วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การเกิดโรคและการแพร่กระจายในแปลงที่สำรวจของโรคยอดเหลือง/ไหม้จากปลายยอดของมะละกอ (*Papaya carica* L.) ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma solani

Disease incidence and distribution in surveyed fields of yellow shoot/ dieback disease of papaya (*Papaya carica* L.) caused by *Candidatus* Phytoplasma solani

ศิริพร ดอนเหนือ[1, 2]*, บุณยาพร ภาคภูมิ[3] และ สุภัสสร บุญหล้า[2]

Siriporn Donnua[1, 2]*, Boonyaporn Parkpoom[1] and Suphatson Bunla[2]

[1]*ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย 73140*
[1] *Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Khamphaeng Saen, Kasetsart University, Khamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom province, Thailand, 73140*
[2] *สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย 73140*
[2] *Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture at Khamphaeng Saen, Kasetsart University, Khamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom province, Thailand, 73140*
[3] *ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร จังหวัดพิจิตร ประเทศไทย 66000*
[3] *Phichit Agricultural Research and Development Center, Phichit province, Thailand, 66000*

บทคัดย่อ: เชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคยอดเหลือง/ไหม้จากปลายยอดของมะละกอในประเทศไทยระบุได้เป็นเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma solani มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16SrRNA เหมือนกับเชื้อ *Ca*. Phytoplasma solani ที่ใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบอ้างอิง (GenBank accession: AF248959) 99.5% จากผลการวิเคราะห์ *In silico* RFLP พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrXII-A เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I *Taq*I *Bst*UI และ *Bfa*I พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างจากกลุ่มย่อยอื่น สอดคล้องกับการจัดกลุ่มเชื้อโดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และยีน *secY* ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani สำรวจในมะละกอ อายุประมาณ 1 ปี จำนวน 2 แปลง ใน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ช่วงเดือน เม.ย. ถึง ก.ย. พ.ศ. 2563 ทั้งสองแปลงพบดัชนีการเกิดโรคและอัตราการตายภายในแปลงเดียวกันมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Tukey's Honestly Significant Different (HSD) โดยค่าดัชนีการเกิดโรค เดือน เม.ย. ถึง ก.ย. พ.ศ. 2563 แปลงที่ 1 คือ 27.64, 30.65, 31.16, 38.57, 41.46 และ 48.74 ตามลำดับ แปลงที่ 2 คือ 13.23, 14.29, 15.21, 18.52, 19.58 และ 23.81 ตามลำดับ อัตราการตาย แปลงที่ 1 คือ 2.51, 5.53, 26.13, 29.15, 30.15 และ 31.16 ตามลำดับ แปลงที่ 2 คือ 0.00, 1.59, 12.70, 14.82, 14.82 และ 17.99 ตามลำดับ
คำสำคัญ: ไฟโตพลาสมา; มะละกอ; ระบุชนิด; ดัชนีการเกิดโรค; การตรวจโรค

ABSTRACT: Phytoplasma, the pathogen of yellow shoot/ dieback disease of papaya in Thailand was idientified as *Candidatus* Phytoplasma solani which showed similarity of 16SrRNA gene sequnce to *Ca*. Phytoplasma solani reference strain (GenBank accession: AF248959) 99.5%. Results of *in silico* RFLP analysis showed that phytoplasma was classified into subgroup 16SrXII-A. Restriction fractments of *Alu*I, *Taq*I, *Bst*UI, and *Bfa*I showed distinct finger printings from other subgroups. Classification by phylogenetic tree analysis of 16S-23S rRNA gene and *secY* gene sequences which classified into that same group with *Ca.* Phytoplasma solani. Papaya plants about 1 year old were serveyed in two different fields from April to September, 2020 in Khamphaeng Saen district, Nakhon Pathom

* Corresponding author: fagrspd@ku.ac.th

Received: date; April 7, 2021 Accepted: date; August 3, 2021 Published: date; December 5, 2021

province. Disease indexs and mortalrity rates within the same field were significantly increased ($P < 0.01$) in both fields when analysis of variances and comparison of means were peformed by Tukey's Honestly Significant Different (HSD) test. Disease indexs in filed 1 from April to September, 2020 were 27.64, 30.65, 31.1, 38.57, 41.46 and 48.74, respectively, and in field 2 were 13.23, 14.29, 15.21, 18.52, 19.58 and 23.81, respectively. Mortality rates in field 1 were 2.51, 5.53, 26.13, 29.15, 30.15 and 31.16 respectively and in field 2 were 0.00, 1.59, 12.70, 14.82, 14.82 and 17.99, respectively.

Keywords: Phytoplasma; papaya; identify; disease index; detection

บทนำ

มีรายงานการพบเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอในหลายประเทศ เช่น ในพื้นที่ปลูกมะละกอของประเทศออสเตรเลีย พบโรคที่สำคัญ 3 โรค ได้แก่ Papaya diseback, Papaya yellow crinkle และ Papaya mosaic ซึ่งพบรายงานความเสียหายในช่วงที่ระบาดรุนแรงตั้งแต่ 10-100% (สุภาพร, 2552; Gibb et al., 1998) มีการจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าวโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16SrRNA และยีนบริเวณ ITS รวมถึงเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคเหลืองขององุ่น ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับโรคเหลืองของแอสเตอร์ (Gibb et al., 1998) มีรายงานเชื้อสาเหตุโรคของมะละกอที่แสดงอาการไหม้หรือตายจากปลายยอดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16SrRNA เหมือนกับเชื้อ *Ca.* Phytoplasma australiense 99.7% (White et al., 1998) พบการเกิดโรคของมะละกอที่มีอาการเหลือง (papaya yellows) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในแถบภาคกลางของไต้หวัน มีสาเหตุจากเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani กลุ่มย่อย 16SrXII-A โดยพบการเกิดโรค 30-35% ในบางช่วงของฤดูปลูก ระหว่างปี ค.ศ. 2006-2010 (Bau et al., 2011) มีการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคของมะละกอทำให้เกิดอาการใบเหลือง ปลายใบม้วนงอ ปล้องสั้น ยอดแตกเป็นพุ่ม ยอดอ่อนเกิดอาการไหม้ ใบร่วง และเกิดอาการไหม้จากปลายยอดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA และวิธี RFLP พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrXIII-E ในขณะที่หลายประเทศรายงานไว้ว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI, 16SrII, 16SrX, 16SrXII, 16SrXVII (Melo et al., 2013) ที่ผ่านมาประเทศไทยยังไม่พบรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาในมะละกอ พบเพียงในอ้อย มันสำปะหลัง ข้าว งา ลำไย ไม้ดอกไม้ประดับ (สุภาพร, 2552) เนื่องจากประเทศไทยมีการปลูกมะละกอกระจายในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และสภาพแวดล้อมเอื้อต่อการเกิดโรค เกษตรกรผู้ปลูกมะละกอพบปัญหาของอาการยอดเหลืองและพัฒนาอาการรุนแรงขึ้นจนมีอาการยอดไหม้ ซึ่งทำให้มะละกอยืนต้นตายอย่างรวดเร็วในที่สุด ทีมวิจัยได้ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในมะละกอที่แสดงอาการดังกล่าวเป็นครั้งแรกในประเทศไทย รวมถึงอาการอื่นๆ ที่คล้ายอาการที่เกิดจากไฟโตพลาสมา (ศิริพรและคณะ, 2564) งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการตรวจระบุชนิดและจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรค ประเมินติดตามการเกิดโรคและการกระจายของโรคในแปลงปลูกมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ ที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคยอดเหลือง/ ไหม้จากปลายยอดของมะละกอ เพื่อประเมินความรุนแรง นำมาคำนวณดัชนีการเกิดโรคและอัตราการตายของต้นมะละกอ ซึ่งจะสามารถทราบแนวโน้มของการระบาดและประเมินความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้

วิธีการศึกษา

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR)

