บทที่2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของลำไย

ลำไย (longan) จัดเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Sapindaceae* มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Euphora longan* Lam ; *Euphora longan* Stren ; *Nephelium longana* Camb. และ *Dimocarpus longan* Lour. พืชที่ร่วมตระกูล ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ เงาะ (Rambutan : *Nephelium lappaceum* L.) ลิ้นจี่(Lychee ; Litchi ; *Litchi chinensis* Sonn: *Nephelium litchi* Camb; *Scytalia chinnsis* Gaert *Dimocarpus litchi* Lour) (พาวิน, 2542)

ลำไยเป็นต้นไม้สูง 10-20 ฟุต มีลักษณะคล้ายลิ้นจี่ แต่ใบเล็กกว่า ผลแก่พร้อมเก็บเกี่ยวได้ใช้เวลา 7 เดือน ผลสีเขียวอมเหลือง เมื่อสุกผลมีรูปค่อนข้างกลมเนื้อสีขาวมีรสหวานเหมือนน้ำผึ้ง ติดผลประมาณ 20-30 ผล ในหนึ่งช่อดอก(นิพัฒน์และเฉลิม, 2542)โดยทั่วไปแล้วลำไยเป็นพืชที่ปลูกง่ายและมีการเจริญเติบโตได้ดีหากสภาพแวดล้อมเหมาะสม ดินที่ปลูกควรจะเป็นดินร่วนที่มีการระบายน้ำดี และมีอินทรียวัตถุสูง อย่างไรก็ตามการปลูกลำไยในปัจจุบันเกษตรมักประสบปัญหาด้านโรคและแมลงศัตรูพืชอยู่เสมอ(สุรชาติ, 2542)

โรคที่สำคัญของลำไย

1. โรคหงอย

ลำไยที่แสดงอาการเป็นโรคหงอย พบในลำไยทุกอายุตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป และมากกว่า 20 ปี ต้นลำไยที่เป็นโรคนี้ มีลักษณะ ต้นแคระแกร็น บางต้นมีใบเขียวซีด จำนวนใบและขนาดใบลดลง ทรงพุ่มโปร่งทำให้สามารถมองเห็นกิ่งก้านในทรงพุ่มได้ชัดเจน(จริยาและคณะ 2542)

2. โรคจุดสาหร่ายสนิม สาเหตุเกิดจาก สาหร่าย *Cephaleurus virescens* มักพบอาการที่ใบเป็นขุยสีขาว รากของสาหร่ายจะเข้าไปซอนไชในเนื้อเยื่อดูดกินน้ำเลี้ยงทำให้เซลล์เน่าตาย สาหร่ายจะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ เรียกว่า ถุงสร้างสปอร์ (sporangium) ซึ่งเป็นส่วนปลายของก้านชู สปอร์(sporangiosphore) และในระหว่างที่ฝนตก ถุงสร้างสปอร์จะถูกพัดกระเด็นไปกับน้ำฝน และสปอร์ที่ตกบนใบพืชจะงอกในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (นิพัฒน์และเฉลิม, 2542 ; น้อย, 2532)

3. โรคราสีชมพู เกิดจากเชื้อรา *Corticium salmonicolor* ซึ่งระบาดในฤดูฝน เมื่อดูจากทรงพุ่มภายนอกจะเห็นอาการใบเหลืองและร่วงเหลือแต่กิ่งเป็นหย่อมๆ บริเวณกิ่งที่ถูกเชื้อทำลาย จะเห็นคราบของเชื้อราสีขาวอมชมพู เส้นใยของเชื้อราประสานกันเป็นวงแผ่ขยายออกไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกิ่งด้านล่างและถ้าทรงพุ่มทึบจะช่วยเพิ่มการระบาดของโรคได้เร็วมากขึ้น(นิพัฒน์และเฉลิม, 2542)

4. โรคราดำ เกิดจากเชื้อราชื่อ *Capnodium ramosum, Meliola euphriae* เป็นผลจากการทำลายของแมลงปากดูด เช่นเพลี้ยต่างๆ

5. โรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว เกิดจากเชื้อราในอากาศ เช่น *Rhizopus nigricans* และ *Aspergillus niger* สปอร์จะปลิวระบาดไปทั่ว กลุ่มสปอร์เป็นสีดำ

6. อาการใบหงิก เกิดจากการใช้สารกำจัดวัชพืชบางชนิด เช่น 2, 4-ดี และพาราควอต ทำให้ใบม้วนงอ ใบมีขนาดเล็กลง ทำให้ผลผลิตลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และอาการที่เกิดจากสารกำจัดวัชพืช ไกลโฟเสท และ อลาคลอร์ คือ ทำให้ใบแคบยาวชอบใบหงิกเป็นคลื่น มักจะพบบนช่อใบบริเวณใกล้ระดับรอบทรงพุ่ม อาการใบม้วนหงิก สามารถพิสูจน์ได้จากการพ่นใบด้วยสารกำจัดวัชพืชอัตราเจือจาง ตั้งแต่ 1-10,000 ของอัตราที่แนะนำ และราดดินด้วยสารกำจัดวัชพืชอัตราเจือจางตั้งแต่ 1-1000 ของอัตราที่แนะนำ(จริยาและคณะ, 2542)

7. โรคพุ่มไม้กวาดของลำไย

โรคพุ่มไม้กวาดหรือที่ทางภาคเหนือเรียกว่า โรคกะหรี่ลำไย นับว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่ง ที่ทำความเสียหายต่อการทำสวนลำไย พบเป็นกับลำไยหลายพันธุ์ที่มีอายุตั้งแต่ 3-4 ปีขึ้นไป ลำไยที่พบเป็นโรคพุ่มไม้กวาด เช่น พันธุ์ดอ เบี้ยวเขียว พันธุ์พื้นเมือง(สุรชาติ, 2542) โรคพุ่มไม้กวาดมีลักษณะการแตกยอดของลำไยมากกว่าปกติมีลักษณะคล้ายไม้กวาด ยอดหรือตาข้างที่แตกออกไม่เจริญเติบโต ปล้องสั้น ใบมีขนาดเล็ก เส้นใบเห็นเด่นชัด ดอกมีขนาดเล็กมีความผิดปกติทั้งรูปร่างและสี ก้านดอกสั้น และเมล็ดเป็นหมัน (Maramorosch, 1992 และ ประสาทพร, 2516) ลำไยที่เริ่มเป็นโรคพุ่มไม้กวาดยังคงให้ผลผลิตอยู่ แต่ไม่มากนัก เมื่ออาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้นจะไม่ให้ผลผลิตเลย ต้นลำไยจะตายในที่สุด(สุรชาติ, 2542) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของลำไยพันธุ์อีดอที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด เปรียบเทียบกับต้นปกติ ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้ คือ ความผิดปกติของลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด เกิดขึ้นบริเวณใบ ปลายยอดและกิ่ง โดยพบว่าลักษณะโครงสร้างของใบไม่มีคิวตินเคลือบเหมือนใบปกติ cell epidermis ทั้งด้าน adaxil และ abaxil เปลี่ยนเป็น trichome ชนิด unicellular hair และ stellate ถัดจาก epidermis เข้าไปไม่พบ palisade cell parenchyma และ spongy parenchyma เหมือนใบปกติ พบแต่เซลล์

parenchyma ที่มีรูปร่างกลมผนังบางเรียงต่อกัน โดยไม่มีช่องว่างหรือช่องอากาศ และไม่พบ chloroplast ในเซลล์เหล่านั้นกลุ่มท่อน้ำท่ออาหารของเส้นกลางใบเป็นแบบ collateral bundle มีหลายกลุ่มที่เรียงตัวเป็น 2 ชั้น ซึ่งแตกต่าง จากกลุ่มท่อน้ำท่ออาหาร ของเส้นกลางใบที่เป็นโรคซึ่งมีอยู่กลุ่มเดียว ยอดที่แตกออกมาจะมากว่าต้นปกติ ลักษณะยอดแตกออกมาชิดกันอยู่เป็นกระจุก ยอดมีสีน้ำตาลเข้มในลักษณะที่ต้นปกติมีสีเขียวแกมเหลือง กิ่งที่เป็นโรคมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมซึ่งต่างจากกิ่งปกติ ซึ่งเป็นรูปสี่เหลี่ยม และเซลล์ epidermis เปลี่ยนเป็นขนมากกว่ากิ่งปกติชั้น cortex ประกอบด้วย เซลล์ parenchyma รูปร่างกลม ต่างกับต้นปกติที่มีรูปร่างเป็นหลายเหลี่ยม พบเซลล์ sclerenchyma ภายในชั้น cortex น้อยกว่าในกิ่งปกติ กลุ่มท่อน้ำท่ออาหารชั้นในมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ vessel ของกิ่งที่เป็นโรคมีขนาดเล็กกว่าของกิ่งปกติ(อำไพวรรณและคณะ, 2537) จากการศึกษาของประชา(2540) พบเซลล์จุลินทรีย์ที่คล้าย มายโคพลาสมา ขนาดประมาณ 300-500 นาโนเมตร อยู่ใน sieve tube และ companion cell ในส่วนของรากที่มีการเจริญขั้นที่สอง ลำต้นที่เจริญขั้นแรก และลำต้นที่มีการเจริญขั้นที่สอง ใบ เกสรตัวผู้ ก้านเกสรตัวเมีย กลีบเลี้ยง กลีบดอก จากการศึกษาของประสาทพร(2516)พบว่า sieve tube มีสาร callose สะสมอยู่มาก

ลักษณะอาการพุ่มไม้กวาดที่พบในไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไป คือ มีการแตกยอดเป็นกระจุก อาการจะพบในพืชหลายชนิดและมีสาเหตุมาจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและแมลง ยกตัวอย่างเช่น อาการพุ่มไม้กวาดในต้น cherry และ black berry เกิดจากเชื้อสาเหตุ คือ รา และ ไร(*Aceria sp.*) ส่วนในต้น elm หรือ aster yellow สาเหตุเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ต้น honey suckle ที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด สาเหตุเกิดจาก เพลี้ยอ่อน นอกจากนั้นยังพบโรคพุ่มไม้กวาดในกุหลาบแสดงอาการ rose rosette ซึ่งยังไม่สามารถบ่งชี้ถึงสาเหตุของโรคได้ แต่พบไร *Phyllocoptes fructiphilus* ในพืชที่เป็นโรคเสมอ และสามารถถ่ายทอดโดยการทาบกิ่งและไรได้(Crowns, 1983) ต่อมาได้พบลักษณะคล้าย double - strand RNA (ds RNA) ในเนื้อเยื่อพืชที่แสดงอาการ rose rosette dsRNA ซึ่งสามารถถ่ายทอดโดยการทาบกิ่งและวิธีกล แต่ไม่พบการถ่ายทอดในเมล็ดที่เก็บจากต้นที่เป็นโรค(Epstein and Hill , 1990)

จากการศึกษาของ Blanchard และ Tatter (1981) พบว่าพืชที่เป็นโรคท่อน้ำ จะถูกทำลายเป็นสีเหลือง และสามารถมองเห็นได้และส่งผลทำให้ไม่มีสารอาหารไปเลี้ยงลำต้นเกิดอาการ decline และตายในที่สุด ลักษณะความผิดปกติทางสรีระดังกล่าวอาจนำไปสู่ลักษณะ พุ่มไม้กวาดได้ส่วนมากในไม้เนื้อแข็ง และ พืชตระกูลสนสาเหตุมักเกิดจากเชื้อรา กาฝาก ไวรัส แมลง ไร และในบางพืชก็ยังไม่ทราบสาเหตุของโรคที่แท้จริง (Boczenk and Griffith, 1961)

สาเหตุของโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย

สาเหตุโรคพุ่มไม้กวาด ได้มีการรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี 2516 พบเชื้อมายโคพลาสมา หรือเชื้อไฟโตพลาสมา มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค แต่เนื่องจากยังไม่สามารถแยกเชื้อดังกล่าวออกมาได้ จึงไม่สามารถพิสูจน์ยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคจริง ผลการศึกษาในระยะต่อมาทำให้เกิดความสับสนเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุของโรคพุ่มไม้กวาด เนื่องจากลักษณะอาการของโรคจะแปรผันไปตามลักษณะของแต่ละพันธุ์ และบางครั้งไม่สามารถตรวจพบเชื้อมายโคพลาสมาภายในเนื้อเยื่อที่เป็นโรค จึงไม่ได้มีการยืนยันสาเหตุที่แน่นอนของโรคพุ่มไม้กวาด (จริยาและคณะ, 2542) ปัจจุบันพบไรลำไยเป็นพาหะสำคัญของโรคพุ่มไม้กวาดในเขตภาคเหนือ รูปร่างมีขนาดเล็กมากไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า(เกรียงไกร, 2544) ซึ่งเป็นไรศัตรูพืชวงศ์ *Eriophyidae* มีลักษณะแตกต่างจากไรแดงและไรศัตรูพืชอื่นๆซึ่งมีขาเพียง 2 คู่หรือ4ขา เท่านั้น จึงเรียกชื่อสามัญว่า ไรสี่ขา หรือ อิริโอไฟอิด(eriophyid mite)(ประนอม, 2541)ไรจะดูดทำลายเซลล์พืช น้ำลายของไรเป็นพิษและชักนำให้เนื้อเยื่อการเจริญผิดปกติซึ่งอาการผิดปกติจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ของไร (Boczenk and Griffith, 1994) ลักษณะอาการพุ่มไม้กวาดของลำไยเกิดจากสารพิษไปรบกวน metabolism ของพืช โดยสารพิษดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยโปรตีน เซลลูโลส เพคติน และเป็นสารควบคุมการเจริญต่างๆ ของพืช เพราะฉะนั้นสารพิษดังกล่าวจึงทำให้พืชแสดงความผิดปกติคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส(เสาวลักษณ์, 2535) นอกจากนั้นยังพบว่าไรยังเป็นพาหะของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด รวมทั้งในบางพืชที่ไม่ทราบเชื้อสาเหตุของโรคอีกจำนวนมากดังแสดงในตารางที่ 1,2

ตารางที่1 ไรพาหะที่มีความสัมพันธ์กับโรคพืชที่ทราบสาเหตุและไม่ทราบสาเหตุ(Hiruki, 1994)

Disease (mite)	Pathogen Particle	Distribution	Transmitted by Sap	Transmitted by Grafl	Symptoms continued after mites killed	Noninfective Mite From eggs
Wheat streak mosaic (*Aceria tulipae*)	Flexuous Particles (700 nm long)	N. America Middle East Europe Europe	+	0	+	+
Agropyron mosaic (*Abacarus hystrix*)	Flexuous Particles (717 nm long)	N. America UK N. Europe	+	0	+	+
Rycgrass mosaic (*A. hystrix*)	Flexuous Particles (700 nm long)	N. America UK N. Europe	+	0	+	+
Hordeum mosaic (Vector unknown)	Flexuous Particles (768 nm long)	N. America	+	0	0	0
Oat necrotic mottle (vector unknown)	Flexuous Particles (720 nm long)	Canada	+	0	0	0
Garlic mosaic (A. tulipae)	Flexuous Particles (700 nm long)	Asia N. America Europe Europe	+	0	+	+
Prunus latent (*Vasates fockeui*)	Flexuous Particles (750 nm long)		+	0	0	0

