บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

พืชตระกูลส้มที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว ส้มเกลี้ยง และส้มตรา (นิด, 2544) พันธุ์ส้มที่มีการปลูกมากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปลูกส้มทั้งหมด คือ ส้มเขียวหวาน ส่วนพันธุ์ส้มที่มีความสำคัญต่อการส่งออกมากที่สุดคือ ส้มโอ (*Citrus grandis*) (จุฑามาศ, 2547)

ส้มโอ

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Citrus grandis* Osb.
	Syn. *C. maxima C. aurantium* L. var *grandis* L. *C. decumana* L.
ชื่อสามัญ	Pomelo
ชื่ออื่นๆ ไทย	ส้มโอ มะโอ หมากโอ ชาดอก
วงศ์	Rutaceae

Scora (1975) กล่าวว่า ส้มโอ หรือ shaddock (*Citrus grandis* (L.) Osbeck, คำเหมือน *Citrus maxima* (J. Burm.) Merr. *C. decumna* L., จัดอยู่ใน

Family *Rutaceae*

sub-family *Aurantioidae*

tribe *Citreae*

sub-tribe *Citrinae*

genus *Citrus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Purseglove (1968) ตั้งข้อสันนิษฐานว่า ส้มโอน่าจะเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศไทยและมาเลเซีย ถึงแม้ว่า Ye (1997) จะกล่าวว่า ส้มโอนั้นมีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีน แล้วจึงแพร่กระจายไปสู่ประเทศอื่นๆ ได้แก่ ประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และญี่ปุ่น แต่นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ลงความเห็นและยอมรับตรงกันว่า ส้มโอนั้นมีแหล่งกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แล้วจึงแพร่กระจายไปยังประเทศจีน อินเดีย และอิหร่าน ในคริสตวรรษที่ 17 ได้มี Captain Shaddock เป็นผู้นำเอาส้มโอจาก Dutch East Indies (Indonesia) เข้าสู่ West Indies (Barbados) ซึ่งต่อมาก็มีการเรียกส้มโอว่า Shaddock ตามชื่อของ Captain Shaddock จากนั้นจึงได้แพร่ขยายไปยังประเทศอื่นๆ ในเขตร้อนชื้น

ส้มโอ (*Citrus grandis*) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่ทุกคนรู้จัก สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย มีผลผลิตตลอดทั้งปี เนื่องจากส้มโอเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดี มีรสหวานหรือหวานอมเปรี้ยวขึ้นอยู่กับพันธุ์และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ อีกทั้งส้มโอเป็นผลไม้ที่มี เปลือกหนาทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานโดยไม่เสียคุณภาพ ทนทานต่อการกระทบกระเทือนระหว่างขนส่งได้ในระยะทางไกลโดยเฉพาะการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ ซึ่งจัดว่าเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยที่มีศักยภาพในการส่งออกและมีแนวโน้มตลาดค่อนข้างสดใส ตลาดต่างประเทศในแถบเอเชีย ได้แก่ ไต้หวัน ฮ่องกง สิงคโปร์ มาเลเซีย และในแถบยุโรป ได้แก่ ฝรั่งเศส อังกฤษ เยอรมนี นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 เป็นต้นมา รัฐบาลได้ให้การส่งเสริมการส่งออกผลไม้ชนิดต่างๆ ออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ ส้มโอเป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับการสนับสนุนในปี 2544 ประเทศไทยส่งออกส้มโอ 7,517 ตัน มูลค่า 131.38 ล้านบาท ซึ่งปริมาณที่ส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี 2543 ถึง 1,000 ตัน (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

