รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ดวยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of *Phyllosticta citriasiana* by Polymerase Chain Reaction

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

Phyllosticta เป็นราสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มและพืชหลายชนิด โดยบางชนิดได้แก่ *P. citricarpa* (syn. *Guignardia citricarpa*) ทำให้เกิดอาการจุดดำ (black spot) บนส้มโอ อีกทั้งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป ด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้เชื้อสาเหตุถูกวินิจฉัยว่าเป็นรา *P. citricarpa* ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการส่งออกส้มโอไปยังต่างประเทศ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความถูกต้องและชัดเจนของการวินิจฉัย จึงศึกษาและจำแนกชนิดของรา *Phyllosticta* ที่ทำให้เกิดอาการจุดสีน้ำตาลบนส้มโอ และพืชอื่น ๆ ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล จากการจัดจำแนกด้วยชุดข้อมูลของรหัสพันธุกรรมตำแหน่ง ITS TEF1 and ACT พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอในประเทศไทย คือ *P. citriasiana* ดังนั้น สถานภาพของรา *P. citricarpa* ยังไม่ปรากฏอยู่ในประเทศไทย นอกจากนี้พบว่ารา *Phyllosticta* สาเหตุของโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กล้วย ทับทิม ฝรั่ง กล้วยไม้ แก้วมังกร คือ *P. capitalensis* และยังพบว่าราชนิดนี้เป็นราชนิดเอนโดไฟท์ของส้มโอและตีนฮุ้ง เพื่อลดข้อจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* โดยใชเทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/PcDOAR3 รวมถึงไพร์เมอร์ที่มีรายงานได้แก่ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ และสามารถนำเยื้อเยื่อจากบริเวณที่แสดงอาการมาตรวจได้โดยตรงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 วัน ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาจากวิธีการเดิมที่ต้องแยกหาเชื้อราสาเหตุ ซึ่งใช้เวลานานกว่า 15 วัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้

นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชกระกูลส้มได้อีกด้วย

Abstract

Phyllosticta species associated with diseases of *Citrus* species and others commodities. *Phyllosticta citricarpa* (syn. *Guignardia citricarpa*), the causal agent of black spot disease of pummelo, has been listed as a quarantine pest for several countries, especially in Europe. Regarding the limitation and similarity of morphological characters of *Phyllosticta* species, the causal agent of tan spot disease of pummelo had been identified as *P. citricarpa*. The uncertainty identification led to the difficulty in export pummelo from Thailand to overseas. To clarify and confirm the identification of the causal agent of spot disease of pummelo, this study was conducted to identify species of *Phyllosticta* isolated from spot lesions on pummelo and also others isolates from some plants based on genealogical concordance approach. The phylogenetic reconstruction of ITS, TEF1 and ACT gene dataset revealed that the causal of tan spot disease of *Citrus maxima* (pummelo) was *P. citriasiana*. Based on the results from this study, the status of *P. citricarpa* (syn. *G. citricarpa*), causal agent of black spot disease, in Thailand is determined as absence. In addition, the isolates of *Phyllosticta* from *Musa acuminata*, *Punica granatum*, *Psidium guajava*, *Hyalocereus undatus* and *Dendrobium* 'Hybrids' were identified as *P. capitalensis*. It was also found that the endophyte *Phyllosticta* obtained from *Paris polyphylla* and *C. maxima* had similar identity to *P. capitalensis*. In order to reduce the limitations of morphological identification and the requirement of fast and accurate diagnosis, the species-specific primer was designed to detect *P. citriasiana*. Three pairs of primers from this study namely, PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 and PcDOAF3/ PcDOAR3 as well as published primers, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4, showed the highly specific results to *P. citriasiana*. In addition, the process of detection had been validated and could detect *P. citriasiana* directly from plant tissue. The fungal isolation from plant materials was not required, which could reduce the time for detecting from more than 15 days to 2 days. Developed the detection method can support the fast and accurate diagnosis of *P. citriasiana*, which could bring the advantages for making a decision for disease management as well as support the export and import of *Citrus* commodities

6. คำนำ

ส้มโอ เป็นไม้ผลที่นิยมของผู้บริโภคภายในและต่างประเทศ จึงมีศักยภาพมากในการส่งออก 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 จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทำให้ประเทศไทยเป็นที่จับตามองว่าเป็นประเทศที่มีโรคจุดดำระบาด ในปี พ.ศ. 2550-2551 ได้มีการศึกษาสาเหตุของโรคและจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น 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* 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 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 ต่อมาพบว่าด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาทำให้เชื้อสาเหตุในกลุ่ม *Phyllosticta* ที่เข้าทำลายพืชกระกูลส้มถูกวินิจฉัยว่าเป็นรา *P. citricarpa* และความแตกต่างนี้สามารถจำแนกได้ด้วยความแตกต่างของข้อมูลพันธุกรรมเท่านั้น

เนื่องการตรวจสอบรา *P. citriasiana* และโรคพืช อาจจะได้ราหลายชนิดในสกุล Phyllosticta ที่อยู่ในกลุ่มของเอ็นโดไฟท์เช่น *P. capitalensis* ซึ่งจะพบมากในเขตร้อนร้อนและกึ่งร้อนชื้นในพืชพื้นเมืองและพืชอื่น ๆ รา *P. capitalensis* สามารถเข้าไปเจริญในแผลได้ โดยทั่วไปการตรวจสอบเชื้อสาเหตุเบื้องต้น ได้แก่การนำผลส้มโอไปบ่มเชื้อ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำไปแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ ซึ่งอาจจะทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดได้ และต้องใช้เวลาหลายวัน (7-15 วัน) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคใหรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นกอนการแสดงอาการของโรค โดยการใชเทคนิคทางชีวโมเลกุลก็เปนแนววทางหนึ่งที่จะสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างรา *P. citriasiana* และ *P. capitalensis* เพื่อตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรตลอดจนเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยราทั้งสองชนิดนี้ต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave
- micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo
- Dry heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum (Glucanex®)
- Lithium Borate buffer (LB)
- PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- SERVA HiSens Stain G
- Nuclease-Free Water
- ไพร์เมอร์ ได้แก่ ITS1/ITS4 (White et al., 1990) และ EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) และ ACT-512F/ ACT-783R (Carbone and Kohn, 1999)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ rose bengal agar (RBA)

6. Sequence assemble program ได้แก่ Geneious Prime 2020.0.3.(https://www.geneious.com)

- วิธีการ

<u>การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllostica citriasiana*</u>

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ (2560-2561)

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้น

สี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Phyllosticta* ที่ศึกษากับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เขี่ยเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward

sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

3. รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.1

4. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar et al., 2008) หรือใช้โปรแกรม online จากเวปไซด์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

5. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *P. citriasiana*

ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ ใช้โปรแกรม GPRIME

6. ทดสอบไพร์เมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *P. citriasiana* และราใน สกุล *Phyllosticta* โดยทำตามขั้นตอน 2.1.5 – 2.1.7

<u>การตรวจสอบรา *Phyllostica citriasiana* ในตัวอย่างต่างๆ ของพืชตระกูลส้ม โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana*</u>

1. การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates) จากแหล่งตัวอย่างๆ พร้อมวิธีการสกัด ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture หรือ mixed cultures ของรา *Phyllosticta*

เขี่ยเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด และตัวอย่างใบส้มร่วง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด หรือใบร่วง จากใบที่ไม่แสดงอาการของโรค มาล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง และนำตัวอย่างใบส้มมาแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินน้ำออกแล้วซับด้วยกระดาษซับจนแห้ง นานประมาณ 5 นาที ย้ายชิ้นตัวอย่างใบส้มลงในถุงพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบส้มออกมาผึ่งที่อุณหูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 17 ชั่วโมง ภายใต้แสง

ฟลูออเรสเซ็นต์ จากนั้นประมาณ 4 วัน ทำการตรวจหาเส้นใยของราที่เจริญออกมาก และอีกประมาณ 10 วัน ตรวจหา fruiting bodies ของราจากนั้นนำตัวอย่างใบพืชที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมากทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผลส้ม

นำตัวอย่างผลส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เฉือนเอาผิวผลส้มบริเวณที่แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 2 x 2 mm ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกิ่งและยอดอ่อนของส้ม

นำตัวอย่างกิ่งหรือยอดอ่อนของส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เฉือนเอาบริเวณผิวที่แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 1-2 mm จากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 6 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณรอบรากของต้นส้ม โดยแยกเอาส่วนของเศษซากพืชหรือใบพืชออกจากตัวอย่างดิน ประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 20 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

2. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะต่อ รา *P. citriasiana* ที่ออกแบบได้

3. การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- การบันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์ราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ราที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllostica citriasiana*</u>

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา

รายละเอียดของรา *Phyllosticta* ดังนี้

Scientific name	*Phyllosticta*
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Subclass	Incertae sedis
Order	Botryosphaeriales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	*Phyllosticta*

Perfect state *Guignardia*

ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชหลายชนิด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืช และที่ผล conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่ง ลำต้น ของพืชด้วย และที่สำคัญรานี้เป็นสาเหตุของโรคจุดดำหรือ Citrus Black Spot ของพืชตระกูลส้มสาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรคจุดดำของส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก มักพบรา *P. capitalensis* (Teleomorph state: G. *mangiferae*) เจริญอยู่ในผลส้มด้วยแต่ไม่แสดงลักษณะอาการ (Glienke-Blanco et al., 2002; Baayen et al., 2002) เช่นเดียวกับโรคจุดน้ำตาล (Tan spot) ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 1) 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 นอกจากนั้นโรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampelicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วย สาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*) (Punithalingam and Holliday, 1975) โรคผลเน่าของฝรั่ง สาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* (anamorphic state: *Phyllosticta psidiicola*) (Gonzlez and Rondn, 2005) เป็นต้น

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราใน genus *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต (DOA 009, 010, 011, 018, 019 058, 040, 088, 090 และ 201) (Table 1) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และนำมาเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร V-8 agar เพื่อนำมาสกัดดี เอ็น เอ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราสกุล *Phyllosticta* จากฐานข้อมูลนานาชาติของรา *Phyllosticta* จาก Wikee *et al*., 2013 (Table 2) โดยจะศึกษาลำดับเบสเพื่อหาความแตกต่างที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Phyllosticta citriasiana* บนตำแหน่ง ITS

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชมาแยกเชื้อสาเหตุ ดังนี้ ที่เกิดจาก *Phyllosticta* มาแยกเชื้อ

1. โรคจุดน้ำตาล (tan spot) ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้รา 2 ไอโซเลต จำแนกเชื้อราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราบนอาหาร PDA จำแนกชนิดเป็นราในสกุล *Phyllosticta* ทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าราสร้างสปอร์ในระยะ anamorph state ทั้ง 2 ไอโซเลต และเก็บตัวอย่างส้มโอโรคจุดน้ำตาล จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มาแยกเชื้อและจำแนกชนิดได้รา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 2)

2. โรคผลจุดดำของผลฝรั่ง มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

3. อาการใบจุดของใบวาสนา มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล*Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

4. อาการใบจุดของส้มโอ จังหวัดนครปฐม มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* จำนวน 2 ไอโซเลต (จากวัดไร่ขิง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และอำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม) (Figure 3)

5. อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 ไอโซเลต

6. ใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา

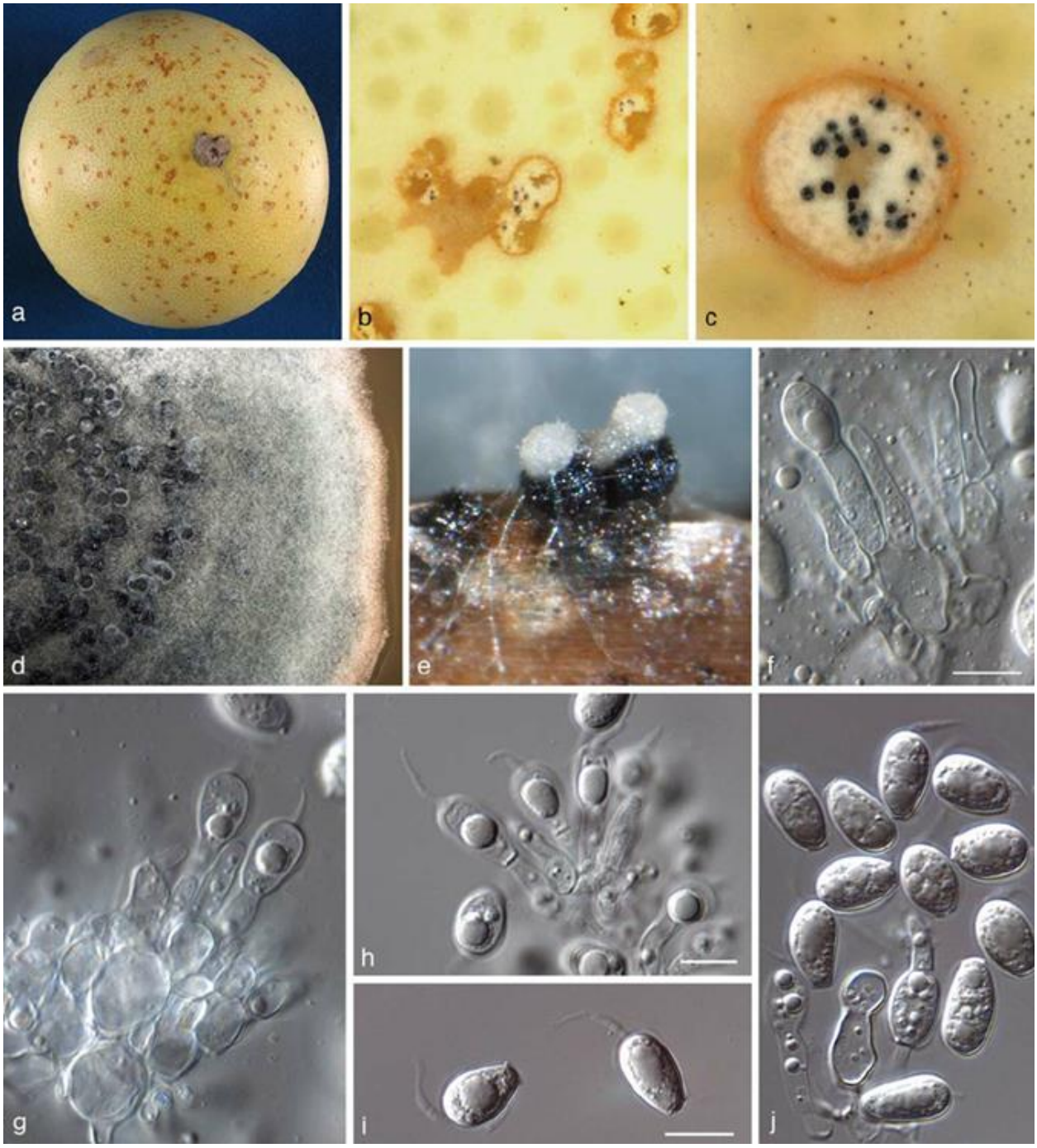

Figure 1: *Phyllosticta citriasiana.* (Photo by: Wulandari *et al*., 2009)

a–c) Symptoms on fruit of Citrus maxima.

d) Colony on malt extract agar.

e) Pycnidia sporulating on sterile pine needles on tap-water agar. f–h) Conidiogenous cells giving rise to solitary conidia.

i, j) Conidia with mucoid sheath and apical mucilaginous appendage visible. Scale bars = 10 µm

Table 1: List of *Phyllosticta* collected in this study

Isolate	*Phyllosticta*	Host	Location	Source
009	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
010	*P. citriasiana*	*Citrus maxima*	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
011	*Phyllosticta sp.*	*Citrus maxima*	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
018	*P. mangifera-indica*	*Mangifera indica*	Chanthaburi	collection
019	*P. citriasiana*	*Citrus maxima*	Nakhon Pathom	collection
040	*Phyllosticta* sp.	*Artocarpus heterophyllus*	Bangkok	collection
058	*P. captilalensis*	*Dracaena goldieana*	Bangkok	collection
201	*P. captilalensis*	*Punica granatum*	Chiang Rai	collection
088	*P. citriasiana*	*Citrus maxima*	Chiang Dao, Chiang Mai	collection
090	*P. citriasiana*	*Citrus maxima*	Kasetsombun, Chaiyapum	collection
	P. captilalensis	*Dendrobium* sp.	Chiang Rai	collection
091	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Kasetsombun, Chaiyapum	isolation
092	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Kasetsombun, Chaiyapum	isolation
093	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Kasetsombun, Chaiyapum	isolation
094	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Kasetsombun, Chaiyapum	isolation
116	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
117	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Phutthamonthon, Nakhon Pathom	isolation
118	*Phyllosticta sp.*	*Dendrobium* sp.	Sai Noi, Nonthaburi	isolation
119	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
120	*Phyllosticta* sp.	*Citrus maxima*	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
121	*Phyllosticta* sp.	*Guava psidii*	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
	Phyllosticta sp.	*Dendrobium* sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation
	Phyllosticta sp.	*Musa* sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation

Table 2: *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al*., 2013

Species	Culture no.[1]	Host	Country	GenBank no.[2]				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	CPC 20258	*Ophiopogon japonicus*	Thailand	KC291339	KF206245	KC342559	KC342536	KF289094
	CPC 20259	*Orchidaceae*	Thailand	KC291340	KF206244	KC342560	KC342537	KF289104
	CPC 20263	*Magnoliaceae*	Thailand	KC291341	KF206241	KC342561	KC342538	KF289085
	CPC 20265	*Euphobiaceae*	Thailand	KF206194	KF206239	KF289182	KF289297	KF289105
	CPC 20266	*Polyscias* sp.	Thailand	KC291342	KF206238	KC342562	KC342539	KF289109
	CPC 20267	*Baccaurea ramiflora*	Thailand	KF206195	KF206237	KF289173	KF306233	KF289078
	CPC 20268	*Hibiscus syriacus*	Thailand	KC291343	KF206236	KC342563	KC342540	KF289117
	CPC 20269	*Ophiopogon japonicus*	Thailand	KC291344	KF206235	KC342564	KC342541	KF289118
	CPC 20270	*Tectona grandis*	Thailand	KC291345	KF206234	KC342565	KC342542	KF289110
	CPC 20271	*Crinum asiaticum*	Thailand	KF206196	KF206233	KF289183	KF289298	KF289106
	CPC 20272	*Orchidaceae*	Thailand	KC291346	KF206232	KC342566	KC342543	KF289079
	CPC 20274	*Mangifera indica*	Thailand	KF206197	KF206231	KF289188	KF289299	KF289119
	CPC 20275	*Polyalthia longifolia*	Thailand	KC291347	KF206230	KC342567	KC342544	KF289107
	CPC 20278	*Euphorbia milii*	Thailand	KC291348	KF206227	KC342568	KC342545	KF289113
	CPC 20423	*Philodendron* sp.	Thailand	KC291349	KF206226	KC342569	KC342546	KF289116
	CPC 20508	*Ixora chinensis*	Thailand	KF206198	KF206225	KF289185	KF289302	KF289111
	CPC 20509	*Cordyline fruticosa*	Thailand	KF206199	KF206224	KF289186	KF289303	KF289112
	CPC 20510	*Pyrrosia adnascens*	Thailand	KF206200	KF206223	KF289174	KF289304	KF289080
	CPC 21035	*Citrus* sp.		KF206201	-	-	KF289305	-
	LGMF 219	*Citrus sinensis*	Brazil	KF206202	KF206220	JF261490	KF289306	JF343737
	LGMF 220	*Citrus sinensis*	Brazil	KF206203	KF206219	JF261488	KF289307	JF343735
	LGMF 222	*Citrus sinensis*	Brazil	KF206204	KF206218	JF261492	KF289308	JF343739
P. citriasiana	**CBS 120486**	*Citrus maxima*	Thailand	FJ538360	KF206314	FJ538418	FJ538476	JF343686
	CBS 120487	*Citrus maxima*	China	FJ538361	KF206313	FJ538419	FJ538477	JF343687
	CBS 120488	*Citrus maxima*	Thailand	JN692545	KF206312	JN692533	JN692521	KF289144
	CBS 123370	*Citrus maxima*	Vietnam	FJ538355	KF206310	FJ538413	FJ538471	JF343689
	CBS 123371	*Citrus maxima*	Vietnam	FJ538356	KF206309	FJ538414	FJ538472	JF343690
	CBS 123372	*Citrus maxima*	Vietnam	FJ538357	KF206308	FJ538415	FJ538473	KF289145
P. citribraziliensis	**CBS 100098**	*Citrus limon*	Brazil	FJ538352	KF206221	FJ538410	FJ538468	JF343691
	CPC 17464	*Citrus* sp.	Brazil	KF170300	KF206263	KF289224	KF289280	KF289159
	CPC 17465	*Citrus* sp.	Brazil	KF170301	KF206262	KF289225	KF289281	KF289160
	CPC 17466	*Citrus* sp.	Brazil	KF170302	KF206261	KF289226	KF289282	KF289161
P. citricarpa	CBS 102374	*Citrus aurantium*	Brazil	FJ538313	KF206324	GU349053	FJ538429	JF343679
	CBS 120489	*Citrus sinensis*	Brazil	FJ538315	KF206311	FJ538373	FJ538431	KF289150
	CBS 127454	*Citrus limon*	Australia	JF343583	KF206306	JF343604	JF343667	JF343771
	CBS 127452	*Citrus reticulata*	Australia	JF343581	KF206307	JF343602	KF289241	JF343769
	CBS 127455	*Citrus sinensis*	Australia	JF343584	KF206305	JF343605	JF343668	JF343772
	CBS 122482	*Citrus sinensis*	Zimbabwe	FJ538317	KF306230	FJ538375	KF289265	KF289146
	CPC 16586	*Citrus limon*	Argentina	KF170293	KF206274	KF289220	KF289269	KF289155
	CPC 16587	*Citrus limon*	Argentina	KF170294	KF206273	KF289219	KF289270	KF289154
	CPC 16603	*Citrus limon*	Uruguay	KF170295	KF206269	KF289213	KF289274	KF289147
	CPC 16604	*Citrus limon*	Uruguay	KF206191	-	-	KF289292	-
	CPC 16605	*Citrus limon*	Uruguay	KF170296	KF206268	KF289214	KF289275	KF289148
	CPC 16606	*Citrus limon*	Uruguay	KF170297	KF206267	KF289215	KF289276	KF289149
	CPC 16609	*Citrus* sp.	Argentina	KF170298	KF206266	KF289217	KF289277	KF289152
	CPC 16149	*Citrus* sp.	Argentina	KF170290	KF206277	KF289216	KF289266	KF289151
	CPC 16151	*Citrus* sp.	South Africa	KF170291	KF206276	KF289221	KF289267	KF289156
	CPC 16152	*Citrus* sp.	South Africa	KF170292	KF206275	KF289218	KF289268	KF289153
P. citrichinaensis	**ZJUCC 200956**	*Citrus reticulata*	China	JN791620	-	JN791459	JN791533	-
	ZJUCC 200964	*Citrus maxima*	China	JN791611	-	JN791461	JN791535	-

Table 2: Continued

Species	Culture no.[1]	Host	Country	GenBank no.[2]				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	ZJUCC 2010150	*Citrus maxima*	China	JN791662	-	JN791514	JN791582	-
	ZJUCC 2010152	*Citrus sinensis*	China	JN791664	-	JN791515	JN791589	-
P. citrimaxima	**CPC 20276** = MFLUCC10-0137 = CBS 136059	*Citrus maxima*	Thailand	KF170304	KF206229	KF289222	KF289300	KF289157
P. concentrica	**CBS 937.70**	*Hedera helix*	Italy	FJ538350	KF206291	FJ538408	KF289257	JF411745
	CBS 134749 = CPC 18842	*Hedera* sp.	Spain	KF170310	KF206256	KF289228	KF289288	KF289163
P. cordylinophila	CPC 21880 = MUCCJ 521	*Cordyline fruticosa*	Japan	AB454357	AB454357	-	AB704244	-
	CPC 20261 = MFLUCC10-0166 = WK024	*Cordyline fruticosa*	Thailand	KF170287	KF206242	KF289172	KF289295	KF289076
	CPC 20277 = MFLUCC12-0014 = WK048	*Cordyline fruticosa*	Thailand	KF170288	KF206228	KF289171	KF289301	KF289075
P. cornicola	CBS 111639	*Cornus florida*	USA	KF170307	-	-	KF289234	-
P. cussonia	CPC 13812	*Cussonia* sp.	South Africa	KF170311	KF206282	KF289223	KF289262	KF289158
	CPC 14873	*Cussonia* sp.	South Africa	JF343578	KF206279	JF343599	JF343662	JF343764
	CPC 14875	*Cussonia* sp.	South Africa	JF343579	KF206278	JF343600	JF343663	JF343765
P. elongata	**CBS 126.22**	*Oxycoccus macrocarpos*	USA	FJ538353	AB095508	FJ538411	FJ538469	KF289164
P. ericarum	**CBS 132534** = CPC 19744	*Erica gracilis*	South Africa	KF206170	KF206253	KF289227	KF28291	KF289162
P. eugeniae	CBS 445.82	*Eugenia aromatica*	Indonesia	AY042926	KF206288	KF289208	KF289246	KF289139
P. foliorum	CBS 174.77	*Cryptomeria japonica*	USA	KF170308	KF206290	KF289200	KF289245	KF289131
	CBS 447.68	*Taxus baccata*	Netherlands	KF170309	KF206287	KF289201	KF289247	KF289132
P. gaultheriae	**CBS 447.70**	*Gaultheria humifusa*	USA	JN692543	KF206298	JN692531	KF289248	JN692508
P. hamamelidis	MUCC 149	*Hamamelis japonica*	Japan	KF170289	-	-	KF289309	-
P. hostae	**CGMCC 3.14355**	*Hosta plantaginea*	China	JN692535	-	JN692523	JN692511	JN692503
	CGMCC 3.14356	*Hosta plantaginea*	China	JN692536	-	JN692524	JN692512	JN692504
	CGMCC 3.14357	*Hosta plantaginea*	China	JN692537	-	JN692525	JN692513	JN692505
P. hubeiensis	**CGMCC 3.14986**	*Viburnum odoratissimim*	China	JX025037	-	JX025042	JX025032	JX025027
	CGMCC 3.14987	*Viburnum odoratissimim*	China	JX025038	-	JX025043	JX025033	JX025028
	CGMCC 3.14988	*Viburnum odoratissimim*	China	JX025039	-	JX025044	JX025034	JX025029
P. hymenocallidicola	**CBS 131309**	*Hymenocallis littoralis*	Australia	JQ044423	JQ044443	KF289211	KF289242	KF289142
	CPC 19331	*Hymenocallis littoralis*	Australia	KF170303	KF206254	KF289212	KF289290	KF289143
P. hypoglossi	CBS 101.72	*Ruscus aculeatus*	Italy	FJ538365	KF206326	FJ538423	FJ538481	JF343694
	CBS 167.85	*Ruscus hypoglossum*	Italy	FJ538366	KF206302	FJ538424	FJ538482	JF343696
	CBS 434.92	*Ruscus aculeatus*	Italy	FJ538367	KF206299	FJ538425	FJ538483	JF343695
P. ilicis-aquifolii	**CGMCC 3.14358**	*Ilex aquifolium*	China	JN692538	-	JN692526	JN692514	-
	CGMCC 3.14359	*Ilex aquifolium*	China	JN692539	-	JN692527	JN692515	-
	CGMCC 3.14360	*Ilex aquifolium*	China	JN692540	-	JN692528	JN692516	-
P. leucothoicola	**MUCC 553 = CBS 136073**	*Leucothoe catesbaei*	Japan	AB454370	AB454370	-	KF289310	-
P. mangifera-indica	**CPC 20274** = MFLUCC10-0029	*Mangifera indica*	Thailand	KF170305	KF206240	KF289190	KF289296	KF289121
P. minima	**CBS 585.84** = IFO 32917	*Acer rubrum*	USA	KF206176	KF206286	KF289204	KF289249	KF289135
P. neopyrolae	**CPC 21879** = MUCC 125	*Pyrola asarifolia*	Japan	AB454318	AB454318	-	AB704233	-
P. owaniana	**CBS 776.97** = CPC 1009	*Brabejum stellatifolium*	South Africa	FJ538368	KF206293	FJ538426	KF289254	JF343767
	CPC 14901	*Brabejum stellatifolium*	South Africa	JF261462	KF206303	JF261504	KF289243	JF343766
P. pachysandricola	**MUCC 124** = NBRC 102276	*Pachysandra terminalis*	Japan	AB454317	AB454317	-	AB704232	-
P. paxistimae	**CBS 112527**	*Paxistima mysinites*	USA	KF206172	KF206320	KF289209	KF289239	KF289140
P. piloprina	CBS 587.69	*Ilex aquifolium*	Spain	KF154278	KF206297	KF289206	KF289250	KF289137
	CBS 616.72	*Ilex aquifolium*	Germany	KF154279	KF206296	KF289205	KF289251	KF289136
P. podocarpicola	**CBS 728.79**	*Podocarpus maki*	USA	KF206173	KF206295	KF289203	KF289252	KF289134

Table 2: Continued

Species	Culture no.[1]	Host	Country	GenBank no.[2]				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
P. podocarpi	CBS 111646	*Podocarpus falcatus*	South Africa	AF312013	KF206323	KC357671	KC357670	KF289169
	CBS 111647	*Podocarpus lanceolata*	South Africa	KF154276	KF206322	KF289232	KF289235	KF268168
P. pseudotsugae	CBS 111649	*Pseudotsuga menziesii*	USA	KF154277	KF206321	KF289231	KF289236	KF289167
P. rhaphiolepidis	**MUCC 432**	*Rhaphiolepis indica*	Japan	DQ632660	-	DQ632724	AB704242	-
P. rubra	**CBS 111635**	*Acer rubrum*	USA	KF206171	EU754194	KF289198	KF289233	KF289129
P. sphaeropsoidea	CBS 756.70 = IFO 32905	*Aesculus hippocastanum*	Germany	AY042934	KF206294	KF289202	KF289253	KF289133
P. spinarum	CBS 292.90	*Chamaecyparis pisifera*	France	JF343585	KF206301	JF343606	JF343669	JF343773
P. styracicola	**CGMCC 3.14985**	*Styrax gradiflorus*	China	JX052040	-	JX025045	JX025035	JX025030
	CGMCC 3.14989	*Styrax gradiflorus*	China	JX052041	-	JX025046	JX025036	JX025031
P. telopeae	**CBS 777.97**	*Telopea speciosissima*	Tasmania	KF206205	KF206285	KF289210	KF289255	KF289141
P. vacciniicola	**CPC 18590**	*Vaccinium macrocarpum*	USA	KF170312	KF206257	KF289229	KF289287	KF289165
P. yuccae	CBS 112065	*Yucca elephantipes*	USA	KF206175	-	-	KF289237	-
Phyllosticta sp.	CPC 11336	*Eucalyptus globulus*	Spain	KF206177	KF206284	KF289199	KF289258	KF289130
	MUCC 147	*Rhododendron keiskei*	Japan	AB454319	AB454319	-	AB704234	-
	CPC 17454	*Mangifera indica*	Brazil	KF206206	KF206265	KF289192	KF289278	KF289123
	CPC 17455	*Mangifera indica*	Brazil	KF206207	KF206264	KF289191	KF289279	KF289122

[1]**CPC:** Culture collection of P.W. Crous, housed at CBS; IFO: Institute For Fermentation, Osaka, Japan; IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakeham Lane, U.K.; LGMF: Culture collection of Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil, CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands; ZJUCC: Zhejiang University Culture Collection, China; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection; CGMCC: China, General Microbiological Culture Collection, Beijing, China; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie prefecture, Japan. Type and ex-type cultures are in bold.

[2]**ITS:** Internal transcribed spacers 1 and 2 together with 5.8S nrDNA; LSU: large subunit 28S nrDNA; TEF1: partial translation elongation factor 1-α gene; ACT: partial actin gene; GPDH: partial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. (Wikee et al. 2013)

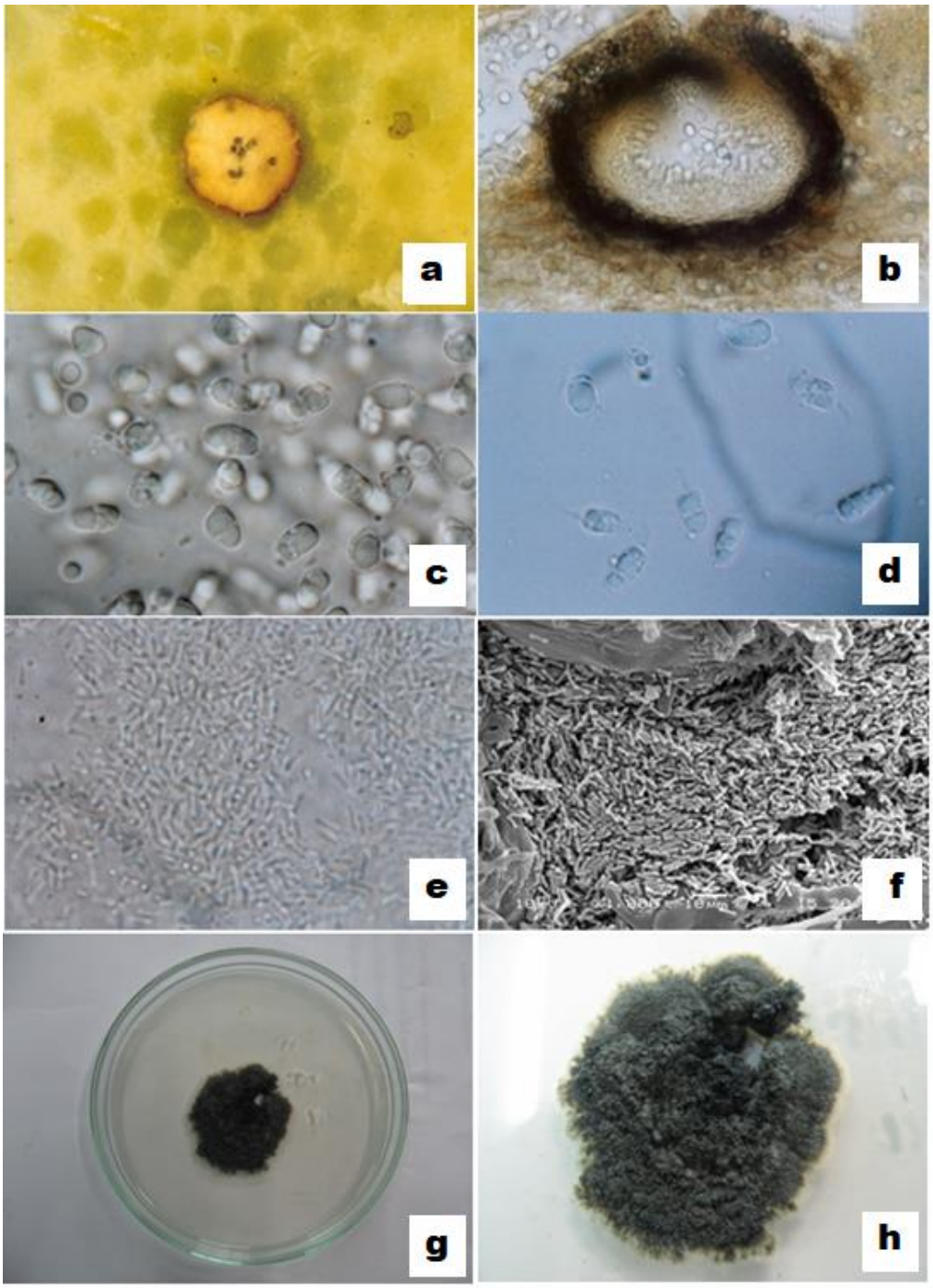

Figure 2: *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo.

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 ℃

h) Colony with loab margin

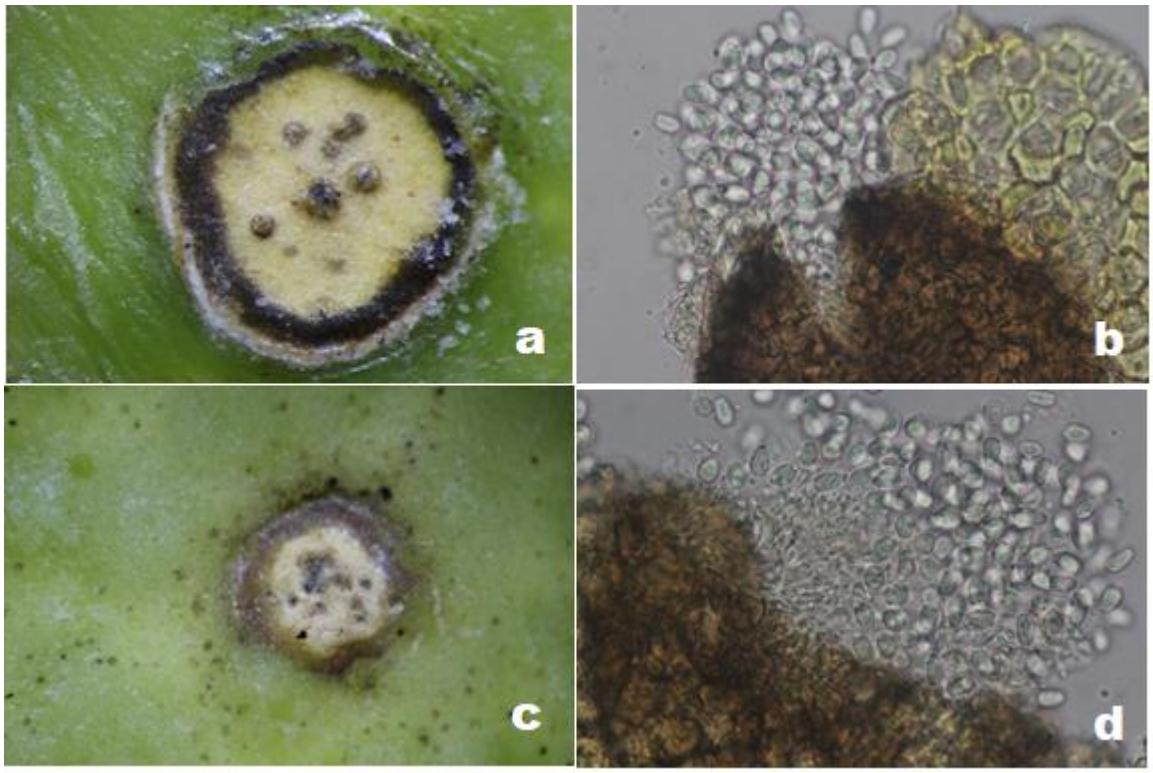

Figure 3: *Phyllosticta* sp. Isolated from fruit of pummelo at Nakhon Pathom province.

a) Tan spot on pummelo fruit at Wae Rai-Khing, Nakhon Pathom province

b) conidium

c) Tan spot on pummelo fruit at Phutthamonthon, Nakhon Pathom province

d) conidium

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราจากข้อ 2.1.1 บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

จากตัวอย่างโรคจุดน้ำตาลของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โรคผลจุดดำของฝรั่ง อาการใบจุดของใบวาสนา อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ และใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และจำแนกชนิดเป็นรา *Phyllosticta* spp. ทั้งหมด

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่

แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยเลี้ยงรา *Phyllosticta* จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ *Phyllosticta mangifera-indica* (018) แยกได้จากมะม่วง *Phyllosticta* sp (040) แยกได้จากขนุน *P. captilalensis* (058) แยกได้จากต้นวาสนา *P. captilalensis* (201) แยกได้จากทับทิม *Phyllosticta* sp (118) แยกได้จากกล้วยไม้ *Dendrobium* และ *Phyllosticta* sp (121) แยกได้จากฝรั่ง และแยกได้จากกล้วย 2 ไอโซเลต (Table 1) และสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา Phyllosticta spp. จำนวน 10 ไอโซเลต โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และส่ง Sequencing จากนั้นทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจัดจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจัดจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป ทำการออกแบบและได้คู่ไพร์เมอร์จำนวน 3 คู่ เพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะในการตรวจคัดเลือกการวิเคราะห์รา *Phyllosticta citriasiana* และทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์กับข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* ในฐานข้อมูล GenBank (Figure 4)

2.1.8 ทดสอบความจำเพาะและความสามารถของคู่ไพร์เมอร์ในการตรวจจับรา *P. citriasiana* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างโดยปฏิกริยา PCR

ดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ต่อรา *Phyllosticta* spp. จำนวน 6 เส้น คือ PcDOAF1, PcDOAR1, PcDOAF2, PcDOAR2, PcDOAF3 และ PcDOAR3 พบว่าไพร์เมอร์ PcDOAF1 และ PcDOAF2 จำเพาะต่อ *P. citriasiana* เพียงชนิดเดียว แต่ PcDOAF3 สามารถ align ได้ทั้งรา *P. citriasiana* และ *P. citrimaxima* (Figure 5) ทั้งนี้ reverse ไพร์เมอร์ทั้ง 3 แบบ (PcDOAR1 PcDOAR2 และ PcDOAR3) มีความจำเพาะต่ำ ซึ่งสามารถ anneal กับ *Phyllosticta* หลายชนิด ได้แก่ *P. citriasiana*, *P. citrimaxima, P. citricarpa, P. brazilianiae, P. citrichinaensis, P. citribrazilliensis* และ *P. brazilianiae*

ทำการ optimize ไพร์เมอร์จำนวน 8 คู่ ต่อรา *P. citriasiana* isolate M0086 ได้แก่ PcDOAF1/PcDOAR1, PcDOAF1/ITS4, PcDOAF2/PcDOAR2, PcDOAF2/ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3,

PcDOAF3/ITS4 (ออกแบบในการทดลองนี้), Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 (ออกแบบโดย Wang et al., 2011) ได้ annealing temperature อยู่ระหว่างอุณหภูมิ 46-60 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 56-60 องศาเซลเซียส (Figure 6)

ผลการทดสอบ primer จำนวน 8 คู่ ต่อ DNA ที่สกัดจาก culture ของ รา *Phyllosticta* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ M0085, M0086, M0089, M0387, M0413, M0414 M0415 และ*Colletotrichum* sp. isolate M0301 พบว่า PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3, PcDOAF3/ITS4, Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana* (Figure 7)

ผลการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ตัดจากเนื้อเยื่อผิวส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล พบว่าไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับได้ (Figure 8)

ผลการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ระยะ 0 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เซนติเมตร (Figure 9) พบว่าเบื้องต้น ไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ ในเนื้อเยื่อใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลได้ห่างสุดประมาณ 1.5-3 เซนติเมตร (Figure 9)

CBS120486_*Phyllosticta_citriasiana* ITS region from TYPE material

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAAAGGTAAT
GGAAGGGGAGGCCGTAAAAAAGCCGCCCAACCTACCTTCACACCCTTGTGTATCTACCACGTTGCTTTGGCG
GGCCGACCCGGTTTTGACCCGGGCGGTCGGTGCCCCCAGCCTAGTTTATGGGCCAGGACGCCTGGCTAAGT
GCCCGCCAGTATACAAAACTCAAGCGATTATTTTGTGTAGTCCTGAGAATTCATTTAATGAAGTAAAACTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCG
TCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGACGTCCGCTGCCGGACGCGCCTGGAAGACCTCGGCG
ACGGCGTCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGGAGGGAGGCGCTGGCCGCCGGACA
ATCGACCTTCGGTCACTATTTTTCCAAGGTTGACCT

M0086 *Phyllosticta citriasiana*

GAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAA
AGGTAATGGAAGGGGAGGCCGTAAAAAAGCCGCCCAACCTACCTTCACACCCTTGTGTATCTACCACGTTGC
TTTGGCGGGCCGACCCGGTTTTGACCCGGGCGGTCGGTGCCCCCAGCCTAGTTTATGGGCCAGGACGCCTG
GCTAAGTGCCCGCCAGTATACAAAACTCAAGCGATTATTTTGTGTAGTCCTGAGAATTCATTTAATGAAGTAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT

TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGT
TCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGACGTCCGCTGCCGGACGCGCCTGGAAGAC
CTCGGCGACGGCGTCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGGAGGGAGGCGCTGGCCG
CCGGACAATCGACCTTCGGTCACTATTTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
AGCTAA

Figure 4: Aligning sites of specific primers on ITS region of *Phyllosticta citriasiana*.

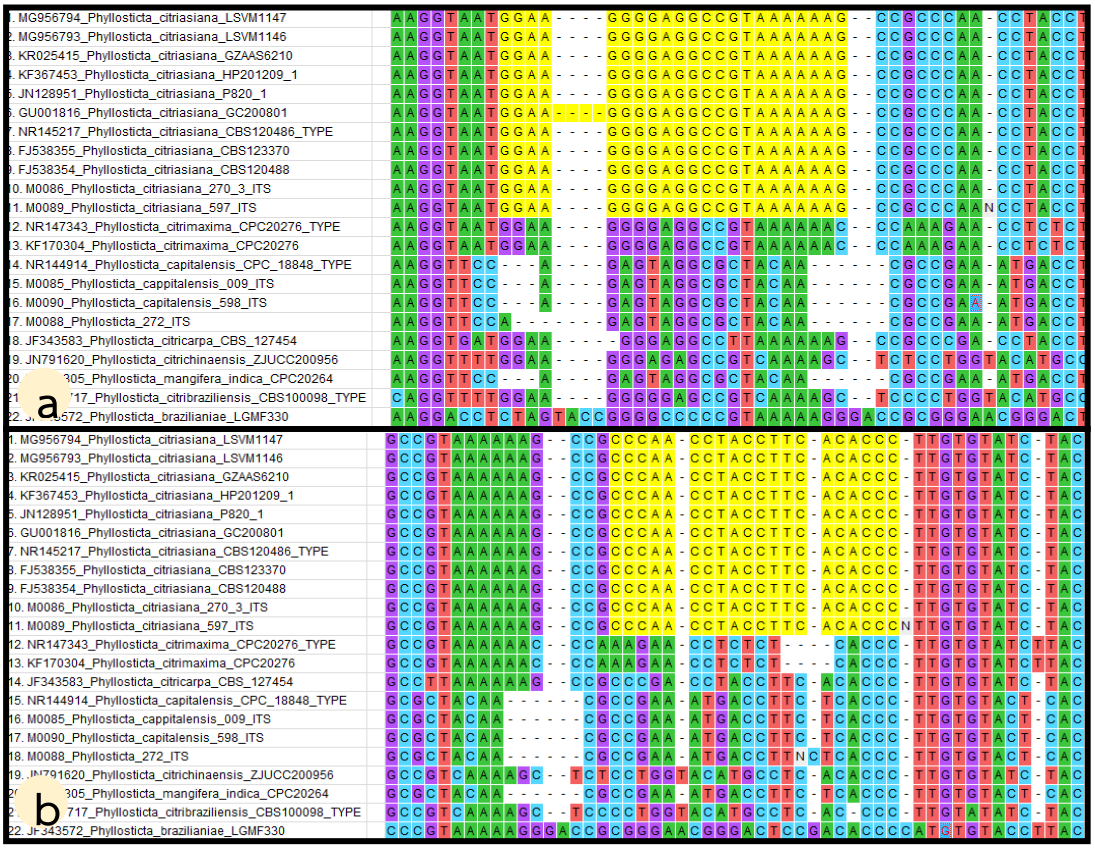

Figure 5: The specificity of primers to *Phyllosticta citriasiana*

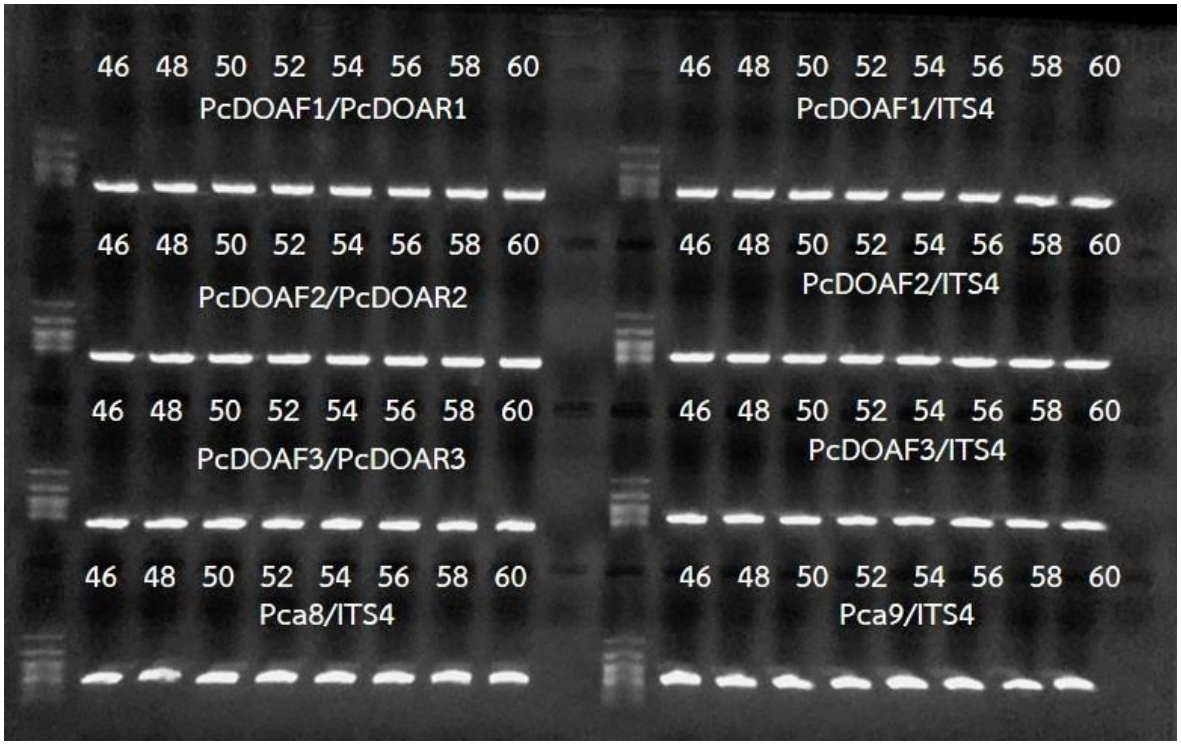

Figure 6: The PCR optimization of 8 pairs of primer

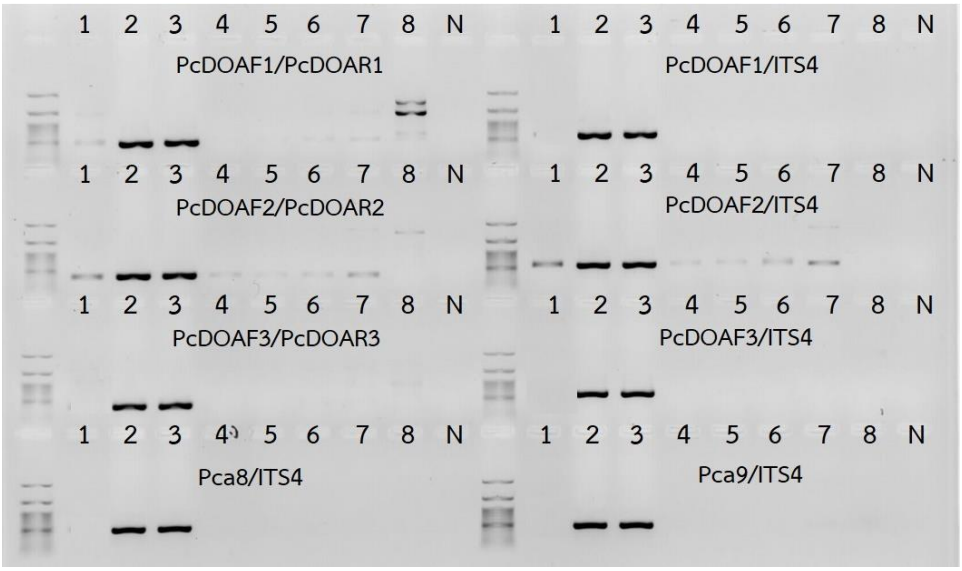

Figure 7: The specificities of primers to fungal taxa (1: *P. capitalensis*; 2-3: *P. citriasiana*; 4: *Phyllosticta* on *Punica granatum*; 5: *Phyllosticta* on guava; 6: *Phyllosticta* on *Dendrobium*; 7: *Phyllosticta* on *Musa* sp.; 8: *Colletotrichum*)

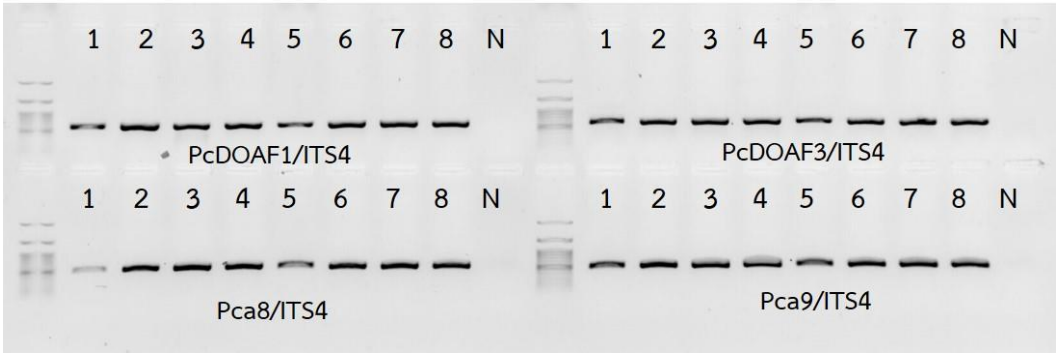

Figure 8: The specificity of primers to DNA of P. citriasiana obtained from brown spot symptom on Citrus fruits (1: No. 597/1-1; 2: No. 597/1-2; 3: No. 597/2-1; 4: No. 597/2-2; 5: No. 597/3-1; 6: No. 597/3-2; 7: No. 598-1; 8: No. 598-2)

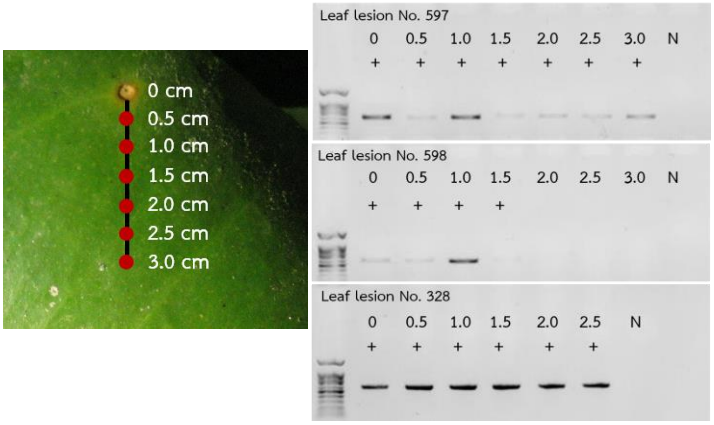

Figure 9: The sensitivity of PcDOAF1/ITS4 primers to P. citriasiana based on the difference of distances from original symptom.

ทำการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 กับตัวอย่างผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ โดยสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวจากผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ รวมจำนวน 138 ตัวอย่าง และดำเนินการทดลองไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัด พบว่าไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* บนใบและผลที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาลได้ แม้แผลจุดสีน้ำตาลจะอยู่ในระยะเริ่มต้นและยังไม่พบการสร้าง fruiting body (Figure 10A)และให้ผลการตรวจจับที่ชัดเจนขึ้นเมื่อแผลจุดสีน้ำตาลพบโครงสร้างของ fruiting body (Figure 10B)

ทั้งนี้ได้ทดสอบไพร์เมอร์กับตัวอย่างปกติที่ไม่แสดงอาการ เพื่อยืนยันความประสิทธิภาพของไพร์เมอร์ที่ได้ ไม่พบหรือไม่แสดงผลบวกในการตรวจจับรา *P. citriasiana* บนตัวอย่างปกติใด ๆ ดังนั้นจากการทดลองนี้ ได้ไพร์เมอร์ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อในการตรวจจับรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่คือ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ PcDOAR3 PcDOAF3/ITS4 รวมถึงไพร์เมอร์ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ที่ออกแบบโดย Wang *et al.* (2012)

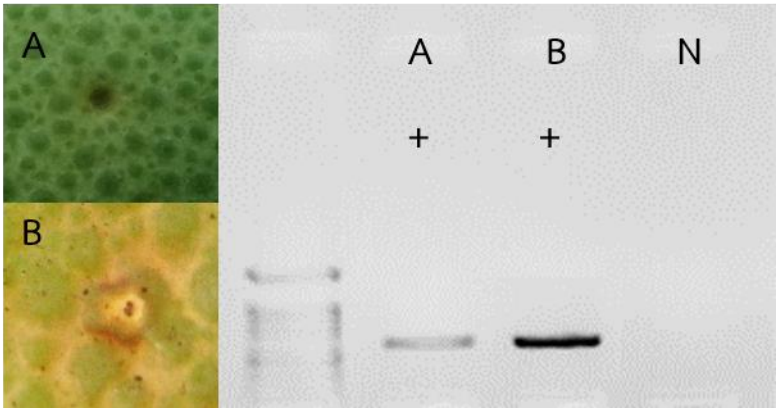

Figure 10: The specificity of primers PcDOAF1/ITS4 to DNA of P. citriasiana obtained from brown spot symptoms at different stages (A: initial stage, fruiting body of fungus absence; B: symptom with fruiting body of fungus)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* โดยใชเทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/ PcDOAR3 รวมถึงไพร์เมอร์ที่มีรายงานได้แก่ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ และสามารถนำเยื้อเยื่อจากบริเวณที่แสดงอาการมาตรวจได้โดยตรงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 วัน ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาจากวิธีการเดิมที่ต้องแยกหาเชื้อราสาเหตุ ซึ่งใช้เวลานานกว่า 15 วัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชกระกูลส้มได้อีกด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยรา *P. citriasiana* สาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ ซึ่งสามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. ชนินทร ดวงสอาด ที่ให้ความช่วยเหลือในงานทางด้านชีวโมเลกุล พัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยรา *P. citriasiana* สาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ ซึ่งสามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ จนประสพความสำเร็จในการพัฒนา และขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช (อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพ์ช 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.

Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553–556.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. Uromycladium falcatarium sp. nov., the cause of gall rust on Paraserianthes falcataria in south-east Asia. Australasian Plant Pathology 44:25-30.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28(12): 1647-1649.

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

Meyer,. L., R. Jacobs, J.M. Kotze, M. Truter and L. Korsten. 2012. Detection and molecular identification protocals for Phyllosticta citricarpa from citrus matter. S. Afr. J. Sci 108 (3/4): 1-6.

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 maxima in Asia. Fungal Diversity 34:23-39.