ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*

Study on Biology and Ecology of *Phyllosticta citriasiana*

พรพิมล อธิปัญญาคม[1/] ชนินทร ดวงสอาด[2/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[2/]

[1/] ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Phyllosticta citriasiana* ไอโซเลต DOA 009 (ส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย) DOA 040 (ส้มโอ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม) DOA 088 (ส้มโอ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่) และ DOA 090 (ส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ) จาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มาเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์ บนอาหาร potato dextrose agar (PDA ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมพบว่าราเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและที่ผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น

คำหลัก : โรคจุดน้ำตาล ส้มโอ *Phyllosticta citriasiana*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-01-60

คำนำ

ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรค Black spot ของพืชส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorph state: *Guignardia citricarpa*) แต่มักพบรา *P. capitalensis* (Teleomorph state: *G. mangiferae*) เจริญอยู่ในผลส้มด้วยแต่ไม่แสดงลักษณะอาการ (Glienke-Blanco *et al*., 2002; Baayen *et al*., 2002) เช่นเดียวกับโรค Tan spot ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* ก็พบรา *P. capitalensis* เจริญอยู่ด้วย และเมื่อทำการแยกเชื้อก็มักพบราทั้งสองชนิดนี้ รา *P. citriasiana* เป็นราที่พบในประเทศจีน เวียดนาม และ ไทย จากรายงาน ไม่พบราชนิดนี้ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Wang *et al*., 2012; Wikee *et al*., 2011; Wulandari *et al*., 2009) แต่ในขณะเดียวกันมีรายงานพบรา *Phyllosticta citribrazilliensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค

เนื่องจากรา *Phyllosticta citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ มีรายงานพบในประเทศไทย ในปี 2550 (Wulandari *et al*., 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน (Seaver, 2012) เวียดนาม ด้วยเหมือนกัน ราเข้าทำลายผลส้มโอระยะใกล้สุกและเข้าทำลายใบ สำหรับพืชอาศัยของราชนิดนี้ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชอาศัยเลย (Wang *et al*., 2012; Wikee *et al*., 2011; Wulandari *et al*., 2009) จากการศึกษาของ Walandari และคณะ (2009) รายงานว่ารานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้ชิดกับรา *Guignardia citricarpa* มาก ซึ่งรา *G. citricarpa* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทย พรพิมลและคณะ (2550) ศึกษาสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำแนกชนิดสาเหตุโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุเป็นรา *Phyllosticta citricarpa* แต่ไม่พบระยะสืบพันธุ์ของราคือ *Guignardia citricarpa* ในแปลงปลูกส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ในปี 2552 Walandari และคณะ (2009) ศึกษาพบโรคใหม่ของส้มโอและตั้งชื่อว่า โรค tan spot สาเหตุเกิดจาก *Phyllosticta citriasiana* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล ซึ่งลักษณะของราชนิดนี้มีลักษณะใกล้ชิดกับรา *Guignardia citricarpa* และ *Guignardia mangiferae* มาก ทำให้เกิดการสับสนในการจำแนกชนิดของราทั้งสามชนิดนี้ เนื่องจากรา *P. citriasiana* พบแพร่กระจายในประเทศเอเชีย เช่น จีน เวียดนาม และไทย และเป็นราที่พบในปี 2552 โดยยังไม่ค่อยมีกี่ศึกษารายละเอียดของเชื้อมากนัก ประกอบด้วยพบการระบาดในประเทศแถบเอเชียเท่านั้น และเนื่องจากส้มโอเป็นพืชที่มีศักยภาพในการส่งออกไปในประเทศในสหภาพยุโรปได้ ซึ่งจะต้องมีปัญหากับการส่งออกส้มโอไปประเทศยุโรป หรือสหรัฐอเมริกา เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมตลอดจนสามารถนำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้

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 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. วัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น
9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	Potato dextrose agar (PDA)
กรรมวิธีที่ 2	Malt extract agar (MEA)
กรรมวิธีที่ 3	Czapek's agar (CzA)
กรรมวิธีที่ 4	Oat meal agar (OMA)
กรรมวิธีที่ 5	V-8 juice agar (V-8 A)
กรรมวิธีที่ 6	Cherry decoction agar

วิธีการทดลอง

เทอาหารแต่ละชนิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด วางทิ้งไว้ในห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5 อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

เทอาหาร PDA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

2.1 <u>เตรียมพืชทดสอบในต้นกล้า</u>

ปลูกพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว เป็นต้น ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

เตรียมผลของพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว เป็นต้น

2.2 <u>เตรียมรา conidial suspension ของรา *P. citriasiana*</u>

เตรียม conidial suspension ของรา *P. citriasiana* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้ conidia กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ แล้วตรวจนับจำนวน conidia ด้วย haemacytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

2.3 <u>เตรียมรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์</u>

เลี้ยงรา *P. citriasiana* บน อาหารอาหารสังเคราะห์ PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะบนอาหารที่มีเชื้อเจริญเติบโตอยู่

2.4 <u>ทดสอบพืชอาศัยในต้นกล้า</u>

เตรียมต้นกล้าของพืชตระกูลส้มให้สมบูรณ์ และพ่น conidial suspension ของรา *P. citriasiana* ที่เตรียมไว้ มีปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร บนพืชทดสอบต่าง ๆ โดยการทำแผลที่ใบพืช และมีกรรมวิธีพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

2.5 <u>ทดสอบพืชอาศัยบนผลส้ม</u>

เตรียมผลส้มชนิดต่าง ๆ และนำราที่เตรียมไว้บนอาหารสังเคราะห์ ทำแผลบนผลส้ม และนำส่วนของเชื้อที่เตรียมไว้ที่เจาะโดย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร มาวางไว้บนส่วนที่ทำแผลไว้บนผลส้ม และสำหรับกรรมวิธีควบคุม นำส่วนของวุ้นปกติวางบนผลส้ม

3. ศึกษาวงจรของโรค Tan spot ของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

3.1 <u>กำหนดแปลงทดลอง</u>

ติดต่อเกษตรกรแปลงส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย วัดพิกัดภูมิศาสตร์ กำหนดแปลงทดลอง

3.2 <u>เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *P. citriasiana* บนส่วนต่างของพืช</u>

เก็บส้มโอระยะต่าง ๆ โดย **ระยะที่ 1** เก็บใบส้มโอหลังจากตัดแต่งกิ่งแล้วทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 2** เก็บใบอ่อนของส้มโอทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 3** เก็บดอก ใบอ่อนของส้มโอทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 4** เก็บผลอ่อน ใบเป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 5** เก็บผลแก่ ใบเป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่เก็บมาตรวจหาสปอร์

3.3 <u>การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช</u>

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 transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10% เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.4 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)

3.5 บันทึกข้อมูลสิ่งแวดล้อม

บันทึกข้อมูลสภาพสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน ของอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

4. เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืชและมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยนำส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง แล้วนำตัวอย่างแห้งโรคพืชมาเก็บในถุงกระดาษ พร้อมลงรายละเอียดข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. เก็บรักษาสายพันธุ์รา

- การเก็บรักษาสายพันธุ์ราบน slant PDA ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15-17 องศาเซลเซียส ในขวด vial
- การเก็บรักษาสายพันธุ์ราใน 10% glycerol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- การเก็บรักษาราในกระดาษกรอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
แปลงส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ D0A 088 (อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่) DOA 009 (อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย) DOA 040 (อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม) และ DOA 090 (อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ) บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA) Czapek's agar (CzA) V-8 juice agar (V-8 A) Malt extract agar (MEA) Oat meal agar (OMA) Cherry decoction agar (ChA) และ Water agar (WA) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการเป็นนานเวลา 14 วัน พบว่า รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 8.250 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA และ V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.650 และ 6.105 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 088 บนอาหาร ChA และ V-8 A ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร OMA (Table 1) (Figure 1)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 8.235 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA และ V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.800 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน ซึ่งรา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 009 มีการเจริญของโคโลนีของเชื้อบนอาหารทั้ง 3 ชนิด :ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) (Figure 2)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 8.27 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร OMA CzA ChA และ V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.495 7.535 6.975 และ 6.835 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 040 บนอาหาร MEA และ OMA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร CzA ChA และ V-8 A (Table 1) (Figure 3)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.620 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร V-8 A MEA CzA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.435 3.735 3.545 และ 3.190 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 บนอาหาร OMA และ V-8 A ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อาหาร OMA และ V-8 A มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MEA CzA และ PDA (Table 1) (Figure 4)

สรุปว่ารา *P. citriasiana* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ DOA 009 DOA 040 D0A 088 และ DOA 090 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ทิ้งไว้นาน 14 วัน พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รองลงมาได้แก่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Table 2)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.1625 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.0375 4.1125 และ 0.6000 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (Table 2) (Figure 5)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 6.8250 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 4.3625 4.2250 และ 1.0500 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่น ๆ (Table 2) (Figure6)

สำหรับรา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 040 ผลของการเจริญที่ดีที่สุดในอุณหภูมิที่ต่างจากไอโซเลตอื่น ๆ คือ เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 3.0500 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ

โคโลนีของราเท่ากับ 2.8875 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเจริญเท่ากันที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 0.7250 เซนติเมตร แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Table 2) (Figure 7)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 6.6250 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.2250 4.2875 และ 1.5500 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่น ๆ (Table 2) (Figure 8)

สรุปว่ารา *P. citriasiana* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สำหรับการทดลองทดสอบอาหารและอุณหภูมิได้ทำการทดลองซ้ำครั้งที่สองแล้ว แต่จะต้องทำการทดสอบอีกครั้งเพราะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียบนอาหารเนื่องจากตู้อบเสีย อุณหภูมิในตู้อบไม่ถึงที่กำหนด

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

การทดสอบการเกิดโรคที่ใบ

ผลการทดสอบการเกิดโรคที่ใบของรา *P. citriasiana* พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่ทำให้เกิดโรคจุดน้ำตาลที่ใบในส้มเขียวหวาน และมะนาว แต่ทำให้เกิดโรคที่ใบของส้มโอหลังจากปลูกเชื้อ 2 อาทิตย์ (Figure 9)

การทดสอบการเกิดโรคที่ลำต้น

ผลการทดสอบการเกิดโรคที่ลำต้นของรา *P. citriasiana* พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่ทำให้เกิดโรคจุดน้ำตาลที่ลำต้นในส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ

การทดสอบการเกิดโรคที่ผล

ปลูกเชื้อรา *P. citriasiana* บนผลส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ เพื่อศึกษาการเกิดโรค พบว่าหลังปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์ พบว่ารา *P. citriasiana* ทำให้ผลส้มโอเกิดโรค ในขณะที่ส้มเขียวหวาน และมะนาว ไม่เป็นโรค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดสอบอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และรา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพืชอาศัย พบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

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

Kotze, I.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*. 65:945-950.

PestID. 2012. Pest Identification Database (PestID). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. https://mokcs14.aphis.usda.gov/aqas/login.jsp. (Archived at PERAL).

Schubert, T., B. Sutton, and A. Jeyaprkash. 2010. Pest Alert: Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*)discovered in Florida (DACS-P-01723). Plant Pathology Section, Florida Department f Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.

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.

Wang, X., G. Chen, F. Huang, J. Zhang, K. D. Hyde, and H. Li. 2012. Phyllosticta species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity* 52:209-224.

Wikee, S., D. Udayanga, P. W. Crous, E. Chukeatirote, E. H. C. McKenzie, A. H. Bahkali, D.-Q. Dai, and K. D. Hyde. 2011. Phyllosticta—an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity* 51:43-61.

Wulandari, N. F., C. To-anun, K. D. Hyde, L. M. Duong, J. de Gruyter, J. P. Meffert, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maximain Asia. *Fungal Diversity* 34:23-39.

Table 1 Colony characteristics after 7 and 14 days growth on various media of 4 isolates of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088, 009, 040, 090)

Media	*Phyllosticta citriasiana*							
	DOA 088		DOA 009		DOA 040		DOA 090	
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days
PDA	1.5600 b	3.1350 bc	1.6300 e	3.0150 c	1.8950 d	3.7050 c	2.0050 a	3.1900 b
CzA	4.7100 a	6.5200 bc	4.4650 c	7.0350 b	4.0700 b	7.5350 b	2.1750 a	3.5450 b
V-8 A	5.1600 a	7.1050 b	5.4300 a	7.8000 ab	5.3450 a	6.8350 b	3.3750 a	5.4350 a
MEA	4.6400 a	5.0700 bc	4.3550 c	7.2500 b	5.5350 a	8.2700 a	2.5650 a	3.7350 b
OMA	5.0750 a	8.2500 a	4.9500 b	8.2350 a	4.1300 b	7.4950 ab	3.4350 a	5.6200 a
ChA	4.0950 b	7.6500 b	3.6400 d	7.8000 ab	3.5450 c	6.9750 b	5.8950 a	1.5750 c
WA	0.8050 d	1.3550 c	0.9000 f	1.8750 d	0.4400 e	2.550 d	0.9150 a	1.3550 c
CV	47.11	100.46	46.32	41.59	49.51	41.96	203.34	49.4

หมายเหตุ: D0A 088 isolated from from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai.
DOA 009 isolated from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai.
DOA 040 isolated from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom.
DOA 090 isolated from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum.

Table 2 Colony characteristics after 14 days growth on various temperature of 4 isolates of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088, 009, 040, 090)

Temperature	*Phyllosticta citriasiana*			
	DOA 088	DOA 009	DOA 040	DOA 090
Room temperature	4.1125 a	4.2250 b	0.7250 b	5.2250 b
25°C	5.1625 a	6.8250 a	2.8875 a	6.6250 a
30°C	5.0375 a	4.3625 b	3.0500 a	4.2875 b
35°C	0.6000 b	1.0500 c	0.7250 b	1.5500 c
40°C	0.0000 b	0.0000 c	0.0000 b	0.0000 d

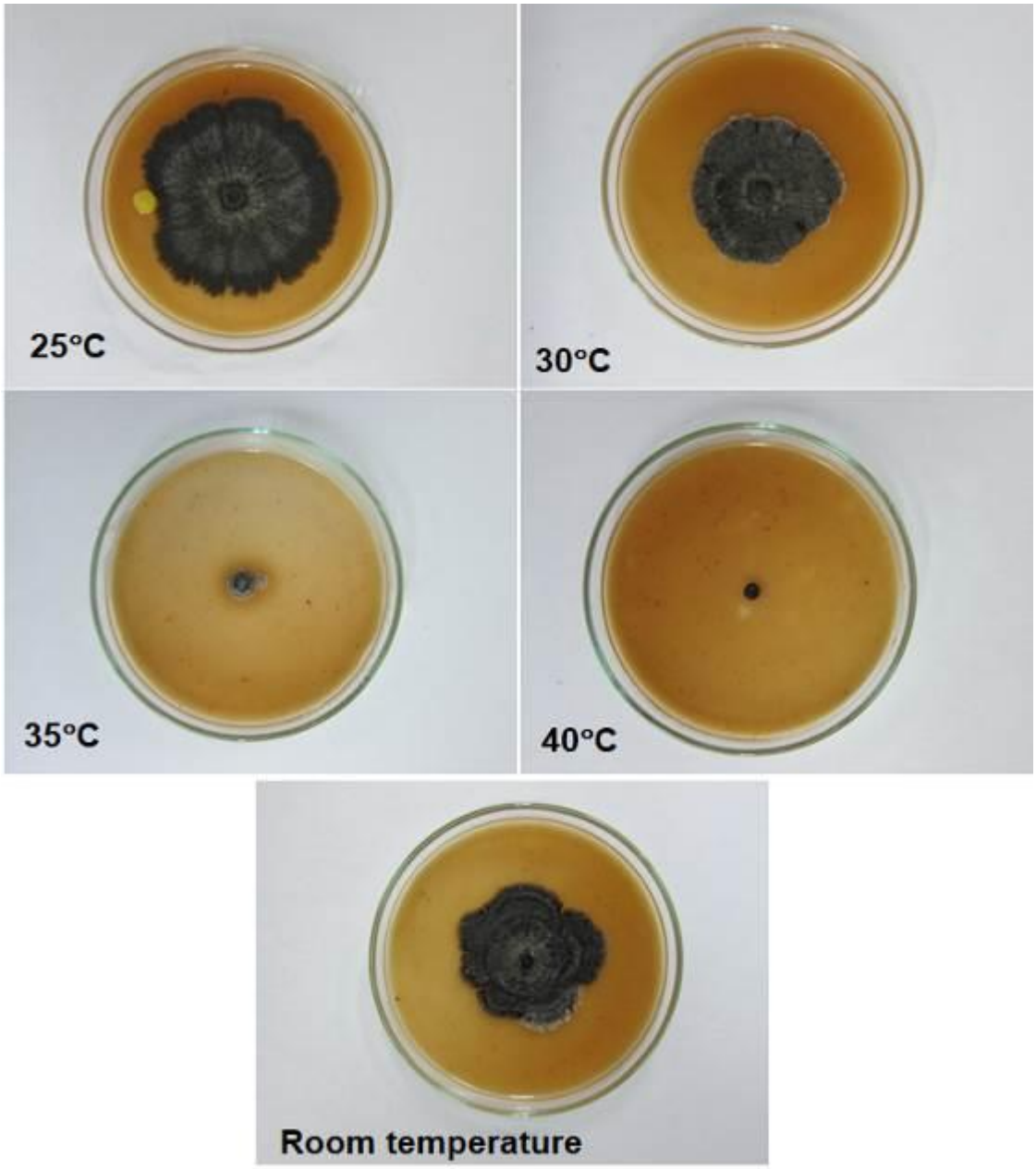

Figure 1 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) collected from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai province after 14 days on various media

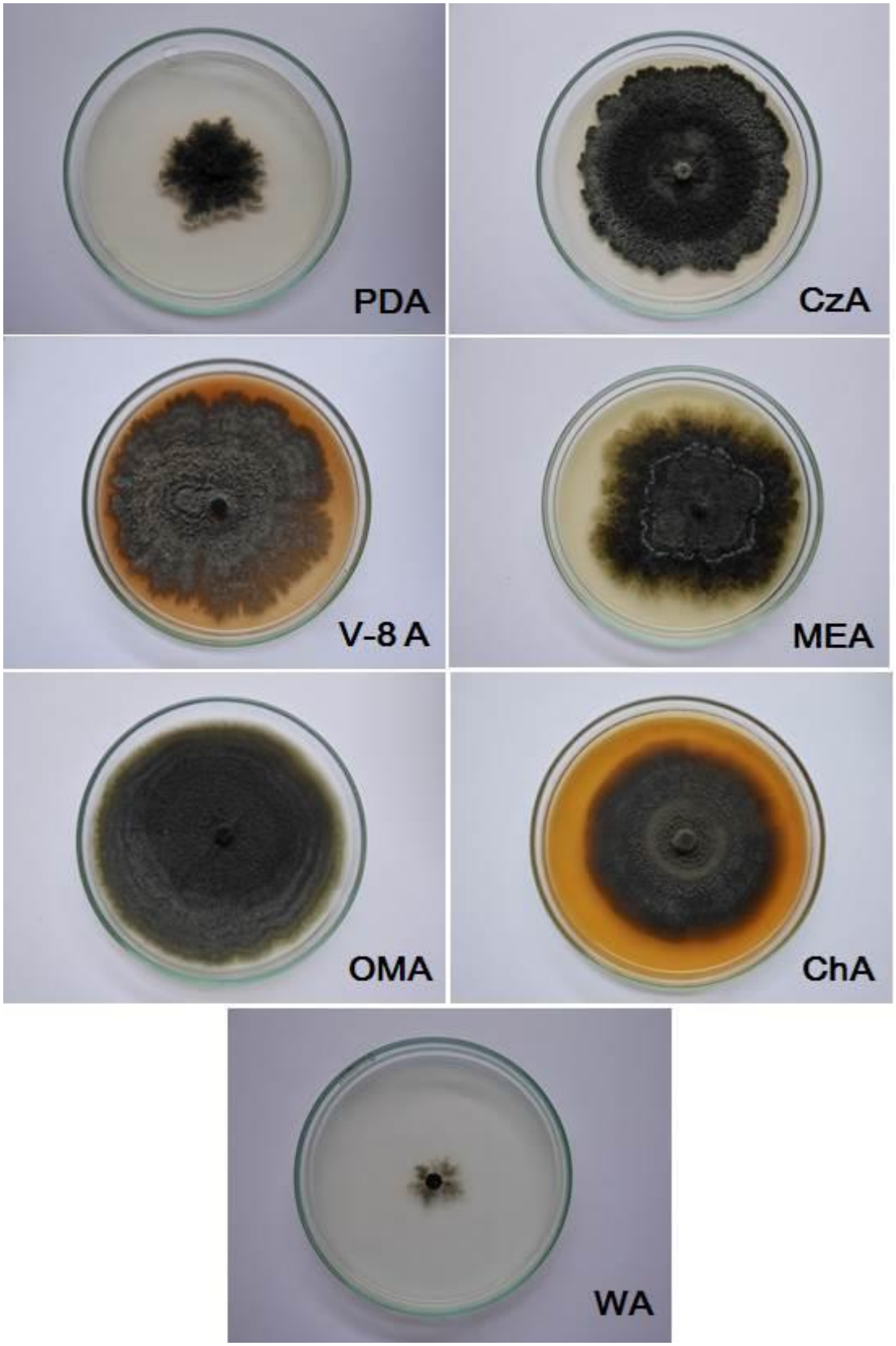

Figure 2 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) collected from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai province after 14 days on various media

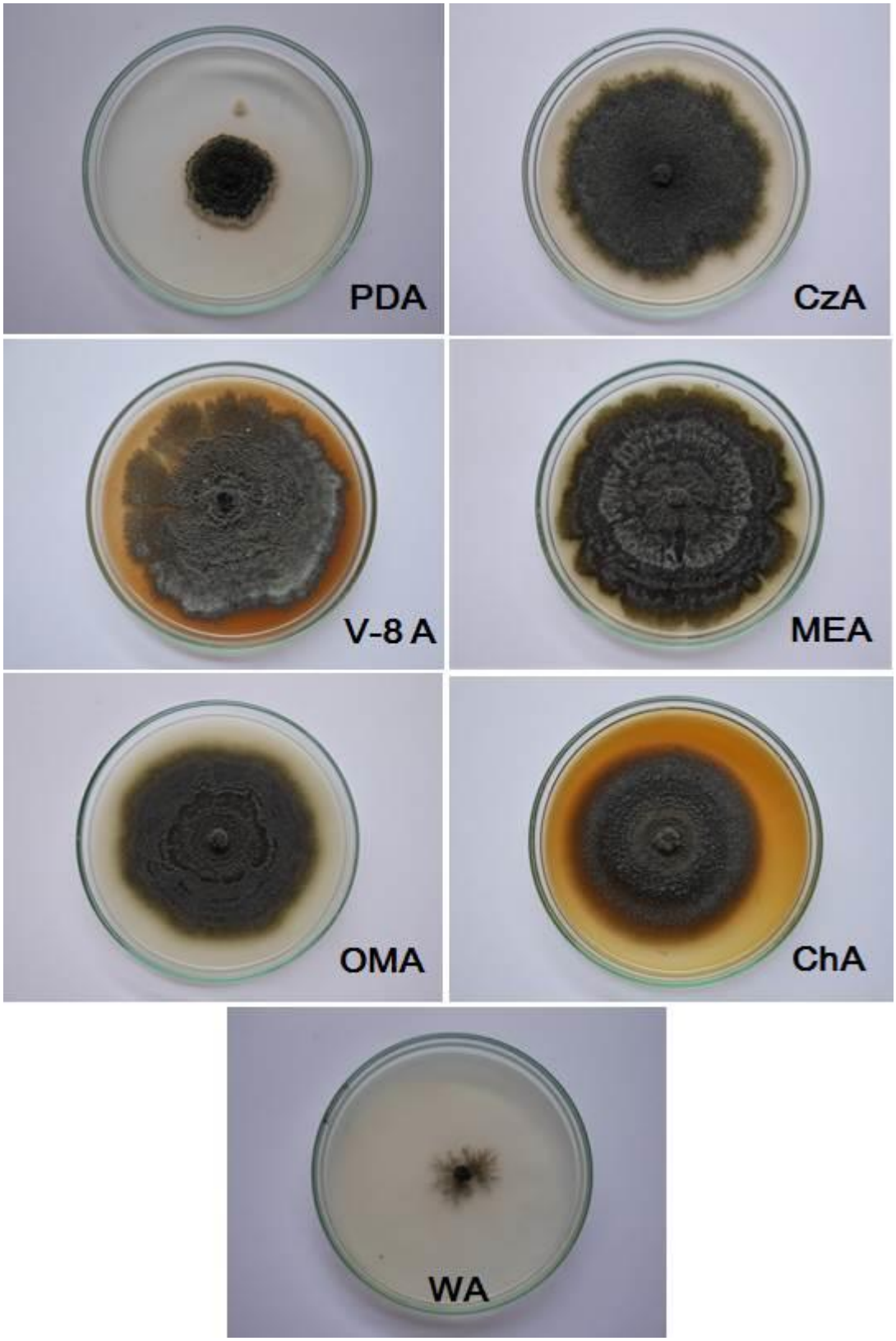

Figure 3 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) collected from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom province after 14 days on various media

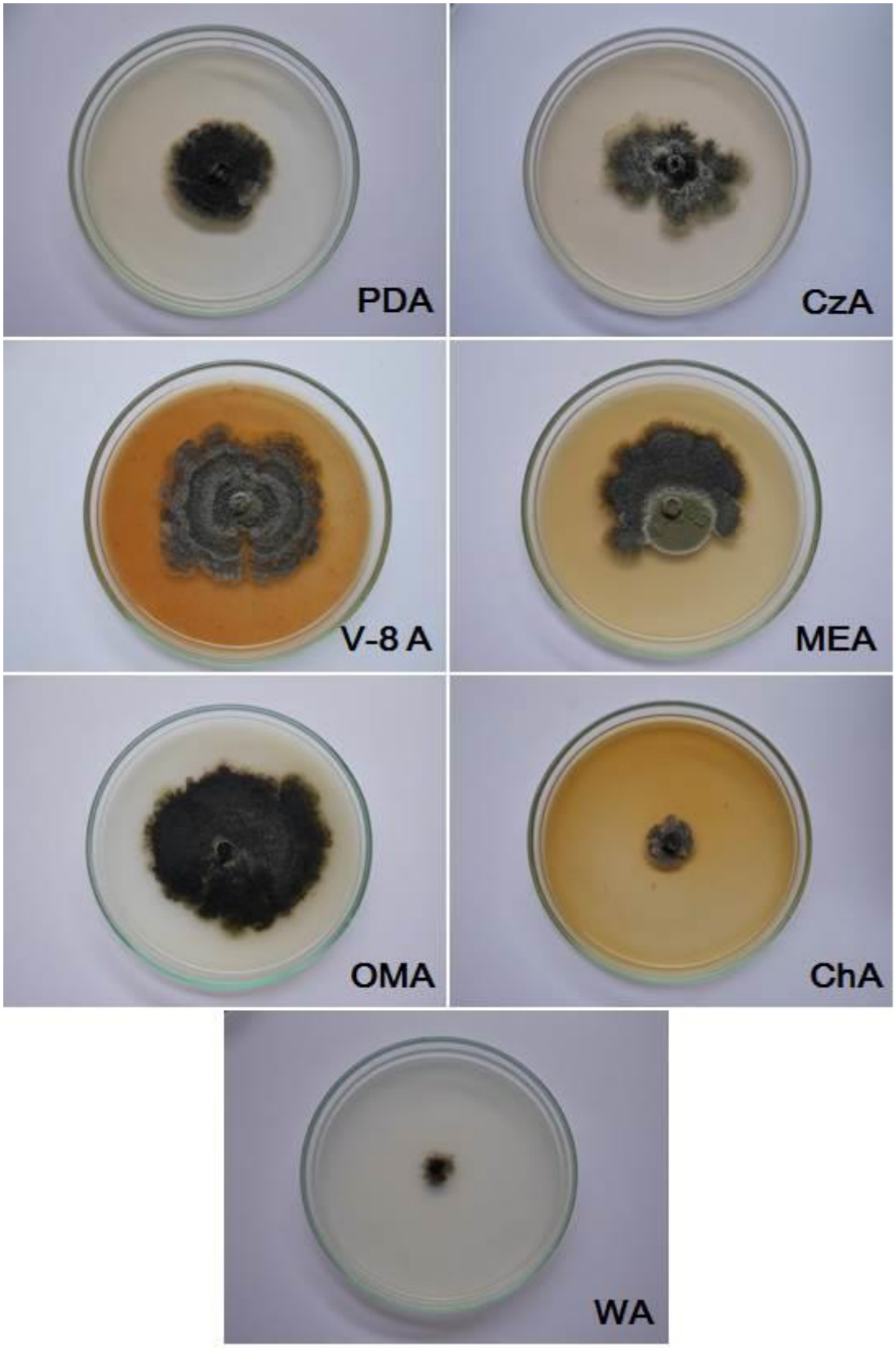

Figure 4 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) collected from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum province after 14 days on various media

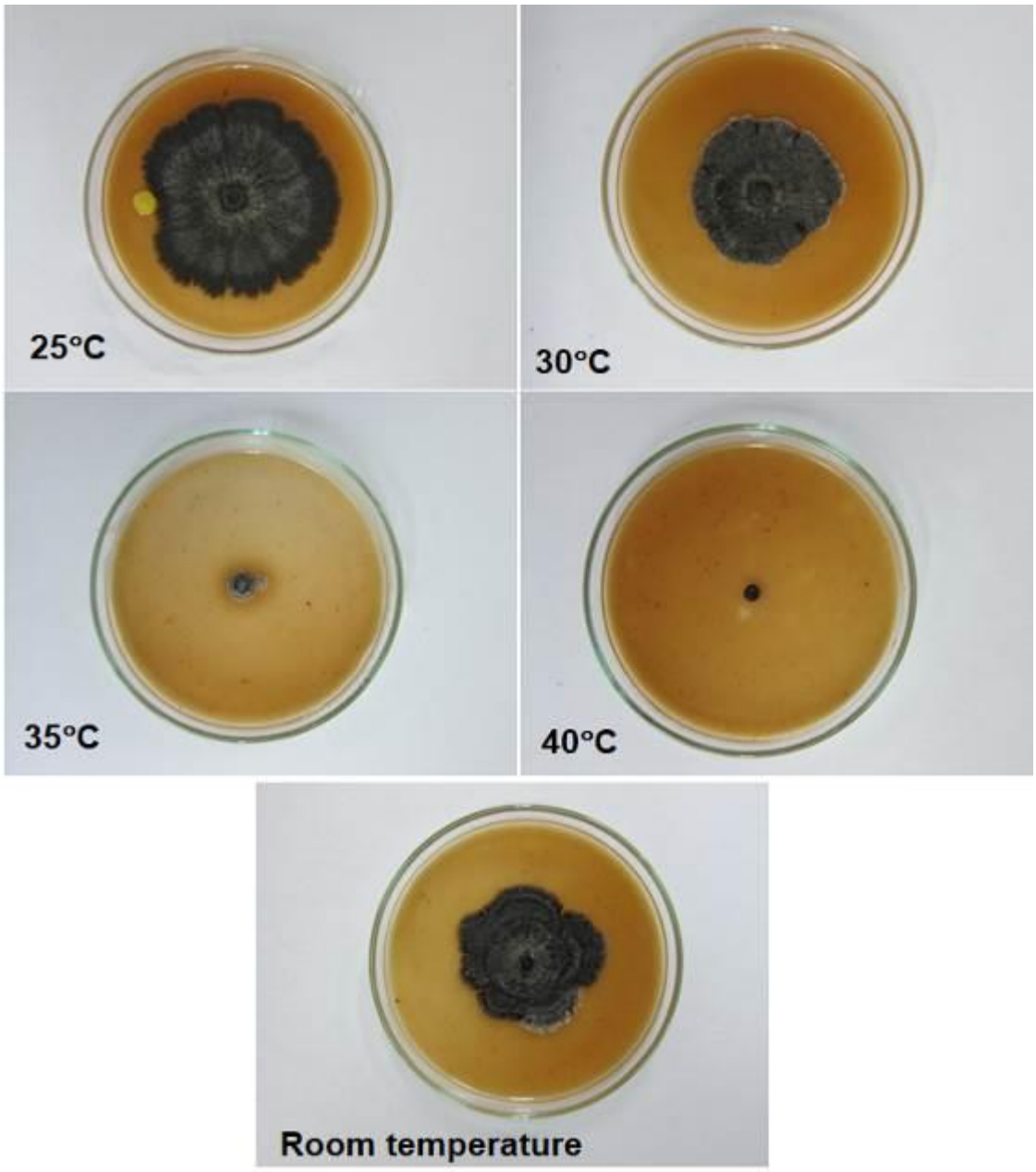

Figure 5 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) after 14 days on various temperature

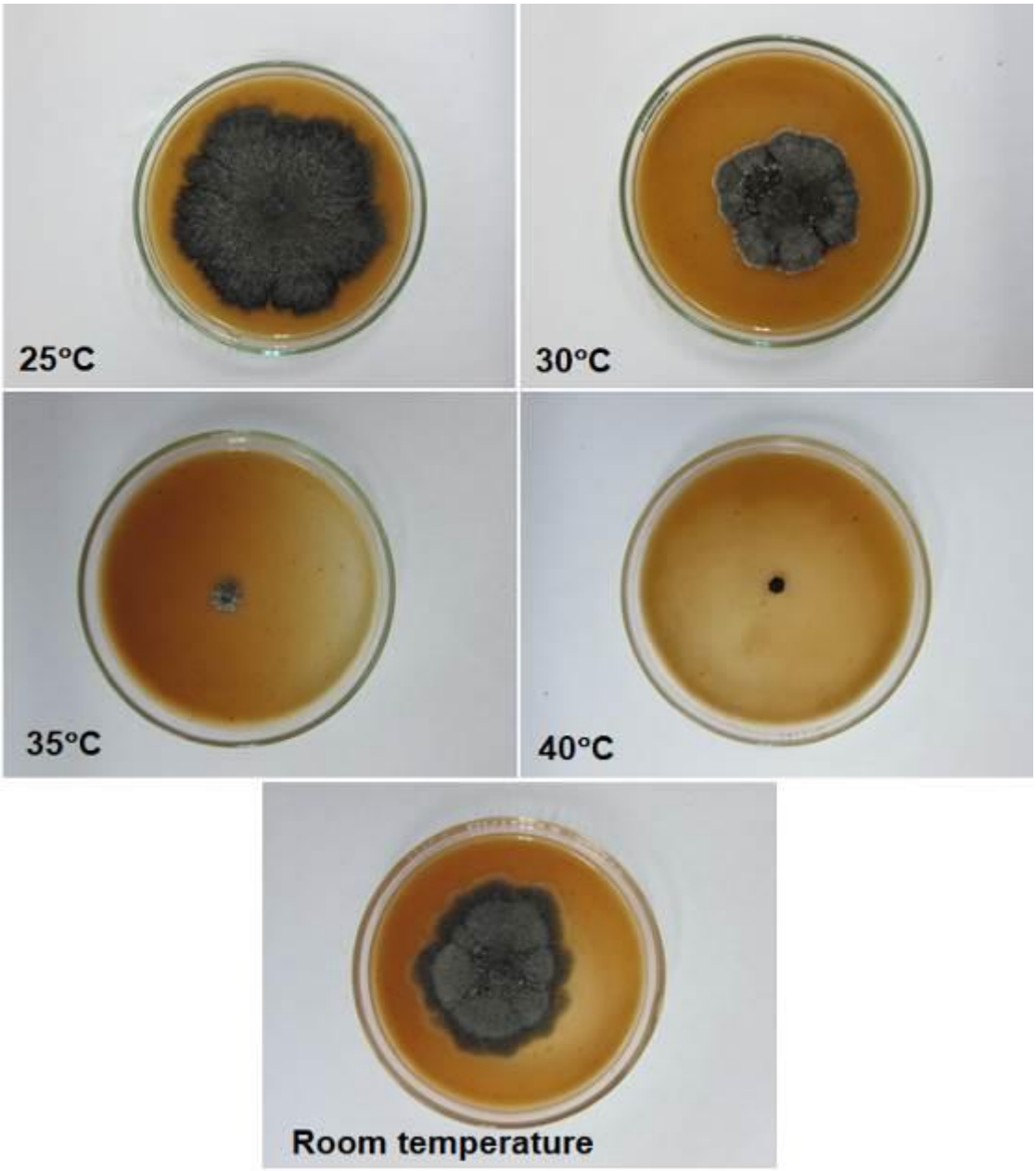

Figure 6 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) after 14 days on various temperature

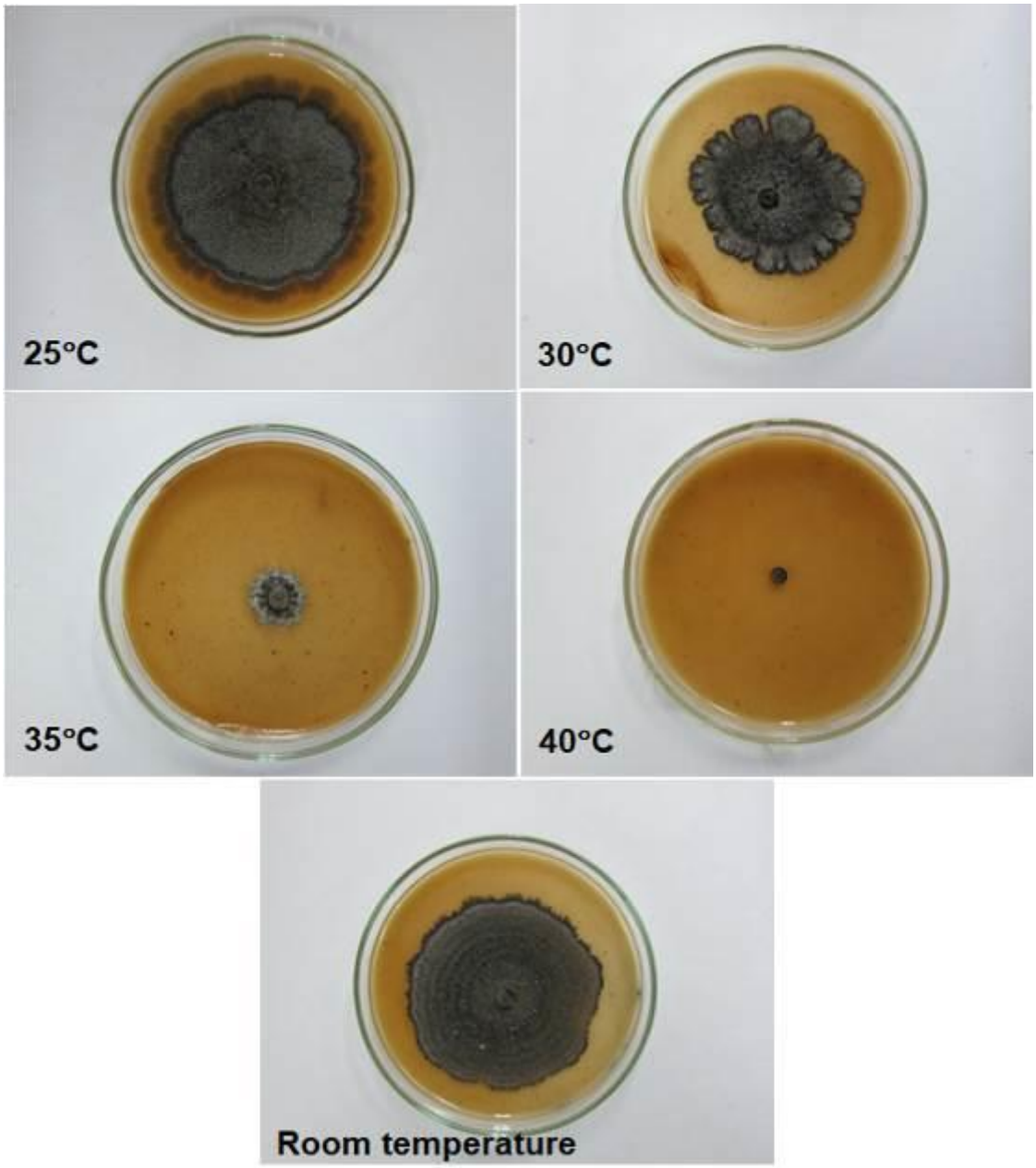

Figure 7 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) after 14 days on various temperature

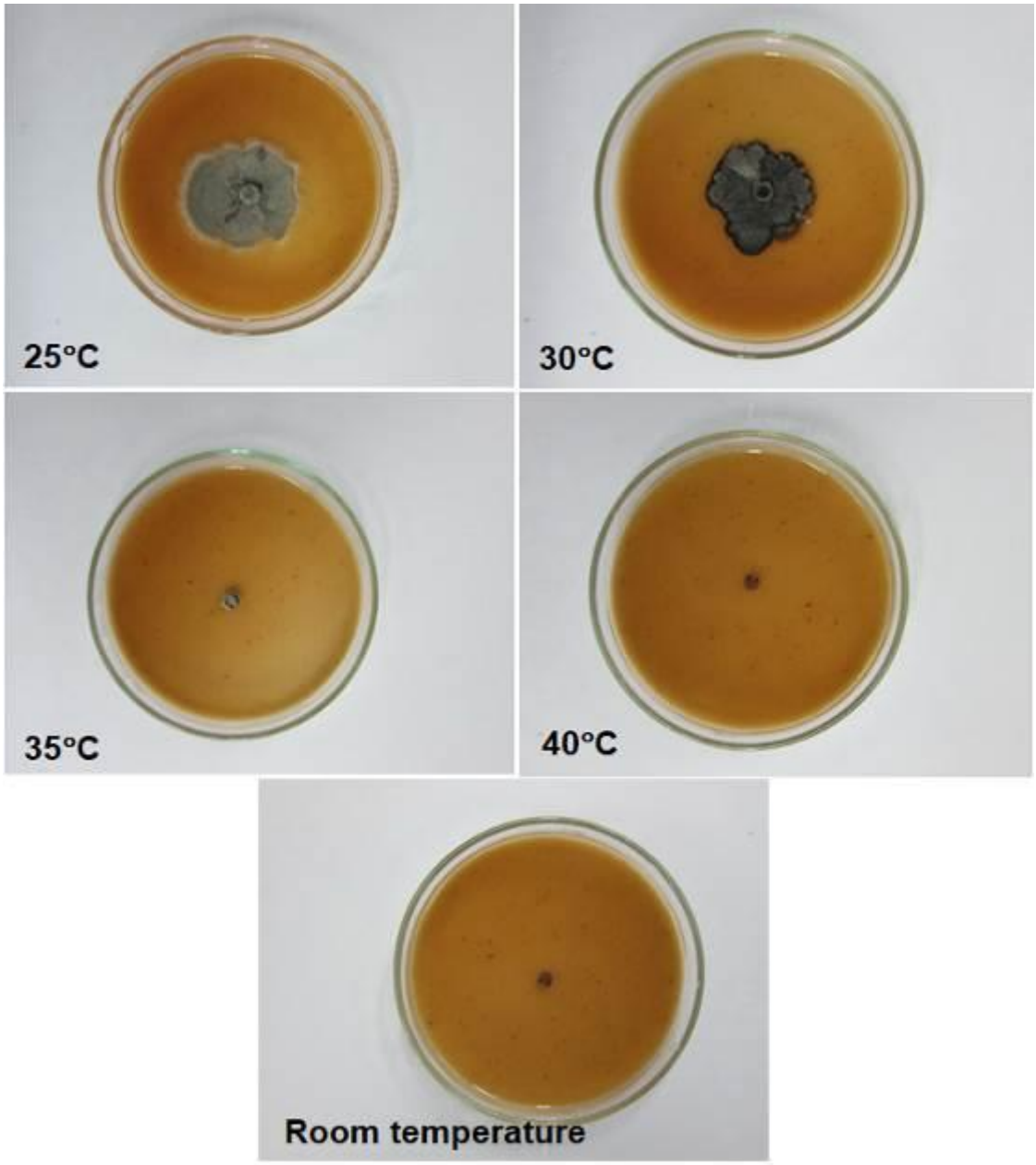

Figure 8 Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) after 14 days on various temperature

Figure 9 Pathogenicity of *Phyllosticta citriasiana* on *Citrus maxima, C. reticulata* and *C. aurantiifolia*