การผลิตส้มโอภายในประเทศไทยมีแหล่งปลูกกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ จังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ เชียงราย และนครปฐม ในปี 2543 มีพื้นที่ปลูกส้มโอทั่วประเทศ 242,628 ไร่ ให้ผลผลิตแล้ว 145,886 ไร่ ผลผลิตรวม 183,930 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 1,261 กก./ไร่ มีมูลค่ารวม 2,663 ล้านบาท ช่วงที่ให้ผลผลิตมากอยู่ระหว่างเดือนสิงหาคม-ตุลาคม ส้มโอที่ปลูกในแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกันไปในเรื่องของพันธุ์ พันธุ์ที่ตลาดต่างประเทศต้องการ คือ พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซึ่งมีผลผลิตในปี 2543 เท่ากับ 86,243 และ 10,831 ตัน คิดเป็น 46.89 และ 5.89 % ของผลผลิตรวม ตามลำดับ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พื้นที่ภาคเหนือตอนบนเป็นแหล่งผลิตส้มโอที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำปาง ผลผลิตส้มโอที่ได้จากพื้นที่ภาคเหนือส่วนใหญ่ ใช้บริโภคภายในประเทศและมีบางส่วนมีการส่งออกไปยังต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศจีนผ่านทางสามเหลี่ยมเศรษฐกิจ การปลูกส้มโอเพื่อการค้าของเกษตรกรในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย เริ่มมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 หลังจากส้มโอให้ผลผลิตและจำหน่ายได้ราคาดีในปี 2536 จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นจำนวนเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอที่อำเภอเวียงแก่นมีประมาณ 2,000 ราย โดยมีแหล่งปลูกครอบคลุมพื้นที่ 4 ตำบล ได้แก่ ตำบล หล่ายงาว ม่วงยาย ท่าข้าม และปอ พื้นที่ปลูกส้มโอทั้งหมดรวม 7,395 ไร่ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้แล้วประมาณ 3,827 ไร่ (สำนักงานเกษตรอำเภอเวียงแก่น, 2549)

การผลิตส้มโอเพื่อการส่งออกพบปัญหาและอุปสรรคสำคัญด้านโรคหลายชนิด เช่น โรคจุดดำ โรคแคงเกอร์ โรคผลเน่า ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพและราคาของผลผลิตส้มโอ (อรพรรณ และจุมพล, 2550) โรคฮวงลองบิงและโรคทริสเตซ่าถือเป็นโรคที่สำคัญต่อพืชตระกูลส้ม โดยทำให้เกิดอาการต้นโทรม ผลผลิตน้อยลง ผลเล็ก คุณภาพลดลง ไม่สามารถให้การผลิตดอกออกผลได้ เนื่องจากอาการทรุดโทรม (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

โรคฮวงลองบิง

โรคฮวงลองบิง (Huanglongbing: HLB) หรือกรีนนิ่ง (greening) หมายถึง โรคยอดเหลือง (yellow shoot disease) (Timmer *et al*., 2003) ในประเทศฟิลิปปินส์ เรียก leaf mottling ประเทศอินเดีย เรียก decline ประเทศจีน เรียก huanglongbing ประเทศไต้หวัน เรียก likubin ประเทศอินโดนีเซีย เรียก phloem degeneration ประเทศสเปน เรียก enverdecimiento (CABI and EPPO, 2003) อย่างไรก็ตามจากการประชุมสัมมนา ครั้งที่ 13 Conference of International Organization of Citrus Virologists ได้เปลี่ยนชื่อเรียก citrus greening เป็น huanglongbing (Ohtsu *et al*., 2002) โรค HLB เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงมาก (Garnsey, 1989) เป็นเชื้อที่เข้าทำลายส่วนสีเขียวของพืช (จรัญ, 2545) Timmer *et al*. (2003) กล่าวว่าโรค HLB นี้ทำให้เกิดความเสียหายกับต้นส้มประมาณ 60 ล้านต้นในแถบแอฟริกาและเอเชีย มีรายงานว่าพบโรคนี้ครั้งแรกที่ประเทศแอฟริกาใต้ เมื่อ พ.ศ. 2516 (อำไพวรรณและคณะ, 2527) ประเทศไต้หวันพบโรคนี้เข้าทำลายตั้งแต่ปี 1951 (Hong-Ji, 2001) นอกจากนี้ Weinert *et al*., (2004) พบโรคนี้เป็นครั้งแรกใน Timor-Leate (ติมอร์ตะวันออก) และประเทศปาปัวนิวกินีในปี 2004

