บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอาการโรคฮวงลองบิง (Huanglongbing, HLB) ในสวนส้มโอเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่นจังหวัดเชียงราย จำนวน 5 สวน สวนละ 8 ตัวอย่าง รวม 40 ตัวอย่าง พบว่าต้นส้มโอที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงเข้าทำลาย ต้นมีอาการตายของกิ่งจากปลายเข้ามา ใบเหลืองร่วงง่าย ผลผลิตที่ได้จากต้นที่เป็นโรค มีขนาดเล็กและรูปร่างบิดเบี้ยวผิดรูป ใบมีลักษณะอาการเหลือง ใบเล็ก เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และใบที่มีอาการเหลืองลักษณะจ้ำสีเขียวกระจายทั่วใบ สอดคล้องกับการศึกษาของ ธีระ (2532), Schwarz (1965) และ Schneider (1968) ที่รายงานว่าลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่งที่เกิดกับส้มนั้นจะมี 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 ใบจะแสดงอาการเหลืองโดยเส้นใบมีสีเขียวชัดเจน บนใบแก่อาจพบเส้นใบและเนื้อใบติดกันโปร่งแสงกว่าปกติ (vein clearing) มักพบอาการใบเหลืองและมีแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling) ยอดมักแห้งตายอย่างรวดเร็ว มีอาการตายจากปลายกิ่ง ลักษณะที่ 2 ใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียวในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง คล้ายอาการขาดธาตุสังกะสี ใบมักตั้งชี้ขึ้น

ในการยืนยันเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงส้มโอที่พบด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ primers A2/J5 ในการตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 703 bp ในทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับ Hocquellet *et al*., (1999) ที่รายงานว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 703 bp ที่ได้จากการใช้ primer A2/J5 เป็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สอดคล้องกับการศึกษาของ Ruangwong and Akarapisan (2006) ที่พบว่า เชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงของส้มในเขตภาคเหนือตอนบน 3 จังหวัดของไทย ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Candidatus* Liberibacter asiaticus เช่นเดียวกับการศึกษาของ Deng *et al.* (2008) ที่ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงของส้มโอในเขตจังหวัด Guangdong ที่ประเทศจีน ก็ให้ผลเช่นเดียวกันว่าเกิดจากเชื้อสาเหตุ *Candidatus* Liberibacter asiaticus เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง (*Candidatus* Liberibacter asiaticus) ในพืชตระกูลส้มอื่นๆ ที่ปลูกรอบสวนส้มโออีกด้วย ได้แก่ ส้มและมะนาว สอดคล้องกับการรายงานของ Huang and Chang (1980) ที่พบการแพร่ระบาดของโรคฮวงลองบิงในส้มโอพันธุ์ Wentan หลังจากที่พบการระบาดของโรคในพืชตระกูลส้มชนิดอื่นๆ ในประเทศไต้หวันมาก่อนนานกว่า 30 ปีแล้ว และเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Halbert ในปี 2005 ที่ตรวจพบตัวอย่างต้นส้มโอ 2 ต้นที่แสดงอาการของโรคฮวงลองบิง ในเขต Miami-Dade County รัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา หลังจากที่ตรวจพบแมลงพาหะเชื้อสาเหตุของโรคฮวงลองบิงในเขตเดียวกันนี้เมื่อ 7 ปีก่อนพบอาการที่ต้นส้มโอ

เมื่อทำการประเมินการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคในสวนส้มโอพบต้นส้มโอที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลายเฉลี่ย 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อสวน สอดคล้องกับการศึกษาของ Ahmad *et al.* (2008) ได้ทำการปลูกเชื้อสาเหตุ HLB ด้วยวิธีการทาบกิ่งและใช้แมลงพาหะช่วยในการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรค HLB เพื่อประเมินความต้านทานของพืชตระกูลส้มต่อเชื้อสาเหตุโรค HLB ผลการทดลองเป็นในทิศทางเดียวกัน พบว่า jasmine orange และ ส้มโอ (pummelo) นั้นเป็นพืชที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุและไม่พบอาการรวมถึงเชื้อสาเหตุในใบพืช หลังปลูกเชื้อนาน 6 เดือน เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาของ Shokrollah *et al.* (2009) ที่ทำการศึกษาความต้านทานของโรค HLB ในพืชตระกูลส้ม 18 ชนิด โดยได้ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรค HLB ด้วยวิธีการทาบกิ่ง เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR หลังปลูกเชื้อนาน 6 เดือน พบว่าพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดแสดงอาการและความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันไป โดยพบพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด ได้แก่ *C. grandis* cv. Limau Bali, *C. hysterix* cv. Limau Purut และ *Citrus sp.* cv. Limau Tembiki โดยทั้งหมดไม่แสดงอาการของโรคเลยและไม่สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR หลังการปลูกเชื้อนาน 6 เดือน

นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสบางส่วนของยีน ribosomal protein (*rpl*KAJL-*rpro*BC operon) จากตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการในส้มโอ ส้มสายน้ำผึ้งและมะนาว พบว่ามีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนถึง 96 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Liberibacter asiaticus (ribosomal protein gene) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศจีน กับ Liberibacter asiaticus (ribosomal protein and RNA polymerase (*rpl*KAJL-*rpro*BC) gene cluster) ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนนี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter africanus ด้วยแต่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมือนต่ำกว่า คือ 80 เปอร์เซ็นต์ กับ Liberibacter africanus Nelspruit ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถแปลออกมาเป็นลำดับของกรดอะมิโนจำนวน 115 amino acids และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สูง โดยพบว่ามีความเหมือนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับกรดอะมิโนของ 50S ribosomal subunit protein L10 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศญี่ปุ่น กับลำดับกรดอะมิโนของ ribosomal protein ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอินเดีย กับ ribosomal protein L10 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศอเมริกา มีความเหมือนถึง 99 เปอร์เซ็นต์ กับ ribosomal protein L10 ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส นอกจากนี้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter africanus เช่นกัน โดยพบว่ามีความเหมือน 81 เปอร์เซ็นต์ และ 73 เปอร์เซ็นต์ กับ ribosomal protein L10 และ *RplJ* ตามลำดับที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส และมีความเหมือน 61 เปอร์เซ็นต์ กับ 50S ribosomal subunit protein L10 ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter americanus ที่มีการศึกษาในห้องทดลองประเทศฝรั่งเศส

จากผลการศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรค HLB ด้วย primer A2/J5 และจากการทำ sequence กล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เข้าทำลายส้มโอในสวนเกษตรกรอำเวียงแก่นจังหวัดเชียงรายที่ทำการศึกษา คือ เชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus

สำหรับผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเตซ่าในส้มโอ พบว่าอาการของส้มโอที่ให้อาการใบยอดด่างเป็นสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้มหรือเหลือง ใบเล็ก หนา ขอบใบม้วนเข้า หดย่น เว้าเสียรูปทรง รวมถึงอาการเส้นใบโปร่งแสง (vein clearing) ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ CTV (*Citrus tristeza virus*) นั้น เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) จากบริษัท BIOREBA ในการตรวจสอบพบว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน้อยมากโดยค่าที่อ่านได้ต่ำกว่าการยอมรับให้เป็นปฏิกิริยาแบบบวก (positive) คือได้ค่า O.D. อยู่ระหว่าง 0.138 ถึง 1.781 เมื่อ positive ต้องมีค่า 2.240 ถึง 2.969 เหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดในส้มสายน้ำผึ้งที่แสดงค่า O.D. อยู่ระหว่าง 2.889 ถึง 3.414 จึงได้ใช้วิธีทาง Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เข้ามาตรวจสอบโดยใช้ specific primers AR18F/AR18R (forward primer 5’-ATGTCAGGCAGCTTGGGAAATT-3’ และ reverse primer 5’-TTCGTGTCTAAGTCRCGCTAAACA-3’) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสที่กำหนดการสังเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ในส่วนโปรตีนห่อหุ้ม p18 ของ CTV (Roy *et al*., 2005) ผลที่ได้พบว่า ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ ณ ตำแหน่งดังกล่าวได้ในอาการที่พบบนใบส้มโอ โดยที่จะเกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มปริมาณของ DNA ที่เป็นส่วนของโปรตีนห่อหุ้ม p18 ของ CTV ได้ในตัวอย่างจากใบส้มสายน้ำผึ้งและมะนาว ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งนั้นได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 511 bp

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสทริสเตซ่าจากใบส้มโอที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทริสเตซ่าได้ทั้งจากวิธี ELISA และ วิธี RT-PCR ถึงแม้ว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA นั้นถือเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีจำเพาะเจาะจงสูง และคุ้มค่าต่อการวินิจฉัยโรคทริสเตซ่าจากตัวอย่างที่สกัดแยกได้จากต้นส้ม แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็เหมือนกับวิธีการทางเซรุ่มวิทยาทั่ว ๆ ไป คือ ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความต้องการปริมาณและคุณภาพของ antisera ความจำเพาะเจาะจงของ monoclonal antibodies รวมถึงชนิดของตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบด้วย (Cambra *et al*., 2002) นอกจากนี้หากปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่มีในใบพืชนั้นมีน้อยมากก็จะทำให้การเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธี DAS-ELISA ไม่ชัดเจนอีกด้วย (Barbarossa *et al*., 2005) นอกจากนี้การที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ที่เป็นส่วนของโปรตีนห่อหุ้ม p18 ของเชื้อไวรัสทริสเตซ่าด้วยวิธี RT-PCR ด้วย specific primers ได้ อาจเนื่องจากเชื้อไวรัสทริสเตซ่านั้นมีหลาย strain ซึ่งจากการศึกษา พบว่าเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่ามีความผันแปรแตกต่างกันในส่วน genomic RNA (Moreno and Guerri, 1997) สอดคล้องกับการศึกษาของ Corazza-Nunes *et al*. (2006) ศึกษาพบว่าเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่ามีความผันแปรแตกต่างกันในส่วน genomic RNA โดยทดสอบการนำ Mexican lime ที่แสดงอาการโรคทริสเตซ่าแบบไม่รุนแรง มาตรวจสอบด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาวิธี DAS-ELISA ด้วย monoclonal antibodies ผลการตรวจสอบพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งผลที่ได้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อไวรัสที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชและอาการที่ปรากฏบนใบพืช จึงได้ทำการทดสอบต่อไปโดยวิธีการใช้ different monoclonal antibodies ตรวจสอบด้วยวิธี SSCP ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสที่ทำการทดสอบมีความหลากหลายในแต่ละไอโซเลทสูงมาก โดยผลจาก SSCP profiles ชี้ให้เห็นว่าแม้แต่ในเชื้อไวรัสทริสเตซ่าในไอโซเลทเดียวกันก็ยังมีความซับซ้อนที่สูงมากเช่นกัน โดยเชื้อไวรัสทริสเตซ่าไอโซเลทที่ได้จาก maxican lime นี้เป็น complex ของเชื้อ CTV haplotypes โดยผลที่ปรากฏสัมพันธ์กันกับอาการที่ปรากฏบนพืช ทั้งแบบ strong stem pitting และในกลุ่มที่มีอาการแบบ weak หรือ moderate stem pitting นอกจากนี้ปัญหาที่เกิดจากการผสมกันระหว่างจีโนไทป์ของเชื้อยิ่งทำให้จึงยากต่อการที่จะเข้าใจถึงกระบวนการก่อให้เกิดโรค รวมทั้งยากต่อการจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ของเชื้อในแต่ละ strain อีกด้วย (Manjunath *et al*., 2000) โดย Vidalakis *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของส้มที่เกิดจากการเข้าทำลายร่วมของเชื้อสาเหตุต่างชนิดกัน ซึ่งพบว่าอาการผิดปกติของส้มที่แสดงออกมาเนื่องจากเชื้อ *Citrus vein enation virus* (CVEV) นั้นถูกบดบังโดยเชื้อ CTV ไอโซเลท T30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่นเดียวกันกับอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อ *Concave gum* (CG) ก็ถูกบดบังโดยเชื้อ *Citrus psorosis virus* (CPsV) รวมถึงอาการที่ปรากฏอาจเกิดจากเชื้อชนิดอื่นเข้าทำลายที่ทำให้เกิดอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสทริสเตซ่า โดย Ito *et al*., 2002 รายงานว่า พบเชื้อไวรอยด์ (Viroids) ถึง 6 กลุ่ม ที่สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลส้มได้ ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus viroid* III (CVd-III) และ *Citrus viroid* IV (CVd-IV)

อย่างไรก็ตามก็อาจเป็นไปได้ว่า อาการที่ปรากฏนั้นอาจเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น *Citrus leaf rugose virus* (CLRV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), *Citrus variegation virus* (CVV), *Citrus yellow mosaic virus* (CYMV) และ *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลส้มและทำให้เกิดอาการคล้ายกันได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส้มโอเวียงแก่นที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved