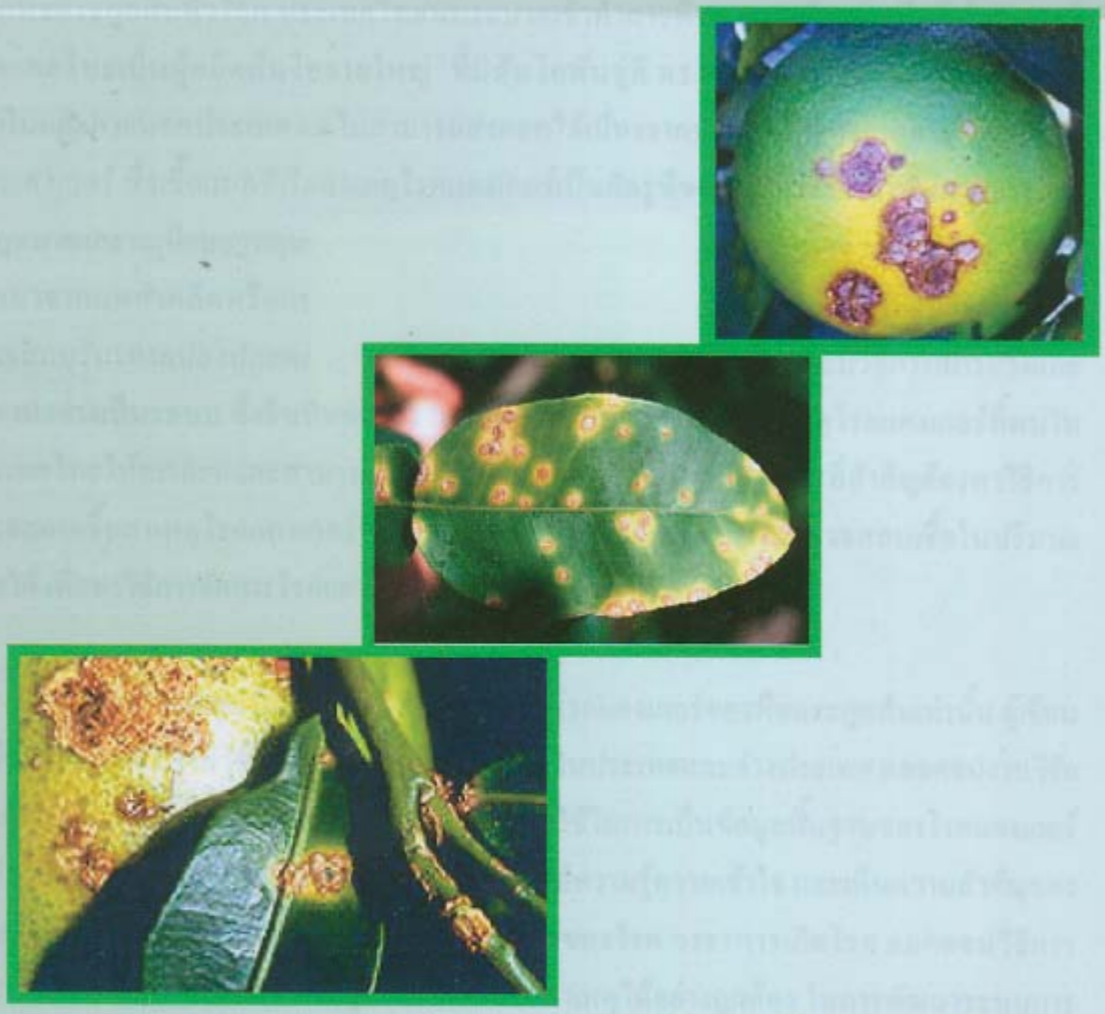
เอกสารวิชาการ

โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม



นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

พ.ศ. 2551

คำนำ

โรคแคงเกอร์ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก ประเทศไทยพบระบาดเข้าทำลายพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ปลูก การที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตส้มโอรายใหญ่ ที่มีส้มโอพันธุ์ดี ตรงความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ แต่ไม่สามารถส่งออกได้เนื่องจากประสบปัญหาจากการระบาดของโรคแคงเกอร์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์เป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงในหลายประเทศมีกฎหมายและระเบียบการควบคุมอย่างเข้มงวดในการนำเข้าพืชตระกูลส้ม ซึ่งพืชตระกูลส้มที่นำเข้าได้ต้องมาจากแหล่งผลิตหรือแปลงผลิตปลอดจากโรคแคงเกอร์โดยต้องมีการพัฒนาระบบการตรวจสอบรับรองแปลงปลอดศัตรูพืชที่เป็นที่ยอมรับของประเทศนำเข้า และมีวิธีการเฝ้าระวังและติดตามอย่างเป็นระบบ ซึ่งจำเป็นต้องทราบชนิดและลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทยให้ละเอียดและสามารถวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้อง และที่สำคัญต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เพื่อหาวิธีการจัดการโรคอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

เอกสารวิชาการฉบับนี้ จัดทำโดยเน้นเฉพาะโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มเท่านั้น ผู้เขียนได้ค้นคว้ารวบรวมงานวิจัยทางด้านโรคแคงเกอร์ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ตลอดจนงานวิจัยของผู้เขียนที่เห็นว่าเป็นประโยชน์และสามารถนำไปใช้ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานของโรคแคงเกอร์ในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ผู้อ่านได้มีความรู้ความเข้าใจ และเห็นความสำคัญของโรคแคงเกอร์ ทราบลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรค วงจรการเกิดโรค ตลอดจนวิธีการจัดการโรคแคงเกอร์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้อง ในการพัฒนาระบบการตรวจรับรองแปลงปลูก และวิธีการเฝ้าระวังและติดตามอย่างเป็นระบบ ทำให้สามารถส่งออกพืชตระกูลส้มไปยังต่างประเทศได้

ณัฏฐิมา ไมพิตเจริญกุล

มกราคม 2551

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	(1)
บทนำ	1
บทที่ 1 ความสำคัญของโรคแคงเกอร์	4
เอกสารอ้างอิง	11
บทที่ 2 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์และพืชอาศัย	12
อาการของโรคแคงเกอร์	12
ลักษณะอาการบนใบ	12
ลักษณะอาการบนกิ่ง	13
ลักษณะอาการบนผล	14
ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ร่วมกับหนอนชอนใบ	15
พืชอาศัย (host range)	16
เอกสารอ้างอิง	18
บทที่ 3 วงจรการเกิดโรค และการระบาดของโรค	19
วงจรการเกิดโรค (Disease cycle)	19
การอยู่รอดของเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์	23
การระบาดของโรคแคงเกอร์	24
การแพร่กระจายของเชื้อ(Pathogen dispersal)	2
การศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในประเทศไทย	25
เอกสารอ้างอิง	27
บทที่ 4 การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	30
เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	30
การจัดจำแนกและระบบการตั้งชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	30
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี ของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri*	32
เอกสารอ้างอิง	35

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 5 ลักษณะและความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	37
การจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามพืชอาศัยและภูมิศาสตร์	37
การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ตามพันธุกรรม (Genotype)	42
เอกสารอ้างอิง	48
บทที่ 6 ยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri*	50
เอกสารอ้างอิง	54
บทที่ 7 วิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	56
การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	56
เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา	56
เทคนิค Polymerase chain reaction	57
เทคนิค Nested PCR	59
เทคนิค Single closed tube nested PCR หรือ One tube nested PCR	61
วิธี Immunomagnetic separation	62
วิธีการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี IMS ร่วมกับ ปฏิกิริยา nested PCR (IMS-nested PCR)	64
เอกสารอ้างอิง	68
บทที่ 8 การจัดการโรคแคงเกอร์	70
การกีดกันเชื้อโรค(Exclusion)	70
มาตรการด้านสุขอนามัย(Sanitation)	71
การกำจัดเชื้อโรค(Eradication)	71
การจัดการโรค(Disease Management)	73
เอกสารอ้างอิง	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนใบ ผล และกิ่ง ของส้มโอ	4
2	อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบรุนแรง ทำให้ต้นทรุดโทรม ใบ และ ผล ร่วง	4
3	โรคแคงเกอร์เข้าทำลายในระยะแรกของ การเจริญเติบโตของผลส้มจะทำให้ผลส้มแตกหรือร่วงตั้งแต่เล็ก	5
4	โรคแคงเกอร์เข้าทำลายที่ใบอย่างรุนแรงจะทำให้ใบร่วงเหลือแต่กิ่ง	5
5	แผนที่การระบาดของโรคแคงเกอร์ในแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลกและประเทศที่ได้ทำการกำจัด (eradication) และอยู่ในระหว่างการกำจัด (currently under eradication)	6
6	ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนใบส้มโอ	13
7	ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนกิ่งมะนาว	13
8	ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนผลส้มโอ	14
9	ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ร่วมกับหนอนชอนใบ	15
10	วงจรการเกิดโรคของโรคแคงเกอร์	19
11	ภาพถ่ายจากกล้อง SEM ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* กำลังเข้าสู่ต้นพืชโดยทางปากใบ และ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เข้าไปอยู่ในปากใบ	20
12	บาดแผลที่เกิดจากรอยขีดข่วนเนื่องจากการเสียดสีของกิ่งและถูกเข้าทำลายโดยแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์	20
13	บาดแผลที่เกิดจากกัดกินของหนอนชอนใบ และถูกเข้าทำลายโดยแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดจุดแผลจำนวนมาก	20
14	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เมื่อปลูกเชื้อลงบนพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ในสภาพเรือนทดลอง	22
15	แผลของโรคแคงเกอร์บนกิ่งที่เป็นเนื้อไม้ของพืชตระกูลส้มสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานาน	22

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร Potato Semi-synthetic agar (PSA) และ อาหาร Yeast Dextrose CaCO3 medium (YDC)	32
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX	44
18	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ BOX แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA	45
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC	46
20	20 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA	47
21	พลาสมิดดีเอ็นเอ pXAC64 และ pXAC33 ที่พบในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 306 ที่มียีนก่อโรคแคงเกอร์ (pthA, PthA1 , PthA2, PthA3) อยู่ในทั้งสองพลาสมิด	53
22	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/ D2 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม และเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์	60
23	**ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยา one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/ Pth3Fและ D3/D4 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis pv. citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์**	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac)ในน้ำบดใบส้มด้วยวิธี standard PCR (A), วิธี one tube nested PCR (B) และ วิธี IMS-nested PCR (C)	65
25	สถานีทำความสะอาดพาหนะและเครื่องจักรโดยใช้สารเคมีฉีดพ่นฆ่าเชื้อโรคก่อนหรือออกจากพื้นที่เพาะปลูก	71
26	การกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์โดยการถอนรากถอนโคน (A) และเผาทำลาย (B) ในแหล่งผลิตส้มการค้าในเมือง มาร์ตินเคาตี มลรัฐฟลอริดา	72
27	การกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ในพื้นที่อยู่อาศัยโดยการตัดกิ่งหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆนำไปทิ้งในที่ทำลายขยะ	72
28	การปลูกแนวป้องกันลม (windbreak) เป็นแถวหน้ากระดานในสวนส้มหรือปลูกระหว่างแถว เพื่อลดการเกิดโรคและการระบาดของโรคแคงเกอร์	73

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตสินค้าเกษตรแหล่งใหญ่แห่งหนึ่งของโลกและมีสินค้าเกษตรหลายชนิดที่มีศักยภาพในการส่งออก พืชตระกูลส้มจัดเป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ส้มเขียวหวาน (Tangerine; *Citrus reticulata* Blanco), ส้มตรา (Sweet orange; *C. sinensis* (L.) Oskeck), มะนาว (Lime; *C. aurantifolia* Swingle) ส้มโอ (Pummelo; *C. maxima* Burm) เป็นต้น ถิ่นกำเนิดดั้งเดิมของพืชตระกูลส้มอยู่ในแถบเอเชียอาคเนย์ แต่สามารถปลูกได้ดีและแพร่หลายทั่วไปในบริเวณเขตกึ่งร้อน เขตร้อน เขตอบอุ่นของโลก ทั้งในยุโรปและอเมริกา (ไชยา, 2531) ประเทศไทยมีการปลูกพืชตระกูลส้มอย่างกว้างขวาง เนื่องจากภูมิอากาศของประเทศไทยเหมาะแก่การเจริญเติบโตของพืชตระกูลส้ม จึงทำให้มีการปลูกพืชตระกูลส้มได้เกือบทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกพืชตระกูลส้มที่สำคัญของประเทศไทย ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ น่าน พิจิตร กำแพงเพชร เป็นต้น ภาคกลางได้แก่ จังหวัด ปทุมธานี สระบุรี ชัยนาท อยุธยา เพชรบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม กาญจนบุรี เป็นต้น ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร นราธิวาส เป็นต้น จากสถิติการเพาะปลูกปี พ.ศ. 2549 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้มประมาณ 705,352 ไร่ แยกออกเป็นพื้นที่ปลูกส้มแต่ละชนิดดังนี้ ส้มเขียวหวาน พื้นที่ปลูกรวม 465,321 ไร่ ผลผลิตรวมทั้งหมด 585,796.58 ตัน ส้มโอ พื้นที่ปลูกรวม 229,051 ไร่ ผลผลิตรวมทั้งหมด 238,600.23 ตัน ส้มตรา ส้มเกลี้ยง ส้มจุก มีพื้นที่ปลูกรวม 10,980 ไร่ ผลผลิตรวม 7,774.50 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) ประเทศไทยส่งผลผลิตในกลุ่มพืชตระกูลส้มออกไปยังต่างประเทศเป็นจำนวนมากในปี 2549 มีมูลค่าทั้งสิ้น 176.4 ล้านบาท โดยส้มโอมีปริมาณและมูลค่าส่งออกมากที่สุด ปริมาณส่งออก 9,600 เมตริกตัน มูลค่า 135 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการปลูกพืชตระกูลส้มของประเทศไทย คือปัญหาเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มในหลายประเทศ (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) ในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วและทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการผลิตส้มเป็นจำนวนมากจนทำให้รัฐบาลกลางออกกฎควบคุมการระบาด และใช้เงินเป็นจำนวนมากในการป้องกันกำจัด (Schoulties *et al.*, 1987) แต่ปัจจุบันนี้ก็ยังคงมีรายงานการ

ระบาดของโรคแคงเกอร์ในอเมริกา (Schubert *et al*, 1996) โรคนี้ที่พบแพร่ระบาดมากในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ที่มีอุณหภูมิสูงและฝนตกชุก (Civerolo, 1994) โรคแคงเกอร์มีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และปัจจุบันระบาดไปทั่วโลก พบโรคนี้ระบาดมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (EPPO/ CABI, 2005) ประเทศไทยพบโรคแคงเกอร์ระบาดอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในฤดูฝนการระบาดของโรคจะรุนแรงยิ่งขึ้น โรคนี้ทำให้ต้นส้มโทรม ผลผลิตลดลง และคุณภาพของผลต่ำ การระบาดของโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยสามารถแพร่กระจายโดยติดไปกับผลและกิ่งพันธุ์พืชตระกูลส้ม โดยเฉพาะการใช้กิ่งพันธุ์ ที่เป็นโรคนี้ติดไปจะทำให้เกิดการระบาดไปยังแหล่งอื่นต่อไป

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตส้มโอรายใหญ่ที่มีส้มโอพันธุ์ดี ตรงความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ นโยบายที่สำคัญของการส่งออกส้มโอไปขายต่างประเทศของประเทศไทย มุ่งเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตส้มโอคุณภาพ เพื่อให้เป็นผู้นำในการผลิตและการตลาดส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก โดยเฉพาะสหภาพยุโรป เป็นตลาดใหญ่แห่งหนึ่งของโลกที่มีความต้องการนำเข้าส้มโอ แต่ติดเรื่องกฎหมายและระเบียบการนำเข้าที่เข้มงวด ทำให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในฐานะผู้รับผิดชอบในเรื่องนี้ ต้องหามาตรการแก้ไขให้สอดคล้องกับกฎหมายและระเบียบการนำเข้าของสหภาพยุโรป โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures; ISPM) ฉบับที่ 10 มีข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช และหาวิธีการเฝ้าระวังและติดตาม ตลอดจนพัฒนาวิธีการตรวจสอบรับรองแปลงปลูกพืชให้เป็นที่ยอมรับของประเทศนำเข้า ซึ่งจำเป็นต้องรู้จักและเข้าใจโรคแคงเกอร์อย่างละเอียดโดยเฉพาะเชื้อสาเหตุของโรคถึงจะสามารถวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้อง และหาวิธีการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นผู้เขียนจึงได้พยายามรวบรวมและค้นคว้า งานวิจัยด้านโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ทั้งในประเทศและต่างประเทศ รวมทั้งงานวิจัยของผู้เขียน ที่เห็นว่าเป็นประโยชน์และและสามารถนำไปใช้ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานของโรคแคงเกอร์ในประเทศไทย เพื่อให้ผู้อ่าน ได้มีความรู้ความเข้าใจ และเห็นความสำคัญของโรคแคงเกอร์ ทราบลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรค วงจรการเกิดโรคตลอดจนวิธีการจัดการโรคแคงเกอร์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้อง ในการพัฒนาระบบการตรวจรับรองแปลงปลูก และวิธีการเฝ้าระวังและติดตามอย่างเป็นระบบ ทำให้สามารถส่งออกพืชตระกูลส้มไปยังต่างประเทศได้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. รายงานสภาพการเพาะปลูกไม้ผลและไม้ยืนต้นประจำปี 2549. (โรเนียว)

ไชยา อุ้ยสูงเนิน. 2531. การปลูกส้มเขียวหวาน. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร รายสินค้า: ส้มโอ . แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/OAE-WEB-SITE/ profile/commodityPRo/2550/58-59.pdf., 13 เมษายน 2551.

Civerolo,E.L 1984. Bacterial canker disease of citrus. J. Rio Grande Valley Hort. Assoc. 37: 127-146.

Civerolo,E.L. 1994. Citrus bacterial canker disease in tropical regions, pp. 45-50. In M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph, and J.G. Swings, eds. Proceedings of the 8th Internatinal Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Paris.

EPPO/CABI . 2005. Xanthomonas axonopodis pv. citri In : Quarantine Pests for Europe. 2nd edition. (Ed. By Smith, I. M., McNamara, D.G., Scott, P.R., and M. Holderness. CABI International, Wallingford, UK.

Schoulties, C.L., E.L. Civerolo, J.W. Miller, R.E. Stall, C.J. Krass, S.R. Poc, and E.P. Ducharme. 1987. Citrus canker in Florida. Plant Dis. 71: 388-395.

Schubert, T.S. and J.W. Miller. 1999. Bacterial Citrus Canker. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

Schubert, T.S. , J.W. Miller and D.W. Gabriel. 1996. Another outbreak of bacterial canker on citrus in Florida. Plant Dis. 80: 1208.

