วิธีการตรวจสอบราสาเหตุโรค Black spot ของส้มโอโดยเทคนิค PCR

Detection of Black Spot Disease on Pummelo by Polymerase Chain Reaction (PCR)

พรพิมล อธิปัญญาคม[1] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1] ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช[2]
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

ส้มโอเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญต่อการส่งออกพืชหนึ่งในประเทศไทย ในปี 2549 ได้พบการระบาดของโรคจุดดำบนผลส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตส้มโอเพื่อการส่งออกเนื่องจากเป็นพื้นที่ที่ปลอดโรคแคงเคอร์ของส้ม โรคนี้เป็นโรคที่สำคัญสำหรับการส่งออกของส้มโอ เนื่องจากประเทศที่นำเข้าส้มโอไม่ยอมรับส้มโอที่แสดงอาการของโรคจุดดำ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ ผลการทดลองจากการแยกเชื้อจากอาการของจุดดำส้มโอตามลักษณะอาการต่าง ๆ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates และจากการตรวจสอบรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ และรา *G. mangiferae* ซึ่งมีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์บนพืช โดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5' TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) ได้นำมาทดสอบเพื่อการนำไปใช้ในตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอเพื่อการส่งออก โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอของราในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย ความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR และไพร์เมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจสอบรา *G. mangiferae* ได้ในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 226 คู่เบส และจากการวิเคราะห์ปฏิกิริยา PCR ของสปอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอของส้มโอปกติที่ความเข้มข้น 70 ng พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบได้กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *G. mangiferae* ที่ระดับ 40 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุด แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบรา *G. citricarpa* ได้

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-03-04-13-51

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burn) Merr.] เป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออกและยังเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ให้ผลผลิตและผลตอบแทนสูงเนื่องจากสามารถปลูกได้ในดินเกือบทุกชนิด ให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี และสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน เกษตรกรจึงนิยมปลูกส้มโอเพื่อการบริโภคในครัวเรือนและปลูกเป็นการค้ากันมาก และเนื่องจากส้มโอเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออก จึงทำให้ส้มโอเป็นไม้ผลส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง สำหรับตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ มาเลเซีย ฮ่องกง และสิงคโปร์ การส่งออกส้มโอของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในปี 2548 มูลค่าการส่งออกส้มโอมีปริมาณ 6,293 เมตริกตัน มีมูลค่าเท่ากับ 99,673,000 บาท และในปี 2549 มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มเป็นจำนวน 9,387 เมตริกตัน มีมูลค่าเท่ากับ 132,905,000 บาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) เห็นได้ว่าส้มโอมีแนวโน้มในการส่งออกมากขึ้นอย่างไรก็ตามประเทศในสหภาพยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น และ ออสเตรเลีย มีความต้องการส้มโอจากประเทศไทย แต่ประเทศไทยไม่สามารถส่งออกส้มโอไปยังประเทศดังกล่าวได้เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องของโรคแคงเกอร์ (canker) และโรคจุดดำ (black spot) สำหรับโรคแคงเคอร์ ในปัจจุบันกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการตรวจรับรองสวนส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย เป็นโครงการนำร่องเพื่อการส่งออกไปประเทศเนเธอร์แลนด์ สำหรับโรคจุดดำนั้นยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้มากนัก

ราสกุล *Guignardia* Viala & Ravaz อยู่ใน Class Ascomycetes, Order Sphaeropsidales, Family Mycosphaerellaceae มีรา *Phyllosticta* Pers เป็น Anamorphic state อยู่ใน Class Coelomycetes ส่วนใหญ่ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืช *Guignardia citricarpa* สาเหตุโรค Black spot ของพืชตระกูลส้ม เป็นเชื้อสำคัญในการกักกันพืช ของประเทศในเขตยุโรป และอเมริกา ซึ่งห้ามนำเข้าผลไม้ที่มีอาการของโรค Black spot โดยเด็ดขาด (Baayen และคณะ, 2002) ปัญหาอีกประการหนึ่งของการตรวจพืชกักกันเพื่อการนำเข้าและส่งออก ลักษณะของแผลมีลักษณะหลายชนิด เช่น hard spot lesions แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทาถึงสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลดำ ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-10 มิลลิเมตร มักแสดงอาการเมื่อผลส้มใกล้เปลี่ยนสีเป็นสีส้มหรือเหลือง ปกติมักพบ pycnidia เล็ก ๆ บนแผล ภายในสร้าง conia ของรา *Phyllosticta citricarpa* เป็น anamorph stage (Sutton and Waterson, 1966; Van der Aa, 1973) ซึ่งสามารถมองเห็น pycnidia ด้วยตาเปล่าและสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ลักษณะแผล hard spot lesions ที่รุนแรงมากแผลจากจุดเล็ก ๆ จะมารวมตัวกัน ขยายใหญ่ขึ้น และมักพบ pycnidia บนแผลมากมาย อาการอีกชนิดหนึ่งคือ freckle spot หรือเรียกว่า false melanose แผลจุด เล็ก ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรง

กลางมีสีเทา แทน น้ำตาลแดง บริเวณรอบแผลลักษณะนี้ก็มักพบแผล hard spot lesions กระจายอยู่ แต่อย่างไรก็ตามอาการทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกันมาก ในปัจจุบันประเทศ EU ตรวจสอบราสาเหตุโรค black spot โดยการนำแผลที่ไม่พบการสร้าง pycnidia ของเชื้อไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะสร้าง pycnidia ขึ้นมา หลังจากนั้นต้องนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่างของรา *G. citricarpa* (pathogenic) และ *G. mangiferae* (non pathogenic) เชื้อทั้งสองมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกันมากจึงมักทำให้การจัดจำแนกชนิดผิด (Glienke-Blanco และคณะ, 2002; Baayen และคณะ, 2002) เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อช้า โดยใช้เวลา 14 วัน จึงจะสร้าง mature pycnidia ดังนั้นวิธีนี้ จึงไม่สะดวกในการตรวจพืชนำเข้า และส่งออกด้วยวิธีนี้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค black spot โดยใช้การใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecule biology) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไวสูง และสามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงปริมาณน้อยก็สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้ การศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนา วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการตรวจสอบและวินิจฉัยโรค black spot ของส้มโอให้มีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ

ในประเทศไทย พรพิมลและคณะ (2550) ได้พบการระบาดของโรคจุดดำบนผลส้มโอพันธุ์ทองดี ขาวไหญ่ และพวงชมภู ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย และส้มโอพันธุ์ทองดี อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ในปี 2549-2550 ทำการแยกเชื้อสาเหตุแยกจากส่วนที่แสดงอาการของโรคและมีจุดดำอยู่ตรงกลางโดยวิธี tissue transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ราที่แยกได้จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรค black spot ของส้มโอ และราที่แยกได้จากพืช

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Tris-HCl , EDTA, NaCl, SDS, sodium acetate, chloroform : isoamylalcohol, ethanol, PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, Taq DNA polymerase

5. เอ็นไซม์ที่ใช้ในการตัดสาย และเชื่อมสายดีเอ็นเอ

6.วัสดุเครื่องแก้วต่างๆ เช่น จานเพาะเลี้ยง,บิกเกอร์, กระบอกตวง, flask, slide และ coverslip เป็นต้น

7. วัสดุวิทยาศาสตร์ เช่น โกร่งบดสาร, หลอด centrifuge, หลอด PCR, QIAquick Gel Extraction Kit

8. ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้มีดังนี้ เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA, เครื่อง centrifuge, เครื่อง electrophoresis, UV transilluminator, เครื่องวัดสารละลาย DNA, vortex mixer, ตู้เขี่ยเชื้อ, กล้องจุลทรรศน์, Refrigerated incubator shaker, ตู้เย็น 4°C และ ตู้เย็น -20°C

วิธีการ

1. การแยกและจำแนกเชื้อสาเหตุ

- <u>ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์</u>

ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo โดยใช้เข็มเขี่ย เขี่ยส่วนของจุดสีดำที่อยู่ตรงกลางแผลมาวางบนสไลด์ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และนำมาวางบนสไลด์ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- <u>แยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี tissue transplanting</u>

นำส่วนของส้มโอที่เป็นโรคที่มีจุดแผลสีดำอยู่ตรงกลางมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร จำนวน 40 ชิ้น ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยวางชิ้นส่วนพืช 4 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