\+ : ผลการตรวจสอบที่เป็นบวก

\- : ผลการตรวจที่เป็นลบ

0 : ยังไม่มีการตรวจสอบ หรือผลการตรวจยังไม่เพียงพอ

DMB : double membrane body

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Disease (mite)	Pathogen Particle	Distribution	Transmitted By		Symptoms Continued After mites killed	Noninfective Mites From eggs
			Sap	Graft		
Spartinn mottle (vector unknown)	Flexuous Particles (725 nm long)	UK	+	0	0	0
Wheat spot mosaic (*A. tulipae*)	DMB	N. America N. America	-	0	+	+
Fig mosaic (E. ficus)	DMB	Middle East	-	0	+	+
Pigeon pea sterility (E.cajani)	DMB	Europe India	-	0	+	0
Currant reversion (P. ribis)	0	UK Europe	-	0	+	0
Rsoe sette (*P. frutiphilus*)	DMB	N. America	+	+	+	0
Cherry mottle leaf (*P. inaequais*)	0	N. America Europe	+	0	+	0
wheat spotting (*A. mckenziei and E. .tritici)*	0	USSR	+	0	0	0

\+ : ผลการตรวจสอบที่เป็นบวก

\- : ผลการตรวจที่เป็นลบ

. 1 : ยังไม่มีการตรวจสอบ หรือผลการตรวจยังไม่เพียงพอ

DMB : double membrane body

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Hriruki(1994)ได้สรุปความสัมพันธ์ระหว่างไรกับเชื้อสาเหตุโรคพืช สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มแรก คือโรคพืชที่พบอนุภาคคล้าย(polyvirus-like particle) เช่น wheat streak mosaic virus, agropyron mosaic virus, spartina mottle virus, ryegrass mosaic virus, hordeum mosaic virus, oat necrotic virus, garlic mosaic virus และ prunus latent virus กลุ่มที่ 2 พบ double membrane body (DMB)ในไซโตพลาสซึมของพืชที่เป็นโรค เช่น wheat spot mosaic, fig mosaic, pigeon pea sterility และ rose rosette กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มพืชที่เป็นโรคแต่ไม่ทราบสาเหตุ เช่น cheery motte leaf , wheat spotting agent, peach mosaic agent และ currant reversion agent

การถ่ายทอดโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย

โรคพุ่มไม้กวาด สามารถถ่ายทอดโดย นำไรสี่ขา (*A. dimocarpi*)จากช่อลำไยที่เป็นโรคมาดูดกินต้นกล้าลำไยปกติ พบว่าลำไยแสดงอาการพุ่มไม้กวาดเหมือนกับลักษณะอาการพุ่มไม้กวาดที่พบในสภาพแปลง แต่ลักษณะอาการจะแตกต่างไปตามแต่ละพันธุ์ และจากรายงานของ Chen *et al,* (1992) พบว่า *Tessaratoma papillosa* และ *Cornegenapsylla sinica* สามารถถ่ายทอดลักษณะโรคพุ่มไม้กวาดจากต้นลำไยที่แสดงอาการไปยังต้นลิ้นจี่ปกติได้

การป้องกันกำจัด

การป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่เคยปฏิบัติมานั้น ทำได้โดยการอัดฉีดสารปฏิชีวนะ เตตราไซคลินเข้าสู่ท่อน้ำท่ออาหารของต้นลำไยที่เป็นโรค แต่ยังไม่สามารถยืนยันว่าช่วยในการรักษาต้นลำไยที่เป็นโรค(ธีระ,2534) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของนวลจันทร์และคณะ (2521) ได้ทดลองใช้เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 750-1000 rpm ฉีดเข้าลำต้นลำไย 2 ครั้ง ครั้งละ 15 ลิวบิกเซนติเมตร ห่างกัน 15 วัน พบว่าไม่สามารถป้องกันหรือยับยั้งอาการพุ่มไม้กวาดของลำไยได้ และจากการศึกษาในลักษณะเดียวกันของประชา (2540) ซึ่งได้ทดสอบสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินกับลำไยพันธุ์อีดอที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาดนั้น ผลการทดลองมีความแปรปรวนและพบว่าไม่สามารถลดหรือยับยั้งการเกิดโรคได้เช่นกัน ส่วนวิธีที่ดีที่สุด คือการเลือกกิ่งพันธุ์จากต้นพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการของโรคพุ่มไม้กวาด สำหรับต้นที่แสดงอาการของโรคควรเผาทำลายเพื่อป้องกันการกระจายของโรคไปยังต้นที่ยังต้นปกติซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในปัจจุบัน(สุรชาติ, 2542)

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อไฟโตพลาสมา

เชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) เป็นจุลินทรีย์ พวกโปรคารีโอต เดิมเรียกมายโคพลาสมา (mycoplasma like organism ; MLO) (Seemuller, et al., 1994) จัดอยู่ใน Class Mollicutes (สุพัฒน์, 2534 ; Freunt, 1981) พบได้ในพืชมากกว่า 200 ชนิดและในแมลงพาหะ ในกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาไม่รวม spriroplasma มีลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับมายโคพลาสมา ในกลุ่ม Acholeplasma (George,1996) และได้จัดระบบอนุกรมวิธานของเชื้อดังนี้

Class : Mollicutes

Order Mycoplasmatales ประกอบด้วย 3 Families

Family Mycoplasmataceae ต้องการสารพวก sterol ในการเจริญเติบโต รูปร่างไม่เป็นเกลียว ขนาดของ genome 5.0 $x10^8$ ดาตัน มี 2 genus คือ Mycoplasma และ Ureaplasma

Family Spiroplasmataceae ต้องการสารพวก sterol ในการเจริญเติบโตมีรูปร่างเป็นเกลียว เคลื่อนไหวได้ ขนาดของ genome 1.0 $x10^5$ ดาลตันมี 1 genus คือ Spiroplasma

Family Acholeplasmataceae ไม่ต้องการสารพวก sterol ในการเจริญเติบโต มีรูปร่างไม่เป็นเกลียว ขนาดของ genome 1.0 x 10^9 ดาลตัน มี 1 genus คือ Acholeplasma

ปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนแปลงการจัดจำแนกและมีข้อมูลอนุกรมวิธานดังนี้ตามตารางที่ 2 และภาพที่ 1

ตารางที่ 2 อนุกรมวิธานและลักษณะสำคัญในสมาชิก Class Mollicutes

	Number of Recognized Species	G+C Content (mol %)	Genome Size(kbp)	Cholesterol E quipment	Habitat	Other Distinctive Features
OrderI : Mycoplasmatales						
FamilyI : Mycoplasmataceae						
Genus I: Mycoplasma	100	23-24	600-1350	Yes	Human, animals	Optimum growth usually 37C′
Genus II: Ureaplasma	6	27-30	760-1170	Yes	Human, animals	Urea hydrolysis
Order II Entamoplasmatales						
Family I: Entamoplamataceae						
Genus I Entamoplasma	6	27-29	790-1140	Yes	Insect, plant	Optimum growth 30 C′
Genus II Mesoplasma	12	27-30	870-1100	No	Insect, plant	Optimum growth 30 C' Sustained growth in serum free medium with 0.04%Tween
Family II Spiroplasmataceae						
Genus I Spiroplasma	30	25-30	940-2400	Yes/No	Insect, Plant	Helical Filaments' optimum growth at 30 –37 C′
Order III : Acholeplasmataceae						
Family : Acholeplasmataceae						
Genus I: Acholeplasma	13	26-30	1500-1650	No	Animal, some plants and insects	Optimum growth 30-37C′
OderIV: Anaeroplasmatales						
Family : Anaeroplasmataceae						
Genus I: Anaeroplasma	4	29-34	1500-1600	Yes	Bovine/ ovin rumen	Oxygen-sensitive anaerobes
Genus II: Asteroleplasma	1	40	1500	No	Bovine/ovine rumen	Oxygen-sensitive anaerobes

ที่มา : (Whitecomb *et al.*, 1991)