บทที่ 1

ประวัติและความสำคัญของโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) ที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) พืชตระกูลส้มเกือบทุกชนิดพบว่ามีโรคแคงเกอร์เป็นโรคหนึ่งที่ระบาดทำลายทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงมาก สามารถเกิดได้กับทุกส่วนของต้น (ภาพที่1) โรคระบาดรุนแรงในฤดูฝน (อำไพวรรณ, 2527) เมื่ออาการของโรครุนแรงจะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วง ผลร่วง (ภาพที่ 2) ผลผลิตลดลง และไม่มีคุณภาพ ผิวไม่สวยและต้นแคระแกร็นถึงตายได้ (อำไพวรรณ และคณะ, 2527) โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่เกิดเฉพาะจุด ไม่สามารถเคลื่อนย้ายหรือแพร่กระจายไปทั่วต้นได้

ภาพที่ 1 อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนใบ ผล และกิ่ง ของส้มโอ

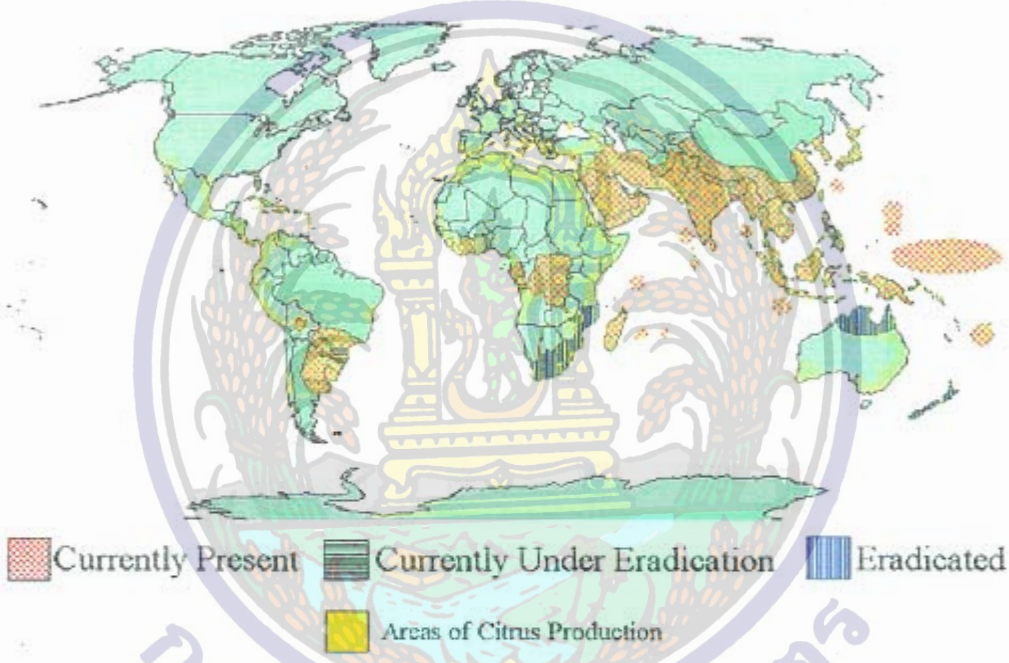
ภาพที่ 2 อาการของโรคแคงเกอร์ที่พบรุนแรง ทำให้ต้นทรุดโทรม ใบ และ ผล ร่วง

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของโรคแคงเกอร์พบว่าเมื่อเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์เข้าทำลายในระยะแรกของการเจริญเติบโตของผลส้มจะทำให้ผลแตกหรือร่วงตั้งแต่เล็ก (ภาพที่ 3) ถ้าเข้าทำลายในระยะเมื่อผลส้มเจริญเติบโตแล้วทำให้เกิดจุดแผลกระจายทั่วผิวของผลส้ม ผลผลิตไม่มีคุณภาพไม่เป็นที่ยอมรับของตลาด ผลส้มที่มีจุดแผลของโรคแคงเกอร์ 80-90% จะพบว่ามาจากต้นที่อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์และมีอาการของโรคแคงเกอร์ที่ใบอย่างรุนแรง เมื่อพบโรคแคงเกอร์ที่ใบอย่างรุนแรงจะทำให้ใบร่วงเหลือแต่กิ่ง (ภาพที่ 4) (Goto, 1992) ตัวอย่างเช่นในประเทศอาเจนตินาผลแกรฟฟรุ๊ตที่มาจากต้นที่ถูกโรคแคงเกอร์เข้าทำลายและไม่ได้ฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชในช่วงปี 1979-1980 เป็นโรคถึง 83-97% (Stall and Seymour, 1983)

ภาพที่ 3 โรคแคงเกอร์เข้าทำลายในระยะแรกของการเจริญเติบโตของผลส้มจะทำให้ผลส้มแตกหรือร่วงตั้งแต่เล็ก

ภาพที่ 4 โรคแคงเกอร์เข้าทำลายที่ใบอย่างรุนแรงจะทำให้ใบร่วงเหลือแต่กิ่ง

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญทางกักกันพืชของหลายประเทศ เชื้อสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) ในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย โดยเฉพาะสหภาพยุโรป เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรง (EPPO/CABI, 2005) การนำเข้าพืชตระกูลส้ม จึงมีกฎหมายและระเบียบควบคุม การนำเข้าอย่างเข้มงวด



ภาพที่ 5 แผนที่การระบาดของโรคแคงเกอร์ในแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลกและประเทศที่ได้ทำการกำจัด (eradication) และอยู่ในระหว่างการกำจัด (currently under eradication) **(ที่มา : Gottwald *et al*, 2002)**

โรคแคงเกอร์เป็นที่รู้จักดีและเริ่มก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในหลายประเทศ (Fawcett, 1936) ปัจจุบันโรคนี้ได้ระบาดไปมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (EPPO/ CABI, 2005) (ภาพที่ 5) Fawcett and Jenkin (1983) ได้รายงานถึงแหล่งกำเนิดของโรคแคงเกอร์อยู่ในประเทศอินเดียและหมู่เกาะชวา เนื่องจากตรวจพบโรคแคงเกอร์ในตัวอย่างแห้งของพืชตระกูลส้มที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชคิว (Kew botanical garden) ของประเทศอังกฤษ โดยตัวอย่างพืชตระกูลส้ม เหล่านั้นได้แก่ *Citrus medica* ที่เก็บมาจากประเทศอินเดียในปี 1827-1831 และ *Citrus arantifolia* ที่เก็บมาจากประเทศอินโดนีเซียในปี 1842-1844 จากการพบครั้งนี้จึงคาดคะเนว่าโรค

แคงเกอร์มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศจีน อินโดนีเซีย และ อินเดีย ที่เป็นแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มในแถบนี้และแพร่กระจายไปยังแหล่งอื่นๆ โดยต้นพันธุ์ โรคแคงเกอร์แพร่ระบาดจากเกาะในหมู่เกาะมหาสมุทรแปซิฟิคไปยังญี่ปุ่น ในสหรัฐอเมริกาพบโรคแคงเกอร์นี้ครั้งแรก โดยติดมากับท่อนพันธุ์ของต้นส้มที่ส่งมาจากญี่ปุ่นในปี 1910 ต้นส้มที่มีโรคแคงเกอร์จากญี่ปุ่นได้นำไปปลูกในมลรัฐฟลอริดาและเท็กซัส เมื่อมีการขยายพันธุ์และนำไปปลูกต่อตามแหล่งต่าง ๆ ของมลรัฐอลาบามา จอร์เจีย หลุยส์เซียนา มิสซิสซิปปี และเซ้าท์แคโรไลนา (Schoulties *et al.*, 1987) ซึ่งกิ่งพันธุ์ส้มที่ได้ขยายพันธุ์ โดยการตอนกิ่งหรือทาบกิ่งที่มีเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่นๆ โดยในฟลอริดาซึ่งเป็นแหล่งปลูกส้มใหญ่ พบการระบาดรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคแคงเกอร์ ในปี 1917 ในแหล่งปลูกส้มต่างๆ ทั้งในบริเวณ Gulf Coast State และ Rio Grande Valley และในแหล่งปลูกส้มอื่นๆ เช่น อเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศบราซิล อาร์เจนตินา ปรากวัย อุรุกวัย และเม็กซิโก พบโรคแคงเกอร์ระบาดในแหล่งปลูกส้ม โดยเฉพาะในอาร์เจนตินา ซึ่งสภาพอากาศเหมาะสมสำหรับการแพร่ระบาดของโรคมากทำให้แพร่ระบาดเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีรายงานการระบาดของโรคแคงเกอร์ ได้มีการทำการทดลองโดยใช้สารประกอบทองแดงฉีดพ่นทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยฉีด 6-7 ครั้ง สามารถป้องกันโรคได้ (Stall and Seymour, 1983) ในประเทศไทยชาวสวนเรียกโรคแคงเกอร์ว่าโรคใบจุดหรือโรคขี้กลาก (อำไพวรรณ, 2527) โรคนี้พบระบาดอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะฤดูฝนการระบาดของโรคจะยิ่งรุนแรงขึ้น โรคทำให้ต้นโทรม ผลผลิตลดลง และคุณภาพของผลต่ำ มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกประมาณปี 2500-2504 โรคนี้พบรุนแรงกับมะนาว ส่วนมะกรูด ส้มเขียวหวาน ส้มเกลี้ยง ส้มคลีโอพัตรา ส้มสามใบ พบอาการไม่รุนแรง (อำไพวรรณ และคณะ, 2527) ตั้งแต่ปี 2515 เป็นต้นมามีรายงานว่าโรคแคงเกอร์ได้ทำความเสียหายให้แก่ส้มเขียวหวานเป็นจำนวนมาก (วิเชียร, 2519) จนถึงปัจจุบันยังพบการระบาดของโรคแคงเกอร์อย่างกว้างขวางในทุกแหล่งปลูกส้มของไทย การระบาดของโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยสามารถแพร่กระจายโดยติดไปกับผลและกิ่งพันธุ์พืชตระกูลส้ม โดยเฉพาะกิ่งพันธุ์ ถ้ามีโรคนี้ติดไปจะทำให้เกิดการระบาดไปยังต้นอื่น ๆ ต่อไป

ในหลายประเทศทั่วโลกเช่นในสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย บราซิล อาร์เจนตินา เป็นต้น มีการใช้เงินจำนวนมากในแต่ละปี ในการป้องกันโรคแคงเกอร์ไม่ให้เข้าในประเทศ โดยการใช้มาตรการกักกันพืช การกำจัดให้หมดไปจากประเทศ และการควบคุมโรคแคงเกอร์ (Das, 2003) ซึ่งผลจากการควบคุมเหล่านี้มีผลกระทบโดยตรงกับการส่งออกพืชตระกูลส้มจากแหล่งปลูกในประเทศที่มีโรคแคงเกอร์ระบาด ประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการรณรงค์เพื่อกำจัดทำลายต้นส้มที่

เป็นโรคโดยความร่วมมือกันของผู้ปลูกส้มในมลรัฐฟลอริดา ร่วมกับรัฐบาลกลางของประเทศสหรัฐอเมริกาทำการรณรงค์กำจัดโรคนี้จนหมด (Schoulties *et al.*, 1987) โดยเริ่มกำจัดในปี 1917 ต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ถูกทำลาย จนถึงในปี 1933 มลรัฐฟลอริดาจึงปลอดจากโรคแคงเกอร์ส้ม รัฐบาลใช้เงินในการกำจัดจำนวนมากถึง 6 ล้านเหรียญสหรัฐ ในปี 1947 ต้นส้มที่เป็นโรคนี้ได้ถูกกำจัดให้หมดไปจากสหรัฐอเมริกา (Stall and Seymour, 1983) นอกจากนี้ในอเมริกายังมีมาตรการทางกักกันพืช ที่ทำคู่ขนานกันไปกับการกำจัดให้หมดสิ้นของต้นส้มที่เป็นโรคมีข้อจำกัดที่เข้มงวดในการนำสินค้าพวกส้มหรือต้นส้มเข้าประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศผู้ส่งสินค้าส้มเข้าประเทศสหรัฐอเมริกาต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดของทางสหรัฐอเมริกาและต้องมีใบรับรองว่าปลอดจากโรคนี้ (Stall and Seymour, 1983) โรคแคงเกอร์ถูกพบระบาดอีกครั้งในเมืองมานาตีเคานตี ฟลอริดา และตอนใต้ของอ่าวแทมปาในปี 1986 และถูกกำจัดให้หมดไปในปี 1994 (Schubert *et al.*, 2001) ต่อมาในปี 1997 โรคแคงเกอร์กลับมาระบาดอีกครั้งในพื้นที่เดิมในเมืองมานาตีเคานตี และทางด้านตะวันออกของฟลอริดา ที่เคยระบาดในปี 1980 ได้มีการพบการระบาดของโรคแคงเกอร์ครั้งแรกในเมืองไมอามีในปี 1995 ซึ่งคาดว่าโรคแคงเกอร์ได้เริ่มเข้ามาสู่เมืองไมอามีตั้งแต่ปี 1992 หรือ 1993 และแพร่ระบาดในแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มในเมืองไมอามี (Gottwald *et al.*, 1997) จากการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ในเมืองไมอามีในปี 1995 พบว่าพื้นที่ที่พบโรคแคงเกอร์ระบาดประมาณ 36.3 ตารางกิโลเมตร อยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยในเขตตะวันตกเฉียงใต้ของท่าอากาศยานนานาชาติไมอามี ซึ่งคาดว่าโรคแคงเกอร์น่าจะมาจากการขนส่งทางอากาศ ผลจากการตรวจพบโรคแคงเกอร์ในปี 1995 ทำให้เกิดโปรแกรมความร่วมมือของรัฐบาลกลางกับรัฐบาลท้องถิ่นในการกำจัดโรคแคงเกอร์ประจวบกับการกลับมาระบาดอีกครั้งของโรคแคงเกอร์ในแหล่งปลูกส้มในเมืองมานาตีเคานตี บนฝั่งตะวันตกของฟลอริดาในเดือนมิถุนายน 1997 ทำให้มีการใช้โปรแกรมการกำจัดโรคแคงเกอร์เหมือนกัน แต่ยังคงพบการระบาดของโรคแคงเกอร์ในแหล่งปลูกส้มอื่นๆ ของมลรัฐฟลอริดา ทั้งเป็นแหล่งการค้าและปลูกในที่อยู่อาศัยในเมืองคลอลิเออร์ เฮนดรี ฮิลสโบรเราช ปาล์มบีช มาร์ติน ดิโซโต มอนโร และบรีวาร์ดเคานตี ซึ่งเชื่อกันว่าจุดกำเนิดมาจากแหล่งระบาดในเขตที่อยู่อาศัยด้านตะวันตกเฉียงใต้ของท่าขนส่งของเมืองไมอามี ผลจากโปรแกรมการกำจัดโรคแคงเกอร์ทำให้ต้นส้มในแหล่งปลูกเพื่อการค้าถูกตัดทิ้งมากกว่า 1.56 ล้านต้น และต้นส้มที่ปลูกในเขตที่อยู่อาศัยจำนวน 600,000 ต้น โดยรวมเป็นพื้นที่มากกว่า 1,701 ตารางกิโลเมตร และมีพื้นที่ในการกักกันพืชมีมากกว่า 2,590 ตารางกิโลเมตร ในเขตเมืองทางตะวันออกเฉียงใต้ของฟลอริดาในท่าขนส่งของไมอามีและเมืองบรีวาร์ดเคานตี รวมเขตกักกันพืชทั้งหมดของมลรัฐฟลอริดา 3,890 ตารางกิโลเมตร (Schubert *et al.*, 2001) ได้มีการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยเปรียบเทียบพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv.

citri ที่แยกได้จากต้นส้มจากเมืองมานาตีเคานตี ในปี 1986-1994 กับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากต้นส้มจากเมืองมานาตีเคานตี ในปี 1997 พบว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่า การกำจัดโรคแคงเกอร์ ในปี 1994 ไม่สมบูรณ์ยังคงมีต้นส้มที่เป็นโรคหลงเหลืออยู่ ทำให้สามารถกลับมาระบาดใหม่ได้ ในขณะที่พันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากต้นส้มจากเมืองไมอามีแตกต่างจากเชื้อที่มาจากเมืองมานาตีเคานตีในปี 1986-1994 และในปี 1997 แสดงให้เห็นว่าการระบาดของโรคแคงเกอร์ในไมอามีมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ถูกนำเข้ามาจากแหล่งอื่น (Gottwald *et al.*, 2001)

ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ใช้เงินจำนวนมากในการกำจัดโรคนี้ ต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ถูกตัดและเผาทำลาย ในฟลอริดาตลอดปี 1915-1933 ต้นส้มถูกทำลายไป 2,570,000 ถึง 3,000,000 ต้น งบประมาณที่ใช้ในการกำจัดโรคจำนวน 6 ล้านเหรียญสหรัฐ และอีกครั้งในระหว่างปี 1984 - 1986 ต้นส้มถูกทำลายไป 20 ล้านต้น งบประมาณที่ใช้จำนวน 25 ล้านเหรียญสหรัฐ (Schoulties *et al.*, 1987) ในปัจจุบันมีการใช้งบประมาณในการกำจัดโรคนี้ปีละ 12 ล้านเหรียญสหรัฐ และมีผู้ทำงานในโปรแกรมการกำจัดโรคแคงเกอร์ในอเมริกามากกว่า 600 คน ทั้งที่มีโปรแกรมการควบคุมเหล่านี้ยังคงมีโรคแคงเกอร์ระบาดในเมืองไมอามีและฟลอริดา (Schubert *et al.*, 2001) ด้วยเหตุนี้นักวิชาการ เกษตรกรและ ภาครัฐบาลยังคงถกเถียงกันเกี่ยวกับความคิด และความเป็นไปได้ในการกำจัดโรคแคงเกอร์ให้หมดไปจากประเทศ (Das, 2003)

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

วิเชียร กำจายภัย. 2519. โรคแคงเกอร์และโรคสแค็ปของส้ม. กสิกร 49(2) : 121-125.

อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์. 2527. โรคส้มในฤดูฝน. วารสารพืชสวน 19(2) : 129-135.

อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2527. โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 126 น.

Civerolo,E.L 1984. Bacterial canker disease of citrus. J. Rio Grande Valley Hort. Assoc. 37: 127-146.

Das, A.K. 2003. Citrus canker – A review. Appl. Hort. 5:52-60.

EPPO/CABI . 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* In : *Quarantine Pests for Europe. 2nd edition*. (Ed. By Smith, I. M., McNamara, D.G., Scott, P.R., and M. Holderness. CABI International, Wallingford, UK.

Fawcett , N.S. 1936. Citrus Disease and Their Control. 2d ed. , McGrow – Hill Book Co. , Inc. New York. 656 p.

Fawcett, H.S. and A.E. Jenkins, 1983. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus Citrus in England and the United States. Phytopathology, 23: 820-824.

Goto, M. 1992. Citrus Canker, pp. 170-208. In J. Kumar, H.S. Chaube. U.S. Singh, and A.N. Mukhopadhyay, eds. Plant diseases of International Importance, Vol. III. Englewood Cliffs, Prentice Hall.

Gottwald, T. R., J. H. Graham, and T. S. Schubert. 1997. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. Fruits 52:371-378.

Gottwald, T. R., J. H. Graham and T. S. Schubert. 2002. Citrus canker: The pathogenand its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. Available Source : http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/.

Gottwald, T. R., G. Hughes, J. H. Graham, X. Sun, and T. Riley. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology 91:30-34.

กองกฎ กรมวิชาการเกษตร

Schoulties, C.L., E L Civerolo, J.W Miller, R.E Stall, C.J. Krass, S.R. Poe, and E.P Ducharme. 1987 Citrus canker in Florida. Plant Dis 71: 388-395.

Schubert, T.S and J.W. Miller. 1999. Bacterial Citrus Canker Florida Department of Agriculture and Consumer Services

Schubert, T.S , S A Rizvi, X. Sun, T. R Gottwald, J H. Graham, and W. N. Dixon 2001 Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. Plant Dis. 85: 340-356.

Stall, R.E and C P Symour. 1983 Canker, a threat to citrus in gulf coast states Plant Dis. 67. 581-585.

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2

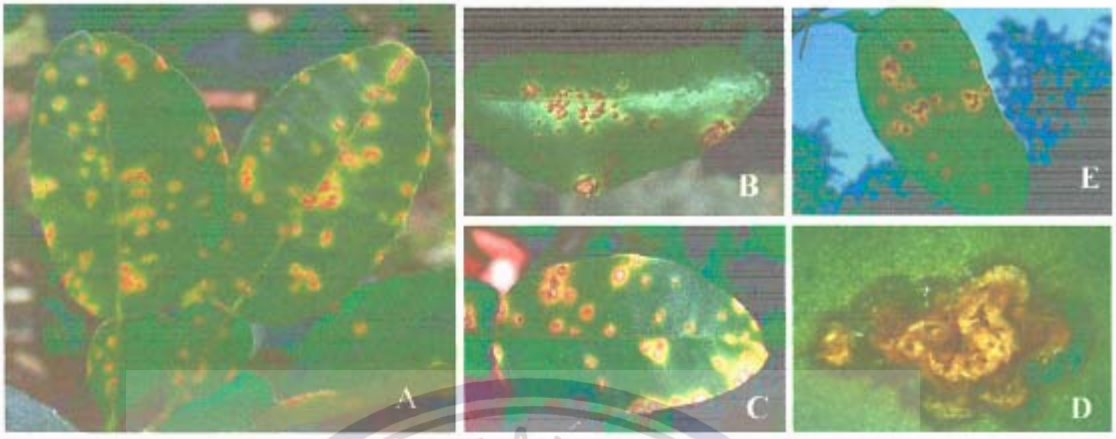
ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์และพืชอาศัย

อาการของโรคแคงเกอร์

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv *citri* สามารถเข้าทำลายบริเวณส่วนเหนือดินของพืชตระกูลส้ม (Goto, 1969) สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชที่อายุน้อย ทั้งใบ กิ่ง ลำต้นและผล โดยส่วนของใบอ่อนและกิ่งอ่อนที่ถูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าทำลายแสดงอาการภายใน 10-12 วันหลังจากเริ่มแตกยอดอ่อน (EPPO/CABI, 2005) ใบแก่จะมีความต้านทานต่อโรคมากกว่าใบอ่อน เนื่องจากใบแก่มีปากใบที่เปิดเสมอ เพราะมีคิวติเคิลปกคลุมทำให้ปากใบหนา เชื้อจึงเข้าทำลายได้ยาก ในทางตรงกันข้ามใบอ่อนปากใบเปิดกว้าง เชื้อจึงเข้าทำลายได้ง่าย (Goto, 1969) เมื่อเชื้อเข้าทำลายรุนแรง จะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วง ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ ผิวไม่สวย และต้นแคระแกรนอาจตายได้ในที่สุด (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