- <u>การจำแนกชนิดรา *Guignardia citricarpa*</u>

ศึกษารูปร่างลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo, compound microscope และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) โดยตรวจดูลักษณะ fruiting body และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ ขนาด สี ชนิดของ fruiting body ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope) นำลักษณะของราดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกรานี้ (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002)

2. การเตรียมเชื้อ:

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากอาการแผลโรคจุดดำต่ละลักษณะอาการ แผลที่ยังไม่เกิดจุดดำ แผลแสดงอาการจุดดำ เป็นต้น บนอาหาร PDA สังเคราะห์ นาน 7-14 วัน

3. การสกัดดีเอ็นเอของรา

นำราที่เลี้ยงไว้ในข้อ 2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการดัดแปลงของ Everett and Rees-Georgr (2006) โดยการดัดแปลงวิธีของ Everett and Rees-Georgr (2006) ใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อไว้แต่ละสายพันธุ์ ขูดสปอร์และเส้นใยของเชื้อบนอาหารออกมาโดยใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อ ล้างเส้นใยและสปอร์ให้สะอาด หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของอาหาร และนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นย้ายส่วนที่ได้ไปยัง microtube1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ (150 mw EDTA pH 8, 5 mM tris pH 8, 1%SDS) และใส่ RNase (10 ไมโครกรัม) ปั่นและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมบัฟเฟอร์ 130 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน QIAshredder Mini Spin Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนใสใส่ใน microtube ใหม่ เติม 1.5 เท่าบัฟเฟอร์ ผสมเบา ๆ ด้วยปิเปต ใส่ใน DNeasy Mini Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร ใน DNeasy Mini Spin Column อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนของ DNeasy Mini Spin Column ใส่ใน microtube ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำซ้ำโดยการเติมบัฟเฟอร์ (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ได้เดีเอ็นเอเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

4. การตรวจสอบเชื้อ

นำดีเอ็นเอของรา *G. citricarpa* ที่สกัดจากสปอร์และเส้นใย ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 นาโนกรัม ของดีเอ็นเอต้นแบบ 0.5 µM ของไพรเมอร์ (ITS1 และ ITS4), 400 µM dNTP, 1unitTaq DNA Polymerase buffer และ 3mM $MgCl_2$ ในปริมาตรรวม 2.5 ไมโครลิตร

PCR program เริ่มต้นด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ตามด้วย อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาตรวจด้วย gel elrctrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer pH 8.5

5. การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR โดยการผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* ที่ความเข้มข้น 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และรา *G. mangiferae* 40 ng ทำปฏิกิริยาโดยใช้ PCR program ตามข้อ 4

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การแยกและจำแนกเชื้อสาเหตุ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากแผลที่มีจุดดำอยู่ตรงกลางเท่านั้น จากการตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound พบว่าจุดดำที่อยู่ตรงกลางแผล เป็น fruiting body ของราที่เรียกว่า pycndia และมี conidia เกิดอยู่ภายใน ผลการศึกษาการแยกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำ โดยนำส่วนของผลส้มโอที่แสดงอาการโรคมาทำการแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ PDA จำนวนอย่างละ 40 ชิ้น พบว่าการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากผลเบื้องต้นบนอาหาร PDA พบราที่มีโคโลนีสีเทาดำ เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เนื่องจากอาจเป็นเพราะการซับชิ้นส่วนพืชไม่แห้ง หรือเกิดการปนเปื้อนจากเครื่องมือหรือเทคนิคการปฏิบัติงาน

ผลการศึกษาการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates โดยการศึกษาลักษณะบนอาหารสังเคราะห์ PDA ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะของ pycnidium, conidia, microcnidia หรือ spermatia ได้จำแนกราสาเหตุเป็น *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorph: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างกับเอกสารที่ศึกษาการจำแนกของราชนิดนี้ (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002) ซึ่งมีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

***Guignardia citricarpa* Kiely**

Anamorphic stage: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine)

= *Phoma citricarpa* McAlp

= *Phyllostictina citricarpa* (McAlp) Petrak

Spermatial stage: *Leptodothiorella* Spec.

โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส โคโลนีเจริญเติบโตช้ามาก สีเทาดำ ด้านใต้วุ้นมีสีเทาดำ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็น lobe ราสร้าง pycnidia ประมาณ 8-10 วัน

ราสร้าง pycnidia ตรงกลางแผลบนผลส้มโอ รูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมโครมิเตอร์ มี papillate ขนาด 10-13 ไมโครมิเตอร์

conidiogenous cells รูปร่าง cylindrical มีขนาด 3.5-8.0 x 2.0-3.0 ไมโครมิเตอร์ conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

conidia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง obovate –elliptical ขนาด 8 x 12 – 6 x 8 ไมโครมิเตอร์ conidia มีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ มี oil drop ภายในสปอร์ ปลาย conidia มีลักษณะ truncate base มี apical appendage ยาวประมาณ 6-18 ไมโครมิเตอร์

spermatia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง dumb-bell ขนาด 5 – 8 x 1-1.5 ไมโครมิเตอร์ มี oil drop อยู่ภายในเซลล์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *G. citricarpa* ได้มีการอธิบายลักษณะต่าง ๆ ของราชนิดนี้โดย (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะของ colony, pycnidia, conidiogenous cells, conidia, spermatia มีลักษณะใกล้เคียงกับเอกสารอ้างอิงที่ได้กล่าวไว้ แต่อาจมีขนาดแตกต่างกันไปซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ อาหารสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกัน

จากการศึกษานี้ไม่พบ perithecia และ ascospores บนใบหรือผลที่เป็นโรค และไม่พบบนอาหารสังเคราะห์เช่นกัน จากการตรวจเอกสารพบว่าราชนิดนี้ก็ไม่สร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ (Baayen *et al*., 2002) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เพราะราสกุลนี้บางชนิดสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ได้ พรพิมล (2550) ศึกษาโรคผลจุดดำของฝรั่งสาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal (anamorph : *Phyllosticta psidiicola* (Petrak) Van der Aa พบรา *G. psidii* บนผลที่เป็นโรคและสามารถชักนำให้สร้าง ascospores บนอาหาร

yeast extract medium ได้ Baayen และคณะ (2002) ศึกษารา *Guignardia mangifera* (anamorphic state: *Phllosticta capitalensis*) ที่แยกได้จากส้มและเป็น nonpathogenic isolate พบว่าสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งราดังกล่าวนี้สามารถแยกได้จากส้มเช่นกัน แต่ความแตกต่างที่สร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกระหว่าง *G. mangifera* และ *G. citricarpa* แต่ไม่ได้เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก

จากการตรวจเอกสารพบว่ารา *G. citricarpa* สร้าง perithecia และ ascospores บนใบของส้มที่ร่วงอยู่บนพื้นดิน และ ascospores นี้เป็น primary inoculum ในการเข้าทำลายใบและผลบนต้นเมื่อมีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เมื่อเข้าทำลายอยู่บนใบและผลแล้วจะสร้าง conidia ภายใน pycnidia (Kiely, 1948; 1949; Kotzé, 2000; Baayen *et al*., 2002) และจากการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บใบของส้มโอที่อยู่ใต้ต้นบนพื้นในช่วงเดือนกรกฎาคม 2550 มาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบรา *Colletotrichum* sp. เป็นจำนวนมาก ไม่พบ ascospores ของรา *G. citricarpa* ที่เป็นดังนี้เนื่องจากใบส้มที่เก็บมาส่วนใหญ่อยู่ ในระยะที่เริ่มย่อยสลายและแปลงส้มโอที่เก็บมานี้ใต้ต้นส้มโอมีความชื้นมาก และ รา *Colletotrichum* sp. เจริญได้รวดเร็วกว่า และราสาเหตุโรคจุดดำเจริญช้า ดังนั้นจึงพบ *Colletotrichum* sp. เป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นการศึกษา ascospores ของราชนิดนี้ที่พักตัวอยู่บนใบที่ร่วงหล่นบนพื้นก็มีความสำคัญ เนื่องจาก ascospores เป็น primary inoculum ที่เข้าทำลายใบและผลส้มโอ ทำให้ทราบช่วงระยะเวลาใดที่มีปริมาณของราสาเหตุอยู่บนพื้นดินมาก เพื่อเป็นข้อมูลและการพยากรณ์การระบาดของโรคนี้ได้ เพราะฉะนั้นการควบคุม โรคจุดดำของส้มโอที่ควรปฏิบัติในเบื้องต้นคือการเขตกรรมโดยการเก็บเศษใบไม้และผลที่ร่วงอยู่บนดินทิ้งไปเพื่อเป็นการลดปริมาณของ inoculums

2. การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ผลของการตรวจสอบรา *G.citricarpa* และ *G.mangiferae* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) พบว่า สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้จากดีเอ็นเอของ *G.mangiferae* โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 226 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Everett and Rees George (2006a) แต่จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาดีเอ็นเอของ *G. citricarpa* ได้ อาจเป็นเพราะราที่แยกได้นี้มีการเจริญของเชื้อช้ามาก จากการที่สกัดดีเอ็นเอนั้น พบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตามการทดลองของ Everett and Rees George (2006a) สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้จากดีเอ็นเอของ *G.mangiferae* โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 501 คู่ เบส

3. การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ngกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* พบว่าเมื่อผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติความเข้มข้น 70 ng กับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* ที่ความเข้มข้น 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และรา *G. mangiferae* 40 ng พบว่าสามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาของรา *G. mangiferae* ได้ที่ระดับดีเอ็นเอของเชื้อที่น้อยที่สุดได้ที่ 40 pg

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการแยกเชื้อจากอาการของจุดดำส้มโอตามลักษณะอาการต่าง ๆ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates และจากการตรวจสอบรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ และรา *G. mangiferae* ซึ่งมีลักษณะเป็น endophyte โดยการใช้เทคนิค Polymrerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) ได้นำมาทดสอบ เพื่อการนำไปใช้ในตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอเพื่อการส่งออก โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอของราในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย ความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR และไพร์เมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจสอบรา *G. mangiferae* ได้ในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 226 คู่เบส และจากการวิเคราะห์ปฏิกิริยา PCR ของสปอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอของส้มโอปกติที่ความเข้มข้น 70 ng พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบได้กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *G. mangiferae* ที่ระดับ 40 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุด แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบรา *G. citricarpa* ได้ อย่างไรก็ตามควรทำการทดลองอีกครั้งเนื่องจากเชื้อสาเหตุที่ทำการศึกษาเป็นเชื้อที่ใหม่ การเจริญเติบโตช้าและเกิดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นทำให้มีปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ณ น่าน บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Guignardia citricarpa*. หน้า 1-12. *ใน* การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.

Baayen, R. ,P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., Weerdt, M., van Brouweeershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W.,Jr., Glienke de Blanco, C., and Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitant endophyte bof woody plants, G. *mangifera* (*Phyllosticta capitalensis*). Phytopathology 92:264-477

Bonants, P.J.M., G.C. Carroll, M. de Weerdt, I R van Brouwershaven and R.P. Baayen. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*/ European Journal of Plant Pathology, 109: 503-513.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006a. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. Plant Pathology 55: 194-199.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006b. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. New Zealand Plant Protection 59: 141-145.

Glienke-Blanco, C., Carlos Ivan Aguilar-Vidoso, Maria LÚcia Carneiro Vieira, Paulo Augusto Vianna Barroso and João LÚcio Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology, 25 (2): 251-255.

Gonzlez, M. S. and Rondn. 2005. First Report of *Guignardia psidii*, an Ascigerous State of *Phyllosticta psidiicola*, Causing Fruit Rot on Guava in Venezuela. Plant Dis. 89:773

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. Agricultural Gazette of New South Wales 60: 17-20.

Kotzé, J., M., 2000. Black spot. Pages 23-25 in : Compendium of Citrus Diseases 2nd ed. L.W.Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,MN.

Meyer, G. M., Sanders, R. Jacobs, and L. Korsten. 2006. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. Plant Dis. 90:97-101.

Punithalingam, E and Holliday, P. 1975. *Guignardia musae*. No. 467 *In:* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Sivanesan, A and P. Holliday. 1981. *Guignardia bidwelli*. No. 710 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, U.K.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Van der Aa HA. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5, 110pp.