอม โดยการปลูกเชื้อXAC บนใบ พบว่า M33 และมะนาวน้ำหอม มีลักษณะการต้านทานต่อโรคโดยเกิด hypersensitive response ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลของยีน

*Pt9/Alu*1, *Pt14/Bfa*1 และ *16R1-19/Tru*1I ว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะการต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาว

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

PONGPAN SONGWATTANA : ANTISERUM PRODUCTION FOR *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* DETECTION AND IDENTIFICATION OF CANKER RESISTANCE GENE ANALOGS IN THAI HYBRID LIME M33. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 82 PP.

CANKER RESISTNCE/M33/HYBRID LIME/CITRUS CANKER/RESISTANCE GENE ANALOGS

Citrus canker is a serious disease of lime in Thailand. This study aims to evaluate the resistance characteristic of hybrid lime M33, Pan lime and Nam Hom lime. The results indicated that, Nam Hom and M33 showed higher resistance level than that of Pan lime. PCR amplification using *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC) specific primers (XAC01 and XAC02) could detect all pathogenic bacterial isolates. The 16S rDNA sequencing confirmed that the virulent bacteria (BP104 and BP210) were 99% identical with XAC (AE008923.1). Bacterial isolate BP210 was used for antiserum production by rabbit injection. The efficiency and sensitivity of antiserum from this study showed that, antiserum at the dilution of 1:4,000 or lower was able to detect XAC (BP210) bacteria at 10^6 CFU/ml for live cells and 10^5 CFU/ml for dead cells. However, the suitable dilution of this antiserum was 1:2,000 which could cross-react with only *X. campestris* pv. *vesicatoria* but not other *Xanthomonas* tested. The pathogen on infected leaves (10^5, 10^4 and 10^3 CFU/ml) was detected by 1:2,000 diluted antiserum. The results indicated that, this antiserum was able to detect the pathogen on infected leaves 4 days post-inoculation when symptom had already

appeared. Thus, this antiserum has low detection efficiency and cannot be used to detect low pathogen concentration or before canker lesion can be observed.

The development of molecular markers can help identify genes that linked to resistance characteristic on resistance plant. This methodology can be used to improve commercial favorable crop species to be disease resistant in the future. In this study, the citrus canker resistance (R) marker genes within M33 and its parents were screened using the Nucleotide binding site (NBS) Leucine-rich repeat (LRR) genes by PCR amplification in combination with restriction enzymes digestion. The resistant evaluation of hybrid lime and its parents was performed by inoculation with XAC on young leaves. The hypersensitive response phenotype on M33 and Nam Hom (resistant lime) confirmed that the marker *Pt9/Alu*1, *Pt14/Bfa*1 and *16R1-19*/*Tru*1I were closely linked with the citrus canker resistance genes.

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2010 Advisor's Signature _____