ลักษณะอาการบนใบ

อาการที่พบบนใบ ในระยะแรกเกิดเป็นจุดแผลลักษณะเท่าหัวเข็ม ขนาด 2-10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 6 A) ขนาดของแผลขึ้นกับอายุของพืชอาศัย ณ เวลาที่เชื้อเข้าทำลาย และพันธุ์ของพืชอาศัย หลังจากเข้าทำลายแล้ว 7 -10 วัน จะเห็นอาการให้ใบรัดเจน (ภาพที่ 6 B) และหลังจากนั้นไม่นานจะสังเกตเห็นเชื้อที่ผิวหน้าใบด้วย (ภาพที่ 6 C) อาการของแผลจะเห็นจุดแผลเป็นจุดนูนสีน้ำตาลทั้งด้านหน้าใบและหลังใบ โดยเห็นชัดเจนด้านหลังใบ แผลจุดนูนมีลักษณะฟูคล้ายฟองน้ำนูนขึ้นมา มีสีเหลืองอ่อน(ภาพที่ 6 D) แผลเกิดขึ้นทั้งสองด้านของใบหรืออาจเกิดเพียงด้านใดด้านหนึ่ง ต่อมาแผลจะปริแตกเนื้อเยื่อแผลให้เห็นมีสีน้ำตาลเข้ม (corky) ตรงกลางแผลยุบตัว ขอบแผลยกตัวขึ้น มีลักษณะคล้ายปล่องภูเขาไฟ ในทุกระยะของการพัฒนาการของโรค บริเวณรอบๆ แผลคลอโรฟิลของใบจะซีดลงจากเนื้อเยื่อปกติ ทำให้ปรากฏเป็นวงสีเหลืองล้อมรอบแผล (halo) (ภาพที่ 6 E) แผลจะเกิดในทุกส่วนของใบรวมทั้งก้านใบด้วย ทำให้ใบเหลืองร่วงก่อนกำหนด (วิวัฒน์, 2510, อำไพวรรณ และคณะ, 2527, Fawcett, 1936)



ภาพที่ 6 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนใบส้มโอ (A) ลักษณะเป็นแผลจุดกลมขนาดเท่าหัวเข็ม ขนาด 2-10 มิลลิเมตร (B) อาการแผลจุดสีน้ำตาลเห็นชัดเจนใต้ใบ (C) อาการแผลจุดสีน้ำตาลบนหน้าใบ (D) ผลจุดนูนมีลักษณะฟูคล้ายฟองน้ำนูนขึ้นมามีสีเหลืองอ่อน (E) วงสีเหลืองล้อมรอบแผล (halo)

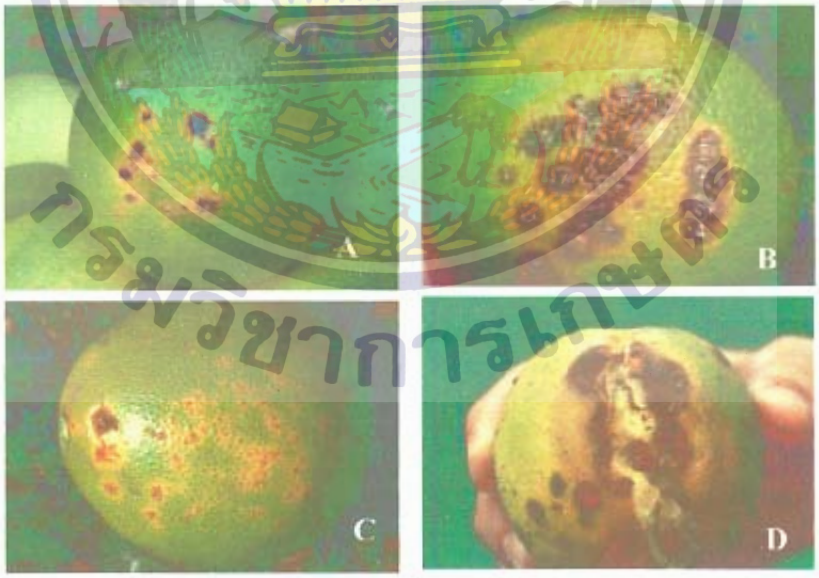
ลักษณะอาการบนกิ่ง

อาการบนกิ่งและต้นมักจะเกิดกับกิ่งอ่อนโดยเฉพาะกิ่งอ่อนของมะนาว แผลที่เกิดใหม่คล้ายอาการบนใบ (ภาพที่ 7 A) ต่อมาแผลจะแห้งแตกแข็งเป็นสีน้ำตาลตามขวางรอบกิ่งหรือขยายตามความยาวกิ่ง รูปร่างแผลไม่แน่นอน และไม่เห็นวงเหลือง (halo) ล้อมรอบ (ภาพที่ 7 B และ C) (วิวัฒน์, 2510; อำไพวรรณ และคณะ, 2527; Fawcett, 1936) เชื้อที่เข้าทำลายที่กิ่งนั้นแผลที่อยู่ที่กิ่งเชื้อสามารถอยู่รอดได้เป็นระยะเวลานาน สามารถทำให้เป็นแหล่งแพร่เชื้อในฤดูการปลูกต่อไปได้

ภาพที่ 7 (A) ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนกิ่งมะนาว (B,C) ลักษณะอาการแผลจุดแห้งแตกแข็งเป็นสีน้ำตาล ไม่มีวงเหลือง (halo) ล้อมรอบ

ลักษณะอาการบนผล

อาการบนผลจะเป็นมากในต้นที่พบโรคแคงเกอร์ที่ใบมาก ลักษณะอาการคล้ายอาการบนใบแต่จะเกิดเดี่ยวๆ มีลักษณะกลม แผลจะฝังลึกลงไปในผิวของผลประมาณ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 8 A) (Gottwald and Graham, 2000) แผลจะเริ่มขยายมีขนาดใหญ่เป็นสะเก็ดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน พบวงสีเหลืองล้อมรอบชัดเจน (อำไพวรรณ และคณะ, 2527) (ภาพที่ 8 B) จุดแผลของโรคแคงเกอร์ บนผลจะพบหลายขนาดเนื่องจากผลส้มใช้เวลาหลายเดือนกว่าจะสุกทำให้เชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์อยู่ในผลได้นานสามารถเข้าทำลายผลส้มได้หลายครั้งทำให้แผลมีขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 8 C) การเข้าทำลายผลอ่อนเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าทำลายในขณะที่ผลอ่อนถ้ารุนแรงจะทำให้ผลร่วง แต่ถ้าไม่รุนแรงส่วนมากก็จะถูกทำลายเสียหายผลผลิตไม่ได้คุณภาพ โดยปกติการเข้าทำลายที่ผลนั้นเชื้อเข้าทำลายเฉพาะที่เปลือกส้ม ไม่เข้าทำลายถึงในกลีบ แต่บางกรณีเชื้อสามารถเข้าทำลายลงไปในเนื้อส้มได้ทำให้เกิดเป็นช่องเปิดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆเข้าทำลาย ทำให้ผลส้มแตกและเน่าได้ (ภาพที่ 8 D)



ภาพที่ 8 (A) ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ที่พบบนผลส้มโอ (B) แผลขยายใหญ่เป็นสะเก็ดรูปร่างไม่แน่นอน มีวงสีเหลือง(halo) ล้อมรอบชัดเจน (C) แผลของโรคแคงเกอร์บนผลจะมีขนาดหลายขนาดแตกต่างกัน (D) เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าทำลายลงไปในเนื้อส้มได้ทำให้เกิดเป็นช่องเปิดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆเข้าทำลาย ทำให้ผลส้มแตกและเน่าได้

ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ร่วมกับหนอนชอนใบ

การเข้าทำลายของหนอนชอนใบสายพันธุ์เอเชีย (*Phyllocnistis citrella*) ซึ่งเป็นช่องทางให้แบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าทำลาย ทำให้เพิ่มจำนวนแผลทำให้โรคลุกลามอย่างรวดเร็ว จากแผลจุดเดี่ยวๆ ทำให้ลุกลามเป็นปื้นๆ แผลที่มีรูปร่างต่างๆ ตามรอยทางเดินในการกินอาหารหนอนชอนใบ (ภาพที่ 9) หนอนชอนใบจะกินอาหารจากชั้นผิว epidermis ของใบส้มซึ่งต่ำกว่าชั้น cuticle ทำให้เกิดรอยแตกจำนวนมากบนชั้น cuticle ของใบส้มตามรอยกัดกินของหนอนชอนใบ ทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าทำลายได้โดยตรงผ่านชั้น cuticle เข้าไปในชั้น parenchyma และ spongy mesophyll ซึ่งเป็นชั้นที่อ่อนแออย่างมากต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค แผลบนใบของส้มปกติจะเกิดเป็นจุดนูนฟูคล้าย callus ภายใน 1-2 วัน แต่จุดแผลของโรคแคงเกอร์ที่เข้าทำลายตามรอยกัดของหนอนชอนใบจะไม่เห็นเป็น callus จะพบเป็นจุดแผลที่ขยายเพิ่มออกไปตามทางเดินในการกินอาหารของหนอนชอนใบ การระบาดของหนอนชอนใบทำให้โรคแคงเกอร์แพร่ระบาดและรุนแรงมากขึ้นกว่าที่ไม่มีหนอนชอนใบ เนื่องเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์กระจายไปทั่วแปลงที่หนอนชอนใบระบาดไม่เฉพาะทำให้เกิดการระบาดในแปลงปลูกเท่านั้น แต่ยังมีศักยภาพในการทำให้เกิดการแพร่ระบาดขยายขอบเขตพื้นที่เพิ่มมากขึ้น (Gottwald and Graham, 2000)

ภาพที่ 9 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ร่วมกับหนอนชอนใบ

พืชอาศัย (host range)

ในบรรดาพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดยทั่วไป พบว่า เกรฟฟรุ๊ต มะนาว (Mexican lime) และส้มสามใบ จะอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์มากที่สุด ในขณะที่ sour orange เลมอน (lemon) และ sweet orange จะอ่อนแอปานกลาง ส่วนส้มแมนดาริน ต้นทาน ปานกลาง ค้นส้มสายพันธุ์เดียวมันค้นที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่จะอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์มากกว่าส้ม ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ในกรณีที่เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายโดยทำให้เกิดบาดแผลหรือโดยการถูกหนอนชอน ใบกัดกินเป็นทางเดินยาว ทำให้ผ่าใบชั้นนอก (mesophyll) เข้าไปลอกเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลาย พืชตระกูลส้มทุกสายพันธุ์และพืชใกล้เคียงทั้งที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ ได้ (Gottwald and Graham, 2000)

Civerolo (1984) ได้รายงานรายชื่อพืชตระกูล Rutaceae ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค แคงเกอร์ *X. axonopodis* pv. *citri* ดังนี้

พืชตระกูลส้มที่อ่อนแอต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้แก่

เกรฟฟรุ๊ต (*C. paradisi* Macf.)

มะนาว (*C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle)

มะนาวหวาน (*C. limettioides* Tan., Palestine)

ส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)

พืชตระกูลส้มที่อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible)

ส้มตรา (*C. sinensis* (L.) Osbeck)

ส้มจี๊ด (*C. aurantium* L.)

เลมอน (*C. limon* (L.) Burm)

พืชตระกูลส้มที่ต้านทานปานกลาง (Moderately resistant)

ส้มแข่ หวาน (*C. reticulata* Blanco)

ส้มโอ (*C. maxima* (Burm) Merr.)

มะนาวตาฮิติ (*C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle)

พืชตระกูลส้มที่ต้านทานสูง (Highly Resistant)

ซ่าหรอน (Citron: *C. medica*)

คัมควอท (Kumquat: *Fortunella* spp.)

การจัดทำโปรแกรมการกำจัดโรคพืช การจำแนกชนิดของพืชอาศัยของศัตรูพืชหรือเชื้อโรคเป็นสิ่งสำคัญ Kalita *et al.* (1997) รายงานว่า วัชพืช goat weed (*Ageratum conyzoides* L.) ในประเทศอินเดียอ่อนแอต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* วัชพืชชนิดนี้พบทั่วไปในแปลงปลูกส้มในประเทศอินเดีย และบางพื้นที่ในมลรัฐฟลอริดา การรายงานนี้เป็นการรายงานพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ไม่ใช่พืชตระกูลส้ม แต่ในประเทศบราซิลได้มีการทดสอบการเกิดโรคบนวัชพืช goat weed โดยการปลูกด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าผลเป็นลบ วัชพืชไม่เกิดโรค จึงมีข้อสนอว่าการเข้าทำลายของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนวัชพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลส้มอาจจะเป็นผลมาจากปฏิกิริยาตอบสนองเชิงลบ (hypersensitivity) จากการปลูกเชื้อโดยใช้เชื้อสาเหตุจำนวนมากและไม่ใช่ความอ่อนแอที่แท้จริง (Gottwald *et al.*, 2002)

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

วิวัฒน์ แดงสุภา 2510 การศึกษาเบื้องต้นโรคแผลแคงเกอร์ของส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดำไพวรรณ กราครนุวัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล วิเชียร ถ้าจายภัย สุพัฒน์ ศรรถธรรม และนิพนธ์ ทัวชัย. 2527. โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ 126 น.

Civerolo,E L 1984 Bacterial canker disease of citrus J Rio Grande Valley Hort Assoc 37: 127-146

EPPO CABI . 2005 *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* In *Quarantine Pests for Europe 2nd edition* (Ed By Smith, I. M , McNamara, D G., Scott, P R , and M Holderness. CABI International, Wallingford, UK.

Fawcett , N S. 1936 Citrus Disease and Their Control 2d ed . McGrow – Hill Book Co , Inc New York. 656 p

Goto, M. 1969 Studies on citrus canker in Japan Proc. First Int. Citrus Symp, 3 1251-1252.

Gottwald, T R and J H Graham 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01 Available Source : http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm. April 20, 2003

Gottwald, T R J H Graham and T S Schubert 2002. Citrus canker The pathogen and its impact. Online Plant Health Progress doi.10.1094/PHP-2002-0812-01-RV Available Source . http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/.

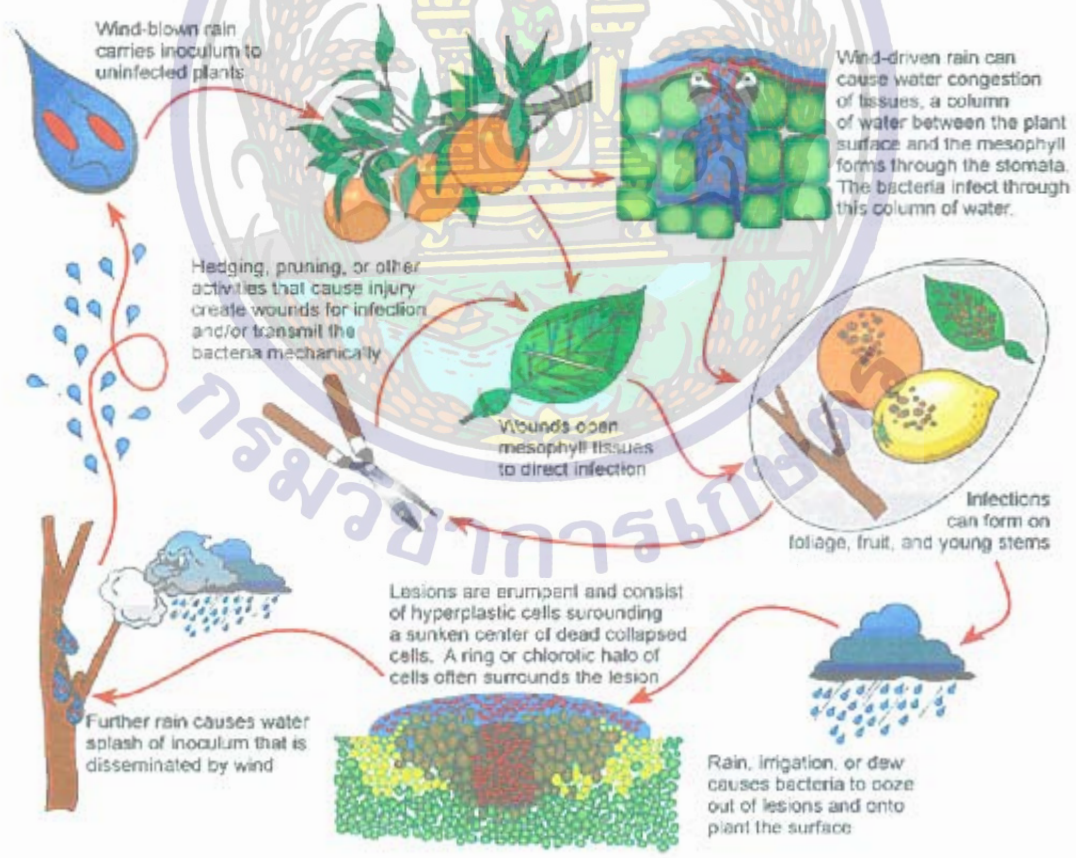
Kalita P , L. C Bora, and K. N Bhagabati. 1997 Goat weed, a host of citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv *citri*). J. Mycol Pl. Pathol 27:96-97

บทที่ 3

วงจรการเกิดโรคแคงเกอร์ และการระบาดของโรค

วงจรการเกิดโรค (Disease cycle)

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณบนใบ กิ่ง และผลของพืชตระกูลส้ม เมื่อมีความชื้นหรือหยดน้ำเกาะบนจุดแผลและปล่อยเซลล์แบคทีเรีย (bacterial ooze) ออกมาและสามารถแพร่กระจายไปเจริญเติบโตบนส่วนอื่นๆของพืชหรือต้นอื่นได้ (ภาพที่ 10) น้ำฝนที่ไหลจากใบที่เป็นแผลแคงเกอร์จะมีเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อยู่ประมาณ 10^5-10^7 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (Gow, 1962) ฝนจึงเป็นตัวการที่สำคัญใน



ภาพที่ 10 วงจรการเกิดโรคของโรคแคงเกอร์ (ที่มา: Gottwald and Graham, 2000)

การแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคตามธรรมชาติและลมที่ความเร็ว 18 mph (8m/s) จะช่วยให้แบคทีเรียแทรกเข้าสู่พืชได้โดยผ่านทางปากใบ (stomatal pores) (ภาพที่ 11 A และ B) (Graham *et al.*, 1992; Gottwald and Graham, 1992) และ บาดแผลต่างๆ เช่น บาดแผลที่เกิดจากรอยขีดข่วนเนื่องจากการเสียดสีของกิ่ง (ภาพที่ 12) จากการกัดกินอาหารของหนอนชอนใบ และจากเม็ดทรายที่ถูกพัดโดยลมพายุ (Timmer, 2000) หนอนชอนใบจะกัดกินบนผิวใบโดยทำให้เกิดบาดแผลอย่างกว้างในชั้น cuticle ของใบเป็นช่องทางทำให้เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าทำลายทำให้เกิดจุดแผลจำนวนมาก (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* กำลังเข้าสู่ต้นพืชโดยทางปากใบ (A) และ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เข้าไปอยู่ในปากใบ (B) (Graham *et al.*, 1992)

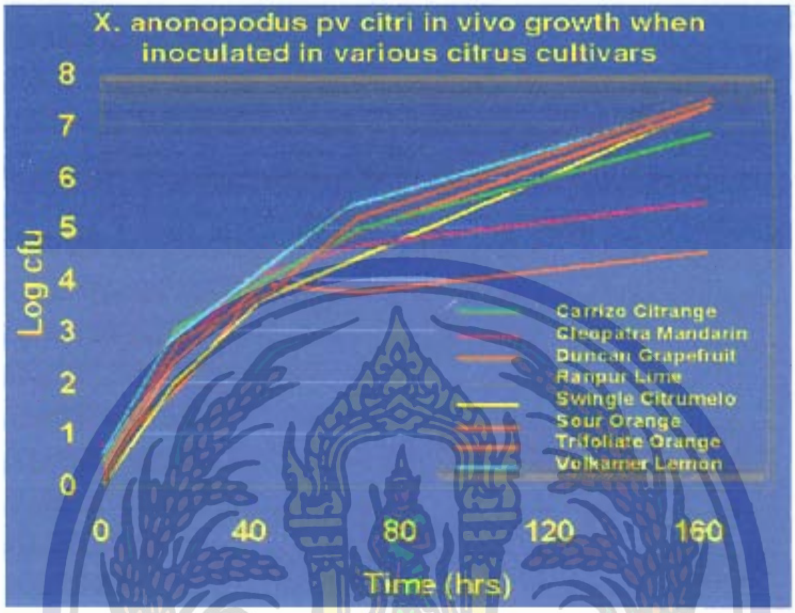
ภาพที่ 12 บาดแผลที่เกิดจากรอยขีดข่วนเนื่องจากการเสียดสีของกิ่งและถูกเข้าทำลายโดยแบคทีเรียสาเหตุโรค

ภาพที่ 13 บาดแผลที่เกิดจากกัดกินของหนอนชอนใบ และถูกเข้าทำลายโดยแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดจุดแผลจำนวนมาก

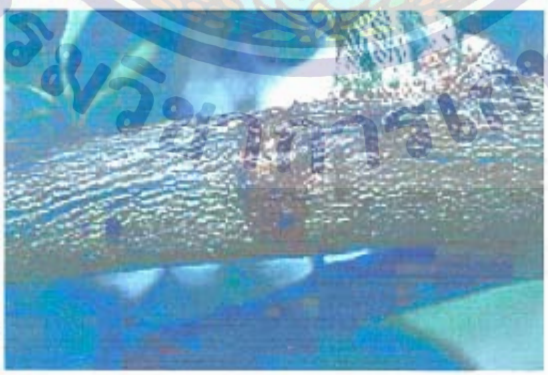
น้ำภายในเนื้อเยื่อของใบพืชสามารถปลิวไปกับฝนหรือพายุ ใบของพืชตระกูลส้มจะมีน้ำ ผิดแน่นอยู่ถึง 7 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตรของพื้นที่ใบ (Goto, 1992) มีการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่อยู่ในน้ำภายในเนื้อเยื่อใบพืชที่มีจุดแผลของโรคแคงเกอร์ที่สามารถทำให้เกิดจุดแผลโรคแคงเกอร์ได้ พบว่า เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เล็กน้อยเพียง 1-2 เซลล์ สามารถทำให้เกิดจุดแผลโรคแคงเกอร์ได้เมื่อถูกบังคับให้เข้าสู่พืชผ่านทางปากใบ (Graham *et al*., 1992, Gottwald and Graham, 1992) มีรายงานจากประเทศอาร์เจนตินาว่า ปริมาณเชื้อสาเหตุที่ถูกละอองฝนสามารถพัดไปได้ไกล 32 เมตร จากต้นที่เป็นโรค (Stall *et al*., 1982) อย่างไรก็ตามในฟลอริดาพบเหตุการณ์ที่ลมฝนและพายุหมุนร้อนสามารถพัดเชื้อให้แพร่กระจายไปได้ไกลถึง 7 ไมล์ (Gottwald *et al*., 1992) นอกจากนี้การตัดแต่งกิ่งที่ทำให้เกิดบาดแผลอย่างรุนแรงจะเป็นจุดที่เชื้อเข้าทำลายได้

เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้าสู่พืชอาศัยทางปากใบ และบาดแผล (Timmer, 2000) อาการของโรคแคงเกอร์เริ่มแรกบนใบเกิดเป็นตุ่มเล็กๆ นูนจากเนื้อเยื่อรอบๆ จุดแผลหลังจากปลูกเชื้อได้ 7 วัน ถ้าอยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าทำลายพืชอาศัยอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส (Kuzuma, 1985) ถ้าอยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าทำลายและสภาพที่เอื้อต่อการจะปรากฏหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 60 วันหรือมากกว่านั้น (Gottwald and Graham, 1992)

การเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นในระหว่างที่แผลขยายออกไปและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียต่อจุดแผลจะมากน้อยเท่าไรขึ้นอยู่กับความอ่อนแอหรือต้านทานของพืชอาศัยชนิดนั้นๆ ถ้าพืชอาศัยอ่อนแอเชื้อสาเหตุจะมีปริมาณเพิ่มมากกว่าพืชอาศัยที่ต้านทาน (ภาพที่ 14) เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตอยู่ในแผลบนใบและผล จนกระทั่งใบและผลร่วงตกลงพื้นดินและจะอ่อยสลายไปในที่สุด ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนกิ่งสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน (ภาพที่ 15) เซลล์แบคทีเรียที่ออกมาอยู่ที่ผิวพืชจะลายเมื่อโดนแสงจนแห้ง การลายของเชื้อแบคทีเรียจะเร็วขึ้นเมื่อถูกแสงอาทิตย์โดยตรง



ภาพที่ 14 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เมื่อปลูกเชื้อลงบนพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ในสภาพเรือนทดลอง (ที่มา: Gottwald and Graham, 2000)



ภาพที่ 15 แผลของโรคแคงเกอร์บนกิ่งที่เป็นเนื้อไม้ของพืชตระกูลส้ม สามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานาน

การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคแคงเกอร์

เชื้อแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินได้เพียงไม่กี่วัน และสามารถมีชีวิตอยู่บนเศษพืชที่ตกอยู่บนดินได้เพียงไม่กี่เดือน แต่เชื้อแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลายปีในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเก็บไว้ให้แห้งและไม่มีต้น (Goto, 1992) ส่วนของพืชอาศัยที่อยู่บนเหนือดินจะอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์โดยเฉพาะช่างดอกซึ่งเป็นระยะที่ก่อนการเจริญเติบโตเต็มที่ ตลอดจนผลอ่อนและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จะออกมาจากแผลแล้วกลายเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรคต่อไปในอากาศ (Tanner, *et al*., 1996)

Rao and Hingorani (1963) พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถอยู่รอดได้นาน 6 เดือน บนใบที่เป็นโรค โรคสามารถอยู่ข้ามฤดูได้เป็นระยะเวลานานโดยอยู่บนกิ่งหรือลำต้นของพืชตระกูลส้ม (ภาพที่ 15) เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถอยู่รอดบนกิ่งมากกว่า 76 เดือน (Chakravarti *et al*., 1966) และมีรายงานในฟลอริดาว่าสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้จากแผลเก่าบนต้นมะนาวที่มีอายุ 5-7 ปี (Graham *et al*., 2000) Vasudeva (1958) รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถมีชีวิตอยู่รอดในใบพืชที่เป็นโรคได้นาน 6 เดือน อยู่ในดินที่ฆ่าเชื้อได้นาน 52 วัน และอยู่ในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อได้นาน 9 วัน และในดินที่ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถอยู่รอดได้เพียง 12 วัน เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถอยู่รอดบนเศษใบพืชตระกูลส้มได้ในระดับประชากรต่ำโดยไม่ทำให้เกิดการพัฒนาของโรคแคงเกอร์ (Goto, 1979) ได้มีการพยายามจะตรวจหาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บนผิวของสิ่งไม่มีชีวิตต่างๆ เช่น ไหมพลาสติก เสื้อผ้า และไม้แปรรูป ทั้งที่ร่มและกลางแจ้งพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคตายภายใน 24 – 72 ชั่วโมง ผลหรือใบที่เป็นโรคแคงเกอร์มือร่วงลงพื้นประชากรของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จะลดลงถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ใน 1 – 2 เดือน เนื่องจากเชื้อปฏิปักษ์และไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อแบคทีเรียในดินได้ (Graham *et al*., 2000)

บ่อยครั้งที่เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถตรวจพบในดินบริเวณรากของพืชตระกูลส้ม และจากวัชพืช ชนิดต่างๆ 13 ชนิด ที่เก็บมาจากสวนส้มเก่าแก่ที่ยอดใหม่ของต้นเต็มที่จะแตกออกมาในฤดูใบไม้ผลิ (Goto *et al*., 1975b) เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถอยู่รอดโดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรากของวัชพืชและไม่เสื่อมสลายไปในฤดูหนาว (Goto *et al*., 1975a)

การระบาดของโรคแคงเกอร์ (Epidemiology)

การเข้าทำลาย (Infection)

ใบ ต้น กิ่ง และ ผล ของพืช เมื่อเจริญเต็มที่ผ้าชั้นนอก (cuticle) จะหนาขึ้น ทำให้ผิวแข็งขึ้น ซึ่งผลทางสรีระวิทยานี้ทำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคแคงเกอร์ (Stall and Seymour, 1983) เช่นเดียวกันในบางเนื้อเยื่อพืชระดูลส้มที่ยังอ่อนปากใบยังไม่ปิดทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายโดยธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการเกิดบาดแผลซึ่งเชื้อจะเข้าสู่พืชได้โดยตรงสามารถเข้าทำลายได้ทั้งในต้นและกิ่งที่เจริญเต็มที่หรือยังอ่อน (Gottwald and Graham, 2000) โรคแคงเกอร์เหมือนกับโรคที่เกิดจากแบคทีเรียทั้งหลาย พาหุฝนเป็นกลไกเริ่มต้นในการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียไปในระยะใกล้และระยะปานกลาง (Gottwald and Timmer, 1995) การแพร่กระจายไปในระยะไกลจะเกิดเนื่องจากการเคลื่อนย้ายของต้นพันธุ์ที่เป็นโรคโดยมนุษย์หรือการเคลื่อนย้ายเครื่องมือที่ปนเปื้อนด้วยโรคแคงเกอร์ นอกจากนี้ภัยธรรมชาติที่เกิดขึ้นเช่น พอร์นาโด และ พาหุฝูร้อนซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการกระจายโรคไปในระยะปานกลางและระยะไกล (Gottwald *et al.* 1997)

เมื่อเชื้อเข้าสู่พืชและเจริญเต็มที่ ระยะเวลาที่ต้องระมัดระวังสำหรับการเข้าทำลายในระยะผลส้มพร้อมในระยะ 90 วันหลังดอกร่วง การเข้าทำลายของโรคแคงเกอร์ที่พบหลังจากนี้จะพบเพียงจุดสะเก็ดนูนเล็กๆ ไม่เด่นชัด เพราะการผลิตส้มมีระยะที่ก่อนแต่ละโรคแคงเกอร์อาจกำเนิดเชื้อกลับไป การเข้าทำลายของผลอาจพบการแพร่กระจายของโรคอีกครั้งบนผลเดียวโดยพบจุดแผลที่มีอายุแผลต่างกันบนผลเดียวกัน ซึ่งอาจจะบ่งบอกถึงการแพร่กระจายของโรคในสวนได้ (Gottwald and Graham, 2000)

การแพร่กระจายของเชื้อ (Pathogen dispersal)

การแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์แพร่กระจายโดยลมและฝนในระยะทางสั้นๆ เช่น การกระจายในต้นหรือต้นใกล้เคียง การพัฒนาของโรคด้านหัวลมพาหุฝนจะมีความรุนแรงมากกว่าด้านที่ไม่ใช่ลม การแพร่กระจายในระยะทางไกลมากกว่า 2 – 3 ไมล์ สามารถเกิดขึ้นได้จาก

สภาพอากาศที่รุนแรง เช่น การเกิดพายุไซโคลนเขตร้อนและทอร์นาโด (Gottwald *et al.*, 2000) การศึกษาในปัจจุบันพบว่า 99% ของการเข้าทำลายจะเกิดขึ้นภายใน 30 วัน โดยระยะที่ 594 เมตร จากต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในสภาพอากาศโคลิ (Gottwald *et al.*, 2002) เฮอร์ริเคนและพายุไซโคลนเขตร้อนเป็นต้นการทำให้เพิ่มการแข่งทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ดีและสามารถแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียไปได้ไกลถึง ระหว่างปี 2004 รัฐฟลอริดาเกิดพายุเฮอร์ริเคนขึ้น 3 ครั้ง ในแหล่งปลูกส้มเพื่อการค้าเป็นเหตุให้การแพร่กระจายโรคไปได้ไกลมากกว่า 53 กิโลเมตร และทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปยังแหล่งปลูกใหม่กว่า 100 แห่ง อย่างไรก็ตามการแพร่ระบาดในระยะทางไกลมักเกิดจากการเคลื่อนย้ายส่วนขยายพันธุ์ที่มีเชื้อติดอยู่ เช่น ต้นไม้ ท่อนพันธุ์ ต้นกล้า แต่ไม่มีรายงานของการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission) (Gottwald and Graham, 2000) การขนส่งผลส้มที่เป็นโรคโดยทางเรือเป็นอีกหนทางหนึ่งที่ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อในระยะทางไกล แต่ยังไม่มีรายงานยืนยัน คนงานที่ทำงานในโรงเรือนอนุบาลพันธุ์ส้มสามารถแพร่กระจายเชื้อจากโรงเรือนหนึ่งสู่อีกโรงเรือนหนึ่งได้โดยติดไปกับมือ เสื้อผ้า และเครื่องมือการเกษตร การแพร่กระจายภายในระหว่างต้นติดไปกับลมน้ำเรือและอุปกรณ์ตัดแต่งกิ่ง และเครื่องพ่นสารเคมี มีหลักฐานยืนยันการแพร่กระจายโรคในแปลงปลูกหรือระหว่างแปลงปลูก แม้ระทั่งส่วนที่ใช้กินผลส้มและใบที่เป็นโรคก็สามารถเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อในระยะไกลได้ (Gottwald and Graham, 2000)

การศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในประเทศไทย

ณัฐฐา และคณะ (2537) ศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* แบบใบมะนาวในประเทศไทยในแปลงปลูกที่จังหวัดปทุมธานี ตั้งแต่ธันวาคม 2534-มกราคม 2536 โดยในแต่ละเดือนทำการเลือกกิ่งของมะนาวที่ใบแก่เต็มที่ (ใบพลิกสาม) ไม่มีสัญญาณของโรคแคงเกอร์ มีจำนวนใบในแต่ละกิ่ง 10 ใบ จากนั้นทำการพ่นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 20 กิ่ง ต่อปีปิเชื้อทิ้งไว้ที่ต้นจำนวน 10 กิ่งเพื่อตรวจนับจำนวนจุดแผลโรคแคงเกอร์ที่เกิดขึ้นในแต่ละลำดับใบในสภาพแปลงปลูก และเก็บกิ่งมะนาวอีก 10 กิ่งจากแปลงปลูกนำมาทำการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมากับใบมะนาว โดยตรวจนับจำนวนจุดแผลของโรคแคงเกอร์ที่ติดมาในแต่ละลำดับใบ และตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมากับใบมะนาวทั้งภายนอกและภายในของแต่ละลำดับใบในห้องปฏิบัติการ จากการตรวจนับจำนวนจุดแผลของโรคแคงเกอร์ที่ติดมากับใบมะนาว สามารถตรวจพบจุดแผลในลำดับใบที่ 4 ถึง 7 มากที่สุด โดยพบในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจนับจำนวนจุดแผลของโรคแคงเกอร์บนใบมะนาวใน

สภาพแปลง และตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมาทั้งภายนอกและภายในใบมะนาวในลำดับใบที่ 4 ถึง 7 เช่นกัน โดยพบในช่วงเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน นอกจากนี้ยังได้ตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมากับน้ำค้างบนใบมะนาว โดยพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมากับน้ำค้างในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม จากการศึกษาพบการระบาดของโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกมากที่สุดในช่วงเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนของประเทศไทย และพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ติดมาทั้งภายนอกและภายในใบมะนาวและน้ำค้างในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือน พฤศจิกายน เช่นกัน ซึ่งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ติดมานั้นสามารถทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูกต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ณัฐชุมา นุญโพนค์ สุนสรา ภาวิจิตร และสุทธิพงษ์ ญาณวารี 2537. การศึกษาบันเทศน์วิทยาของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* บนใบมะนาวในประเทศไทย รายงานผลงานวิจัยปี 2537. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Chakravarti, B.P., S. Porwal and M. Rangarajan, 1966. Studies on citrus canker in Rajasthan. I. Disease incidence and survival of the Pathogen. Labdev J. Sci. Tech., 4: 262-265.

Goto, M. 1962. Studies on citrus canker I. Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. Iwata, Japan. 12: 1-72. (in Japanese with English summary).

Goto, M. 1970. Studies on citrus canker III. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in soils and on the surface of weeds. Bull. Fac. Agric. Shizouka Univ., 20. 21-29.

Goto, M. 1992. Citrus canker. *In* Plant diseases of international importance. Vol. III (J. Kumar, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, Eds.) Prentice-Hall, Englewood Cliff, N.J. pp. 170-208.

Goto, M., K. Ohta, and N. Okabe. 1975a. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. I. Detection of the bacterium from a grass (Zoysia) sporcal). Ann. Phytopath. Soc. Japan 41:9-14.

Goto, M., K. Ohta, and N. Okabe. 1975b. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 41:141-147.

Gottwald, T. R., and J.H. Graham. 1992. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathology 82:930-935.

Gottwald, T. R., and L. W. Timmer. 1995. The efficacy of windbreaks in retarding the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Trop.Agric. 72:194-201.

Gottwald, T.R. and J.H. Graham. 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01. Available Source: http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm. April 20, 2003.

Gottwald, T. R., J.H. Graham, and D. S. Egel. 1992. Analysis of foci of Asiatic citrus canker in a Florida citrus orchard. J. Plant Dis. 76:389-396.

Gottwald, T. R., J.H. Graham, and T. S. Schubert. 1997. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. Fruits 52 371-378.

Gottwald, T.R. and J.H. Graham. 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor. DOI 10.1094/PHI-I-2000-1002-01. Available Source: http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm. April 20, 2003

Gottwald, T. R., J. H. Graham and T. S. Schubert. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. Available Source: http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/.

Graham, J. H., T. R. Gottwald, J. D. Riley and D. Achor. 1992. Penetration through leaf stomata and stratum of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. Phytopathology 82:1319-1325.

Graham, J. H., T. R. Gottwald, J. D. Riley, J. Cubero and D. L. Drouillard. 2000. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). (Abst.) In: Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce FL, June 20-22, 2000. Online. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

Kouzumi, M. 1985. Citrus canker: The world situation. Pages 2-7 in: Citrus Canker: An International Perspective. J. W. Timmer, ed. Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred.

Rao, Y. P. and M. K. Hingorani. 1963. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. Indian Phytopath., 16: 362-364.

Stall, R. E. and C. P. Symon. 1983. Canker, a threat to citrus in gulf coast states. Plant Dis. 67: 581-585.

Stall, R. E., G.M. Marco and B.I. Canteros. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to cankerosis of citrus. Phytopathology, 72: 1097-1100.

Timmer, L. W. 2000. Inoculum production and epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. (Abst.) In: Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce FL, June 20-22, 2000. Online. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

Timmer, L. W., S. E. Zitko and T. R. Gottwald. 1996. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on symptomatic and asymptomatic citrus leaves under various environmental conditions. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 448-451.

Vasudeva, R.S. 1958. Sci. Rep. Indian Agric. Res. Inst., New Delhi, 1956-57. p. 93.

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4

การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse 1915) Vauterin *et al.* 1995

Scientific Classification

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class Gamma Proteobacteria

Order Xanthomonadales

Family Xanthomonadaceae

Genus *Xanthomonas*

Species: *X. axonopodis*

Synonymes *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson

X. campestris pv. *citri* (Hasse) Dye 1978

X. campestris pv. *aurantifolia* Gabriel *et al.* 1989

X. axonopodis pv. *aurantifolia* (Gabriel *et al.*) Vauterin *et al.* 1995

การจัดจำแนกและระบบการตั้งชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (Taxonomy and Nomenclature)

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์มีการเปลี่ยนแปลงระบบการตั้งชื่อใหม่หลายครั้ง โดยครั้งแรกมีการตั้งชื่อคือ *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson ต่อมาได้มีการศึกษาลักษณะย่อยของเชื้อเพิ่มเติมมากขึ้นด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยขึ้นในปี 1980 ที่ประชุม International Society for Plant Pathology (ISPP) Dye *et al.* (1980) ได้เสนอให้จัดเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่ใช้ *X. campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye

Gabriel *et al.* (1989) ได้เสนอให้มีการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บางสายพันธุ์ในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ใหม่จาก *X. campestris* pv. *citri* เป็น *X. campestris* pv. *aurantifolii* โดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของเชื้อจากเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่งในขณะนั้นข้อมูลสนับสนุนอื่นๆ มีไม่เพียงพอทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับและตกไป

Vauterin *et al.* (1995) ได้ศึกษารายละเอียดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เพิ่มเติมโดยศึกษาทางด้าน DNA-DNA hybridization และ ข้อมูลการใช้แหล่งอาหาร (carbon source) ของเชื้อโดยใช้ Biolog microplates จึงเสนอเปลี่ยนแปลงชื่อเป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ซึ่งชื่อนี้ได้รับการยอมรับจาก คณะกรรมการระดับนานาชาติจัดทำระบบอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (International Committee on the Systematic of Bacteria (ICSB)) (Yong *et al.*, 1996)

ต่อมา Schaad *et al.* (2005) ได้เสนอระบบการตั้งชื่อใหม่อีกครั้งโดยทำการศึกษารายละเอียดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เพิ่มเติมทางด้าน DNA-DNA relatedness assays ลำดับเบสของ 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) และผลวิเคราะห์จากเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) จากเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ 44 สายพันธุ์จาก 5 กลุ่มของโรคแคงเกอร์และภายใต้สภาพ DNA reassociation (Tm 15 องศาเซลเซียส) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามจีโนมได้เป็น 3 taxon จึงขอเปลี่ยนแปลงจากชื่อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ตามลักษณะ genotype และ pathotype ทั้ง 3 กลุ่มออกเป็น

Taxon I เป็น *X. axonopodis* pv. *citri* (ex Hasse, 1915) sp. nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker A

Taxon II เป็น *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (ex Gabriel *et al.*, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker B C และ D

Taxon III เป็น *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 nov. nom. rev. comb. nov. เป็นกลุ่ม canker E

แต่ระบบการตั้งชื่อของ Schaad *et al.* (2005) ไม่ถูกต้องตามกฎของ ICSB จึงไม่เป็นที่ยอมรับ ต่อมา Schaad *et al.* (2006) จึงได้ตีพิมพ์บทความแก้ไข โดยได้เสนอข้อมูล DNA-DNA reassociation ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งเป็นข้อมูลที่จำเป็นในการจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียตามระบบสมัยใหม่ (modern classification) เพื่อสนับสนุนระบบ

การตั้งชื่อของ Gabriel *et al.* (1989) โดยเสนอเปลี่ยนชื่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม เป็น *Xanthomonas citri* pv. *citri* ซึ่งบทความนี้เพิ่งตีพิมพ์ในวารสาร Systematic and applied microbiology ประจำเดือน ธันวาคม 2006 และยังไม่มีการตอบรับจาก ICSB

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) เซลล์เดียว รูปท่อน (rod shape) ขนาด 0.5-0.75 x 1.5-2.0 ไมโครเมตร มี flagellum อันเดียวอยู่ด้านข้าง (polar flagella) จะเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส (วิวัฒน์, 2510; Fawcett, 1936) โคโลนีบนอาหารมีสีเหลือง เนื่องจากการสร้างสาร xanthomonodin เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลกลโกส (glucose) หรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ โคโลนีจะเป็นมันเยิ้ม (mucoid) เนื่องจากสร้างสาร exopolysacaride slime (Gottward and Graham, 2000) (ภาพที่ 16 A,B) จากการศึกษาทางชีวเคมี พบว่าเชื้อไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ เกิด H_2S ไม่เกิดกรดและแก๊สในน้ำตาลต่างๆ ไม่สร้างสารอินโดล (indole) สามารถย่อยแป้ง ย่อยสาร aesculin casein และ gelatin ได้ (Goto *et al.*,1980) สร้างเอ็นไซม์ catalase และ tyrosinase ไม่สามารถสร้าง oxidase และ carbohydrate แล้วยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้ glucose, galactose, mannose, trehalose, sucrose, maltose และ mannitol แต่ไม่สามารถใช้ arabinose, rhaffinose และ sorbitol (วิวัฒน์, 2510)

ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร (A) Potato Semi-synthetic agar (PSA) และ (B) อาหาร Yeast Dextrose $CaCO_3$ medium (YDC)

ณัฏฐิมา และคณะ (2536) ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากพืชตระกูลส้มที่พบในประเทศไทย โดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ เปรียบเทียบกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นและอาร์เจนตินา พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทย มีคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์คล้ายกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่นมากกว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศอาร์เจนตินา

ณัฏฐิมา และวงศ์ (2546) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย โดยทำการเก็บรวบรวมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกจากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆจากแหล่งปลูกทั่วประเทศจำนวน 152 ไอโซเลท นำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้าง spore มีหาง (Flagellation) เส้นเดียวที่ส่วนปลาย รูปร่างท่อนตรง ขนาด 0.5 x 1.7 µm มีการใช้ออกซิเจน (Oxydation) สามารถย่อยแป้ง ย่อยเจลาติน ย่อย Tween 80 และย่อย Casein สร้างเอนไซม์ Lecithinase ได้ ไม่ใช้ Arginine และ Gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอ็นไซม์ Urease เกิดก๊าซ Hydrogen sulphide (H_2S) สร้างสาร Acetoin เกิด protcolysis ใน Litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Tyroinase และจากการทดสอบการใช้น้ำตาล 31 ชนิด ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Utilization of Carbohydrates) ที่ 21 วัน พบว่าเชื้อทั้ง 152 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาล arabinose , xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, treehalose. sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L- methyl, D-glocoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, gluconate, oxalate, acetate และ tartrate และพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ rhamnose, sorbitol และsalicin แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดนี้ ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin 23 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่ สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin 44 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่ทั้งสองน้ำตาล 25 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ทั้งสองน้ำตาล 60 ไอโซเลท

จากการทดสอบพบว่ากลุ่มที่ 4 มีจำนวนมากที่สุดถึง 40 % รองลงมาคือ กลุ่มที่ 2 มี 29 % กลุ่มที่มีน้อยที่สุดได้แก่ กลุ่มที่ 1 มี 15 % ผลจากความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นพบว่า ปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเกิดการสร้างด่าง (alkali production) โดยเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลโดยเปลี่ยนสีของอาหารจากเขียวมะกอกเป็นสีน้ำเงินเข้ม พบปฏิกิริยาส่วนน้อยที่เกิดการสร้างกรด (acid production) โดยอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวมะกอกเป็นสีเหลืองส้ม ซึ่งทั้งการสร้างกรดและด่างเกิดจากการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรียนั้นเอง

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ สุเนตรา ภาวิจิตร และสุทธิพงษ์ ญาณวารี 2536. การเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของ Strain ของ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* จากพืชตระกูลส้มที่พบในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัยปี 2536. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2546 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 932-948.

วิวัฒน์ แดงสุภา. 2510. การศึกษาเบื้องต้นโรคแคงเกอร์ของส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Dye , D.W. , J.F. Bradbury , M. Goto , A.C. Hayward , R.A. Lelliott and M.N.Schroth. 1980. International standard for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype Strain. Rev. Plant Pathol. 19:153 – 168.

Fawcett , N.S. 1936. Citrus Disease and Their Control. 2d ed. , McGrow – Hill Book Co. , Inc. New York. 656 p.

Gabriel, D.W., Kingsley, M.T., Hunter, J.E. and Gottwald, T.R. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 14-22.

Goto, M, T. Takahashi ,and M.A. Massina. 1980. Comparative study to the strains of *Xanthomonas campestris pv. citri* isolated from citrus canker in Japan and cancresis B in Argentina. Phytopath. Soc Japan 46 ; 329 – 338.

Gottwald, T.R. and J.H. Graham 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01. Available Source : http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm, April 20, 2003.

Schaad, N. W., E. Postnikova, G.H. Lacy, A. Sechler, I. Agarkova, P.E. Stromberg, V.K. Stromberg, A.K. Vidaver. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.. Syst. Appl. Microbiol. 28: 494-518.

Schaad, N.W., E. Postnikova, G. Lacy, A. Sechler, I. Agakova, P.E. Stromberg, V.K. Stromberg and A.K. Vidaver. 2006. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. Syst. Appl. Microbiol. 29: 690-695.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and J. Swing. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:472-489

Young, J.M., G.S. Saddler, Y. Takikawa, S.H. Deboer, L. Vauterin, L. Gardan, R.I. Gvozdyak and D.E. Stead. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995, Rev. Plant. Pathol. 75: 721-763.

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 5

ลักษณะและความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

เชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์มีความหลากหลายและมีความผันแปรทำให้เกิดชนิดของเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งไม่สามารถแยกจากลักษณะอาการของโรคได้เนื่องจากลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์บนพืชอาศัยที่เกิดจากเชื้อทุกชนิดมีลักษณะอาการที่เหมือนกัน แต่สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละชนิดได้โดย พืชอาศัย ลักษณะทางสรีระวิทยา ความไวต่อ bacteriophage คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา DNA-DNA homology การวิเคราะห์genomic DNA ด้วย PCR ซึ่งวิธีหลังๆเป็นวิธีการทาง DNA-based assays จะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมและการเกิดโรคบนพืชอาศัยที่เฉพาะชนิดเท่านั้น (Gottwald and Graham, 2000)

การจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามพืชอาศัยและภูมิศาสตร์

จากการศึกษาทางด้านการแพร่ระบาดในภูมิศาสตร์ต่างๆ (Geographic distribution) และพืชอาศัย (Host range) ทำให้แบ่งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ออกได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ :

1. CBCD-A (Citrus bacterial canker disease-A) เป็น Asiatic canker หรือ Canker A หรือ common form เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุด (Schubert *et al.*, 2001) พบระบาดเรื้อรังในเอเชีย แอฟริกา หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิค (Oceania) และในอเมริกาใต้ เชื้อสาเหตุของโรคในกลุ่มนี้จะเป็นพวกที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด Verniere *et al.* (1998) ได้รายงานการศึกษาลักษณะทาง phenotype ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในแถบประเทศทางเอเชียตะวันตกเฉียงใต้หรือตะวันออกกลาง ได้แก่ โอมาน ซาอุดิอาระเบีย อิหร่าน และอินเดีย พบว่าเชื้อที่พบสามารถทำให้เกิดโรคกับมะนาวเท่านั้นและพบว่าลักษณะทาง phenotype และ genotype คล้ายคลึงกับ canker A แต่ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาแตกต่างกันจึงแยกออกมาจากกลุ่ม canker A เป็นสายพันธุ์ canker A* ต่อมา Sun *et al.* (2000) ได้รายงานการพบสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มลรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้เกิดโรคได้เฉพาะในมะนาวแมกซิกันและ alemow (*Citrus macrophylla*) เท่านั้น เรียกว่าสายพันธุ์ cankerA^{w}

2. CBCD-B (Concrosis B, canker B หรือ false canker) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบก่อโรคกับมะนาวหวาน (lemon) ในประเทศอาร์เจนตินา ในปี 1923 (Schubert *et al.*, 2001) ต่อมามีการแพร่ระบาดมายังประเทศใกล้เคียงได้แก่ ประเทศอุรุกวัยและปรากวัย เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเข้าทำลาย มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเปรี้ยว และส้มโอ ได้ แต่ไม่สามารถเข้าทำลายเกรฟฟรุ๊ตได้ (Schubert *et al.*, 2001) ปัจจุบันได้มีการเสนอให้แยกเชื้อสาเหตุ canker B ออกมาเป็นตั้งชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*

3. CBCD-C (Mexican lime concrosis) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบก่อโรคเฉพาะมะนาว [lime : C. *aurantifolia* (christm)] Swigh "Mexican" ในประเทศบราซิลในปี 1963 (Schoulties *et al.*, 1987) และพบเฉพาะในประเทศบราซิลเท่านั้น ปัจจุบันได้มีการเสนอให้แยกเชื้อสาเหตุออกมาเป็นชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* เช่นเดียวกับ canker B

4. CBCD-D (Mexican bacteriasis) โดยในปี 1987 ได้พบโรคของ Mexican lime ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุแคงเกอร์ แต่พบในเมืองโกลิมา ประเทศเม็กซิโก พบว่ามักเกิดเป็นแผลลักษณะแคงเกอร์บนใบและกิ่ง ไม่พบบนผล (Schoulties *et al.*, 1987) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่พบในพื้นที่มานานแล้วและปัจจุบันสันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อรา *Alternaria limicola* (Schubert *et al.*, 2001)

5. CBCD-E (Citrus bacterial spot) โดยในปี 1984 ได้เกิดการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ในฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาพบว่าลักษณะอาการของโรคไม่เหมือนโรคแคงเกอร์โดยทั่วๆ ไป พบในต้นกล้าส้ม (nursery form of citrus canker) จากการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาและ phage พบว่าเชื้อแบคทีเรียตัวนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว แต่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *X. campestris* pv. *alfalfae* จัดเป็นกลุ่มใหม่ (Schoulties *et al.*, 1987) ปัจจุบันได้แยกออกมาตั้งชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Gabriel *et al.*, 1989; Graham and Gottwald , 1991; Stall and Civerolo, 1991)

ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ได้ถูกจัดจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Asiatic group ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Canker A และ South American group ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ Canker B และ C (Gabriel, 2001) โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันทางลักษณะพันธุกรรม พืชอาศัย และ แหล่งการแพร่ระบาด (ตารางที่ 1) (Brunings and Gabriel ,2003)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ

Canker group	*C. sinensis* (Sweet orange)	*C.paradisi* (Grapefruit)	*C. limon* (Lemon)	*C. aurantifolia* (Mexican lime)
***X. axonopodis* pv. *citri* (canker A)**	++++	+++	+++	++++
***X. axonopodis* pv. *citri* (canker A*)**	-	-	-	++++
***X. axonopodis* pv. *citri* (canker A^w)**	-	HR	-	++++
***X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (canker B)**	+	+	+++	++++
***X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (canker C)**	HR	HR	HR	++++

\+ หมายถึง การเกิดโรคบนพืชอาศัยเล็กน้อย (weak canker)

++++ หมายถึง การเกิดโรครุนแรงบนพืชอาศัย (strong canker)

\- หมายถึง ไม่มีอาการโรคแคงเกอร์

HR หมายถึง Hypersensitive response

ที่มา : ดัดแปลงจาก Brunings and Gabriel (2003)

ณัฏฐิมา และ วงศ์ (2546) ได้ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของประเทศไทย จำนวน 152 ไอโซเลท โดยการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ มะนาว มะกรูด

ส้มโอ และส้มเขียวหวาน พบว่าสามารถแบ่งความรุนแรงของเชื้อ (pathogenic strains) เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน มี 111 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด และส้มโอ แต่ไม่เป็นโรคกับส้มเขียวหวาน 22 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว มะกรูด แต่ไม่เป็นโรคกับส้มโอ ส้มเขียวหวาน 6 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน แต่ไม่เป็นโรคกับมะกรูด 13 ไอโซเลท

กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มที่เกิดโรคกับส้มทั้ง 4 ชนิด ที่ทดสอบมีจำนวนถึง 111 ไอโซเลท คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 73.33% ซึ่งเป็นกลุ่มที่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทยและสามารถเกิดขึ้นกับพืชตระกูลส้มทุกชนิดหลาย ๆ แหล่งในประเทศไทย

ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ตามแหล่งปลูกในประเทศไทย ทั้ง 113 สายพันธุ์ บนพืชทดสอบพืช 5 ชนิด คือ มะนาว ส้มโอ ส้มเขียวหวาน เลมอน และเกรฟฟรุต พบว่าเชื้อทั้ง 113 ไอโซเลทสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด มีความรุนแรงของโรคมากทั้งหมด โดยสามารถทำให้พืชทดสอบเกิดโรคได้ภายใน 5 วัน (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) แล้ว เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม canker A

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยตระกูลส้ม 5 ชนิด ด้วยเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ กับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย

เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์	มะนาว	ส้มเขียวหวาน	เลมอน	เกรฟฟรุ๊ต	ส้มโอพันธุ์ทองดี	ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา	ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่	ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	ส้มโอพันธุ์... ข่อย
X. axonopodis pv. *citri* (canker A)	++++	+++	+++	++++	ND	ND	ND	ND	ND
X. axonopodis pv. *citri* (canker A*)	++++	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
X. axonopodis pv. *aurantifolii* (canker B)	++++	+	+++	++++	ND	ND	ND	ND	ND
X. axonopodis pv. *aurantifolii* (canker C)	++++	HR	HR	HR	ND	ND	ND	ND	ND
เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทย	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++

\+ หมายถึง การเกิดโรคบนพืชอาศัยเล็กน้อย (weak canker)

++++ หมายถึง การเกิดโรครุนแรงบนพืชอาศัย (strong canker)

\- หมายถึง ไม่มีอาการโรคแคงเกอร์

HR หมายถึง Hypersensitive response

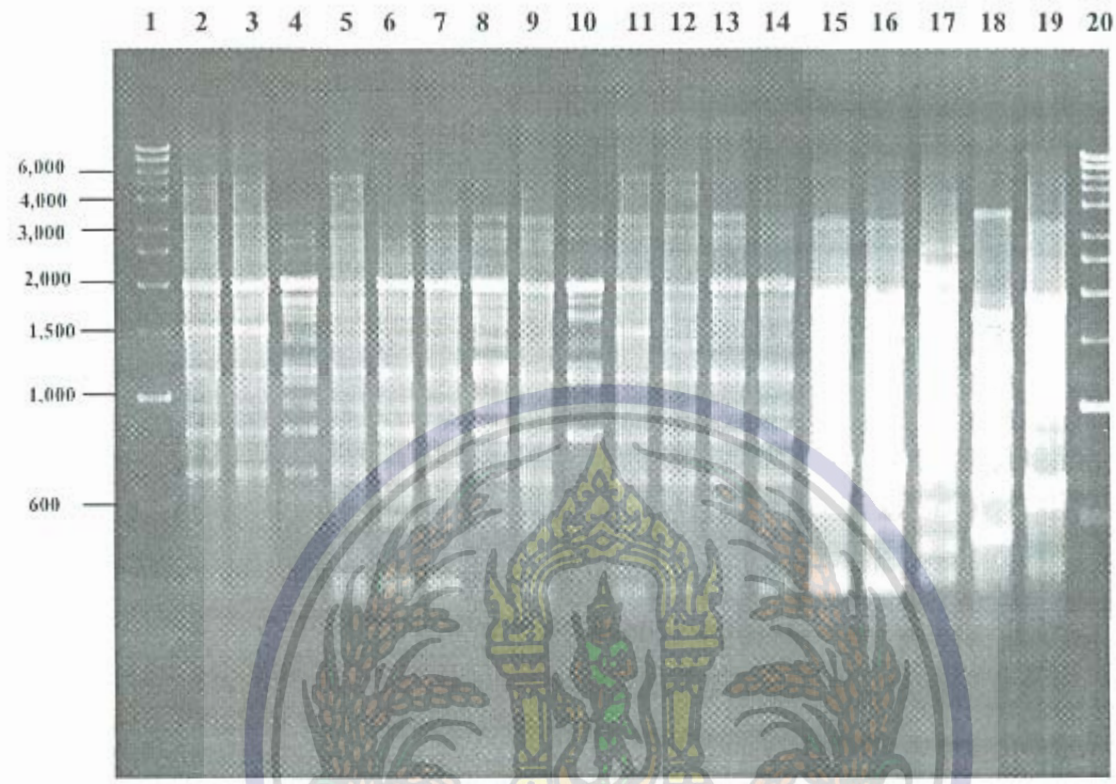
ND หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ตามพันธุกรรม (Genotype)

Cubero and Graham (2002) ได้นำเทคนิค Repetitive DNA PCR-based method (rep-PCR) มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์และศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในฟลอริดา กับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากแหล่งปลูกส้มทั่วโลก พบว่าเทคนิค rep-PCR แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามการเกิดโรคของพืชอาศัย ได้แก่ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* และภายในกลุ่มยังมีความแตกต่างที่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มย่อย (subgroup) ได้ โดยพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากเมืองมานาตี เคานตี ฟลอริดา มีความเหมือนกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มาจากประเทศจีน และมาเลเซีย และ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากไมอามี ตรงกันกับ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มาจากแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอเมริกาใต้

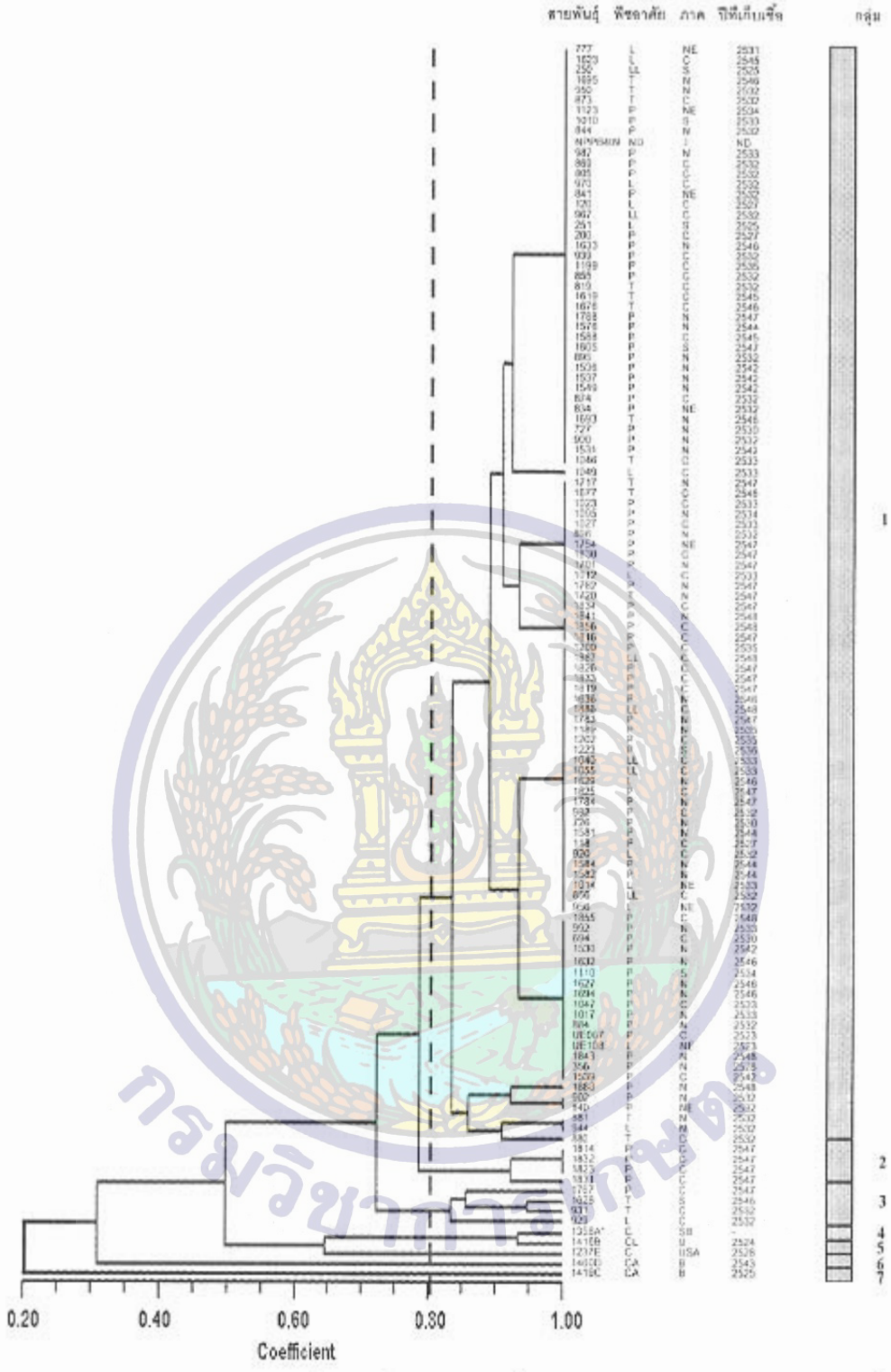
ณัฏฐิมา (2550) ได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากประเทศไทย จำนวน 152 ไอโซเลท ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี rep- PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX (ภาพที่ 17และ 18) และ ERIC (ภาพที่ 19 และ 20) โดยทำการจัดกลุ่มเชื้อที่ค่า similarity 0.73 สามารถแยกกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ได้ 5 กลุ่มตามการจัดกลุ่มตามการเกิดโรคบนพืชอาศัยและแหล่งการระบาดตามภูมิประเทศ สอดคล้องกับงานทดลองของ Cubero and Graham (2002) ที่ได้นำเทคนิค rep- PCR มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์และศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในฟลอริดากับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากแหล่งปลูกส้มทั่วโลก พบว่าเทคนิค rep-PCR สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนเป็น 2 กลุ่ม ตามการเกิดโรคของพืชอาศัยและแหล่งการระบาดตามภูมิประเทศ ได้แก่ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B ซึ่งจากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ cankerA NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น และเมื่อทำการจัดกลุ่มเชื้อที่ค่า similarity 0.8 พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่มโดยกลุ่มเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A จากประเทศไทย แยกเป็นกลุ่มย่อยออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ของประเทศไทย 76 -90 เปอร์เซ็นต์จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มเดียวกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A