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคฮวงลองบิงมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ที่อยู่ใน subdivision α-Proteobacteria โดยจะพบเชื้อนี้เจริญอยู่เฉพาะในท่อลำเลียงอาหาร (phloem limited bacteria) และไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม "*Candidatus*" generic name Liberobacter (Jagoueix *et al*, 1994) ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น Liberibacter (Garnier *et al*, 2000) โดยพบว่าเชื้อสาเหตุมี 3 สายพันธุ์ คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus พบในแถบเอเชียและทั่วไป *Candidatus* Liberibacter africanus พบในแถบแอฟริกาใต้ (Jagoueix *et al*, 1994) และ *Candidatus* Liberibacter americanus พบในบราซิล (Teixeira *et al*, 2005)

โรคฮวงลองบิง (huanglongbing: HLB) หรือโรคกรีนนิ่ง (greening) มีผลกระทบกับความสมบูรณ์ของต้นส้ม มีรายงานว่าพบโรคฮวงลองบิงและแมลงพาหะในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2516 (อำไพวรรณและปราณี, 2542) การแพร่ระบาดของโรคมีหลายวิธี คือติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ กิ่งตอนหรือกิ่งพันธุ์ หรือจากการติดตาทาบกิ่ง นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยแมลงที่เป็นพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดส้ม หรือเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (asian citrus psyllid) อาการของโรค HLB ใบจะมีสีเหลืองซีด หรือมีด่างสีเขียว บางใบพบว่าเส้นกลางใบยังคงมีสีเขียว ในต้นที่เป็นโรครุนแรง ใบจะมีขนาดเล็กลง เรียวยาว ใบมีสีเหลืองซีด ใบหนากว่าปกติ ใบอาจร่วงก่อนแก่ อาจมีอาการเล็กน้อยเพียงบางกิ่ง หรือเป็นทั้งต้น นอกจากนี้กิ่งอาจแห้งตายจากยอดลงมา ผลมีขนาดเล็กลง มีรสเปรี้ยวเปลือกผลมีสีซีดจางและอาจร่วงก่อนสุก เมล็ดลีบ ไม่สมบูรณ์ เมื่ออาการลุกลามไปทั่วต้นในที่สุดต้นจะโทรมและตาย นอกจากนี้บางครั้งอาจพบว่ามีอาการเกิดร่วมกับอาการของโรคทริสเตซ่า (Garnsey, 1989) และอาการของโรคพบว่ามีอาการคล้ายกับอาการใบแก้วที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสี จึงทำให้เกิดความสับสนได้ (Timmer *et al*., 2003)

Hocquellet *et al*. (1999) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุและความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียเชื้อสาเหตุ Liberibacter species โดยการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของ ribosomal protein gene ของ *β*–operon ด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งในการสกัดดีเอ็นเอใช้ 2 วิธี คือ สกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) method โดยใช้เส้นกลางใบส้ม 2 กรัม และสกัดโดยใช้ wizard extracts 50 ไมโครลิตร ใช้เส้นกลางใบส้ม 0.1-0.3 กรัม ส่วนในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ใช้ primer A2 และ primer J5 ซึ่ง primer A2 เข้าไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณ 3'-end ของ *rpl*A gene ส่วน primer J5 เข้าไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณ 3'-end ของ *rpl*J gene ในส่วนของ ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุพบว่า primer ทั้งสองนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุและสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 species ที่เป็นเชื้อสาเหตุได้ โดยพบว่า *Candidatus* Liberibacter africanus เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 669 bp และ *Candidatus* Liberibacter asiaticus เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp บน 2% agarose gel นอกจากนี้ยังได้ทำ Southern

