การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

Identification of *Phyllosticta* Plant Pathogenic Fungi Using Morphological and Molecular Characteristics

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 3 ชนิด ในจังหวัดฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม และนครราชสีมา นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 1 ไอโซเลท *P. punica* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta* sp. และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-16-56

คำนำ

ราสกุล *Phyllosticta* Pers จัดอยู่ใน มี Class Coelomycetes มีรา *Guignardia* Viala & Ravaz อยู่ใน Class Ascomycetes, Order Sphaeropsidales, Family Mycosphaerellaceae เป็น Teleomorph state ส่วนใหญ่ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชหลายชนิด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืชและที่ผล conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่งลำต้น ของพืชด้วย และที่สำคัญรานี้เป็นสาเหตุของโรคจุดดำหรือ Citrus Black Spot ของพืชตระกูลส้มสาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) โรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampelicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วยสาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*) (Punithalingam and Holliday, 1975) โรคผลเน่าของฝรั่ง สาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* (anamorphic state: *Phyllosticta psidiicola*) (Gonzlez and Rondn, 2005) เป็นต้น

Guignardia citricarpa สาเหตุโรค Black spot ของพืชตระกูลส้ม เป็นเชื้อสำคัญในการกักกันพืช ของประเทศในเขตยุโรป และอเมริกา ซึ่งห้ามนำเข้าผลไม้ที่มีอาการของโรค Black spot โดยเด็ดขาด (Baayen *et al*., 2002) ปัญหาอีกประการหนึ่งของการตรวจพืชกักกันเพื่อการนำเข้าและส่งออก ลักษณะของแผลมีลักษณะหลายชนิด เช่น hard spot lesions แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทาถึงสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลดำ ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-10 มิลลิเมตร มักแสดงอาการเมื่อผลส้มใกล้เปลี่ยนสีเป็นสีส้มหรือเหลือง ปกติมักพบ pycnidia เล็ก ๆ บนแผล ภายในสร้าง conia ของรา *Phyllosticta citricarpa* เป็น anamorph stage (Sutton and Waterson, 1966; Van der Aa, 1973) ซึ่งสามารถมองเห็น pycnidia ด้วยตาเปล่าและสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ลักษณะแผล hard spot lesions ที่รุนแรงมากแผลจากจุดเล็ก ๆ จะมารวมตัวกัน ขยายใหญ่ขึ้น และมักพบ pycnidia บนแผลมากมาย อาการอีกชนิดหนึ่งคือ freckle spot หรือเรียกว่า false melanose แผลจุด เล็ก ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทา แทน น้ำตาลแดง บริเวณรอบแผลลักษณะนี้ก็มักพบแผล hard spot lesions กระจายอยู่ แต่อย่างไรก็ตามอาการทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกันมาก และมีลักษณะคล้ายกับอาการของโรคอื่นๆ ซึ่งแยกความแตกต่างโดยใช้สายตาได้ยาก เช่น อาการของ false melanose โรค melanose (เกิดจาก *Diaporthe citri*) โรค greasy spot (เกิดจาก *Mycosphaerell citri*) และแผลที่เกิดจาก *Phyllosticta* spp. (Kotzé, 2000) ในปัจจุบันประเทศ EU ตรวจสอบราสาเหตุโรค black spot โดยการนำแผลที่ไม่พบการสร้าง pycnidia ของเชื้อไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะสร้าง pycnidia ขึ้นมา หลังจากนั้นต้องนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่างของรา *G. citricarpa* (pathogenic) และ *G. mangiferae* (non pathogenic) เชื้อทั้งสองมีลักษณะทางสัณฐาน คล้ายกันมากจึงมักทำให้การจัดจำแนกชนิดผิด (Glienke-Blanco *et al*., 2002; Baayen *et al*, 2002) เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อช้า โดยใช้เวลา 14 วัน จึงจะสร้าง mature pycnidia ดังนั้นวิธีนี้ จึงไม่สะดวกในการตรวจพืชนำเข้า และส่งออกด้วยวิธีนี้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค black spot โดยใช้การใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain

Reaction) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecule biology) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไว รวดเร็วและแม่นยำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS

2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ

4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol , lactic acid, shear's sulution

5. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6 อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ

water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Phyllosticta* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

การเตรียม DNA จากเส้นใยของรา

7. การเตรียมเส้นใยขอรา

เลี้ยงรา *Phyllosticta* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจาก
นั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

8. การสกัด DNA จากรา

นำรา *Phyllosticta* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 5 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

9. การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1

(5’TTTCCGTAGGTGAACCTGC3’) และ ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA

- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.*, 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

13.2.4 <u>การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA</u>

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

13.2.6 <u>การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด</u>

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นรา ในกลุ่ม *Colletotrichum* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด
ตุลาคม 2555 – กันยายน 2558

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ
- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 3 ชนิด ในจังหวัดฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม และนครราชสีมา ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการแยกตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 3 ชนิด ในจังหวัดฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม และนครราชสีมา ได้ราทั้งหมด 21 ไอโซเลท

3. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 1 ไอโซเลท *P. punica* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta* sp. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อ บนพืชอาศัยต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 – เดือนกันยายน 2556

พืช	เชื้อสาเหตุ	สถานที่
ผลส้มโอ	*Phyllocticta* 3 ไอโซเลท	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
	Phyllocticta 16 ไอโซเลท	อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย
มะม่วง	*Phyllocticta mangiferae*	อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา
ทับทิม	*Phyllosticta punica*	อำเภอกลางดง จังหวัดนครราชสีมา

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 3 ชนิด แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 1 ไอโซเลท *P. punica* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta* sp. และจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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