NCPPB409 จากประเทศญี่ปุ่น มีเพียง 3.5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์อยู่ในกลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 จะเห็นได้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยมีความผันแปรไม่มาก โดยส่วนใหญ่มีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ประชากรเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทย เป็นเชื้อที่แพร่ระบาดอยู่ภายในประเทศ การขยายพันธุ์และการขยายพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้มในประเทศไทย จะใช้กิ่งพันธุ์ในการขยายพันธุ์ ทำให้มีการแพร่กระจายของโรคแคงเกอร์ จากต้นแม่พันธุ์จากแหล่งเดิมไปยังแหล่งใหม่ด้วยกิ่งพันธุ์นั้นเอง ทำให้พบความผันแปรของเชื้อไม่สูงมาก โดยพบว่าลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เก็บจากแหล่งปลูกดั้งเดิมและแหล่งปลูกใหม่ไม่มีความแตกต่างกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ได้จากปฏิกริยา rep- PCR ของเชื้อที่แยกได้เมื่อ 20 ปีที่แล้ว (ตั้งแต่ปี 2528-2548) กับเชื้อที่แยกได้ในปัจจุบันไม่มีความแตกต่างกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกจากส้มโอ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากส้มโอที่ปลูกใน จ.กาญจนบุรี ซึ่งพบในช่วงปี 2547 มีลักษณะลายพันธุ์ดีเอ็นเอแตกต่างจากกลุ่มอื่น อาจเนื่องมาจากสภาพภูมิประเทศของจังหวัดกาญจนบุรีที่ประกอบไปด้วยทิวเขา หุบเขา และที่ราบลุ่ม บางที่แห่งมีลักษณะเป็นป่าไม้ และภูเขา บางที่เป็นที่ราบแห้งแล้ง บางแห่งเป็นที่ราบอุดมสมบูรณ์ และเป็นจังหวัดชายแดนติดกับประเทศเมียร์ม่า นอกจากนี้ลักษณะสภาพภูมิอากาศของจังหวัดกาญจนบุรีมีความแตกต่างกันออกไป เนื่องจากเป็นจังหวัดที่ใหญ่มีพื้นที่กว้างขวางมาก บริเวณที่ราบจะมีสภาพภูมิอากาศคล้ายคลึงกับจังหวัด ใน ภาคกลาง ส่วนบริเวณที่เป็นป่าและภูเขาจะแตกต่างไปคือ ในฤดูร้อนจะร้อนจัด ในฤดูหนาวจะหนาวจัด และปริมาณน้ำฝนของจังหวัดกาญจนบุรีเฉลี่ยทั้งปีอยู่ในเกณฑ์น้อย เนื่องจากมีภูเขาปิดกั้นกระแสลมจากมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ทำให้บางบริเวณของจังหวัดกาญจนบุรีเกิดสภาพอับฝนโดยมีฝนตกน้อย ทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ปรับสภาพให้อยู่รอดในสภาพอับฝน นอกจากนี้จังหวัดกาญจนบุรีมีชายแดนติดกับประเทศเมียร์มาร์อาจมีการเข้ามาของกิ่งพันธุ์จากประเทศเมียนม่าร์ ทำให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างออกไป

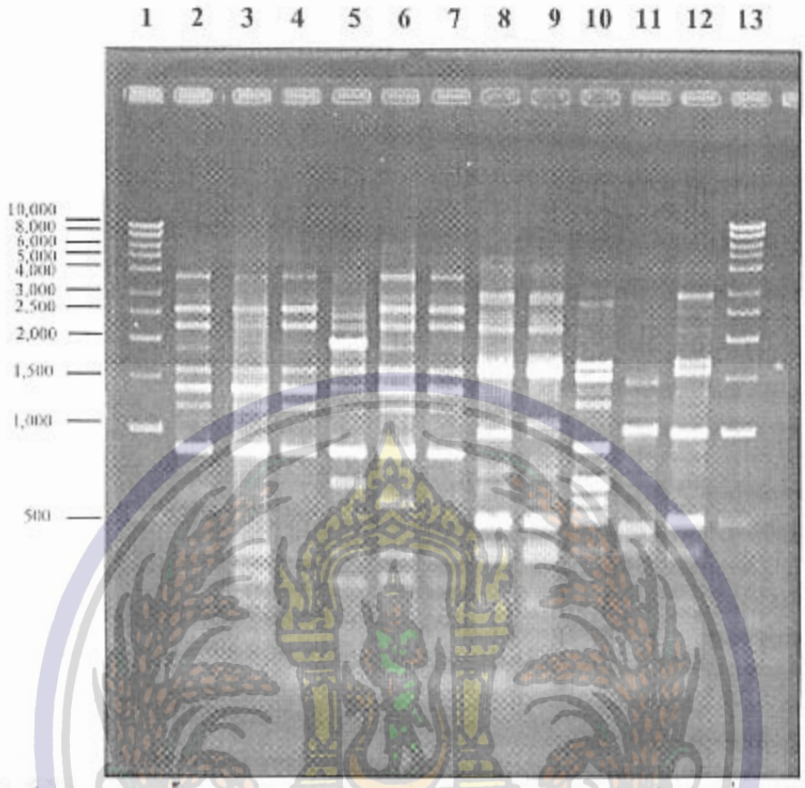


ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้จากปฏิกริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOX

Lane ที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb) , Lane ที่ 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1782, Lane ที่ 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1834, Lane ที่ 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1628, Lane ที่ 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1862, Lane ที่ 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 120, Lane ที่ 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 200, Lane ที่ 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 913, Lane ที่ 9 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 967, Lane ที่ 10 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 929, Lane ที่ 11 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1720, Lane ที่ 12 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1629, Lane ที่ 13 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1886, Lane ที่ 14 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ NCPPB409 canker A, Lane ที่ 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1396 canker A*, Lane ที่ 16 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 cankerB, Lane ที่ 17 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1419 canker C, Lane ที่ 18 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1360 cankerD, Lane ที่ 19 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 cankerE ,Lane ที่ 20 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)



ภาพที่ 18 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ BOX แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (C *Citrus* sp.; CA *C. aurantrifolii*; CL lemon; L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; B บราซิล; J ญี่ปุ่น; SB ซาอุดิอาระเบีย; U อุรุกวัย; USA สหรัฐอเมริกา; ND no detailed)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC

Lane ที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)

Lane ที่ 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1095

Lane ที่ 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1855

Lane ที่ 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 819

Lane ที่ 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1049

Lane ที่ 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 856

Lane ที่ 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ NCPPB409 canker A

Lane ที่ 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1396 canker A*

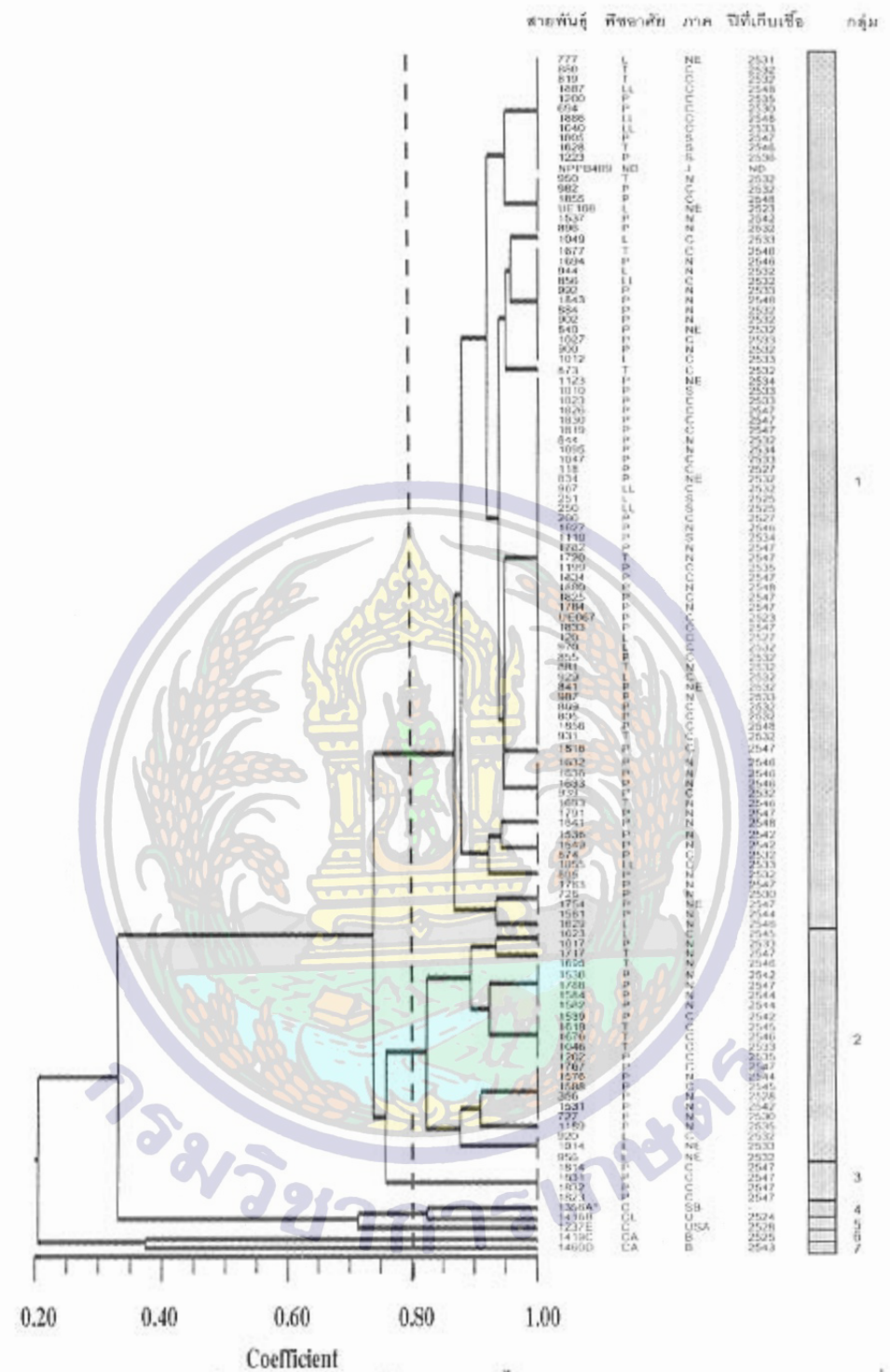
Lane ที่ 9 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 cankerB

Lane ที่ 10 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1419 cankerC

Lane ที่ 11 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1360 cankerD

Lane ที่ 12 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 cankerE

Lane ที่ 13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb)



ภาพที่ 20 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ERIC แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA (C *Citrus* sp.; CA *C. aurantrifolii*; CL lemon; L มะนาว; LL มะกรูด; P ส้มโอ; T ส้มเขียวหวาน; N ภาคเหนือ; C ภาคกลาง; S ภาคใต้; NE ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; B บราซิล; J ญี่ปุ่น; SB ซาอุดิอาราเบีย; U อุรุกวัย; USA สหรัฐอเมริกา; ND no detailed)

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และวงศ์ บุญสืบสกุล 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2546 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 932-948.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล 2550. ชีววิทยาและการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 136 หน้า.

Brunings, A.M. and D.W. Gabriel. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol. Plant Pathol. 4, 141–157.

Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1257-1264.

Gabriel, D.W. 2001. Citrus canker. *In* O.C. Maloy and T.D. Murray (eds). Encyclopedia of Plant Pathology, pp. 215–217. New York: John Wiley & Sons.

Gabriel, D.W., M.T. Kingsley, J.E. Hunter and T.R. Gottwald. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 14-22.

Gottwald, T.R. and J.H. Graham 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01. Available Source : http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm, April 20, 2003.

Graham, J. H. and T.R. Gottwald. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. Plant Dis. 75:1193-1200.

Schoulties, C.L., E.L. Civerolo, J.W. Miller, R.E. Stall, C.J. Krass, S.R. Poc, and E.P. Ducharme. 1987. Citrus canker in Florida. Plant Dis. 71: 388-395.

Schubert, T.S., S.A. Rizvi, X. Sun, T.R. Gottwald, J.H. Graham, and W.N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. Plant Dis. 85: 340-356.

Stall, R.E. and E.L. Civerolo. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 399-420.

Sun, X., R.E. Stall, L. Cubero, T.R. Gottwald, J.H. Graham, W.H. Dixon, T.S. Schuber, M.E. Peacock, E.R. Dickstein, and P.H. Chaloux. 2000. Detection of a unique is citrus canker bacterium from Key lime Wellington and Lake Worth, Florida, p. 15. In Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop. Ft. Pierce, Florida, Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Available Source: http://www.doacs.state.fl.us/~pi/abstracts.pdf, March 25, 2002.

Vernière, C., J.S. Hartung, O.P. Pruvost, E.L. Civerolo, A.M. Alvarez, P. Maestri, and J. Luisetti. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. Eur. J. Plant Pathol. 104: 477-487.

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 6

ยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Swarup *et al.* (1991) รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบยีนและโคลนยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ (Pathogenicity gene, *pth*) จากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยพบว่ายีน *pthA* เป็นยีนที่ก่อให้เกิดอาการอุตมยมกบนใบแคงเกอร์น้ำมาก ของโรคแคงเกอร์อย่างเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลส้ม ทีม *pth* ดูบนพลาสมิดดั้งเดิมของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้มีการทดลองยืนยันการเป็นยีนก่อโรคแคงเกอร์อย่าง เฉพาะเจาะจงโดย Swarup *et al.* (1991) โดยแยกยีน *pthA* และใส่เข้าไปในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ แล้วนำไปปลูกเชื้อบนพืชตระกูลส้ม พบว่าสามารถทำให้พืชตระกูลส้มแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ได้ และมีบางเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* ที่ได้รับยีน *pthA* เหล่านั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย เช่น ฝ้าย และ พืชตระกูลถั่ว พบว่าไม่สามารถทำให้พืชอาศัยนอกนั้นแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ แต่เกิดอาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response (HR)) ขึ้นแทน (Swarup *et al.*, 1992)

ยีน *pthA* เป็นยีนที่จำเป็นในการทำให้เกิดอาการของโรคแคงเกอร์ โดยพบในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A Swarup *et al.* (1992) ได้รายงานว่า พบยีน *pthA* หลายสำเนาในพลาสมิดดั้งเดิมของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายสุโรแคงเกอร์ (ภาคผนวกที่ 2) และไม่พบยีนนี้ในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* อื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม (Cubero and Graham, 2002, Swarup *et al.*, 1992)

ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ได้จากการศึกษายีน *pthA* พบว่าน้อยกว่า 3 คัดลอก มีลำดับเบสที่คล้ายกันมากกับยีน *pthA* โดย 2 คัดลอกที่เป็นยีนที่ก่อโรคในพืชตระกูลส้ม ส่วนอีก 1 คัดลอกไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Kamoun and Kado, 1998, Swarup *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีนที่ก่อโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B และสายพันธุ์ canker C คือยีน *pthB* และ *pthC* ซึ่งยีนเหล่านี้มีลำดับเบสและกรดอะมิโนคล้ายกันยีน *pthA* เมื่อเทียบกับยีน *pthB* และ *pthC* ดังกล่าวแล้ว ถ้าย้ายเข้าสู่เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A พบว่า สามารถเกิดโรคกับพืชตระกูลส้มได้ทุกชนิดในขณะที่ยีน *pthA* และ *pthC* อยู่ในเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จะก่อโรคกับพืชตระกูลส้มบางชนิดเท่านั้น

คือมะนาวเท่านั้น แต่เมื่อย้ายมาอยู่ในเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สายพันธุ์ cankerA สามารถเกิดโรคกับพืชตระกูลส้มได้หลายชนิดขึ้น แสดงว่ายีนก่อโรคเหล่านั้นไม่เกี่ยวข้องกับพืชอาศัย (Brunings and Gabriel, 2003)

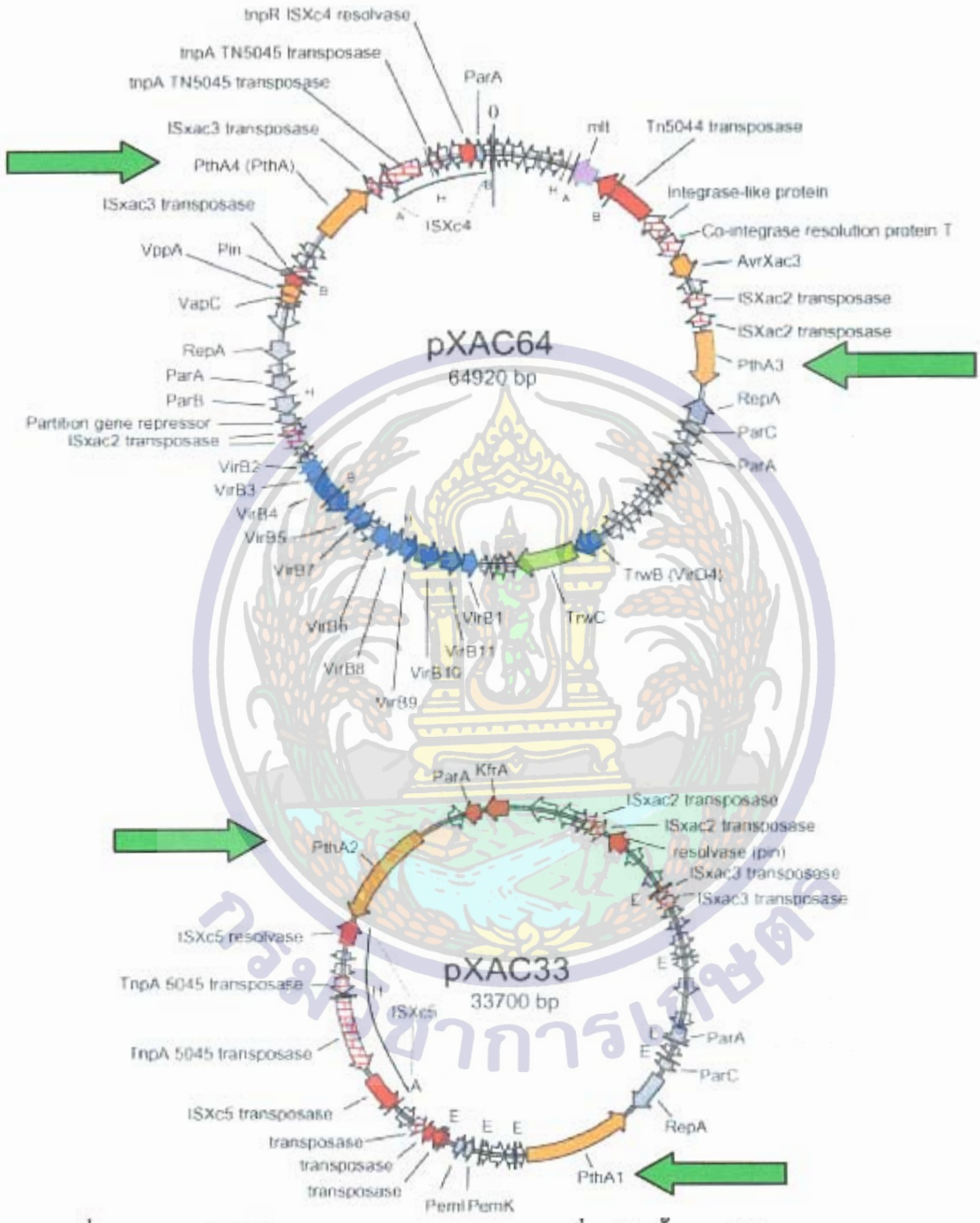
Duan *et al.*(1999) ได้ทดลองแยกยีน *pthA* ออกมา แล้วถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์ในพืชตระกูลส้ม โดยใช้วิธี bombardment และวิธี Agrobacterium inoculation พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ของพืชตระกูลส้มแสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ภายใน 10-14 วัน และเมื่อย้ายยีน *pthA* เข้าสู่เซลล์พืชอื่น ๆ เช่น ยาสูบ พืชตระกูลถั่ว และฝ้าย พบว่าเกิดอาการตอบสนองฉับพลันหรือพืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitive response (HR) แทน

ยีน *pthA* เป็นยีนในกลุ่มยีน *Avirulence/Pathogenicity* (*avr/pthA*) ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* ซึ่งยีนในกลุ่มนี้จะพบกระจายเฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ปัจจุบันมีการค้นพบยีนในกลุ่มนี้ถึง 27 ยีน (Gabriel, 1999; Leach and While, 1996) ยีน *pthA* เป็นยีนแรกของกลุ่มยีน *avr/pthA* ที่พบว่าเป็นยีนที่จำเป็นในการเกิดโรคบนพืชอาศัย (Gabriel, 1999) ยีนอื่นๆ ของกลุ่มยีนนี้ ได้แก่ยีน *avr Bs3, avr Bs3-2* จากเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*, ยีน *avrb6, avrb7, avr B101, avrB106* จาก *X. axonopodis* pv. *malvacearum* และ *avrXa* จากเชื้อ *X. oryzae* และ *pthA, pthB, pthC* จาก *X. axonopodis* pv. *citri* ยีน *avr/pth* นี้ สมาชิกส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็นยีน *avirulence* (*avr*) อย่างเดียวไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ยกเว้นในยีน *pthA, pthB, pthC* ใน *X. axonopodis* pv. *citri* และ ยีน *pth N pth N2* และ *avrb6* ใน *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคในพืชอาศัย (host-specific pathogencity function) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นยีน *avr* ตามทฤษฎียีนต่อยีน (gene for gene hypothesis) ทำให้เกิดความจำเพาะในการเกิดโรค (race-specific) และยังเกี่ยวข้องกับการรับรู้ของเชื้อโรคในพืชอื่นที่ไม่ใช่พืชอาศัย (non host plant species) (Gabriel, 1999)

โครงสร้างของกลุ่มยีน *avr/pth* นี้มีลักษณะลำดับสำคัญคือ จะมีลำดับเบส 102 คู่เบส จำนวน 14 ถึง 23 ชุด เรียงต่อๆ กัน บริเวณส่วนกลางของยีนนี้ (Yang *et al.*, 1994) สมาชิกของกลุ่มยีนนี้จะเป็นยีนที่เป็นยีนอนุรักษ์สูง (high conserved) และมี encode protein ของกรดอะมิโนเหมือนกัน 90-97% ความผันแปรของแต่ละยีนที่จะไม่เหมือนกัน อยู่ที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ encode ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 12-13 ของแต่ละยีน โครงสร้างของยีนภายในกลุ่มยีนนี้ พบว่าตรง control domain จะประกอบด้วยชุดของลำดับเบสจำนวน 102 คู่เบสที่ซ้ำๆ แต่ละยีนจะ

มีจำนวนชุดของลำดับเบส 102 คู่เบสที่ซ้ำกันแตกต่างกัน (Yang *et al.*, 1994) ตั้งแต่15.5 ซ้ำ ของยีน *avr Bp* ของ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* จนถึง 27.5 ซ้ำของ *avr Xa7* จาก *X. oryzae* และจากการศึกษาลำดับเบสของยีน *pthA* เปรียบเทียบกับยีน *avrb6* และยีน *avrBs3* พบว่าเหมือนกัน 97% (Gabriel, 1999)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่. 21 พลาสมิดดีเอ็นเอ pXAC64 และ pXAC33 ที่พบในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 306 ที่มียีนก่อโรคแคงเกอร์ (*pthA, PthA1 , PthA2, PthA3*) อยู่ในทั้งสองพลาสมิด (da Silva *et al*., 2002).