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hybridization เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้งกับแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย oligonucleotide probe DJ โดย oligonucleotide probe DJ จะเข้าไปจับระหว่าง *rplA-rplJ* genes ของเชื้อสาเหตุทั้งสองสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ได้ทดลองถึงความไวของ primer พบว่ายังสามารถตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุทั้งสองสปีชีส์ได้แม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 0.01 นาโนกรัม

Hung *et al*. (1999) ทำการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งโดยใช้วิธีพีซีอาร์ พบว่าใช้เวลาภายใน 6 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 การสกัด nucleic acids ใช้เวลา 2 ชั่วโมง โดยนำเส้นกลางใบส้มประมาณ 250 มิลลิกรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วละลายใน DNA extraction buffer บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย CTAB แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงสกัดด้วย chloroform/isoamyl alcohol ตามด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol ขั้นตอนที่ 2 การทำพีซีอาร์ ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ด้วย primer 226 primer pair และขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ PCR product ใช้เวลา 1 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย eletrophoresis บน 1.4 % agarose gel, 100 V นาน 30-40 นาที ในการทดลองได้ใช้ตัวอย่างส้มที่ได้จากแหล่งต่างๆ ในแถบเอเชีย ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้เวลาในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

Teixeira *et al*. (2005) รายงานว่า พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ในมลรัฐ Sao Paulo ในประเทศบราซิล โดยการตรวจสอบได้ใช้วิธี PCR ที่ศึกษาในบริเวณ 16S rDNA การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวใช้ primer GB1 (5'-AAGTCGAGTACGCAAGTACT-3') และ GB (5'-CTATATTTGCCATCATTAAGTTG-3') และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1027 bp ซึ่งขนาดที่ได้มีความแตกต่างจากเชื้อสาเหตุทั้งสองสายพันธุ์ที่เคยมีรายงาน จึงได้ให้ชื่อเชื้อที่พบนี้ว่า *Candidatus* Liberibacter americanus และพบว่ามีแมลงพาหะ คือ *Diaphorina citri*.

Ruangwong and Akarapisan (2006) ทำการศึกษาโรคฮวงลองบิงของส้มในพื้นที่ปลูก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ เมื่อตรวจสอบโรคโดยใช้เทคนิค PCR จากการใช้ คู่ไพร์เมอร์ OI1/OI2c และ A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1160 bp และ 730 bp จากใบส้มที่เป็นโรค แต่ไม่พบในใบปกติ สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรค HLB โดยปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชที่เป็นโรคทั้งหมด 5 วิธี แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่า วิธีที่ 3 (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al*., 1999) และวิธีที่ 4 (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al*., 1983) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจสอบโรค HLB ในขั้นตอนการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุที่พบด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์ A2/J5 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp ในทุกตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคและจากการหาลำดับเบสบริเวณ ribosomal protein gene ของเชื้อสาเหตุที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากเชียงใหม่ (HLB-CM) เชียงราย (HLB-CR) และแพร่ (HLB-P) ผลที่ได้พบว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค HLB คือเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus.

Deng *et al*. (2008) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงของส้มโอ ที่จังหวัด Guangdong ประเทศจีน โดยศึกษาจากยีนในบริเวณ 16S rDNA , *rpl*AJ (*β*-operon of ribosomal protein) ของเชื้อสาเหตุที่แยกได้พบว่าเป็นเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus และเมื่อศึกษาส่วน *omp* sequence โดยวิธี single-nucleotide polymorphisms พบว่าเป็นเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus กลุ่มเดียวกับสายพันธุ์จากประเทศไทย เนปาล และจากแหล่งที่ยังไม่สามารถระบุได้จากจีน แต่ต่างจากสายพันธุ์จากฟิลิปปินส์ และ China-Behai

โรคทริสเตซ่า

โรคทริสเตซ่า พบแพร่ระบาดรุนแรงเป็นครั้งแรกในประเทศแอฟริกาใต้ และต่อมาสร้างปัญหาให้กับทุกประเทศทั่วโลกที่ปลูกส้ม โดยในปี 1981 มีรายงานว่าส้มทั่วโลกเกิดความเสียหายจากโรคนี้ทั้งหมดกว่า 50 ล้านตัน (Mooney and Harta, 1992) สำหรับโรคทริสเตซ่านี้มีรายงานว่าน่าจะพบครั้งแรกในประเทศจีน (Meisaku, 2002) ในอดีตปัญหาของการปลูกส้มเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* ที่ทำให้เกิดโรครากและโคนเน่า ซึ่งต่อมาได้มีการนำเอาส้มที่ติดตาบนต้นส้ม sour orange ที่ต้านทานต่อโรคดังกล่าวมาปลูกแทน แต่หลังจากนั้นไม่นานได้เกิดการระบาดของโรคทริสเตซ่าในส้มที่ติดตาบนต้นส้ม sour orange และทำความเสียหายกับต้นส้มอย่างมากในประเทศอาร์เจนติน่า บราซิล และอุรุกวัย โดยมีรายงานถึงความเสียหายของส้มที่เกิดจากโรคนี้เป็นครั้งแรกในประเทศอาร์เจนติน่าในปี 1930 ซึ่งส้มที่ปลูกในประเทศอาร์เจนติน่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นส้มที่ติดตาบนต้นส้ม sour orange สำหรับประเทศไทยมีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2515 (ไมตรี, 2540)

เชื้อไวรัส (*Citrus tristeza virus*, CTV) เป็นไวรัสกลุ่ม closterovirus มีรูปร่างเป็นแบบ flexuous threadlike particle ยาวประมาณ 2,000 นาโนเมตร กว้างประมาณ 10-12 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13.3 x 10^6 ดาลตัน มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ RNA (Lee and Bar-Joseph, 2000) ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนหลายชนิด เช่น *Toxoptera citricidus*, *Aphis spiraecola* และ *A. gossypii* ลักษณะการถ่ายทอดเป็นแบบ semi-persistent (Yoshida, 1996)

โรคนี้สามารถเกิดได้กับส้มทุกพันธุ์ มักทำให้เกิดอาการเหลือง (seedling yellow) อาการต้นโทรม (decline) หรืออาการร่องปุ่ม (stem pitting) ซึ่งอาการเหล่านี้อาจจะเกิดอย่างใดอย่างหนึ่งหรือเกิดร่วมกัน ต้นที่มีอาการเหลือง ต้นจะแคระแกรนและตายภายในระยะเวลาไม่นาน ส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาการต้นโทรม เกิดจากการแห้งตายของเซลล์ท่อลำเลียงอาหาร ต้นส้มจะแคระแกรน ใบเหลือง เหี่ยว กิ่งแห้งตาย ผลมีขนาดเล็ก และตายในที่สุด (Brlansky *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบอาการเส้นใบโปร่งแสง (vein clearing) ใบเหลืองซีดคล้ายอาการขาดธาตุอาหาร ใบมีขนาดเล็ก และหนาผิดปกติ ขอบใบม้วนเข้าคล้ายรูปถ้วย ใบแก่เส้นใบนูนแข็งหรือแตก (corky vein) การแตกยอดใหม่หรือกิ่งก้านลดลง กิ่งแห้งตาย ติดผลมากแต่มีขนาดเล็ก และมักหลุดร่วงง่าย ต้นส้มอาจแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนหรือไม่ชัดเจนและบางครั้งอาจไม่แสดงอาการของโรคเลย โรคทริสเตซ่าสามารถถ่ายทอดและแพร่ระบาดได้โดยติดไปกับกิ่งพันธุ์หรือตาพันธุ์และแมลงพาหะนำโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพลี้ยอ่อน *Toxoptera citricidus* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายทอดเชื้อจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่ง (อำไพวรรณและปราณี, 2542)

ในการวินิจฉัยและตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคนั้น เนื่องจากเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อที่เจริญอยู่เฉพาะในท่อลำเลียงอาหารและไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นในการวินิจฉัยและตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคจึงต้องอาศัยวิธีการทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างของเชื้อไวรัสทริสเตซ่าแต่ละไอโซเลท เช่น การใช้พืชทดสอบ การใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา คือ เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค direct tissue blot immunoassay (DTBIA) นอกจากนี้ยังได้มีการประยุกต์ใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อช่วยตรวจสอบเชื้อ CTV เช่น เทคนิค two-step reverse-transcription (RT-PCR) (Huang *et al*., 2004); one-step RT-PCR (Hung *et al*., 2000); immunocapture (IC)-RT-PCR (Cambra *et al*., 2002) และ multiplex RT-PCR (Roy *et al*., 2005)

Enzyme linked immonosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา อาศัยหลักการการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งจะทำการติดฉลาก (label) แอนติเจนและแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์นี้เมื่อทำปฏิกิริยากับ substrate แล้วจะทำให้เกิดสี วิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็วและปลอดภัย แบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ competitive ELISA ใช้ในการวิเคราะห์โดยชุดตรวจสำเร็จรูป (ELISA test kit) และ non-competitive ELISA ซึ่งแบ่งย่อยได้ 2 วิธี คือ Direct ELISA หรือ Sandwich ELISA และ Indirect ELISA ส่วนใหญ่นิยมใช้ในทางการแพทย์ แต่ปัจจุบันเริ่มมีการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชมากขึ้น (นภาธร, 2536; รัตนา, 2537)

Roberts *et al*. (2001) ศึกษาเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าเป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเตซ่าที่รวดเร็ว โดยใช้แอนติบอดีไปจับกับเชื้อไวรัส ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ polyclonal antibody ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสทั้งสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง ส่วน monoclonal antibody (MLA-13) ใช้ตรวจหาเฉพาะเชื้อไวรัสสายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Florida ที่ทำให้เกิดอาการต้นโทรมบนส้ม sour orange และสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการร่องบุ๋มเท่านั้น ไม่สามารถตรวจหาสายพันธุ์ mild strain ได้

Das *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษาโรคกรีนนิ่งของส้มในประเทศอินเดีย โดยนำเอาส่วนใบพืชที่เป็นโรคมาทำการพิสูจน์ทาง biological และทางเซรุ่มวิทยา พบว่าพืชที่นำมาทดสอบนั้นมีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่างเชื้อ CTV และแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus และเมื่อทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการทาบกิ่งแล้ว พบว่า อาการของโรคกรีนนิ่งจะแสดงออกมาก่อนแต่อาการที่เห็นนั้นจะมีเชื้อ CTV แทรกซ้อนอยู่ด้วย แต่เมื่อนำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคโดยวิธี ELISA พบเพียงเชื้อ CTV อย่างเดียว แสดงว่าการตรวจโดยวิธี ELISA เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

อย่างไรก็ตาม เชื้อไวรัสมีมากมายหลายสายพันธุ์ที่ยากต่อการตรวจสอบเนื่องมาจากปริมาณของเชื้อที่มีน้อยหรือยังไม่พบการแพร่ระบาด วิธี PCR ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ จำเพาะเจาะจงและแม่นยำสูงที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในส้ม โดย Hung *et al*. (2000) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในส้ม โดยวิธีนี้ใช้เทคนิค Reverse Transcription (RT) และ Polymerase Chain Reaction (PCR) ร่วมกัน และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี Two-step RT-PCR และ Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) โดยพบว่า วิธี one-step RT-PCR นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบเชื้อ CTV สูงกว่า แม้ว่าจะมีปริมาณของเชื้อในพืชอาศัยน้อยก็ตาม

Zhipeng *et al*. (2004) ศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในต้นตอ sweet orange และ grapefruit จาก 21 แหล่งที่แตกต่างกันในเขต Florida นำมาตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เปรียบเทียบกับวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และวิธี Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม decline-inducing จำนวน 7 ไอโซเลท กลุ่ม non-decline-inducing จำนวน 6 ไอโซเลท และ กลุ่มที่เป็นทั้ง decline-inducing และ non-decline-inducing จำนวน 8 ไอโซเลท ผลการตรวจสอบพบว่าวิธี RT-PCR ไม่เพียงแต่จะสามารถตรวจสอบและระบุความแตกต่างระหว่างเชื้อ CTV ระหว่างกลุ่ม decline inducing กับ non-decline-inducing ได้เท่านั้น แต่ยังสามารถตรวจสอบพบเชื้อได้ในต้น sweet orange หรือ grapefruit ที่มีเชื้อทั้งสองไอโซเลทร่วมกันในต้นเดียวได้อีกด้วย สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก วิธี RT-PCR, ELISA และ DTBIA ให้ผลที่เหมือนกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำต้น sweet orange จำนวน 2 ตัวอย่าง และ grapefruit จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม decline inducing เมื่อนำมาตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วย CTV-specific monoclonal antibody MCA13 วิธี ELISA หรือ DTBIA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา แต่เมื่อนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างเดียวกันมาตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR สามารถตรวจพบ fragments ที่มีขนาด 320 bp ในตัวอย่างที่ทดสอบ นั่นแสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR นั้นมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าวิธีการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา

Roy *et al*. (2005) ได้ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสส้ม 7 สายพันธุ์ จากส่วน RNA ของเชื้อไวรัส 6 สายพันธุ์ และจากส่วน DNA ของเชื้อไวรัส 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Citrus leaf rugose virus* (CLRV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus variegation virus* (CVV), *Citrus yellow mosaic virus* (CYMV) และ *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) ด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (mPCR) เปรียบเทียบกับวิธี simplex PCR พบว่า วิธี mPCR สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อได้เป็นอย่างดี เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในส้ม

Ghosh *et al*. (2008) ตรวจสอบเชื้อไวรัสในส้ม ด้วยวิธี Duplex PCR เมื่อทำการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุด้วย specific primers พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ถึงสองสายพันธุ์ที่เข้าทำลายร่วมกันในส้มต้นเดียว คือ *Citrus tristeza clostero virus* (CTV) ชนิด RNA ที่มีขนาด 511 bp และ *Citrus mosaic badna virus* (CMBV) ชนิด DNA ที่มีขนาด 245 bp โดยเชื้อทั้งสองส่งผลร่วมกันทำให้เกิดอาการต้นโทรม

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzyme gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีน (gene) หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลองโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*In vitro* DNA replication) (อังสนา, 2546)

หลักการของเทคนิค PCR โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติของดีเอ็นเอที่ว่า โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอสามารถจับคู่กันได้เพราะมีเบสคู่สมกัน (complementary) ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอชิ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบเดิม ดังนั้นก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น โดย PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ primer 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ขั้นแรกเรียกว่า denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 92-95 องศาเซลเซียส ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ primer สายสั้นๆ (14-30 mers) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้ช่วงอุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส ขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5’ ของ primer ตามข้อมูลของต้นแบบ ดีอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่จำนวนที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่หนึ่งถึงขั้นที่สามหมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณ (amplify) ดีเอ็นเอได้มากมาย (พิสวรรณ, 2540)

ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยาดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate: dNTPs) ประกอบด้วย dATP dCTP dTTP และ dGTP ส่วน primer ที่นิยมใช้คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและที่มีคุณภาพไม่ดีนัก แต่ถ้าใช้คุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาและมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อปฏิกิริยาและเอ็นไซม์ เลือกใช้เอ็นไซม์ที่ทนความร้อนได้ (Thermostable DNA polymerase) ชนิดที่ใช้กันมาก คือ *Taq* polymerase (สุรินทร์, 2545)

การแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นกับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย (สุรินทร์, 2545)

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucose สลับกับ 3,6 anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารละลายต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อิเลกโทรโฟรีซิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับโพลีอะคริลาไมด์ การทำ อิเล็กโทรไฟรีซิสมักทำในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved