รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช

2. โครงการวิจัย : การศึกษาสถานภาพศัตรูพืชกักกันในประเทศไทย

กิจกรรมที่ 1 : การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on Biology and Ecology of *Phyllosticta citriasiana*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

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 โดยศึกษาการเจริญของเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) malt extract agar (MEA) oat meal agar (OMA) V-8 juice agar (V-8 A) และ cherry decoction agar ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิที่ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการพบว่ารา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา Phyllosticta capa และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

Abstract

To study the optimum temperature and suitable media for the growth of *Phyllosticta citriasiana*, the causal agent was isolated from tan spot on *Citrus maxima* collected from various locations, then confirmed the species using molecular data. Four accessions of *P. citriasiana*, namely DOAM0086 (Chiang Dao, Chiangmai), DOAM0089 (Wiang Kaen district, Chiangrai), DOAM0412 (Nakhon Chai Si district, Nakhon Pathom) and DOAM0623 (Kaset Sombun district, Chaiyaphum), had been tested on potato dextrose agar (PDA) malt extract agar (MEA) oat meal agar (OMA) V-8 juice agar (V-8 A) and cherry decoction agar at different temperature. It was found that most of *P. citriasiana* isolates presented the best growth rate on OMA and the optimum temperature was at 25 degree Celsius. There was one exemption for DOAM0412, which present the best results on MEA and at 30 degree Celsius. The biological study confirmed that *C. maxima* was the host of *P. citriasiana*. The symptom was found on leave and fruits, but not stem, branches or branchlets. Conidia and spermatia could be observed on foliage and fruits as well as the dried leave, which fallen and embedded in soil. This had become the source of inoculum for further spreading in the next season. In addition, the endophytic as *P. capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*), which was non-pathogen, also presented while isolated fungi from specimens. Based on this study, the sexual stage of *P. citriasiana* had not been found.

6. 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) เช่นเดียวกับโรคใบจุดสีน้ำตาล (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 มีรายงานพบในประเทศไทยในปี 2550 (Wulandari et al., 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน (Seaver, 2012) เวียดนามด้วยเหมือนกัน 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) ศึกษาพบโรคใหม่ของส้มโอและตั้งชื่อว่าโรค 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

ส้มโอ เป็นไม้ผลที่นิยมของผู้บริโภคภายในและต่างประเทศ และมีศักยภาพมากในการส่งออก แต่เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องโรค ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการส่งออกส้มโอไปยังตลาดสำคัญของโลก โดยโรคพืชที่สำคัญต่อการส่งออกส้มโอคือ โรคแคงเคอร์ (Canker) สาเหตุจากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* และโรคจุดดำ (Black spot) สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa* (syn. *Guignardia citricarpa*) โดยเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป ในปี 2549 ประเทศไทยส่งออกส้มโอไปประเทศเนเธอร์แลนด์ และด่านตรวจพืชของประเทศเนเธอร์แลนด์ ตรวจพบโรคลักษณะคล้ายโรคจุดดำบนผลส้มโอจากประเทศไทย และได้สั่งเผาทำลายทั้ง container จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทำให้ประเทศไทยเป็นที่จับตามองว่าเป็น

ประเทศที่มีโรคจุดดำระบาด ในปี พ.ศ. 2550-2551 ได้มีการศึกษาสาเหตุของโรคและจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็น รา *P. citricarpa* พร้อมทั้งศึกษาเทคโนโลยีในการป้องกันกำจัด

ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรค Black spot ของพืชส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก *P. citricarpa* (Teleomorph state: *G. 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* .ในขณะเดียวกันก็พบรา 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 *P. citribrazilliensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค

เนื่องจากรา *P. citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ มีรายงานพบในประเทศไทย ในปี 2550 (Wulandari et al., 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน เวียดนาม ด้วยเหมือนกัน ราเข้าทำลายผลส้มโอระยะใกล้สุกและเข้าทำลายใบ สำหรับพืชอาศัยของราชนิดนี้ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชอาศัยเลย (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011; Wulandari et al., 2009) จากการศึกษาของ Walandari และคณะ (2009) รายงานว่ารานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้ชิดกับรา P. citricarpa มาก ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ต่อมาพบว่าด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้เชื้อสาเหตุในกลุ่ม *Phyllosticta* ที่เข้าทำลายพืชกระกูลส้มถูกวินิจฉัยว่าเป็นรา P. citricarpa และความแตกต่างนี้สามารถจำแนกได้ด้วยความแตกต่างของข้อมูลพันธุกรรมเท่านั้น เนื่องการตรวจสอบรา *P. citriasiana* และโรคพืช อาจจะได้ราหลายชนิดในสกุล Phyllosticta ที่อยู่ในกลุ่มของเอ็นโดไฟท์เช่น *P. capitalensis* ซึ่งจะพบมากในเขตร้อนร้อนและกึ่งร้อนชื้นในพืชพื้นเมืองและพืชอื่น ๆ รา *P. capitalensis* สามารถเข้าไปเจริญในแผลได้

7. 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. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ 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 ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด วางทิ้งไว้ในห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน10 ซ้ำ 9 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 ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

2.1 <u>เตรียมพืชทดสอบในต้นกล้า</u>

ปลูกพืชทดสอบชนิดต่างๆ 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 บนพืชทดสอบต่างๆ 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 บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย วัดพิกัดภูมิศาสตร์ กำหนดแปลงทดลอง

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

เก็บส้มโอระยะต่าง ๆ โดย**ระยะที่ 1** เก็บใบส้มโอหลังจากตัดแต่งกิ่งแล้วทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติ และใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ 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

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ แปลงส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย
- อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารและอุณหภูมิต่างๆ
- พืชอาศัยของรา

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* จำนวน 4 ไอโซเลต

ได้แก่ DOA 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 8.25 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.65 และ 6.52 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 8.24 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA V-8 A MEA CzA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.80 7.80 7.25 7.04 เซนติเมตร ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกัน แต่มีการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญบนอาหาร PDA และ WA ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 3.02 และ 1.88 เซนติเมตร ตามลำดับ (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 7.50 7.54 6.98 และ 6.83 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 5.62 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร V-8 A MEA CzA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.44 3.74 3.55 และ 3.19 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 บนอาหาร OMA และ V-8 A ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อาหาร OMA และ V-8 A แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MEA CzA และ PDA (Table 1) (Figure 4)

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

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

Media	Colony growth of 4 isolates of *Phyllosticta* after 14 days			
	DOA 088	DOA 009	DOA 040	DOA 090
PDA	3.14 bc	3.02 c	3.71 c	3.19 b
CzA	6.52 bc	7.04 b	7.54b	3.55 b
V-8 A	7.11 b	7.80 ab	6.84 b	5.44 a
MEA	5.07 bc	7.25 b	8.27 a	3.74 b
OMA	8.25 a	8.24 a	7.50 ab	5.62 a
ChA	7.65 b	7.80 ab	6.96 b	1.58 c
WA	1.36 c	1.88 d	2.55 d	1.36 c
CV	100.46	41.59	41.96	49.4

Remarks: 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.

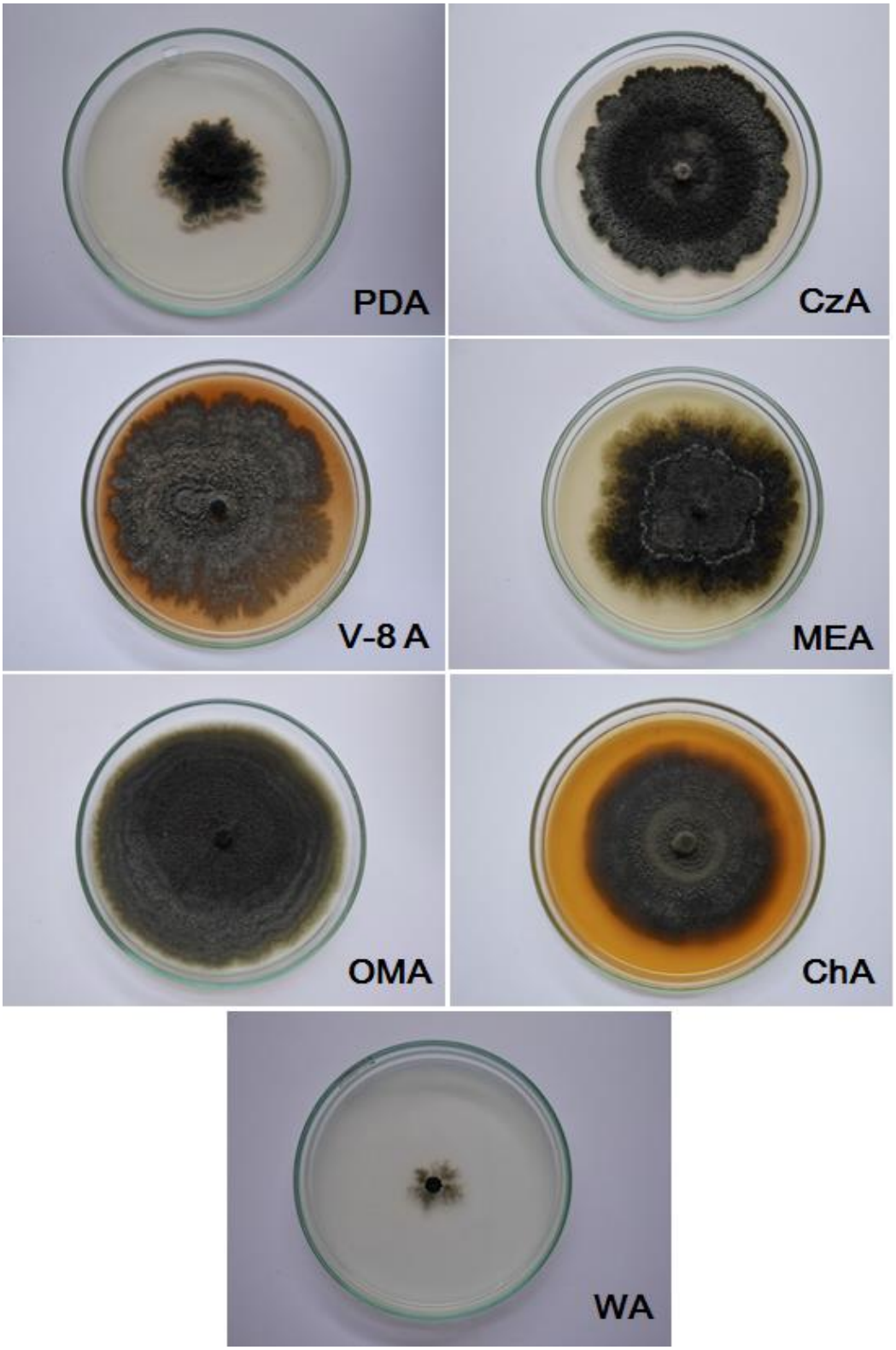

Figure 1: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) collected from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai province after 14 days on various media.

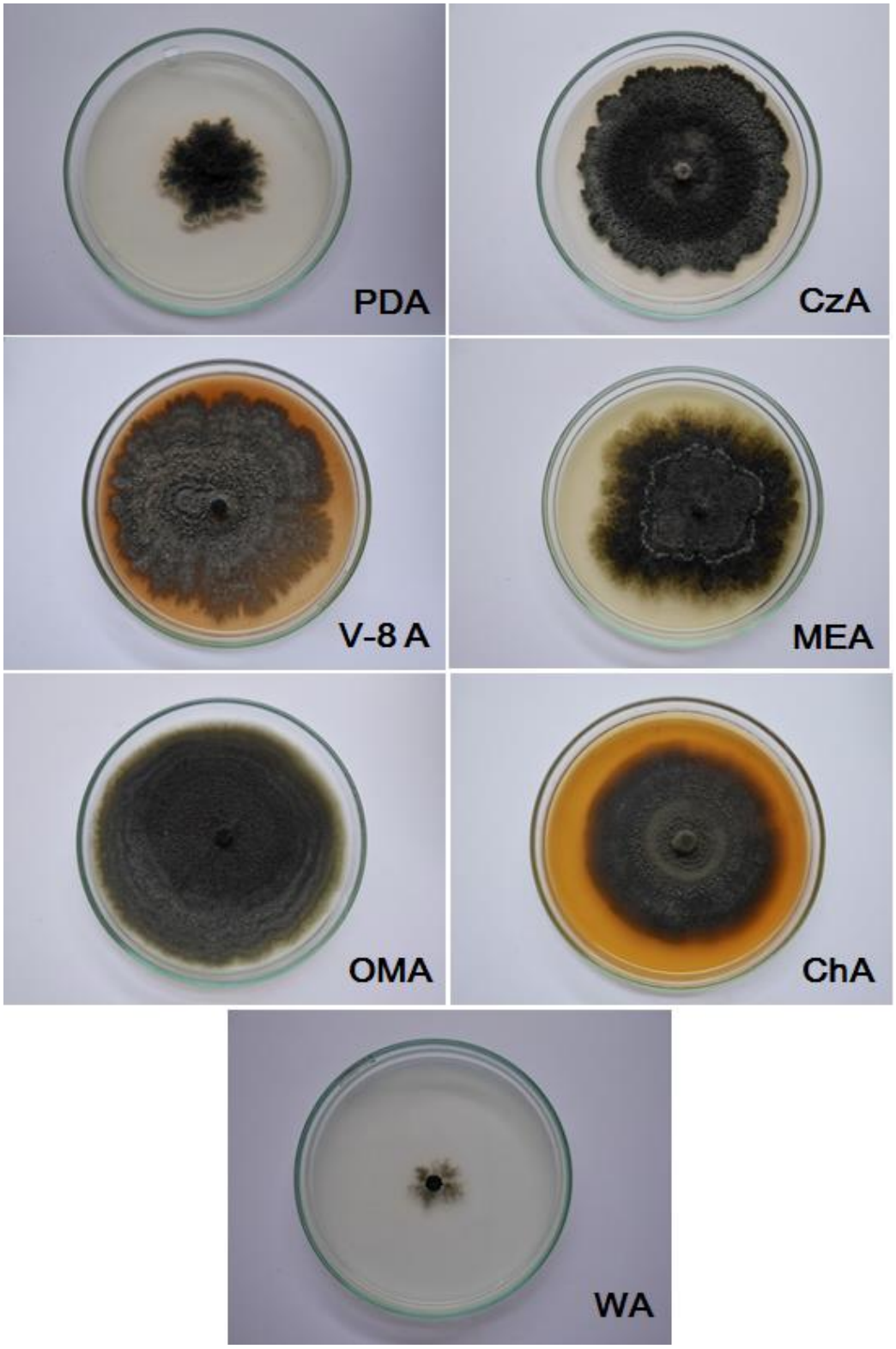

Figure 2: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) collected from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai province after 14 days on various media.

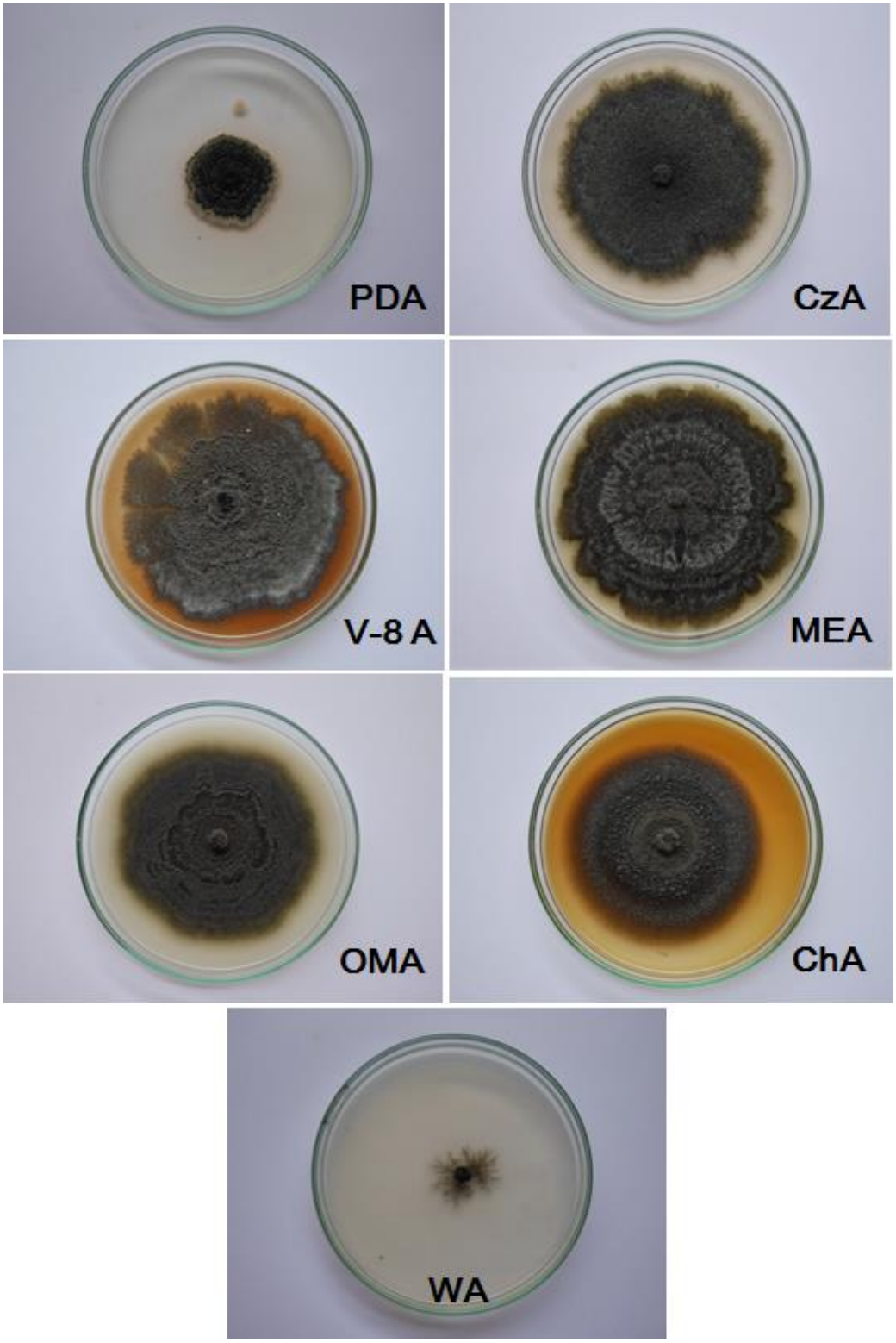

Figure 3: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) collected from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom province after 14 days on various media.

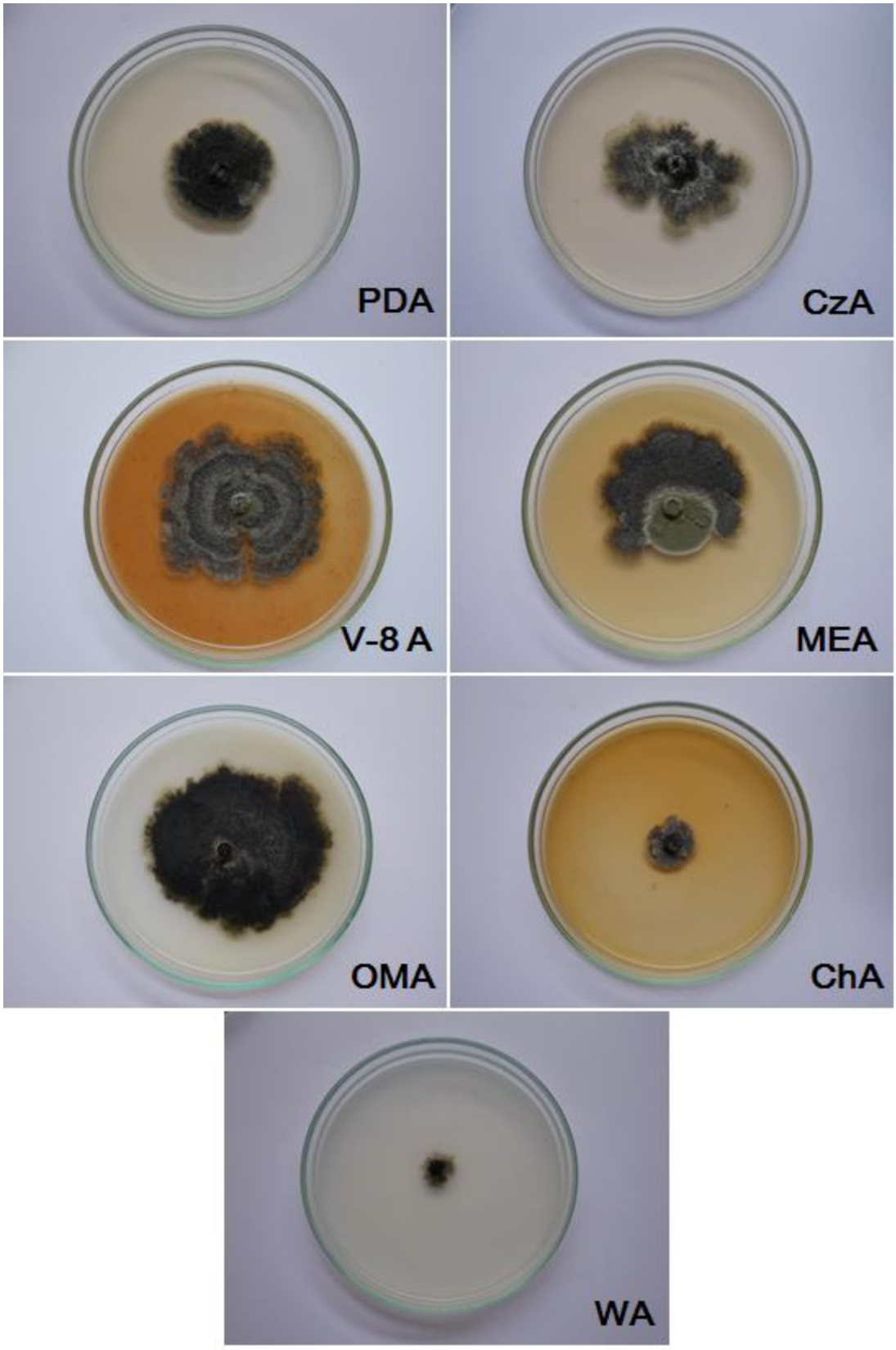

Figure 4: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) collected from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum province

after 14 days on various media.

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 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Table 2)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.16 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.04 4.11 และ 0.60 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 6.83 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 4.37 4.23 และ 1.05 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่นๆ (Table 2) (Figure6)

สำหรับรา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 040 ผลของการเจริญที่ดีที่สุดในอุณหภูมิต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 3.05 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 2.89 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเจริญเท่ากันที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการอุณหภูมิห้องปฏิบัติการและอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 0.73 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 6.63 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.23 4.29 และ 1.55 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 เจริญได้ดี

ที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่นๆ (Table 2) (Figure 8)

สรุปว่าารา *P. citriasiana* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

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

Temperature	Colony growth of 4 isolates of *Phyllosticta* after 14 days			
	DOA 088	DOA 009	DOA 040	DOA 090
Room temperature	4.11 a	4.23 b	0.73 b	5.23 b
25°C	5.16 a	6.83 a	2.89 a	6.63 a
30°C	5.04 a	4.37 b	3.05 a	4.29 b
35°C	0.60 b	1.05 c	0.73 b	1.55 c
40°C	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 d
CV				

Remarks: 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.

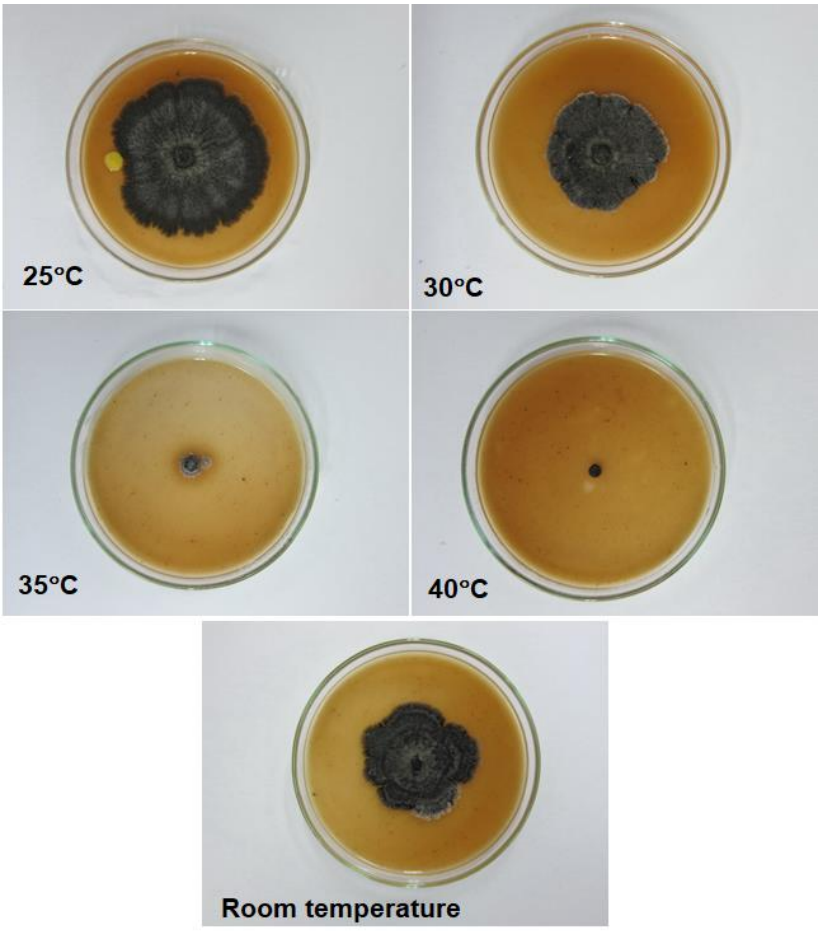

Figure 5: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) after 14 days on various temperature.

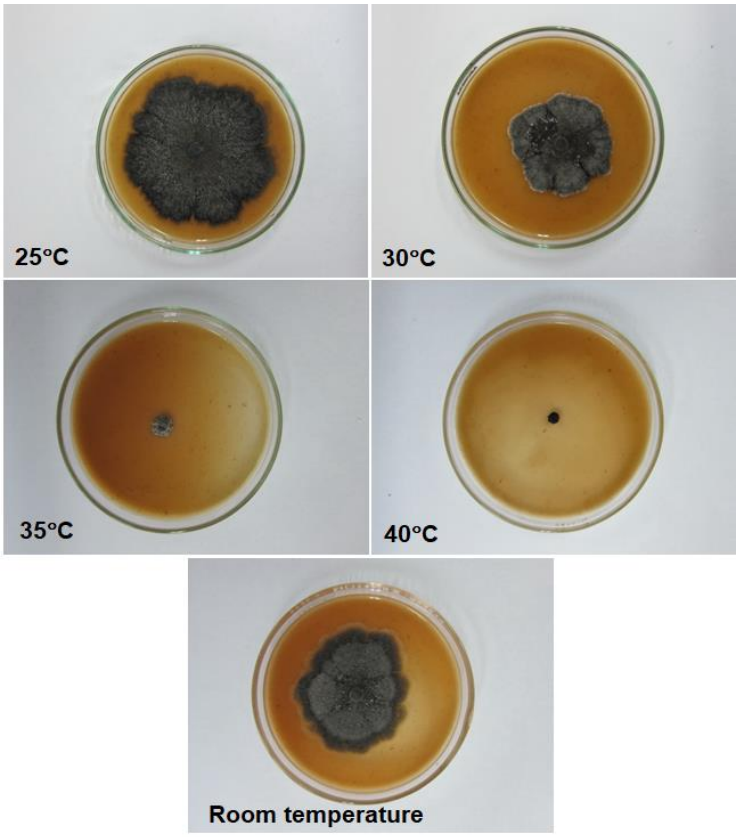

Figure 6: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) after 14 days on various temperature.

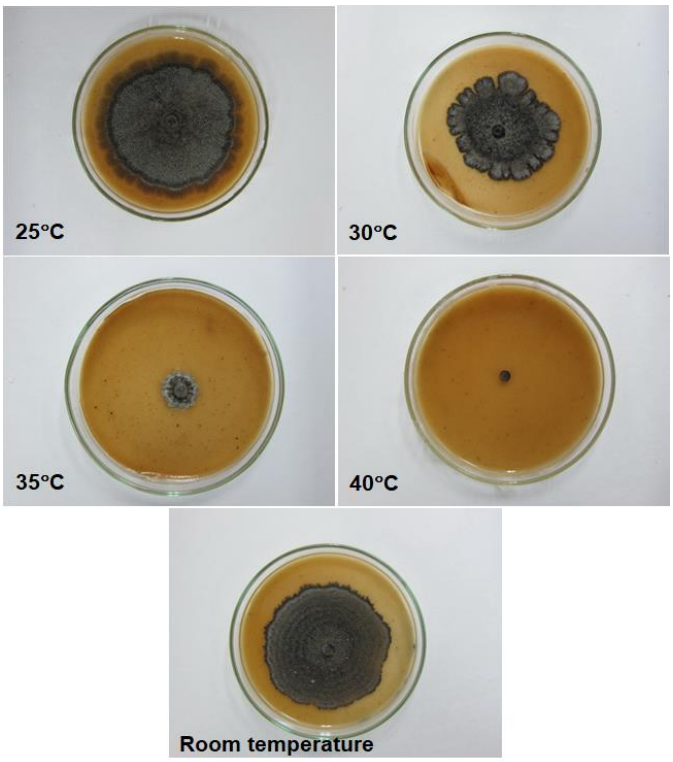

Figure 7: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) after 14 days on

various temperature.

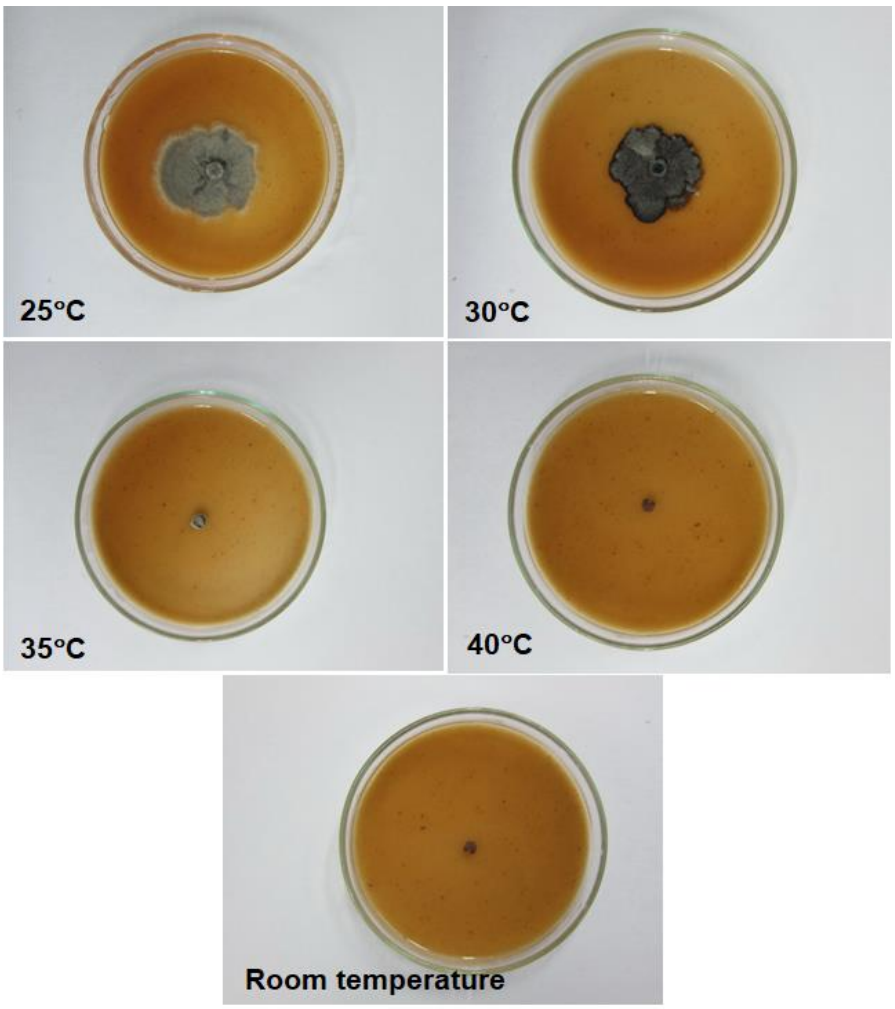

Figure 8: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) after 14 days on various temperature.

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

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

3. ศึกษาวงจรของโรค Tan spot ของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

3.1 กำหนดแปลงทดลอง

สวนส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มีพิกัดภูมิศาสตร์ละติจูด 20 องศา 5 ลิปดา 34 พิลิปดา เหนือ 100 องศา 30 ลิปดา 13 พิลิปดา (20° 05' 34" N 100° 30' 13" E) ระดับความสูงเท่ากับ 366 เมตร (Figure 10)

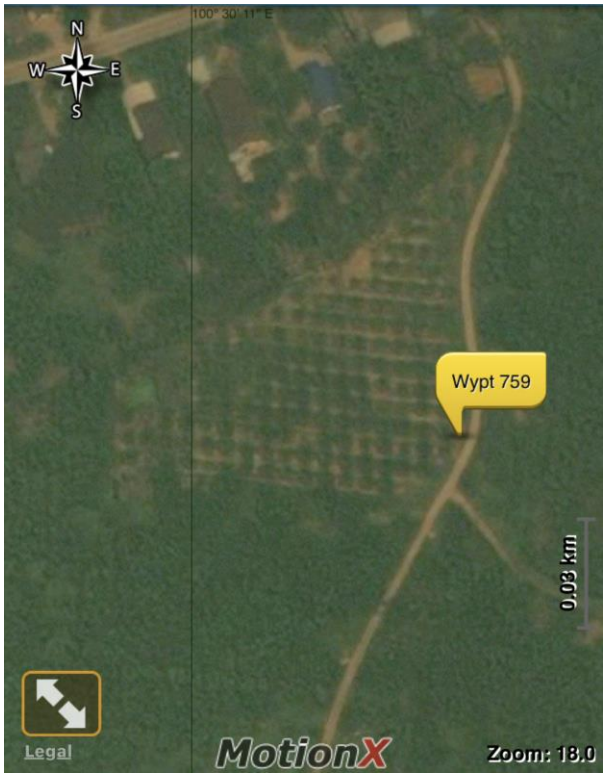

Figure 10: Global Positioning System (GPS) of pummelo plantation in Lai Ngao Sub-district, Wiang Kaen District, Chiang Rai province.

3.2 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *Phyllosticta citriasiana*

เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *P. citriasiana* บนส่วนต่างของพืชในช่วงเดือนตุลาคม 2561 - เดือนมีนาคม 2562 ที่สวนส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มีพิกัดภูมิศาสตร์ ละติจูด 20 องศา 5 ลิปดา 34 พิลิปดา เหนือ 100 องศา 30 ลิปดา 13 พิลิปดา (20° 05' 34" N 100° 30' 13" E) ระดับความสูงเท่ากับ 366 เมตร (Figure 10) **โดยเก็บใบแก่แสดงอาการโรคใบจุดในระยะที่ 1** :ซึ่งพบราสร้างสวนขยายพันธุ์ของเชื้อสีน้ำตาลเข้มอยู่ในแผลใบจุดพบรา *P. citriasiana* เจริญอยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อสีน้ำตาลเข้ม สร้างสปอร์อยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อของเชื้อที่เรียกว่า pycnidia **เก็บใบแก่ปกติมาแยกเชื้อ** พบรา *Guignardia mangiferae* ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญอยู่บนใบ **โดยเก็บใบในระยะที่ 2 ใบอ่อนปกติ** พบรา *G. mangiferae* ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญอยู่บนใบส้มโอปกติ และไม่พบใบอ่อนเป็นโรค **โดยเก็บตัวอย่างดอกในระยะที่ 3** มาทำการแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อรา และ**เก็บตัวอย่างผลอ่อนปกติ.ในระยะที่ 4** มาทำการแยกเชื้อ ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อรา แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนผลส้มโอที่แสดงอาการโรค (Table 3)

การศึกษาวงจรชีวิตของรา *P. citriasiana* ที่ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พบว่าระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วพบโรคจุดน้ำตาลที่ใบและผลที่แสดงอาการโรค ระยะเตรียมต้นก่อนออกดอกจนถึงระยะแตกใบอ่อนและระยะออกดอกนั้นจากการตรวจเชื้อไม่พบโรคจุดน้ำตาลพบแต่รา *Guignardia mangiferae*

บนใบและดอกปกติ ซึ่งราชนิดนี้มีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์ ในระยะติดผลอ่อนพบโรคจุดน้ำตาลที่ใบ และในระยะติดผลจนถึงระยะเก็บเกี่ยวพบโรคจุดน้ำตาลทั้งที่ใบและที่ผล

สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Telomorphic State: *Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

Table 3: *Phyllosticta* species isolated from various part of pummelo.

Fungi isolation	stage 1		stage 2	stage 3	stage 4	stage 5	Time collection
	Mature leaves (healthy)	Mature leaves (disease)	Young leaves (healthy)	Flowers (healthy)	Young fruits (healthy)	Mature fruits (disease)	
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		October 2018
Phyllosticta citriasiana		√	-	-	-		October 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	√	-	-		November 2018
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		November 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	√	-	-		December 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	√	√		January 2019
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		February 2019
Phyllosticta citriasiana		√	-	-	-		February 2019
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	√	√		February 2019
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		March 2019
Phyllosticta citriasiana	-	√	-	-	-		March 2019
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	-	√		March 2019
Phyllosticta citriasiana		√					April 2019
ไม่พบเชื้อ			√				April 2019

Phyllosticta citriasiana		√				√	May 2019
ไม่พบเชื้อ	√				√		May 2019
Phyllosticta citriasiana		√				√	June 2019
ไม่พบเชื้อ	√				√		June 2019

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษาวงจรชีวิตของรา *Phyllosticta citriasiana* ส่วนของพืชที่เป็นโรคแยกได้รา *P. citriasiana* ส่วนของพืชที่ปกติแยกได้รา *Guignardia mangiferae* (Amamorphic State: *Phyllosticta capitalensis*) (Table 3)

3.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

***Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter**

Teleomorph state: -

โรค: ใบจุดน้ำตาล (tan spot)

พืช: ส้มโอ (*Citrus maxima*)

สถานที่: ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ลักษณะอาการ

อาการของโรคพบทั้งบนใบ (Figure 11A) และผลส้มโอ (Figure 11B) ลักษณะอาการของแผลบนผลจะพบได้ตั้งแต่ในระยะที่ผลส้มโอยังมีสีเขียว และอาการจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อผลส้มโอเจริญเติบโตเต็มที่ อาการเริ่มแรกมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ สีน้ำตาล พบในผลส้มโอที่มีสีเขียว (Figure 12A) ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นจุดกลม แผลยุบตัวแต่ไม่ลึก ตรงกลางแผลมีสีเทาหรือสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม แผลมีขนาด 2-10 มิลลิเมตร สีน้ำตาลและมีสีเหลืองล้อมรอบ และเมื่อผลส้มโอใกล้สุก แผลตรงกลางยุบตัวลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา บางครั้งพบราสร้างส่วนขยายพันธุ์ (pycnidia) สีดำ ตรงกลางแผล (Figure 12B) แต่ไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ascocarp) บนแผล ลักษณะอาการแบบนี้เรียกว่า Hard spot lesions (Figure 12B) มักพบอาการลักษณะนี้ในระยะก่อนเก็บเกี่ยว หรือระยะเก็บเกี่ยวช่วงแรก เมื่อส้มโอเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองพบว่ามีจุดแผลเพิ่ม

มากขึ้น และแต่ละแผลอาจรวมตัวกันขยายใหญ่ขึ้น ส่วนใหญ่ราสร้าง pycnidia สีดำ ตรงกลางแผล อาการลักษณะนี้เรียกว่า Freckle spot (Figure 12C) ผลส้มโอที่แก่เต็มที่ และผลส้มโอที่เก็บไว้หลังการเก็บเกี่ยวในที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาการของโรครุนแรงขึ้น มักพบแผลยุบตัว เกิดจุดแผลเป็นจำนวนมาก มีสีน้ำตาล ถึง น้ำตาลแดง และราสร้าง pycndia เป็นจำนวนมาก เรียกอาการลักษณะแผลนี้ว่า Virulent spot (Figure 12D) จากการศึกษาอาการในระยะเริ่มแรกค่อนข้างสับสนเพราะเกิดแผลจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ ค่อนข้างวินิจฉัยยากว่าเป็นโรคหรือไม่ แต่เมื่อเก็บส้มโอที่เป็นโรคไว้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ พบว่าแผลขยายใหญ่ขึ้น และพบว่าราสร้าง Pycnidia เป็นกลุ่มสีดำบนกลางแผล เมื่อนำมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบ pycnidia เป็นกลุ่ม (Figure 13A) และทำการตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ ตรวจใต้กล้อง compound พบว่าราสร้าง conidia ภายใน pycnidia (Figure 13B) ฝังอยู่บนเนื้อเยื่อของผลส้มโอ

ลักษณะอาการบนใบ พบจุดแผลบนใบมีลักษณะของแผลคล้ายกับแผลที่เกิดบนผลส้มโอคือเกิดจุดแผลเล็ก ๆ สีน้ำตาล แผลตรงกลางยุบตัวลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา บางครั้งพบราสร้าง pycnidia สีดำ ตรงกลางแผล (Figure 13A) ส่วนใหญ่จะพบบนใบแก่ ซึ่งใบที่เป็นโรคเหล่านี้จะหลุดร่วงลงดินในที่สุด ถ้าไม่มีการเก็บเศษซากใบเหล่านี้ออกจากแปลงปลูกก็จะเป็นแหล่งของเชื้อสาเหตุในการเข้าทำลายในเวลาที่เหมาะสมต่อไป ลักษณะอาการแผลบนใบจะพบไม่มากนักบนต้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาการบนผลส้มโอ

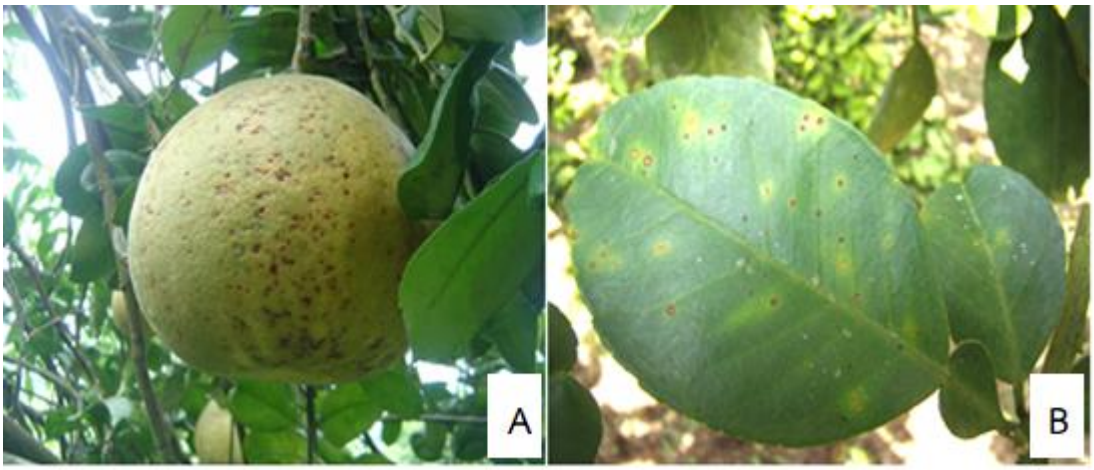

Figure 11: Tan spot symptoms caused by *Phyllosticta citriasiana*:

(A) Typical hard and virulent spot on pummelo fruit;

(B) Hard spot lesion on pummelo leaf

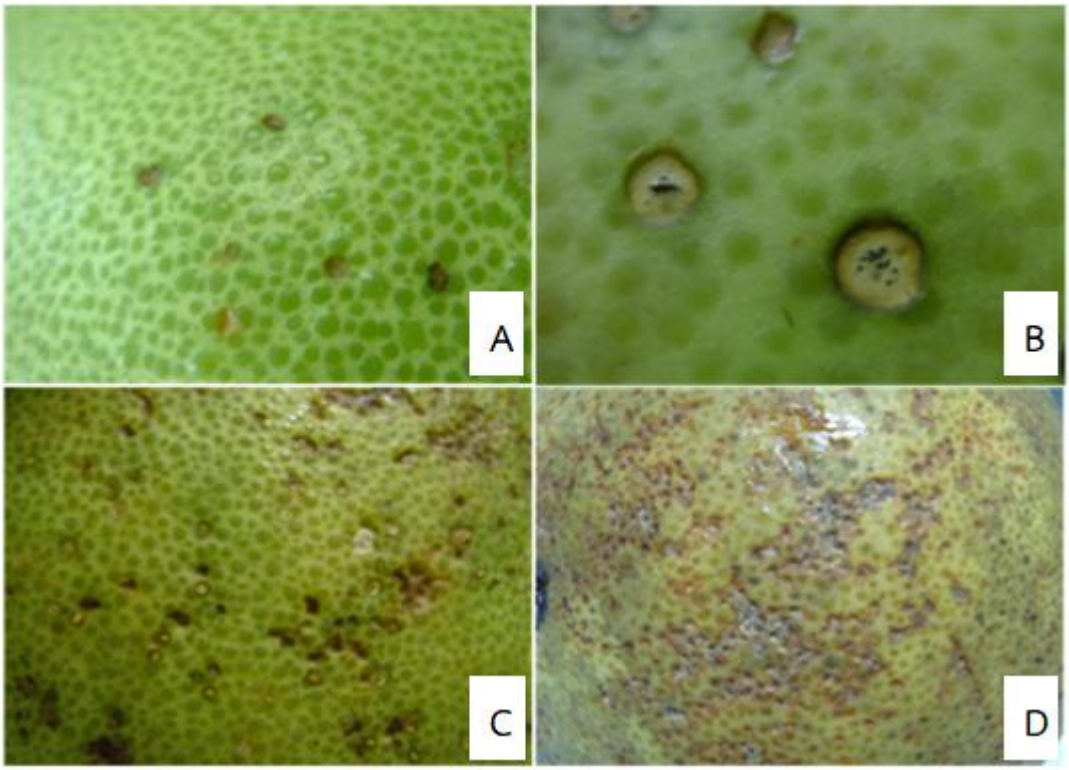

Figure 12: Typical symptoms of tan spot disease on Pummelo:
(A) Lesion on green fruit; (B) Hard spot lesions with pycnidia in the center of the necrotic tissue; (C) Freckle spots;
(D) Virulent spots spread during storage.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากแผลที่มีจุดน้ำตาลอยู่ตรงกลาง เมื่อตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound พบว่าจุดที่อยู่ตรงกลางแผล เป็น fruiting body ของราที่เรียกว่า pycnidia ซึ่งมี conidia เกิดอยู่ภายใน ผลการศึกษาการแยกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำ โดยนำส่วนของผลส้มโอที่แสดงอาการโรคมาทำการแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ PDA จำนวนอย่างละ 40 ชิ้น พบว่าการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากผลเบื้องต้นบนอาหาร PDA พบราที่มีโคโลนีสีเทาดำ เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เนื่องจากอาจเป็นเพราะการซับชิ้นส่วนพืชไม่แห้ง หรือเกิดการปนเปื้อนจากเครื่องมือหรือเทคนิคการปฏิบัติงาน ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราเพื่อการจำแนกชนิดมีดังนี้

ลักษณะโคโลนีของราบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25 มิลลิเมตร (Figure 13G) ที่อุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส โคโลนีของราเจริญเติบโตช้ามาก โคโลนีสีเทาดำ ด้านใต้วุ้นมีสีเทาดำ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็น lobe (Figure 13H) ราจะสร้าง pycnidia เมื่ออายุ 8-10 วัน

ลักษณะ pycnidia ที่พบบริเวณกลางแผลบนผลส้มโอมีรูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม (Figure 13A) pycnidia เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมครอน มี papillate ขนาด 10-13 ไมครอน (Figure 13B)

ลักษณะ pycnidia ที่พบบริเวณกลางแผลบนผลส้มโอมีรูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม (Figure 13A) pycnidia เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมครอน มี papillate ขนาด 10-13 ไมครอน (Figure 13A)

ลักษณะ conidiogenous cells รูปทรงกระบอก (cylindrical) มีขนาด 3.5-8.0 x 2.0-3.0 ไมครอน conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

ลักษณะ conidia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง obovate –elliptical ขนาด 8 x 12 – 6 x 8 ไมครอน conidia มีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ มี oil drop ภายในสปอร์ ปลาย conidia มีลักษณะ truncate base (Figure 13C) มี apical appendage ยาวประมาณ 6-18 ไมครอน (Figure 13D)

ลักษณะ spermatia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง dumb-bell ขนาด 5 – 8 x 1-1.5 ไมครอน มี oil drop อยู่ภายในเซลล์ (Figure 13E, 13F)

จากการศึกษานี้ไม่พบ perithecia และ ascospores บนใบหรือผลที่เป็นโรค และไม่พบบนอาหารสังเคราะห์เช่นกัน ได้สอดคล้องกับรายงานของ Wulandari et al. (2009) ที่รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เพราะราสกุลนี้บางชนิดสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ได้ Baayen et al. (2002) ศึกษารา *Guignardia mangifera* (anamorphic state: *Phyllosticta capitalensis*) ที่แยกได้จากส้มและเป็น nonpathogenic isolate พบว่าสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งราดังกล่าวนี้สามารถแยกได้จากส้มเช่นกัน แต่ความแตกต่างในการสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกระหว่าง *G. mangifera* และ *G. citricarpa* แต่ไม่ได้เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก อย่างไรก็ตามควรจะต้องมีการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุในระดับโมเลกุลเพื่อเป็นการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุต่อไป

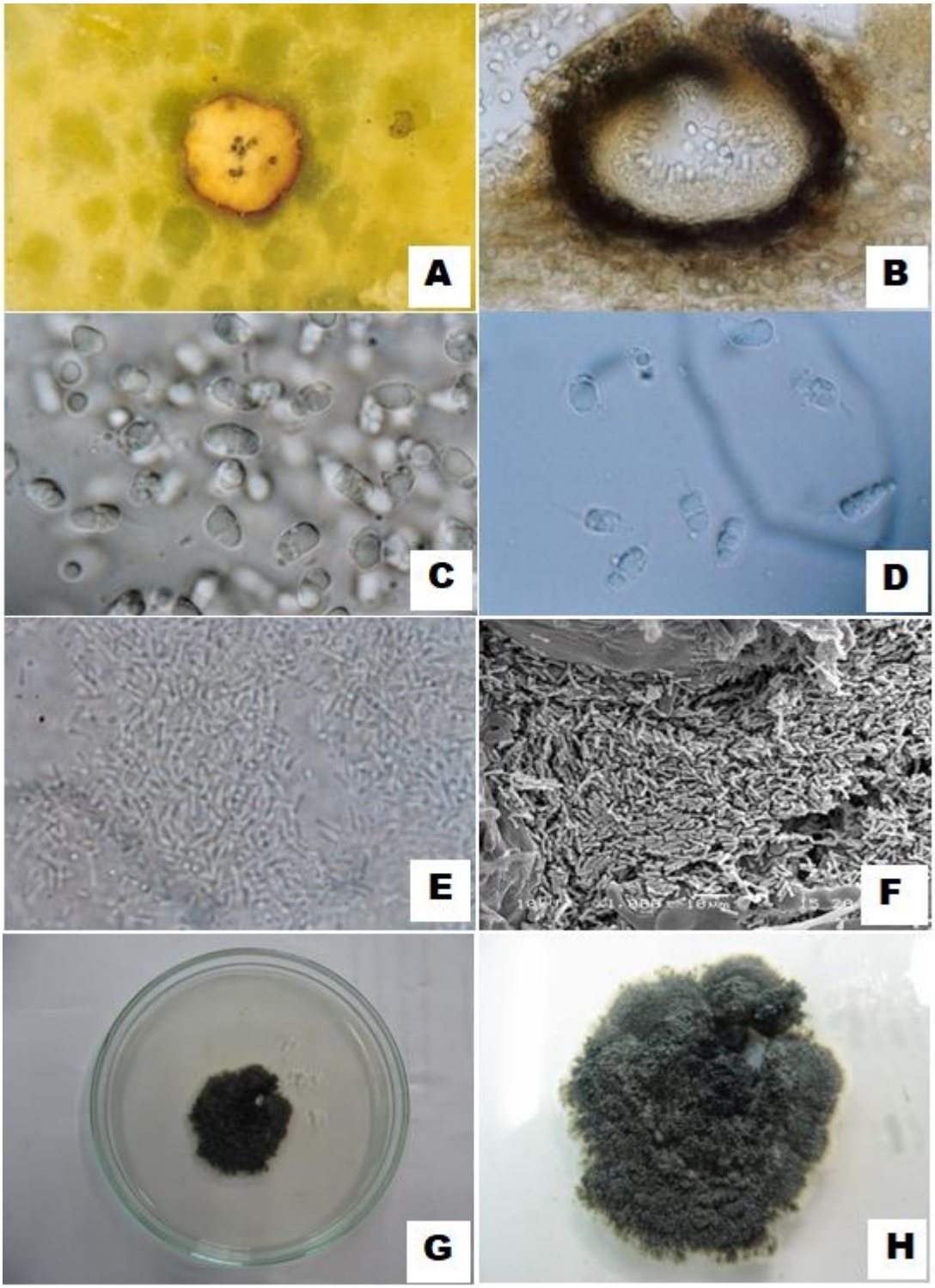

Figure 13: *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo

A) Hard spot lesions with pycnidia in the center of the tissue;

B) Pycnidia (400X); C) Conidium (1000X); D) Conidium with mucoid sheath and apical mucilaginous appendage (1000X);

E) Spermatial state, spermogonium 1000X; F) SEM photomicrograph of spermatia 1000X

G) Colony on PDA, 7 days at 30+2 °C; H) Colony with loab margin

Phyllosticta capitalensis Henn

Teleomorph state: *Guignardia mangiferae* A.J. Roy

เอ็นโดไฟท์: ส้มโอ (*Citrus maxima*)

สถานที่: ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ลักษณะโคโลนี ของราบนอาหาร Potato Dextrose Agar เส้นใยฟู เริ่มแรกโคโลนีสีขาว สร้างเส้นใยเป็นจำนวนมาก ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวถึงสีเขียวเข้มภายใน 2-3 วัน เส้นใยสีขาว ขอบโคโลนีมีรอยหยัก ต่อมาเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มถึงสีดำ ใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ โคโลนีเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน

ลักษณะ pycnidia ลักษณะกลม สีน้ำตาลถึงสีดำ สูง 120-125 ไมครอน กว้าง 135-149 ไมครอน ผนังหนา 12-15 ไมครอน (Figure 14)

ลักษณะ conidiogenous cells รูปทรงกระบอก (cylindrical) สีใส ขนาด 2.2x2.2-3.0 ไมครอน conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

ลักษณะ conidia รูปร่างรีตรงกลางกว้าง ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังเรียบ ขนาด 8–11× 5– 6 ไมครอน โคนิเดียมีเหยื่อหุ้ม มี appendage 1 เส้น ยาว 5-8 ไมครอน

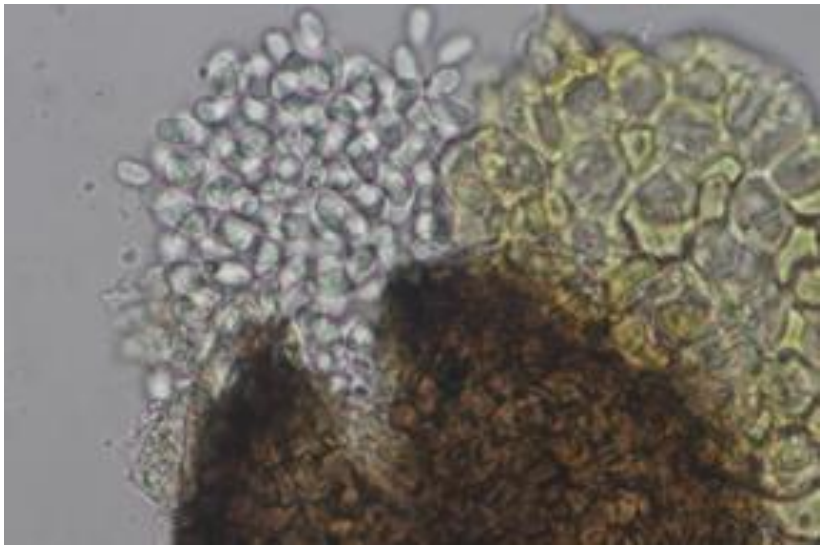

Figure 14: *Phyllosticta capitalensis* isolated from young fruit disease.

1.4 เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้จากตัวอย่างแห้งโรคพืชและราเอ็นดาไฟท์ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ไว้ใน Culture Collection เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Phyllosticta citriasiana* ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิพบว่ารา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา Phyllosticta capa และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana* เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสมของโรค Tan spot ของส้มโอ และเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช (อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช) ดร. ชนินทร ดวงสอาด นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน และน้อง ๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

12. 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 of 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 Institute. 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.