เอกสารอ้างอิง

Brunings, A.M. and D.W. Gabriel. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol. Plant Pathol. 4, 141–157.

Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1257-1264.

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.

Gabriel, D.W. 1999. The *Xanthomonas avr/pth* gene family, pp. 39-55. In G. Stacey and N.T. keen, eds. Molecular. Plant Microbe Interaction. St. Paul, Minnesota, APS Press.

Kanamori, H. and S. Tsuyumu. 1998. Comparison of Nucleotide Sequences of Canker-forming and Non-canker-forming pthA Homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Annu. Phytopathol. Soc. Jpn. 64, 462–470.

Leach, C.E. and White, F.F. 1996. Bacterial avirulence genes. Annu. Rev. Phytopathol. 34: 153-179.

da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amara, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature, 417, 459–463.

Swarup, S., R. De Feyter, R.H. Brlansky, and D.W. Gabriel. 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.

Swarup, S., Y. Yang, M.T. Kingsley, and D.W. Gabriel. 1992. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol. Plant Microbe Interact. 5: 204-213.

Yang, Y., De Feyter, and D.W. Gabriel. 1994. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacarum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. Mol. Plant Microbe Interact. 7: 345-355.

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 7

วิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชต้องการวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว เฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ ซึ่งแต่เดิมวิธีการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยทั่วไป ใช้วิธีการแยกเชื้อจากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการโรค เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป แล้วนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งต้องใช้เวลาดำเนินการมากกว่า 7 วัน และต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

ความรู้ทางด้านเซรุ่มวิทยาได้มีการนำมาใช้ในงานตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยใช้วิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แต่การตรวจสอบโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยามีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อย มีความไวในการตรวจสอบเชื้อค่อนข้างต่ำ ต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเฉพาะ (enrichment- ELISA method) จึงจะตรวจสอบได้ แต่ต้องใช้เวลาถึง 3 วันในการตรวจสอบ และเกิดปฏิกิริยาข้ามทางเซรุ่มวิทยากับเชื้ออื่นๆ ทำให้ผลการตรวจสอบผิดพลาด (Llop *et al*., 2000)

Civerolo and Fan (1982) ได้พัฒนาเทคนิค ELISA ตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตมาจากเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* นำไปใช้ตรวจสอบด้วยวิธี double antibody sandwich ELISA พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในระดับ 10^3-10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มพบว่าแอนติซีรั่ม เกิดปฏิกิริยากับ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A ไม่เกิดปฏิกิริยากับ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B จากประเทศอาร์เจตินา และ บราซิล แต่พบว่าแอนติซีรั่มเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ได้

Alvarez *et al.* (1991) ได้ผลิต monoclonal antibodies (MAb) สำหรับตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* โดยได้ผลิต MAbA1 ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และไม่เกิดปฏิกิริยากับสายพันธุ์อื่นๆ แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* ได้

ณัฏฐิมา และคณะ (2539) ได้ผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยวิธี glutaradehyde fixed cell พบว่าสามารถผลิตแอนติซีรัมที่มีค่า titer 1 : 5,000 มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia carotovora* และ *Bacillus spp.* ทั้งหมด 16 สายพันธุ์

เทคนิค Polymerase chain reaction

ต่อมาได้มีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยามาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

Hartung *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 572 คู่เบส จากพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *citri* XC62 ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ EcoRI แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC9 จากนั้นนำไปหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ขนาด 18 คู่เบส จำนวน 7 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค PCR กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ พบว่ามี 4 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* และไม่เพิ่มปริมาณในเชื้ออื่น ๆ และพบว่ามีไพรเมอร์ 2/3 สามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* pathotype A (canker A)

Cubero and Graham (2002) ได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดหนึ่งออกแบบมาจากส่วน internally transcribed spacer (ITS) และอีกชุดออกแบบจากยีน *pthA* ที่อยู่บนพลาสมิด เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแคงเกอร์บน

พืชอาศัยพบว่า ไพรเมอร์ทั้งสองชุดถูกนำไปตรวจวินิจฉัยกับเชื้อ *Xanthomonas* ที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม พบว่า ไพรเมอรที่ออกแบบมาจาก ITS มีความเฉพาะเจาะจงกับ canker A ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มาจากยีน *pthA* ที่อยู่บนพลาสมิดสามารถตรวจวินิจฉัยได้กว้างขวางกว่าโดยสามารถตรวจ canker B บางสายพันธุ์ได้

Lertsuchatavanich (2005) ได้ออกแบบไพรเมอร์ 354 R/F เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี PCR จากชิ้นส่วนโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเป็นส่วนของ conserved hypothetical protein พบว่า ไพรเมอร์ 354 R/F มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และ A* โดยทำปฏิกิริยากับทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มหลายชนิดในประเทศไทย สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น สายพันธุ์จากประเทศซาอุดิอาราเบีย ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ ซึ่งไพรเมอร์ 354R/F นี้แสดงให้เห็นว่ามีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

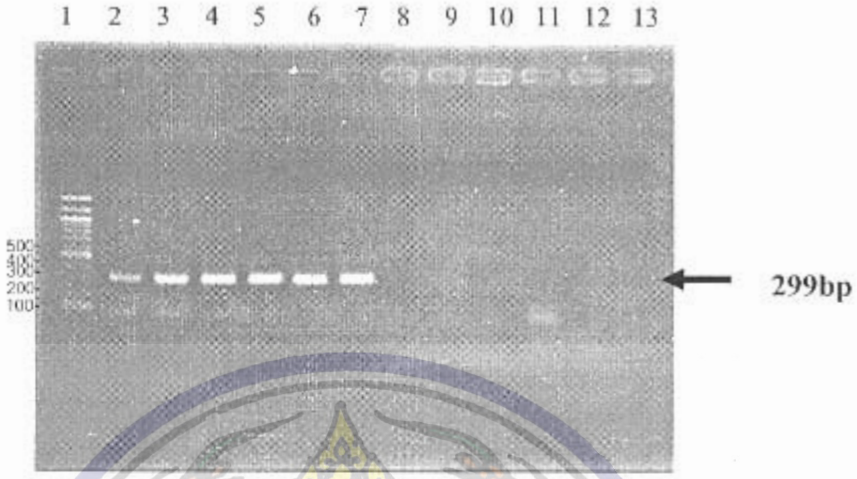
ณัฏฐิมา และ คณะ (2548) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์จากยีน *pthA* เนื่องจากยีน *pthA* พบเฉพาะในเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในการชักนำให้เกิดโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม โดยทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น ลำดับเบสของยีน *pthA* ถูกอนุรักษ์ไว้ให้เหมือนกันและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อๆ ไป การเลือกออกแบบไพรเมอร์จากยีน *pthA* จะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์กับพืชตระกูลส้ม primer D1 (GGCCTTGA TCAAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ถูกออกแบบมาจาก *pthA* gene ของ complete genome ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ Gene Bank accession No. V28802 ใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xTaq buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1% Triton X-100), 3mM $MgCl_2$, 0.5 µM ไพรเมอร์ D1 และไพรเมอร์ D2, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) และ 1U Taq polymerose (Promega) ปฏิกิริยา PCR เริ่มด้วยการแยกสาย ดีเอ็นเอ ต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ (DNA amplification reaction condition) ประกอบด้วย 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

30 วินาที , 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำ 40 รอบ สุดท้ายทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR นำมาวิเคราะห์โดยใช้ 1.5 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TAE buffer (0.4 M Tris-base, 0.2 M Glacial Acetic Acid, 0.01 M EDTA) ความต่างศักดิ์คงที่ ที่ 100 โวลล์ เป็นนาน 15 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ 1 แถบ ขนาด 299 คู่เบส (ภาพที่ 22) การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ D1/D2 พบว่า ไพรเมอร์ D1/D2 สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A และ สายพันธุ์ที่แยกได้จากสายพันธุ์ประเทศไทยได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ canker B, C, D และ E ได้ โดยมีความไวในการตรวจหาที่ ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอเท่ากับ 25 พิโคกรัม/ ปฏิกิริยา และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์ แขวนลอย เท่ากับ 8.1×10^2 หน่วยโคโลนี/ปฏิกิริยา

เทคนิค Nested PCR

เทคนิค nested PCR เป็นการใช้คู่ไพรเมอร์ 2 ชุด ในการตรวจยืนเป้าหมายที่ต้องการ (single locus) โดยคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 จะออกแบบเหมือนกับการตรวจยืนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ซึ่งอาจเรียกว่า external primer และมีคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ซึ่งเรียกว่า nested primer หรือ internal primer ซึ่งจะออกแบบให้อยู่ส่วนในของระหว่าง external primer ซึ่งจะทำให้ผลผลิตการขยายยืนมีขนาดสั้นกว่าคู่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะทำให้การตรวจยืนเป้าหมายมีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งถ้าหากไพรเมอร์ชุดที่ 1 เกิดการขยายยืนเป้าหมายผิดไป ปฏิกิริยาดังกล่าวก็จะถูกแก้ไข ป้องกันการเกิดความผิดพลาดของ false positive ได้ McManus and Jones (1995) ได้นำหลักการของ nested PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Erwinia amylovora* พบว่าวิธีนี้ยังให้ผลดีในการลดปัญหาของสารยับยั้ง PCR (PCR inhibitors) ซึ่งทำให้เป็นปัญหาในการเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างพืช

Hartung *et al.*(1996) ได้ศึกษาการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axodopodis* pv. *citri* โดยใช้ specific primer ในการเพิ่มปริมาณในส่วนของ plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณต่ำที่ระดับ



ภาพที่ 22 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1/ D2 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลท์

Lane 1 100 bp DNA ladder

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1123

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 884

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 873

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 950

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 777

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ N1601 canker A

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1396 canker A*

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 cankerB

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1419 cankerC

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1360 cankerD

Lane 12 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 cankerE

Lane 13 น้ำ

10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แต่เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงพบว่าประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อลดลง 10 เท่า และ พบปัญหาการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของกลุ่มสารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ที่มีผลต่อการปฏิกิริยา nested PCR

เทคนิค Single closed tube nested PCR หรือ One tube nested PCR

จากการใช้วิธี Nested PCR ซึ่งต้องมีการดูดย้ายตัวอย่างทดสอบจากหลอดหนึ่งไปสู่อีกหลอดหนึ่งในการทำปฏิกิริยากับคู่ไพรเมอร์ที่ 2 ทำให้มีโอกาสเกิดปัญหาการปนเปื้อนในตัวอย่าง เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น จึงได้มีการพัฒนาการทำปฏิกิริยา nested PCR ในหลอดเดียวกัน (Single closed tube) (Llop *et al.*, 2000) ขึ้นมา โดยวิธีนี้จะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่เบสที่ออกแบบให้ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน ซึ่งทำได้ง่าย สะดวก ป้องกันการปนเปื้อนได้ ประหยัดเวลา และสารเคมีที่ใช้

การออกแบบไพรเมอร์ของ one tube nested PCR มีหลักในการเลือกไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่เบส ดังนี้

1. ไพรเมอร์คู่แรก (external primer) จะต้องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะสามารถออกแบบไพรเมอร์คู่ที่สอง (internal primer) ภายในชิ้นดีเอ็นเอได้ เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรกจะเป็นต้นแบบ (template) ให้กับไพรเมอร์คู่ที่สอง

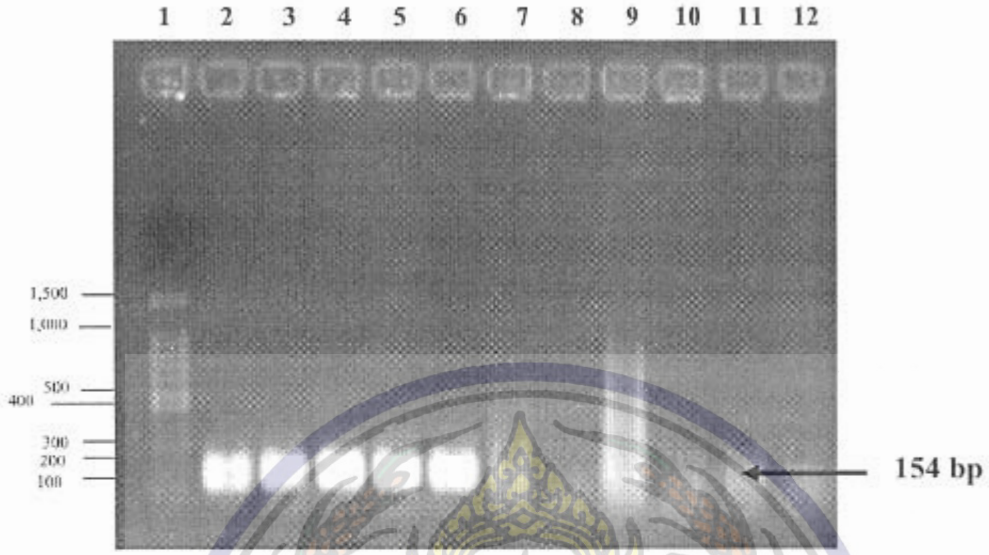
2. อุณหภูมิสำหรับจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperatures) ของไพรเมอร์ของคู่แรกและคู่สอง ต้องแตกต่างกันเพื่อให้ปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่แยกจากกัน

ณัฏฐิมา (2550) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ด้วยเทคนิค one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุดแรก Pth3F (GGTACCCGGCGGTCGCATGA)/ pth3R (GGTGAGGGGGCAGGGGGAGA) และไพรเมอร์ชุดที่สอง D3 (GGTGTGGTGCCTCGATAGAT) /D4 (CGAACAGACCATTGCCCTAT) ที่มี annealing temperature ที่แตกต่างกัน โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x*Taq* buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0,

0.1% Triton X-100), 3 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.01 µM ของไพรเมอร์ pth3F และ pth3R, 2 µM ไพรเมอร์ D3 และ D4, *Taq* DNA polymerase 3 units (Promega, USA) ปฏิกิริยา PCR เริ่มด้วยการแยกสาย DNA ต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA amplification reaction condition) ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาซ้ำ 25 รอบ เริ่มรอบที่สองของปฏิกิริยา PCR โดยแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณรอบสองประกอบที่อุณภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำ 40 รอบ สุดท้ายทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR นำมาวิเคราะห์โดยใช้ 1.5 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TAE buffer) ความต่างศักดิ์คงที่ ที่ 100 โวลล์ เป็นนาน 15 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ 1 แถบ ขนาด 154 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 23) ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสของยีน *pthA* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ ดีเอ็นเอเท่ากับ 0. 5 พิโคกรัม/ปฏิกิริยา และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยที่ตรวจได้คือ 9.4 หน่วยโคโลนี/ ปฏิกิริยา

วิธี Immunomagnetic seperation

จากปัญหาสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่ปลดปล่อยออกจากพืชส่งผลรบกวนปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยตรงจากตัวอย่างพืช (Hartung *et al.*,1996) จึงได้มีการนำวิธี immunomagnetic separation (IMS) หรือ immunocapture มาใช้ร่วมกับวิธี PCR หรือ nested PCR เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวและเพิ่มประสิทธิภาพและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืช (Hartung *et al.*, 1996; Walcott and Gitaitis, 2000; Poussier *et al.*, 2002) วิธี IMS เป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา โดยการใช้ immunomagnatic beads เคลือบด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช แล้วนำ bead ไปยึดจับกับเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช แยกออกจากเซลล์แบคทีเรียอื่นๆ และสารยับยั้งที่มาจากพืชได้ และตรวจเชื้อที่ถูกจับยึดด้วยวิธี PCR หรือ nested PCR เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบและสามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืช (Alvarez, 2004)



ภาพที่ 23 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยา one tube nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pth3R/ Pth3F และ D3/D4 กับดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis pv. citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มและเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด เมื่อแยกขนาดบน 1.5% agarose gel electrophoresis ความต่างศักดิ์ 100 โวลท์

Lane 1 100 bp DNA ladder

Lane 2 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1123

Lane 3 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 884

Lane 4 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 950

Lane 5 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 777

Lane 6 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ N1601 canker A

Lane 7 *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ 1396 canker A*

Lane 8 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1416 canker B

Lane 9 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1419 canker C

Lane 10 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* สายพันธุ์ 1360 canker D

Lane 11 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* สายพันธุ์ 1267 canker E

Lane 12 น้ำ

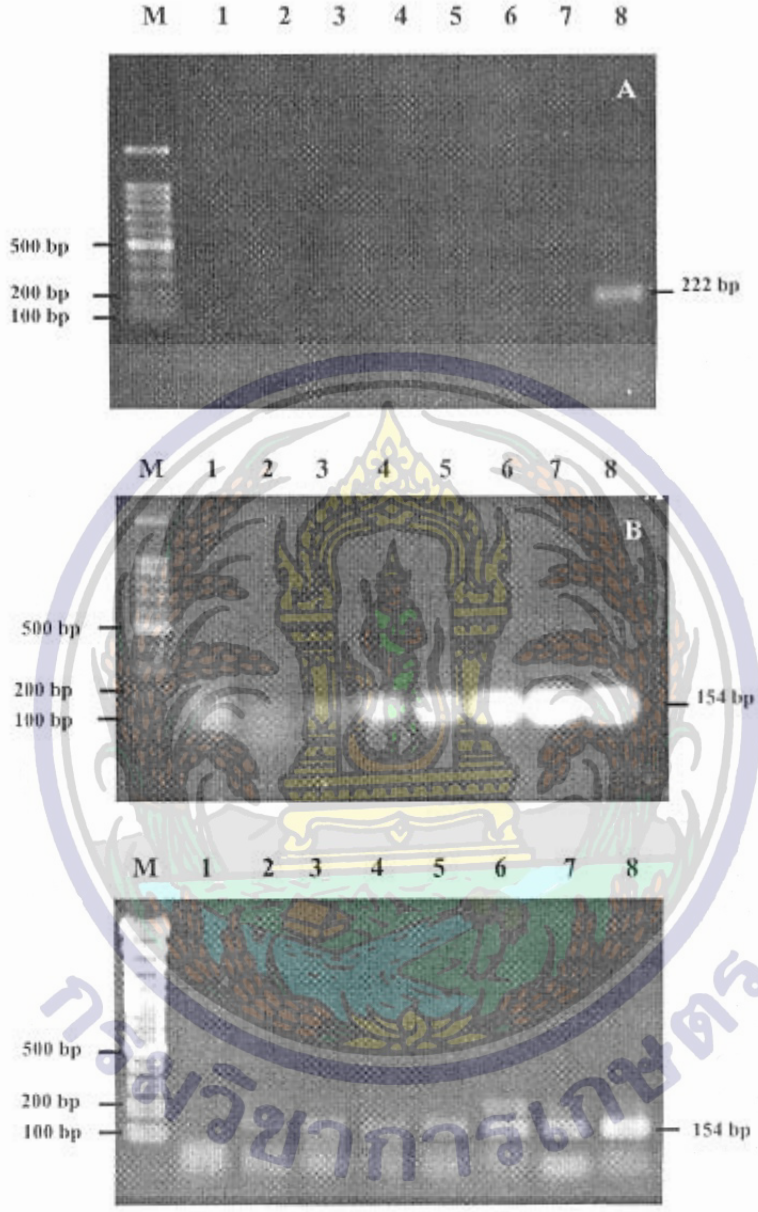
Hartung *et al.* (1996) ได้พัฒนาวิธี nested PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยตรงจากตัวอย่างพืช พบปัญหาการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ พวกสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีผลต่อการปฏิกิริยา nested PCR จึงได้ใช้เทคนิค Immunocapture ร่วมกับ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยตรงจากตัวอย่างใบส้มในแปลงปลูก พบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ nested PCR อย่างเดียวถึง 100 เท่า

ณัฏฐิมา (2550) ได้นำวิธี immunomagnetic separation (IMS) มาใช้ร่วมกับวิธี one tube nested PCR (IMS-nested PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของตัวอย่างจากแปลงปลูกที่มีการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ พบว่า ให้ความเฉพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ 5.8 เซลล์/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี nested PCR 10 เท่าและสารยับยั้งที่ปลดปล่อยจากใบส้มไม่มีผลรบกวนต่อการตรวจโดยวิธี IMS-Nested PCR (ภาพที่ 24) เมื่อนำวิธี IMS-nested PCR ไปใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากตัวอย่างของพืชตระกูลส้มที่เก็บมาจากแปลงปลูกที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์ จำนวน 50 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธี one tube nested PCR และ standard PCR พบว่าวิธี IMS-Nested PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ โดยตรวจพบเชื้อจำนวน 44 ตัวอย่าง (88%) ในขณะที่วิธี one tube nested PCR สามารถตรวจหาพบเชื้อจำนวน 38 ตัวอย่าง (76%) และ standard PCR สามารถตรวจพบเชื้อจำนวน 15 ตัวอย่าง (30%) นอกจากนี้วิธี IMS-nested PCR ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการได้โดยตรวจพบเชื้อ 20 ตัวอย่างจาก 26 ตัวอย่างที่นำมาทดลอง ในขณะที่วิธี standard PCR ไม่สามารถตรวจสอบได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า วิธี IMS-Nested PCR สามารถนำไปใช้เป็นประจำในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกและสามารถนำไปใช้ในงานด้านกักกันพืชได้

วิธีการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี IMS ร่วมกับ ปฏิกิริยา nested PCR (IMS-nested PCR) (ณัฏฐิมา, 2550)

การเตรียม immunomagnetic bead

นำ paramagnetic Dynabead M280 (Dynabead M280 sheep anti- mouse; Dynal, Oslo, Norway) มาเคลือบด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (CAB 92200; Agdia, Elkart, USA) โดยนำ 180 ไมโครลิตร($\approx 10^8$ bead) ของ paramagnetic Dynabead M280 ย้าย



ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) ในน้ำบดใบส้มด้วยวิธี standard PCR (A), วิธี one tube nested PCR (B) และ วิธี IMS-nested PCR (C)

M: GeneRuler 100 bp plus DNA ladder, Lane1: H_2O,

Lane2: Xac 5.8 Cells/ปฏิกิริยา , Lane3: Xac 5.8 x10 Cells/ปฏิกิริยา,

Lane4: Xac 5.8x10^2 Cells/ปฏิกิริยา, Lane5: Xac 5.8x10^3Cells/ปฏิกิริยา,

Lane6: Xac 5.8x10^4 Cells/ปฏิกิริยา, Lane7 : Xac 5.8x10^5 Cells/ปฏิกิริยา,

Lane 8 : Xac 5.8x10^6 Cells/ปฏิกิริยา

ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้งๆ ละ 3 นาที โดยใช้ magnetic particle concentrator (MPC;Dynal, Oslo, Norway) ดูดจับ paramagnetic bead ไว้ข้างหลอด ในระหว่างเปลี่ยนสารละลายPBS แต่ละครั้ง ละลาย paramagnetic bead ด้วย สารละลาย PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X axonopodis* pv. *citri* จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง ล้าง paramagnetic bead ด้วย สารละลาย PBS ที่มี 0.1 % bovine serum albumin (PBS-BSA) จำนวน 4 ครั้งๆละ 3 นาที ละลาย paramagnetic bead ด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 1 มิลลิลิตร

การตรวจเชื้อด้วยวิธี IMS-nested PCR

นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นในระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 500 ไมโครลิตร ย้ายลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมด้วย paramagnetic bead ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีเรียบร้อยแล้ว จำนวน 50 ไมโครลิตร (~10^5 bead) เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS-BSA จำนวน 2 ครั้งๆละ 3 นาที ละลาย paramagnetic bead ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 15 ไมโครลิตร ดูดมา 1 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

จากการนำวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่ได้ศึกษาและพัฒนามาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกพืชตระกูลส้ม พบว่าการนำวิธีทางเซรุ่มวิทยาได้แก่ ELISA มาปรับใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อได้ต่ำ จึงได้นำวิธี PCR ตามวิธีของ ณัฏฐิมา และคณะ (2548) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกพืชตระกูลส้มพบว่าไพรเมอร์D1/D2 ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในน้ำบดใบส้มได้เลย แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างจากใบส้มมีการปลดปล่อยสารออกมายับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) (ณัฏฐิมา, 2550) จึงมีการพัฒนาวิธี nested PCR ในหลอดเดียว (one tube nested PCR) เพื่อแก้ปัญหาสารยับยั้งที่ปลดปล่อยออกจากใบส้ม ลดการปนเปื้อนจากการเปลี่ยนถ่ายหลอดและเป็นการประหยัดเวลา พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบมีความไวคือ 9.4 หน่วยโคโลนี/ปฏิกิริยา แต่พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อกลุ่ม Xanthomonas อื่น ๆได้ เช่น เชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* เนื่องไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา one tube nested PCR ออกแบบมาจากยีน *pthA* ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะในเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และเป็นยีนที่ชักนำให้เกิดอาการของ

โรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Swarup *et al*, 1991; Duan *et al*, 1999) แต่ยีน *pthA* จัดอยู่ในกลุ่มยีน *Xanthomonas avirulence-pathogenicity* (Xanthomonas avr/pth gene family) (Garbriel, 1999) เช่นเดียวกับยีน *Avrb6* ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดโรคใบจุดเหลี่ยมฝ้ายที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน และยีน *pthA* มีความเหมือนของข้อมูลลำดับเบสกับยีน *avrb6* ถึง 97% (Garbriel, 1999) และเหมือนกับยีน avirulence ในเชื้อกลุ่ม Xanthomonas อื่น ๆ ทำให้การตรวจเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยการตรวจยีน *pthA* ไม่ให้ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Cubero and Graham,2002; Mavrodieva *et al*, 2004) ดังนั้นจึงได้นำวิธี immunomagnetic separation (IMS) ซึ่งเป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยามาใช้ร่วมกับวิธี nested PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า IMS-nested PCR โดยการใช้ immunomagnatic beads ที่ติดด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไปยึดจับกับเซลล์ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ออกจากเซลล์แบคทีเรียอื่นๆและสารยับยั้งที่มาจากพืช และนำมาตรวจเชื้อที่ถูกจับยึดด้วยวิธี nested PCR โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ 5.8 เซลล์/ปฏิกิริยา และมีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่านั้น ส่งผลให้เทคนิค IMS-nested PCR มีความเฉพาะเจาะจงและความไวในการตรวจเชื้อที่ดีขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล 2550. ชีววิทยา และการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 136 หน้า.

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ วนิดา ฐิตะฐาน และวงศ์ บุญสืบสกุล 2539. การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม. รายงานผลงานวิจัยปี 2539. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช ปีที่19 ฉบับที่1-2 หน้า 35-46.

Alvarez, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bactria and diagnosis of bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 42:339-366.

Alvarez, A.M., A.A. Benedict, C.Y. Mizumoto, L.W. Pollard and E.L. Civerolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. campestris* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. Phytopathology 81: 857-865

Civerolo,E.L and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme linked immunosorbant assay. Plant Dis. 66: 231-236

Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1257-1264.

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.

Gabriel, D.W. 1999. The *Xanthomonas avr/pth* gene family, pp. 39-55. In G. Stacey and N.T. keen, eds. Molecular. Plant Microbe Interaction. St. Paul, Minnesota, APS Press.

Hartung, J. S., J. F. Daniel and O. P. Pruvost.1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. Appl. Environ. Microbiol. 59:1143-8

Hartung, J. S., O. P Pruvost, I. Villemot and A. Alvarez. 1996. Rapid and colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* p.v. *citri* by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. Phytopathology 86:95-101.

Lertsuchatavanich, U. 2005. Detection, Identification and control of *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* in *Citrus* spp. In Thailand. Ph.D. Thesis, Kasetsart University

Llop, P., A. Bonaterra, J. Penalver and M.M. Lopez. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single close tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 2071-2078.

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.

McManus, P.S. and A.L. Jones. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR dot-blot reverse blot hybridizations. Phytopathology 85 : 1547-1553.

Poussier, S., J.J.Cheron, A. Couteau and J. Luisetti. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. J. Microbiol. Methods 51: 349-359.

Swarup, S., R. De Feyter, R.H. Brlansky, and D.W. Gabriel. 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.

Walcott, R.R. and R.D. Gitaitis. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.

บทที่ 8

การจัดการโรคแคงเกอร์ (Disease Management)

ในประเทศที่ไม่พบโรคแคงเกอร์หรือได้กำจัดโรคหมดสิ้นไปจากประเทศแล้วจะอาศัยมาตรการทางกักกันพืชในการป้องกันไม่ให้เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์เข้ามาและระบาดในประเทศ (Gottwald *et al.*, 2001) เช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ในอดีตการระบาดของโรคแคงเกอร์น่าจะมาจากประเทศในแถบเอเชีย เพราะแหล่งกำเนิดของโรคอยู่ในแถบเอเชีย แต่ประเทศเหล่านี้อยู่นอกเขตเอเชีย ทำให้ต้องใช้มาตรการทางกักกันพืชในการควบคุมและกำจัดโรคแคงเกอร์ ถ้ามาตรการเหล่านี้สามารถเริ่มได้เร็วจะทำให้กำจัดโรคแคงเกอร์ประสบผลสำเร็จ แต่มาตรการนี้ก็ต้องทำลายต้นส้มเป็นจำนวนมาก การกำจัดโรคแคงเกอร์มีข้อจำกัดถึงแม้ประเทศผู้ผลิตส้มรายใหญ่ของโลกจะไม่อนุญาตให้นำชิ้นส่วนของพืชตระกูลส้มหรือกิ่งพันธุ์ส้มจากประเทศที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์เข้าประเทศ แต่ยังคงพบการระบาดของโรคแคงเกอร์ในพื้นที่ใหม่ใน มลรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย (Schubert *et al.*, 2001)

การกีดกันเชื้อโรค(Exclusion)

การกีดกันเชื้อสาเหตุโรคเป็นขั้นตอนแรกที่ใช้ในการป้องกันโรคแคงเกอร์เพื่อกีดกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่บริเวณพื้นที่ปลูกหรือภายในประเทศ ในประเทศหรือทวีปที่มีสภาพอากาศเหมาะสมสำหรับการแพร่ระบาดของโรค การกีดกันด้วยการออกกฎข้อบังคับที่เข้มงวดในการนำเข้าส่วนขยายพันธุ์และผลจากแหล่งที่มีโรคแคงเกอร์ สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้ (Gottwald *et al.*, 2001) ในปัจจุบันมีการเดินทางและการค้าระหว่างประเทศเพิ่มมากขึ้นทำให้เพิ่มโอกาสให้มีการนำเชื้อและแมลงศัตรูเข้าสู่ประเทศมากขึ้น มีเอกสารหลักฐาน ถึง 6 ฉบับ ที่แสดงถึงการเข้ามาของโรค แคงเกอร์ในมลรัฐฟลอริดา เริ่มตั้งแต่ปี 1985 ทำให้ต้องมีการกำจัดและทำลายต้นส้มเป็นจำนวนมากและโรคแคงเกอร์ได้กลับเข้ามาอีกครั้งทำให้เกิดการระบาดครั้งใหม่ทำให้ต้องเสียเงินในการกำจัด (Schubert *et al.*, 2001)

มาตรการด้านสุขอนามัย (Sanitation)

มีหลายกรณีที่การระบาดของโรคแคงเกอร์ในพื้นที่ใหม่เกี่ยวข้องกับมนุษย์และการถ่ายทอดทางวิธีกล (Mechanical transmission) มนุษย์สามารถนำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์เข้ามาในแหล่งปลูกได้ โดยเชื้อแบคทีเรียติดมากับผิวหนัง เสื้อผ้า ถุงมือ เครื่องมือและอุปกรณ์การเกษตร หรือเชื้อแบคทีเรียอาจติดไปกับยานพาหนะโดยการสัมผัสกับใบพืชเป็นโรคที่เปียกหรือมีส่วนของพืชที่เป็นโรคติดไปกับเครื่องจักรทางการเกษตรเช่น รถแทรกเตอร์ เครื่องมือเกษตร เครื่องพ่นสารเคมี เป็นต้น โรคแคงเกอร์ระบาดได้โดยการขนย้ายพืชที่เป็นโรค ในพื้นที่มีโรคแคงเกอร์อยู่จำเป็นต้องสร้างสถานีทำความสะอาดเพื่อทำความสะอาดหรือทำลายแบคทีเรียปนเปื้อนมากับคนงาน พาหนะและเครื่องจักร โดยทั่วไปจะทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อด้วยการพ่นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อนเข้าหรือออกจากพื้นที่เพาะปลูก (ภาพที่ 25) (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

ภาพที่ 25 สถานีทำความสะอาดพาหนะและเครื่องจักรโดยใช้สารเคมีพ่นฆ่าเชื้อโรคก่อนหรือออกจากพื้นที่เพาะปลูก (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

การกำจัดเชื้อโรค (Eradication)

เมื่อปรากฏโรคแคงเกอร์ในพื้นที่เพาะปลูก วิธีกำจัดเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น(inoculum) ออกไปด้วยการตัดและทำลายต้นที่เป็นโรคซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับในการกำจัดโรค เพื่อให้การกำจัดโรคได้ผลสำเร็จจะต้องถอนรากถอนโคนต้นส้มที่เป็นโรคและเผาทำลาย (ภาพที่26) แม้แต่ต้นส้มที่

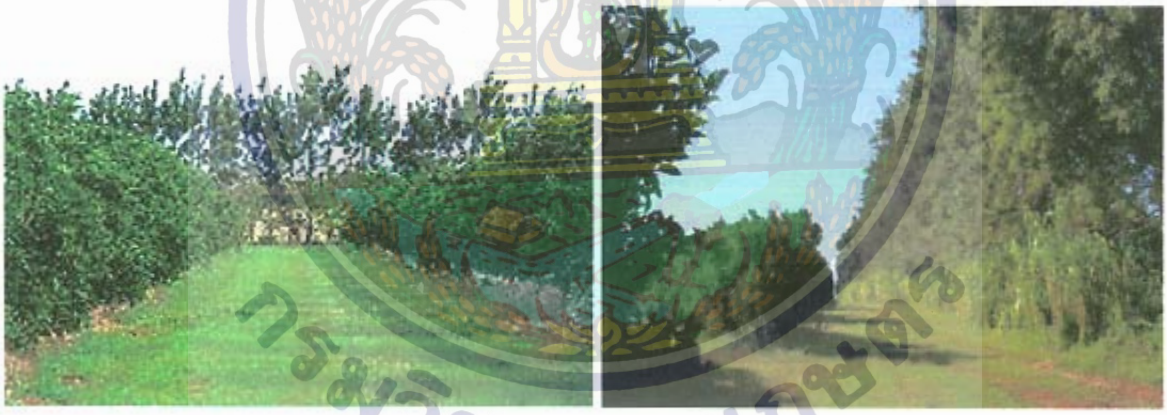
เป็นโรคที่พบในพื้นที่อยู่อาศัย ต้องตัดกิ่งที่เป็นโรคลงมาและหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ (ภาพที่27) เพื่อทำลายไม่ให้เหลือเป็นแหล่งของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในการแพร่ระบาดต่อไป ในมลรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกามีกฎหมายของรัฐกำหนดไว้ว่าเมื่อพบต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ทั้งในที่อยู่อาศัยและในแหล่งผลิตส้มเป็นการต้องกำจัดต้นส้มทุกต้นในรัศมี 579 เมตร (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

ภาพที่ 26 การกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์โดยการถอนรากถอนโคน (A) และเผาทำลาย (B) ในแหล่งผลิตส้มการค้าในเมือง มาร์ตินเคาตี มลรัฐฟลอริดา (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

ภาพที่ 27 การกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคแคงเกอร์ในพื้นที่อยู่อาศัยโดยการตัดกิ่งหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปทิ้งในที่ทำลายขยะ (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

การจัดการโรค (Disease Management)

ในประเทศที่มีโรคแคงเกอร์ระบาดอยู่อย่างรุนแรง วิธีการที่เหมาะสมในการจัดการโรคคือการใช้ส้มพันธุ์ต้านทาน เช่น ส้มวาเลนเซีย และส้มแมนดาริน (Leite and Mohan, 1984) ในภูมิภาคที่มีโรคแคงเกอร์ระบาดเป็นประจำ (endemic) ควรใช้การเขตกรรม (cultural practices) ร่วมด้วยเพื่อลดความรุนแรงของโรค พยายามหลีกเลี่ยงการทำงานในสวนส้มที่มีโรคแคงเกอร์ในขณะที่ต้นไม้เปียกเนื่องจากน้ำค้างและฝน (Gottwald and Graham, 2000) การลดความเร็วลมเป็นวิธีหนึ่งที่ลดการเกิดโรคได้โดยการปลูกแนวป้องกันลมเป็นแถวหน้ากระดานในสวนส้มหรือปลูกระหว่างแถว (ภาพที่ 28) (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002) การลดความเร็วลมทำให้โอกาสของแบคทีเรียเข้าสู่ปากใบและบาดแผลบนใบและผลลดต่ำลง (Gottwald and Timmer, 1995)



ภาพที่ 28 การปลูกแนวป้องกันลม (windbreak) เป็นแถวหน้ากระดานในสวนส้มหรือปลูกระหว่างแถว เพื่อลดการเกิดโรคและการระบาดของโรคแคงเกอร์ (Gottwald and Graham, 2000; Gottwald *et al.*, 2002)

ในพื้นที่มีโรคแคงเกอร์เป็นปัญหาที่สำคัญ การควบคุมโรคต้องใช้การเขตกรรม หลายๆวิธีร่วมกัน รวมทั้งต้องมีมาตรการด้านสุขอนามัย เช่น การลดความเร็วลม การควบคุมหนอนชอนใบ และการพ่นสารประกอบทองแดง การพ่นสารประกอบทองแดงสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อได้ (Stall and Seymour, 1983) เพราะว่าผลส้มจะมีช่วงที่อ่อนแอต่อโรค 90 วันแรกนับตั้งแต่กลีบดอกร่วงทำให้ต้องพ่นสารประกอบทองแดง 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นเกราะป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคบนผลส้มตลอดระยะเวลาที่อ่อนแอ ซึ่งการพ่นสารขึ้นอยู่กับฝนและความอ่อนแอของพันธุ์พืชที่ปลูก (Leite *et al.*, 1987) การลดความเร็วลมสามารถลดการแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคได้เป็นอย่างดี และเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการพ่นสารประกอบทองแดงด้วย (Gottwald and Graham, 2000) การควบคุมหนอนชอนใบเป็นสิ่งจำเป็นโดยเฉพาะในต้นอ่อนและในพันธุ์มีการเจริญเติบโตและแตกยอดบ่อย (Gottwald *et al.*, 2001)

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Gottwald, T. R., and L. W. Timmer. 1995. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Trop.Agric. 72:194-201.

Gottwald, T.R. and J.H. Graham 2000. Citrus canker. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01. Available Source : http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/CitrusCanker/default.htm, April 20, 2003.

Gottwald, T. R., J. H. Graham and T. S. Schubert. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. Available Source : http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/.

Gottwald, T. R., G. Hughes, J. H. Graham, X. Sun, and T. Riley. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology 91:30-34.

Leite, Jr., R. P., and S. K. Mohan. 1984. Evaluation of citrus cultivars for resistance to canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in the State of Paraná, Brazil. Proc. Int. Soc. Citriculture 1:385-389.

Leite, Jr., R. P., S. K. Mohan, A. L. Pereira and C. A. Campacci. 1987. Integrated control of citrus canker: Effect of genetic resistance and application of bactericides. Fitopatologia-Brasileira 12:257-263

Schubert, T.S., S. A. Rizvi, X. Sun, T. R. Gottwald, J. H. Graham, and W. N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. Plant Dis. 85: 340-356.

Stall, R.E. and C.P. Symour. 1983. Canker, a threat to citrus in gulf coast states. Plant Dis. 67: 581-585.