A. palmae = *Acholeplasma palmae*,

KVG*

AY1=Aster yellow

SAY = Severe stranst

BB = Blueberry bulletin

PpDB= Papaya die back

PYL=Papaya yellow leaf

STOL = Stobur of paper

PD= Pear decline

PYLR =Peach yellow leaf roll

ESFY=Apricot chlotic leaf roll

SpaWB*

P. australasla*

SUNHP=Sunnhem witches' broom

SPWB=Sweet potato witches's broom

P. aurantlflla*

BoLL*

PEP*

CX=Canada peach X-disease

VAC=Vaccinium witches' broom

KAP*

PPWB=Pigeon pea witches' broom

VILL*

YLD=Yellow leaf disease

LDN=Lethal of coconut disease

AshY2=Aster yellow 2

CP=Clover proliferation

EY=America elm yellow

FD=Florescence lime witches' broom

LfWB=Loofah witches' broom

BVK*

GaLL=Crown gall of grapevine

RYD=Rice yellow dwarf

* = ไม่สามารถแสดงชื่อเต็ม

cPh = Clover phyllody

OAY= Oenothera aster yellow

OA= Onion yellow

AAY=America aster yellow

AYA*

AGY= Australian grapevine

VK= Vergilbungskrankheit

IBS= Internal brown spot of aster yellow

PDI*

AT=Apple proliferation

ESFYC*

BWB*

TBB= Tomato big bud

PnWB=Peanut witches' broom

SpWB=Sweet potato litter leaf

FBP=Faba bean phyllody

IAWB*

CYE=Clover yellow ICPh*

WX=Western X-disease

TWB= Tsuwabuki witches' broom

REY*

CPPWB*

LY=Coconut lethal yellow

LDG*

TLD=Lethal disease of coconut

Ashy=Aster yellow

BILL*

ULW=French elm yellow

ALY=Aster yellow(sugar beet)

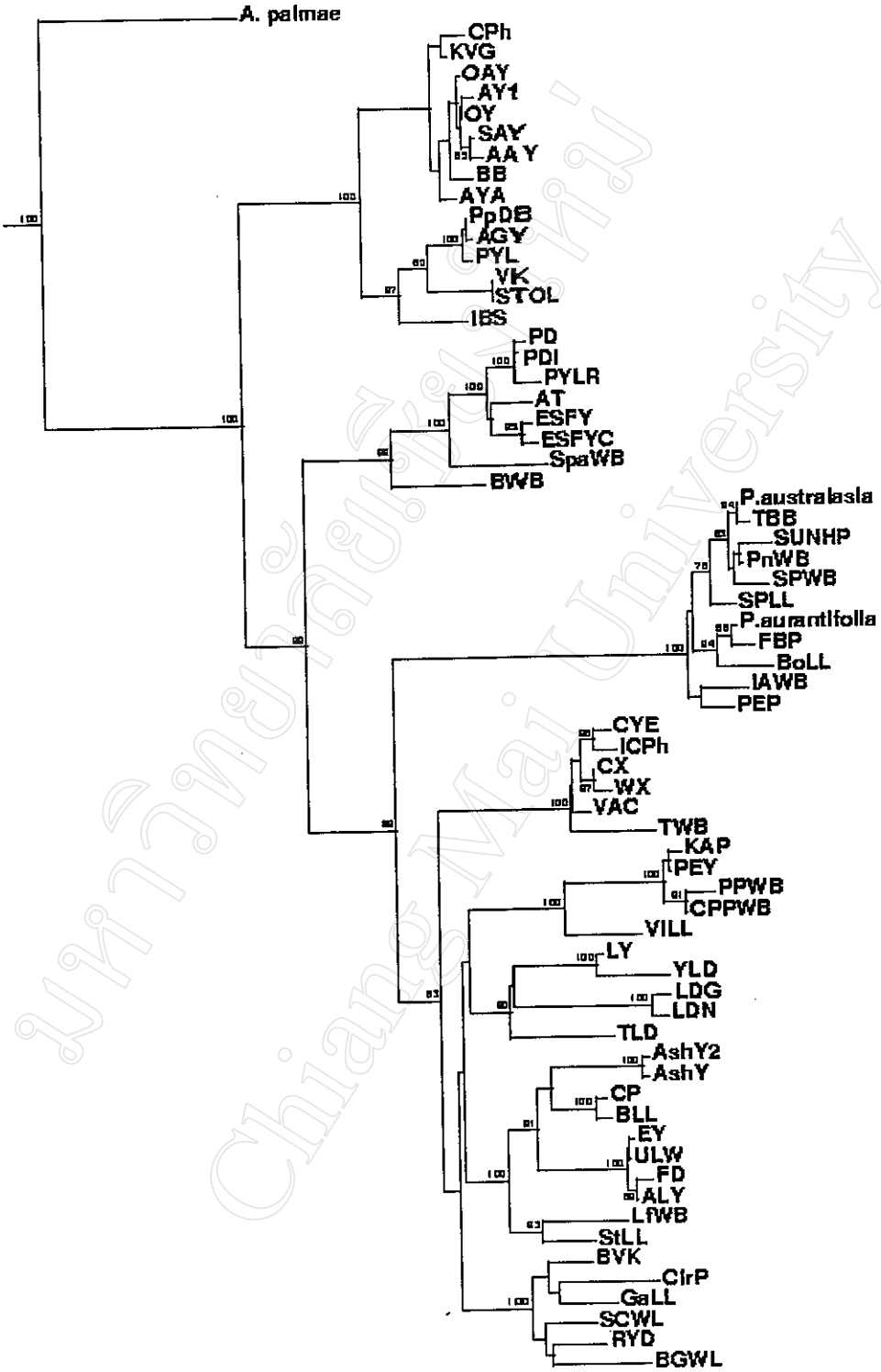
StLL*

ClrP*

SCWL=Sugarcane white leaf

BGWL=Bermuda grass white leaf

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

<u>ภาพที่1</u> อนุกรมวิธานของเชื้อไฟโตพลาสมา(The Phytoplasma Working Group *et al.*, 1991)

1.2. คุณสมบัติของเชื้อไฟโตพลาสมา

เชื้อไฟโตพลาสมา ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงแต่สารพวก phospholipid ล้อมเซลล์เซลล์ไว้ จึงทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาส่วนใหญ่มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือที่เรียกว่า polymorphic ซึ่งคล้ายกับเซลล์แบคทีเรียขนาดเล็กที่ไม่มีผนังเซลล์ (สมศิริ, 2529)ส่วนใหญ่รูปร่างกลมรี หรือ รูปไข่ เป็นระยะ mature element อยู่ภายใน sieve cell ของเนื้อเยื่อลำไย (ประสาทพร, 2516) และจากการศึกษาของ Worley (1975) พบ element อยู่ในส่วน mitochondria, plastid หรือ nucleus แต่ไม่พบใน parenchyma cell ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีรูปร่างแบบ spherical และ tubular body ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.15 -1.8 ไมโครเมตร มีลักษณะแบบ branch และอาจมีการเรียงตัวคล้าย endoplasmic reticulum (Florence and Cameron, 1987) สำหรับเชื้อไฟโตพลาสมาจนถึงปัจจุบันยังไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ (Davis and Sinclair, 1998) และเป็นจุลินทรีย์ที่มีความอ่อนแอต่อสารปฏิชีวนะ พวกเตราไซคลิน แต่ต้านทานเพนนิซิลลิน นอกจากนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จในการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคตามขั้นตอนใน Koch's postulates (Nienhaus and Sikora, 1979)

เชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไปจะพบในน้ำคั้นพืช และมีจำนวนน้อยในท่ออาหาร เชื้อใน Class Mullicutes จะถ่ายทอดจากพืชต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งโดยใช้แมลงพาหะ เชื้อเจริญอยู่บริเวณหลอดอาหาร ต่อมน้ำลาย และส่วนต่างๆของแมลงพาหะ โดยที่แมลงพาหะได้รับเชื้อหลังจากดูดกินบนใบพืชที่เป็นโรคโดยเฉพาะใบอ่อนมากกว่าใบพืชที่แก่ แมลงพาหะไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อใน Class Mullicutes ได้ทันทีหลังจากดูดกิน แต่ระยะการถ่ายทอดของแมลงต้องดูดกินพืชนาน 10-45 วัน(inoculation period) ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเชื้อในตัวแมลงพาหะ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มของเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปเมื่อเชื้อเข้าไปในตัวแมลงโดยเพิ่มปริมาณในเซลล์ของลำไส้ (intestinal cell)ของแมลงพาหะก่อน จากนั้นผ่านไปยังต่อมน้ำลายช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ และในที่สุดจะพบบริเวณสมอง เมื่อความเข้มข้นของเชื้อมีปริมาณที่สูงก็เริ่มถ่ายทอดเชื้อไปยังพืชต้นใหม่ต่อไปเรื่อยๆ ความสามารถในการถ่ายทอดน้อยลงจนกระทั่งแมลงจบชีวิต ซึ่งพบเชื้อมากในระยะตัวอ่อนมากกว่าตัวเต็มวัย และมีชีวิตจนถึงระยะที่แมลงลอกคราบ(George, 1996) โดยทั่วไปเชื้อไฟโตพลาสมาจะแย่งใช้สาร cholesterol ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ plasma membrane ของเซลล์พืช ทำให้ขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์พืชทำงานผิดปกติ ตลอดจนถ้าการเข้าทำลายของเชื้อรุนแรงอาจส่งผลทำให้กระทบกระเทือนต่อขบวนการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโต และเกิดการเสียความสมดุลของฮอร์โมนในพืช(Maramorosch, 1979)

อาการของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายมีลักษณะแตกต่างกันออกไป สามารถแบ่งลักษณะอาการเป็น 3 อาการ คือ อาการแคระแกรนหยุดการเจริญเติบโต ส่งผลทำให้ต้นโทรมอย่างช้า ๆ หรือรวดเร็ว อาการแตกยอดเป็นพุ่มฝอยหรือพุ่มไม้กวาด(witches ' broom) ซึ่งเกิดจากการเจริญของส่วนปลายยอดที่ผิดปกติไป ทำให้เกิดกลีบดอกและใบจำนวนมาก ส่วนอาการสุดท้าย คือ อาการของใบคล้ายส่วนของดอก(phyllody) และการคงสีเขียวของส่วนดอก (viresence) (สุพัฒน์, 2534)

การตั้งชื่อและการเรียกชื่อส่วนใหญ่ประกอบด้วย ชื่อสามัญ และอาการที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายเช่น coconut lethal yellow, sugarcane white leaf, Bermuda grass white leaf, Sunn hemp witches' broom และ faba bean phyllody (สุพัฒน์, 2534 ; Marcone *et al.*, 1997)

เชื้อไฟโตพลาสมาอาศัยอยู่ในเซลล์ท่อน้ำและท่ออาหารของพืช ปริมาณของเชื้อจึงมีไม่มากเมื่อเทียบกับเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่นๆ และมักพบเชื้อปริมาณมากบริเวณปลายยอด หรือปลายราก และบริเวณเส้นกลางใบย่อย เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาไม่มีผนังเซลล์จึงจำเป็นต้องรักษาแรงดันออสโมซิสให้ สมดุลกับเซลล์พืชที่เชื้ออาศัยอยู่ เพราะฉะนั้นเชื้อไฟโตพลาสมาจะถูกทำลายได้ง่าย โดยการเปลี่ยนความเป็นกรด-ด่าง ความดันออสโมติก และ ปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ (Maramorosch, 1979) ด้วยเหตุนี้เชื้อไฟโตพลาสมาจึงไม่สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล หรือถ่ายทอดผ่านเมล็ด การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาทำได้โดยการเชื่อมระบบเซลล์ท่อน้ำท่ออาหาร เช่น การติดตา ทาบกิ่ง และแมลงพาหะที่เป็น phloem-feeding จำพวก เพลี้ยจั๊กจั่น (leaf hopper) เพลี้ยกระโดด (plant hopper) และเพลี้ยไก่ฟ้า(psyllidae) เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเคลื่อนที่ผ่านทางระบบท่อลำเลียงอาหาร โดยใช้ฝอยทอง (*Cuscuta* ssp.) เนื่องจากฝอยทองสามารถเจริญอยู่บนพืชอาศัย โดยสร้าง haustorium เข้าไปในบริเวณเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารดูดสารอาหารจากพืช เมื่อฝอยทองเจริญบนต้นใหม่ก็จะถ่ายทอดเชื้อสาเหตุนั้นผ่านทาง haustorium ได้ และข้อดีอีกประการหนึ่งคือ ฝอยทองสามารถเจริญได้ดีในพืชหลายชนิด จึงเหมาะกับการทดลองพืชอาศัย นอกจากนี้ฝอยทองยังสามารถถ่ายทอดเชื้อโรคพืชจากพืชต่างชนิดได้ ข้อสำคัญ คือ ฝอยทองจะต้องเกาะพืชทั้งสองชนิดและมีชีวิตอยู่ได้ การถ่ายทอดจึงจะ ประสบผลสำเร็จ เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถเก็บไว้เป็นเวลานานหลายๆปี โดยวิธี in *vitro* graft inoculation ในชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ (สุพัฒน์, 2534 ; Maramorosch, 1992 ; Jarausch *et al.*, 1999)

การตรวจวินิจโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาทำได้ยาก เนื่องจากยังไม่สามารถเลี้ยงเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ จึงได้ใช้วิธีการต่างๆในการตรวจแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาวิธีที่เคยปฏิบัติมานั้นเดิมใช้คุณสมบัติทางด้านชีววิทยา (ชุตินันท์, 2540) เช่น การศึกษา ลักษณะอาการของโรค แมลงพาหะ พืชอาศัย และการตอบสนองสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินของพืชอาศัยวิธีดังกล่าวให้ผลที่ไม่แน่นอนและใช้เวลานาน ต่อมาได้พัฒนาและนำกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมาใช้ในการตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อพืช และ แมลงพาหะ(สุพัฒน์, 2534)

Hibben (1996)ได้ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในท่ออาหารของพืชบริเวณ sieve tube โดยการย้อมสี Diens' stain และ การตรวจภายใต้กล้อง transmission electron microscopy(TEM) แต่ไม่สามารถมองเห็นอนุภาคของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ เนื่องจากในระยะ mature element ของเชื้อในเนื้อเยื่อพืชที่แสดงอาการ die back พบปริมาณอนุภาคต่ำ (Guthrie *et al.*, 1998) จากการศึกษาของ Douglas (1986) พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรค X-diseaseใน peach และ chockcherry โดยนำตัวอย่างของพืชแช่ลงในสารละลาย glutadehyde เพื่อให้เนื้อเยื่อคงสภาพ และ ตัดเนื้อเยื่อด้วย cryostat แล้วนำเนื้อเยื่อพืชที่ได้ไปย้อมด้วยสารเรืองแสง fluorochrome 4-6 diamo-2-phenylindloe(DAPI)ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากนั้นทำ blind test ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบว่าสามารถมองเห็นอนุภาคของเชื้อไฟโตพลาสมาได้(สุภาพร, 2540) ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าวเหมาะสำหรับตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อพืชที่มีจำนวนมากเท่านั้น แต่ไม่ประสบความสำเร็จในกรณีที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาต่ำในเนื้อเยื่อพืช นอกจากนั้นวิธีดังกล่าวยังไม่มีความจำเพาะเจาะจงและไม่สามารถบอกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ต่อมาได้นำเทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาทั้ง polyclonal และ monoclonal antibody ตลอดจนวิธี immunosorbent electron microscopy และ gold -labeled antibody เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา แต่พบว่าเทคนิคดังกล่าวไม่สามารถให้ผลที่ชัดเจนได้เพราะรูปร่างทาง สัญฐานวิทยาของเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งมีลักษณะคล้าย อนุภาคไวรัสที่ปนเปื้อนในปฏิกิริยา(Vera and Milne, 1994)

ต่อมาได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งตรวจจากดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชที่เป็นโรคใช้ primer ที่ออกแบบที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16 S rRNA และ 23S rRNA (Siddiique *et al.*, 1998) ซึ่ง primer นี้สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคได้ทุกชนิด(Lee *et al.*, 1993)

1.3. การป้องกันกำจัด

แนวทางปฏิบัติในการป้องกันกำจัดโรค คือ การคัดเลือกท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรคจากต้นที่ไม่แสดงอาการของโรค หรือท่อนพันธุ์ที่ได้จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น meristem tip culture, shoot tip grafting ร่วมกับการใช้สารปฏิชีวนะ ส่วนการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคทำได้โดยการควบคุมการแพร่ระบาดของแมลงพาหะ ตลอดจนการทำลายต้นพืชที่เป็นโรคและวัชพืชเพื่อลดแหล่งอาศัยของเชื้อ หรือ การใช้พันธุ์ต้านทาน (สุพัฒน์, 2534)

1.4. เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ประยุกต์ใช้ในการศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมา

1.4.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณจีน(gene)หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเฉพาะบริเวณที่ต้องการ เพื่อเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง หรือเรียกว่า *in vitro* enzymatic gene amplification ค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 (ปราณี, 2540) อาศัยหลักของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ(DNA replication) ในหลอดทดลองซ้ำๆ กันหลายรอบ โดยอาศัยเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เริ่มต้นจากดีเอ็นต้นแบบ(DNA template)ที่เป็นสายคู่ การสังเคราะห์สายใหม่เกิดจากการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ และอาศัยดีเอ็นเอสั้น ๆ (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dCTP, dATP, dTTP, dGTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นสายตั้งต้นแบบทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมา นอกจากนั้นในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย buffer ที่เหมาะสม เมื่อปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำๆ หลายรอบซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation

เป็นขั้นตอนในการทำให้ ดีเอ็นสายคู่(double strand) แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน primer annealing

เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถ เกาะติดกับดีเอ็นเอแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม คือ เป็นลำดับเบสนิวคลีไทด์สายเดิม

3. ขั้นตอน primer extension

เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ทนร้อน (themostable DNA polymerase)

งานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลได้มีการพัฒนากว้างขวางมากขึ้น เทคนิค PCR นี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำ ต่อมาได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (ปราณี, 2540)โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคและพืชปกติ นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความเข้มข้นต่ำในพืช โดยใช้ primer ที่สังเคราะห์จากส่วนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันสูง คือ ตำแหน่ง 16S rRNA ของ โปรคาร์ริโอต(Ahens and Seemuller, 1992) ต่อมาได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์ primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงบริเวณ 16S ribosomal RNA จากกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่า primer มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาจากพืชที่เป็นโรค รวมทั้งแมลงพาหะ นอกจากนั้นเทคนิค PCR ยังถูกนำมาใช้หาความความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายพืชที่แตกต่างกัน โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบและจัดจำแนกได้ (Marcone and Rangozzin, 1997)

สุรศักดิ์ (2540) ได้นำเอาเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ PCR product มากขึ้น เทคนิคนี้ต้องอาศัยปฏิกิริยา PCR สองขั้นตอนด้วย primer 2 คู่ โดย primer คู่แรกจะใช้ในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนแรกและ primer คู่แรกจะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย(target DNA) และมีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นที่2 โดยใช้ primer คู่ที่สองซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะผลผลิตของดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก primer คู่แรก เทคนิคดังกล่าวได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อพืช (Waterworth and Ray, 1999) ซึ่งวิธีนี้ สามารถนำมาพัฒนาในการตรวจ และจำแนกสายพันธุ์ของกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาได้(Lee *et al.*, 1995) นอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจ

สอบเชื้อได้ในปริมาณที่ต่ำประมาณ 4 - 340 เซลล์ในปฏิกิริยา(Berges *et al.*, 2000) โดยเฉพาะในไม้ยืนต้น คือ peach yellow leaf roll, Western X, apricot chlorotic leaf roll, plum leptonecrosis และ apple proliferation โดยใช้ universal primer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงส่วน 16S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.2-1.5 กิโลเบส จากนั้นนำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้ง โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อมากขึ้น (Wang *et al.*, 1998)) ต่อมาได้พัฒนานำเอาเทคนิค PCR และ Nested PCR ตรวจหาเชื้อสาเหตุในแมลงพาหะคือ *Hishimonoides sellatiformis* ของ mulberry dwarf phytoplasma พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในไข่และตัวอ่อนที่เพิ่งจะฟักได้ (Kawakita *et at.*, 2000)

1.4.2. เทคนิค Hybridization

เทคนิค hybridization เป็นเทคนิคที่สำคัญทางชีวโมเลกุล ใช้สำหรับการตรวจติดตามกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่สนใจจากตัวอย่างตรวจและได้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา เทคนิคดังกล่าวต้องมีการผลิต DNA probe ซึ่งเตรียมจาก chromosomal, extra-chromosomal DNA และ ชิ้นส่วนจาก 16 S rRNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ primer ที่ไม่จำเพาะเจาะจงก็สามารถนำมาตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาได้ นำดีเอ็นเอมาติดฉลากด้วย radioactive หรือ non-radioactive biotin เพื่อง่ายในการติดตามดีเอ็นเอเป้าหมาย(รุ่งโรจน์, 2544) และเฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์เชื้อไฟโตพลาสมามากยิ่งขึ้น (Wayne *et al.*, 1995) โดยอาศัยเทคนิค dot-blot hybridization ซึ่งเป็นเทคนิคที่ประสบผลสำเร็จในการตรวจและจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคทั้งในสภาพแปลงปลูกและชิ้นส่วนขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการได้ในปริมาณมาก(Narayanasamy, 1998)

จากการศึกษาโรคใบด่างของอ้อย sugarcane white leaf disease ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาและมีการระบาดรุนแรง ซึ่งเป็นปัญหาของการปลูกอ้อยในประเทศไทย โดยการแยกดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรค และใช้ DNA probe ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค ทำให้ตรวจได้ง่ายและรวดเร็ว (Kazuo *et al.*, 1994) นำเอา *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะตัด genomic ดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรค sweet potato witches' broom (SPWB) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปโคลนเพิ่มปริมาณในพลาสมิด pGEMf(+) ผลผลิตที่ได้คือ SPWB-phytoplasma specific recombinant plasmid แล้วนำไปตัดด้วย *Eco*RI แล้วติดฉลากด้วย digoxigenin และใช้เป็น DNA probe ติดตามดีเอ็นเอของ SPWB ได้ (Ko and Lin, 1994)

1.4.3. เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของ restriction endonuclease ในการย่อยหรือตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นๆในตำแหน่งที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้น ๆ (ปราณี, 2540) ต่อมาเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในประโยชน์ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยดูความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA โดยอาศัย restriction enzyme (รุ่งโรจน์, 2544) ปัจจุบันได้นำเอาเทคนิค PCR มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อจากนั้นนำเอา PCR product ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzyme) ก็จะได้ลักษณะของแบบแผนลายพิมพ์ของเชื้อที่สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้(Marcone *et al.*, 1997) และต่อมาได้มีการพัฒนานำเอาเทคนิค Nested PCR ช่วยในการจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงในแต่ละกลุ่มของเชื้อมาเป็นคู่ primer คู่ด้านใน หลังจากได้ผลผลิตดีเอ็นเอแล้ว นำชิ้นส่วนที่ได้มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ 15 ชนิด และจัดกลุ่มหาค่า similarity coefficient โดยสามารถจัดออกเป็น 5 กลุ่ม คือ aster yellow, western-X disease, sugarcane leaf white , elm yellow (Lee *et al*, 1994)

สุภาพรและคณะ (2540) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยศึกษาในพืชที่เป็นโรค 8 ชนิด คือ โรคใบขาวอ้อย หญ้าแพรก หญ้า Brachiaria โรคเหลืองเตี้ยของข้าว โรคแตกพุ่มฝอยของงา ปอเทือง ผักเสี้ยนผี และโรคดอกเขียวของแพงพวย โดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโรคแตกพุ่มฝอยของงา แล้วนำมาติดฉลากด้วยสาร digoxigenin เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอ probe สำหรับตรวจและวินิจโรคด้วยเทคนิค dot blot และ southern blot hybridization พบว่าดีเอ็นเอ probe สามารถทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอจากพืชที่แสดงอาการของโรคได้ทุกชนิด และจากการเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของดีเอ็นเอก็มีความคล้ายคลึงกัน ได้แก่ กลุ่มโรคใบขาวของหญ้าแพรกและหญ้า Brachiaria กลุ่มโรคแตกพุ่มฝอยของงา และ ปอเทือง กลุ่มโรคใบขาวของอ้อยและโรคใบเหลืองเตี้ยของข้าว ส่วนโรคแตกพุ่มฝอยของผักเสี้ยนผี และโรคดอกเขียวของแพงพวยมีแบบแผน RFLP ที่แตกต่างกันออกไป จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายอ้อยและวัชพืชตระกูลหญ้าบางชนิดในประเทศไทยพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ โดยสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อยหญ้าจากภาคกลาง เหนือ และตะวันออก กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อยและหญ้าภาคกลาง เหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อยและหญ้าจากภาคตะวันออก และกลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อจากอ้อยและหญ้าจากภาคตะวันออก (รุ่งโรจน์, 2544)

2. เชื้อไวรอยด์

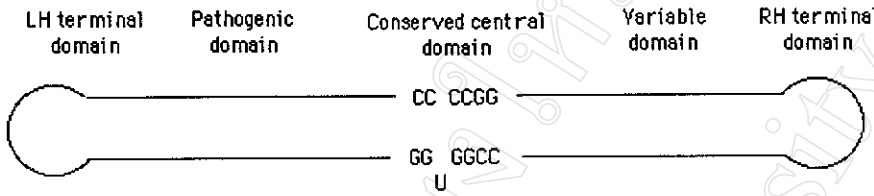
ไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กมากเท่าที่พบในปัจจุบัน การค้นพบไวรอยด์เริ่มจากการศึกษาเชื้อสาเหตุของโรค potato spindle tuber ในช่วงต้นปี 1922 ซึ่งเชื่อกันว่าเกิดจากเชื้อไวรัส (Diener, 1987) จากการศึกษาครั้งนี้ได้พบลักษณะของเชื้อหลายประการที่สรุปได้ว่า เชื้อสาเหตุของโรค potato spindle tuber มีความแตกต่างจากเชื้อไวรัสโดยทั่วไปคือ

1. เชื้อที่พบในเซลล์พืช มีลักษณะเป็นเส้นอาร์เอ็นเอ โดยไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม
2. อาร์เอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคมีขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1.1-1 .3 x 15^5 ดาลตัน
3. ไม่ต้องการไวรัสผู้ช่วย(helper virus)ในการเพิ่มปริมาณและการเคลื่อนที่
4. เชื้อสาเหตุทนทานต่ออุณหภูมิสูงกว่าเชื้อไวรัสโดยทั่วไป

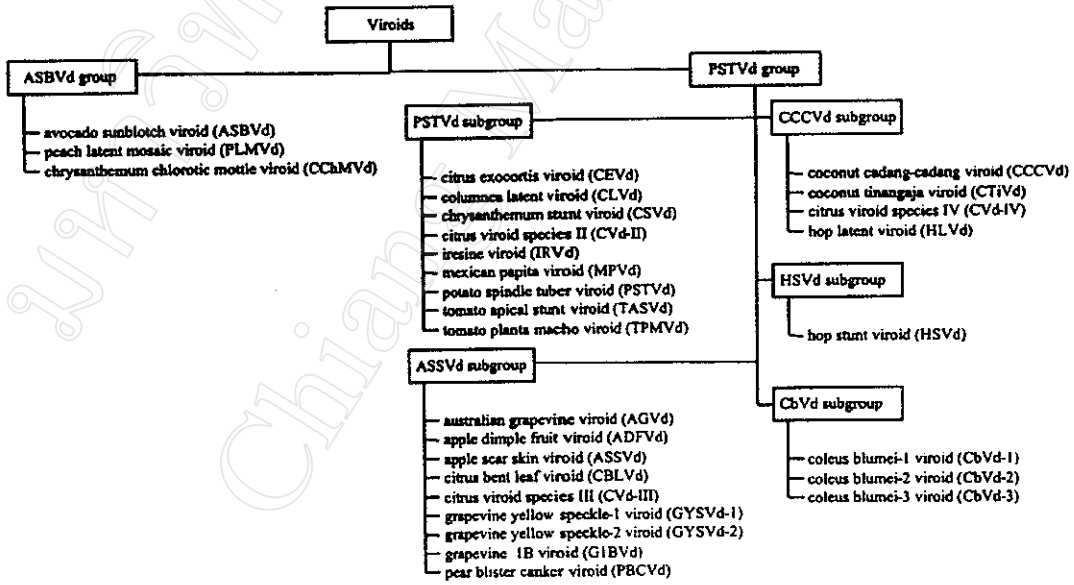
จากลักษณะความแตกต่างของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว ทำให้ทราบว่าเชื้อสาเหตุมีความแตกต่างจากเชื้อไวรัสและได้มีการเรียกเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ว่าไวรอยด์ (สุพัฒน์, 2540 ; Diener, 1979)

2.2 ลักษณะทั่วไปของไวรอยด์

โมเลกุลของไวรอยด์มีลักษณะเป็นอาร์เอ็นเอวงปิดสายเดี่ยว(single stranded circular RNA) มีขนาดประมาณ 246-375 นิวคลีโอไทด์ โมเลกุลของไวรอยด์ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม ไม่มีการทำงานของ mRNA (Owens and Hammond, 1990)ไวรอยด์ที่พบในพืชที่เป็นโรคมีทั้งลักษณะเป็นเส้น ต่อกันเป็นวง และบางส่วนของโมเลกุลมีการจับกันของนิวคลีโอไทด์ในเส้นเดียวกันทำให้มีสภาพเป็นเส้นคู่สลับกับวงที่เกิดขึ้น เนื่องจากการไม่จับคู่ของนิวคลีโอไทด์ การตรวจหาโมเลกุลของไวรอยด์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถมองเห็นอนุภาคคล้ายเกลียวเชือกขนาดเล็ก ซึ่งมีทั้งส่วนที่คล้ายกับเกลียวทับกันแน่นและส่วนที่คลายเกลียวออก (สุพัฒน์, 2534) ไวรอยด์เพิ่มปริมาณได้ในเซลล์พืช โดยมีกลไกที่เรียกว่า rolling-circle type mechanism แต่ใช้เอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase จากพืช และมีโครงสร้างจีโนมดังภาพที่ 2 และจัดอนุกรมวิธานดังภาพที่3(คนึงนิตย์, 2541)



ภาพที่ 3. โครงสร้างจีโนมของไวรอยด์(Keese and Symons, 1985)



ภาพที่4. การจัดจำแนกกลุ่มไวรอยด์ในปัจจุบัน(Diener, 1987 and Regenmortel *et al.*, 2000)

2.3 อาการของโรคที่เกิดจากไวรอยด์(สุพัฒน์, 2538)

ก. อาการภายนอกไวรอยด์สามารถชักนำให้เกิดอาการผิดปกติกับพืชได้คล้ายคลึงกับไวรัส ตัวอย่างอาการภายนอกที่เห็นได้ชัดเจนคือ เตี้ยแคระ (stunting) ใบม้วนลง (epinasty) เส้นใบมีสีผิดปกติ (venial discoloration)ใบบิดเบี้ยว (leaf clearing) เส้นใบใส (vein clearing) จุดแผล (localized chlorotic or necrotic spot)ใบด่าง (leaf mottling) ใบแห้งตาย (leaf necrosis) และต้นพืชตาย (death of whole plant)

ข. อาการภายในเซลล์ (cytopathic effects) อาการผิดปกติภายในเซลล์พืชที่ตรวจพบมีดังนี้

1. plasmalemmasome คือ กลุ่มของเมเบรนที่รวมตัวกันภายในเซลล์ พบค่อนข้างมากในเซลล์ที่ถูกไวรอยด์เข้าทำลาย แต่ลักษณะดังกล่าวมีปรากฏในเซลล์ที่ไม่เป็นโรคเช่นกัน สันนิษฐานว่า plasmalemmasome คงจะเกี่ยวข้องกับระยะเริ่มแรกของการเข้าทำลายของไวรอยด์

2. ลักษณะความผิดปกติของคลอโรพลาสต์เช่น การจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบของ thylakoid membrane หรือ grana ตลอดจนการเสื่อมสภาพของคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นเหตุการณ์สืบเนื่องจากขบวนการเกิดโรคจากเชื้อไวรอยด์

2. ความผิดปกติของผนังเซลล์เช่น ความหนาบาง การบิดเบี้ยว เป็นลักษณะที่พบในพืชหลายชนิดที่ถูกเชื้อไวรอยด์เข้าทำลาย ความสัมพันธ์ของความผิดปกติดังกล่าวกับขบวนการเข้าทำลายของ ไวรอยด์ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด

3. การทึบแสงอิเล็กตรอน ซึ่งเกิดจากสารเคมีในตัวอย่างพืชเป็นโรค และยังไม่ทราบขบวนการเกิดสารเคมีในพืชดังกล่าวที่แน่ชัด

ไวรอยด์มักอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์พืช โดยเฉพาะบริเวณนิวคลีโอไทด์และในมีปริมาณเชื้อภายในเซลล์น้อยมาก เช่น พบ potato spindle tuber viroid (PSTVd) ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ของอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ การเพิ่มปริมาณไวรอยด์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ความเข้มของแสงหรือ ความสมบูรณ์ของธาตุอาหารก็มีผลต่อการสังเคราะห์ไวรอยด์เช่นกัน ไวรอยด์ผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อเซลล์พืชทั้งอยู่ในรูปสายยาวและวง แต่ช่วงแรกที่พบเป็น monomeric viroid ที่เป็น single-stranded circular form จากนั้นจึงพบ linear form (Diener, 1979) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบไวรอยด์ในพืชชั้นสูงเท่านั้น ยังไม่มีรายงานว่าพบไวรอยด์ในสัตว์หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Hammond, 1990)

2.4. การแพร่ระบาดของไวรอยด์

เชื้อไวรอยด์ส่วนใหญ่แพร่ระบาดโดยวิธีกล เช่น การปนเปื้อนต้นพืชปกติจากต้นพืชที่เป็นโรค โดยวิธีการเพาะปลูกต่าง ๆ เช่น การขยายพันธุ์โดยการตัดแต่งกิ่งการไถพรวน และการดูแลรักษา เชื้อไวรอยด์ สามารถติดไปกับคน เครื่องจักรกลทางการเกษตร การปนเปื้อนชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค นอกจากนี้เชื้อไวรอยด์ยังสามารถติดไปกับละอองเกสรเมื่อมีการผสมข้าม ทำให้สามารถแพร่เชื้อจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติได้(Diener, 1987)

2.5 การตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรอยด์

เนื่องจากไวรอยด์มีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ง่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพราะไม่มีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ดังนั้นการวินิจฉัยที่เหมาะสม รวดเร็วและเชื่อถือได้ในการตรวจสอบไวรอยด์จึงมีความสำคัญ เนื่องจากไวรอย์มีลักษณะเฉพาะ จึงต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบต่างๆ ดังนี้

2.5.1. Bioassay

เป็นการตรวจวินิจฉัยโรคโดยใช้พืชทดสอบ ซึ่งพืชทดสอบจะแสดงอาการได้ทั้งแบบแผลจุด และลักษณะแผลที่แพร่กระจ่ายทั่วลำต้น ไวรอยด์บางชนิดไม่จำเป็นต้องมีพืชทดสอบในการตรวจวินิจฉัยโรค เนื่องจากมีอาการเฉพาะที่เกิดกับพืชอาศัยตามธรรมชาติ และอาการดังกล่าวอาจคล้ายคลึงกับโรคที่เกิดจากเชื้อโรคพืชอื่นๆ(Diener, 1979)

2.5.2 Gel Electrophoresis Detection (polyacrylamide gel electrophoresis)

โมเลกุลของ ไวรอยด์ต่างจาก อาร์เอ็นเอทั่วไป คือ มีโครงสร้างทุติยภูมิมากจนคล้ายกับดีเอ็นเอ จึงต้องมีการตรวจหาอาร์เอ็นเอของไวรอยด์โดยใช้วิธี PAGE ใน 8 M urea จะทำให้สามารถแยกโมเลกุลของ circular RNA ออกจาก linear form ที่ปนเปื้อนจากพืชอาศัยได้(Palukaitis, *et al.*, 1991)

2.5.3 Nucleic Acid Hybridization

เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ในตัวอย่างพืชที่มีความละเอียดแม่นยำและรวดเร็ว โดยใช้ดีเอ็นเอ probe ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ viroid นั้น ๆ โดยวิธี dot blot hybridization เพราะเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อไวรอยด์ที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างพืช มีความเฉพาะเจาะจง ประหยัดเวลาและทำได้ง่าย แต่มีข้อจำกัด คือไม่สามารถแยกขนาดของอาร์เอ็นเอของไวรอยด์ออกมาได้(Maramorosch, 1991)

2.5.4. Polymerase Chain Reaction

เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์สำหรับการตรวจวินิจฉัยการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ เนื่องจากโมเลกุลของไวรอยด์เป็น single –stranded RNA จึงต้องทำ reverse transcription ก่อน เพื่อให้ได้ cDNA จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะสูง ซึ่ง primer ที่นำมาใช้มักจะสังเคราะห์ขึ้นมาจากส่วน conserved domain (C domain) ของโมเลกุลไวรอยด์ ซึ่งสามารถตรวจหาไวรอยด์ในตัวอย่างพืชได้ทุกชนิด (สุพัฒน์, 2540)

2.4.5. Sequence

การหาลำดับเบส(sequence) ของเชื้อไวรอยด์มี 2 วิธี คือ การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยตรงจากอาร์เอ็นเอของไวรอยด์ และการหาลำดับเบสโดยตรงจาก cDNA ของไวรอยด์ที่ clone ได้ ทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรอยด์ที่เคยมีการศึกษามาก่อน(คนึงนิตย์, 2541)

4. การป้องกันกำจัดโรคไวรอยด์

4.1. การใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค โดยการขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristem tip) ควบคู่กับการใช้อุณหภูมิต่ำจะมีโอกาศได้ต้นพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อไวรอยด์สูงกว่าวิธีอื่นๆ

4.2. การลดการแพร่ระบาดของโรค ทำได้โดยการทำลายต้นนนพืชที่แสดงอาการคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์การจัดการด้านโรงเรือน ปลูกพืชทดลอง หรือแปลงปลูก ควรระมัดระวังความสะอาดของเครื่องมือ ควรล้างด้วยสารละลายไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซนต์

3.3. ใช้พันธุ์ต้านทาน เช่น กรณีของเชื้อ citrus exocortis viroid