เก็บตัวอย่างมะละกออายุประมาณ 1 ปี ซึ่งอยู่ในระยะที่กำลังออกผล ที่แสดงอาการยอดเหลืองในแปลงปลูกมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือน เม.ย. ถึง ก.ย. พ.ศ. 2563 แบ่งตัวอย่างตามระดับความรุนแรงของอาการออกเป็น 5 ระดับ จาก 0 ถึง 4 ได้แก่ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ ระดับ 1 แสดงอาการเหลืองที่ยอด 1-25% ระดับ 2 แสดงอาการเหลืองที่ยอด 26-50% ระดับ 3 แสดงอาการเหลืองที่ยอด 51-75% และระดับ 4 แสดงอาการเหลืองที่ยอด 76% ถึงยืนต้นตาย นำตัวอย่างใบมะละกอมาตัดเอาเส้นกลางใบและชั่งให้ได้ประมาณ 0.1 ก. นำมาบดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบดตัวอย่างจนเป็นผงละเอียด แล้วนำมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Sambrook et al., 1989) จากนั้นนำมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Nested PCR โดยใช้ universal primers สำหรับตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ในการทำปฏิกิริยาในรอบแรกใช้คู่ไพรเมอร์ P1: 5'-

AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'/ P7: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' ตามด้วยคู่ไพรเมอร์ R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'/ R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' ในการทำปฏิกิริยาในรอบที่สอง (Christensen et al., 2013) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 1.8 kb และ 1.2 kb ตามลำดับ ใช้ตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่เกิดจากไฟโตพลาสมาเป็น positive control ใช้ dH_2O และตัวอย่างมะละกอที่เพาะจากเมล็ดโดยปลูกไว้ในโรงเรือนกันแมลงเป็น negative control ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 61°C และ 58°C ตามลำดับ ใช้ชุดปฏิกิริยา KOD FX Neo (Toyobo, Japan) ในปฏิกิริยารวม 0.02 มล. ประกอบด้วย 2x PCR buffer ปริมาตร 0.01 มล. 25mM dNTPs (Toyobo, Japan) ปริมาตร 0.04 มล. จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 20mM P1 (forward primer) และ 20mM P7 (reverse primer) ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร 4 unit/ul KOD FX Neo (DNA polymerase) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร dH_2O ปริมาตร 0.041 มล. สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม T-Professional (Thermocycler, Germany) จากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.0 % agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอของผลจากปฏิกิริยา

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และยีน *secY*

หาลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมา โดยวิธี Direct sequencing ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1/P7 (Christensen et al., 2013) และคู่ไพรเมอร์ PosecF1/ PosecR1 (Fialova et al., 2009) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และยีน *secY* ตามลำดับ แล้วส่งให้บริษัท Solgent ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มา edit และ align โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (MEGA 6.0) ทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค *In silico* RFLP ของยีน 16SrRNA โดยใช้โปรแกรม *i*PhyClassifier (Zhao et. al., 2009) เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มเชื้อ และทำการ Blast เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และยีน *secY* ในฐานข้อมูล GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาของทั้งสองยีนจากฐานข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0

การประเมินการเกิดโรคและหาค่าดัชนีการเกิดโรคยอดเหลือง/ ไหม้จากปลายยอดของมะละกอ

ทำการประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาในมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ อายุประมาณ 1 ปี ในอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ตั้งแต่เดือน เม.ย. ถึง ก.ย. พ.ศ. 2563 โดยแบ่งระดับความรุนแรงของอาการโรคออกเป็น 5 ระดับ จาก 0 ถึง 4 ดังที่กล่าวในข้างต้น โดยสำรวจจำนวน 2 แปลง แปลงที่ 1 มีจำนวน 199 ต้น และแปลงที่ 2 มีจำนวน 189 ต้น สำรวจแบบร่องเว้นร่อง ใน 1 ร่องจะปลูกมะละกอเป็นแถวคู่จำนวน 12-15 ต้น/แถว จากนั้นนำผลการประเมินความรุนแรงมาคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease index) ตามวิธีของ McMaugh (2005) คิดเป็น % โดยใช้สูตร ดัชนีการเกิดโรค (Disease index) = [(0xA)+(1xB)+(2xC)+(3xD)+(4xE)] x100 /(จำนวนต้นทั้งหมด x ค่าระดับความรุนแรงของโรคที่เป็นระดับสูงสุด) เมื่อ A, B, C, D และ E แทนจำนวนต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคเป็น 0, 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และประเมินอัตราการตาย (Death หรือ Mortality rate) คิดเป็น % โดยใช้สูตร อัตราการตาย (Mortality rate) = จำนวนต้นที่ตายในช่วงหนึ่งที่ศึกษา x 100 / จำนวนต้นทั้งหมดที่ศึกษา แล้วนำข้อมูลดัชนีการเกิดโรคและอัตราการตายตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ด้วยโปรแกรม R รวมถึงทำแผนที่การเกิดโรคของแต่ละแปลงเพื่อศึกษาการแพร่กระจายของโรคภายในแปลงในแต่ละเดือน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested PCR

ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างใบมะละกอจากต้นที่สุ่มมาตรวจซึ่งแสดงระดับความรุนแรงของโรคต่างกันทั้ง 5 ระดับ จำนวน 3 ต้นต่อระดับความรุนแรง จาก 0 ถึง 4 (**Figure 1**) ในปฏิกิริยารอบที่สองของ Nested PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 kb ในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจ ได้แก่ ตัวอย่าง 14-7(0), 15-13 (0) และ 5-10 (0) ที่ไม่แสดงอาการ ตัวอย่าง 4-18 (1), 8-2 (1) และ 5-7 (1) ที่แสดงอาการระดับ 1 ตัวอย่าง 4-10 (2), 1-6 (2) และ 3-3 (2) ที่แสดงอาการระดับ 2 ตัวอย่าง 7-4 (3), 7-20 (3) และ 13-16 (3) ที่แสดงอาการระดับ 3 ตัวอย่าง 9-10 (4), 5-2 (4) และ 7-7 (4) ที่แสดงอาการระดับ 4 เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในมะละกอ (TH-NKT015 accession no. MW533147) และไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย (SCWL2) ซึ่งเคยมีการยืนยันการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามาแล้ว แต่ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ใช้เป็น negative control คือ น้ำเปล่าและมะละกอปลอดโรคที่ปลูกในโรงเรือน (**Figure 2**)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และยีน *secY*

ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท TH5-2 และส่งเก็บไว้ในฐานข้อมูล GanBank, NCBI โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA ขนาด 1,680 bp โดยมีเลข accession: MT548611 และยีน *secY* ขนาด 1,052 bp โดยมีเลข accession: MW464324 เมื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มเชื้อจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA โดยใช้โปรแกรม *i*PhyClassifier พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมา ไอโซเลท TH5-2 (GenBank accession: MT548611) จำแนกได้เป็นเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani กลุ่มย่อย 16SrXII-A โดยมีความคล้ายคลึงเชื้อ *Ca*. Phytoplasma solani ที่เป็น reference strain (GenBank accession: AF248959) 99.5% เช่นเดียวกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดอาการใบเหลืองย่น ตายจากปลายยอดของมะละกอ ที่พบรายงานในไต้หวัน ที่ระบุเป็นเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani กลุ่มย่อย 16SrXII-A ซึ่งเหมือนเชื้อ reference strain (GenBank accession: AF248959) 99.6% (Bau et al., 2011) ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ *In silico* RFLP เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrXII พบว่ามีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนเชื้อในกลุ่มย่อย 16SrXII-A โดยสามารถจำแนกเชื้อแยกออกจากกลุ่มย่อยอื่นได้ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I *Taq*I *BstU*I และ *Bfa*I (**Figure 3**) ผลจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA (**Figure 4a**) และยืนยันด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* (**Figure 4b**) พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาไอโซเลท TH5-2 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani เช่นกัน ซึ่งมีรายงานว่ายีน *secY* สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ดีกว่ายีน 16SrRNA (Lee et al., 2010)

การประเมินการเกิดโรคและหาค่าดัชนีการเกิดโรคยอดเหลือง/ ไหม้จากปลายยอดของมะละกอ

ตรวจติดตามการเกิดโรคยอดเหลือง/ ไหม้จากปลายยอดของมะละกอในแปลงปลูก จำนวน 2 แปลง ใน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ตั้งแต่เดือน เม.ย. จนถึง ก.ย. พ.ศ. 2563 ซึ่งมีช่วงของอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดในรอบวันเฉลี่ยระหว่าง 24.77 – 37.72 °C (**Figure 5c**) พบว่าดัชนีการเกิดโรค (**Figure 5a**) และอัตราการตาย (**Figure 5b**) ของทั้งสองแปลงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเดือน มิ.ย. และเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับความชื้นสัมพัทธ์ (**Figure 5d**) โดยที่แปลงที่ 1 มีค่ามากกว่าแปลงที่ 2 โดยพบว่า ค่าดัชนีการเกิดโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ แปลงที่ 1 ใน เดือน เม.ย. ถึง ก.ย. คือ 27.64, 30.65, 31.16, 38.57, 41.46 และ 48.74 ตามลำดับ แปลงที่ 2 คือ 13.23, 14.29, 15.21, 18.52, 19.58 และ 23.81 ตามลำดับ ส่วน เปอร์เซ็นต์อัตราการตาย แปลงที่ 1 คือ 2.51, 5.53, 26.13, 29.15, 30.15 และ 31.16 ตามลำดับ แปลงที่ 2 คือ 0.00, 1.59, 12.70b, 14.82, 14.82 และ 17.99 ตามลำดับ จากการติดตามการแพร่กระจายของการเกิดโรคพบว่าทั้งสองแปลงมีการแพร่กระจายไปยังต้นข้างเคียงและมีระดับความรุนแรงเพิ่มขึ้นทุกๆ เดือน (**Figure 6**) ไฟโตพลาสมาสามารถแพร่ระบาดผ่านแมลงพาหะจำพวกแมลงปากดูด เนื่องจากทั้งสองแปลงไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงซึ่งอาจเป็นผลทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคภายในแปลงจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งได้ แต่ทั้งนี้ยังไม่ทราบชนิดของแมลงพาหะนำโรคนี้ ในอนาคตจึงควรศึกษาเกี่ยวกับแมลงพาหะเพิ่มเติม

เพื่อให้สามารถควบคุมโรคนี้ได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ การทดลองครั้งนี้ทำการสำรวจในระยะการเจริญเติบโตเดียวของมะละกอ คือ อายุประมาณ 1 ปี ซึ่งกำลังออกผล เมื่อมะละกอติดเชื้อและอาการพัฒนารุนแรงขึ้นจนยืนต้นตายทำให้มีผลกระทบต่อผลผลิตชัดเจน แต่ทั้งนี้ในการทดลองเมื่อเข้าฤดูฝนพบปัญหาน้ำท่วมต้นโทรมตายทั้งหมดทำให้สามารถติดตามการเกิดโรคได้เพียง 6 เดือน แต่ก็สามารถทำให้ทราบแนวโน้มการระบาดและผลกระทบจากการเกิดโรคนี้ได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการระบาดของโรคในช่วงการเจริญเติบโตของมะละกอในระยะต่างๆ และศึกษาติดตามการระบาดให้ครอบคลุมตลอดทั้งปี จากการทดลองนี้พบว่าในแปลงที่พบการเกิดโรครุนแรงมีดัชนีการเกิดโรคสูงถึง 48.74% และมีอัตราการตายสูงถึง 31.16% ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานในไต้หวันมีรายงานว่าพบการเกิดโรคในบางช่วงของฤดูปลูก ระหว่างปี ค.ศ. 2006-2010 โดยพบการเกิดโรค 30-35% (Bau et al., 2011) ส่วนในออสเตรเลียพบโรคของมะละกอที่เกิดจากไฟโตพลาสมาทำให้เกิดความเสียหายระหว่าง 10 - 100% แม้จะเป็นเชื้อคนละสปีชีส์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคเหลืองในแอสเตอร์ (Gibb et al., 1998) และพบเชื้อ *Ca.* Phytoplasma australiense ที่เข้าทำลายมะละกอเช่นกัน (White et al., 1998)

Figure 1 Severity levels of yellow shoot/ dieback disease of papaya from 0 to 4 scores; (a) score 0 = asymptomatic plant, (b) score 1 = 1-25% yellow leaves, (c) score 2 = 26-50% yellow and necrosis leaves, (d) score 3 = 51-75% yellow and necrosis leaves, (e) and (f) score 4 = 76% yellow and necrosis leaves to death, respectively

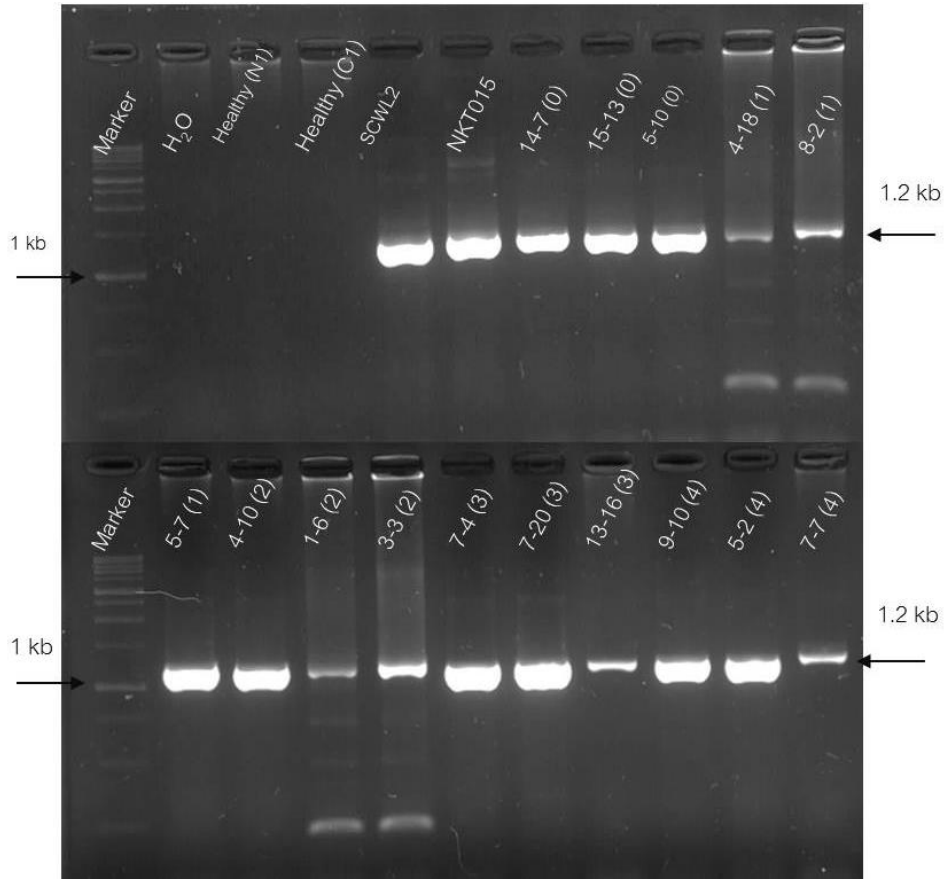

Figure 2 Gel electrophoresis of 16SrDNA amplicons, Nested PCR using R16F2n/R16R2 primers: Marker = 1 kb DNA ladder, 0.5 µg/µl, ExcelBandTM (SMOBio, Taiwan); dH_2O = negative control; Healthy (N1) = asymptomatic papaya from orchard; Healthy (C1) = asymptomatic papaya in screenhouse; SCWL2 = sugarcane white leaf phytoplasma (positive control); TH-NKT015 (positive control); 14-7(0), 15-13 (0) and 5-10 (0) = asymptomatic leaves; 4-18 (1), 8-2 (1) and 5-7 (1) = 1-25% yellow leaves; 4-10 (2), 1-6 (2) and 3-3 (2) = 26-50% yellow and necrosis leaves; 7-4 (3), 7-20 (3) and 13-16 (3) =51-75% yellow and necrosis leaves; 9-10 (4), 5-2 (4) and 7-7 (4) = 76% yellow and necrosis leaves to death

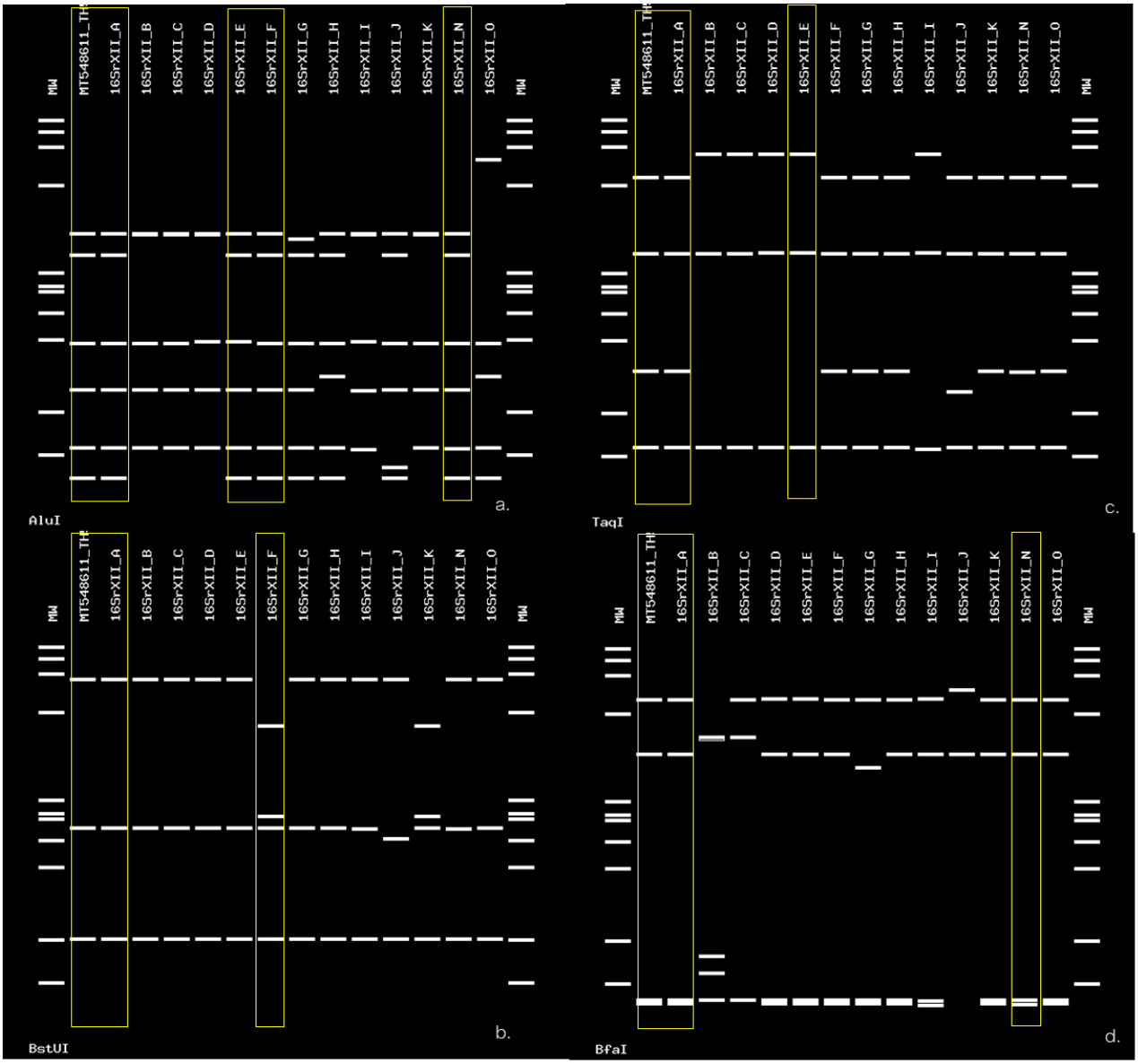

Figure 3 The virtual RFLP patterns were derived from the query 16SrDNA fragment of the TH5-2 isolate (GenBank accession: MT548611) compared to reference strains in 16Sr group XII: (a.) Restriction pattern of *Alu*I showed the TH5-2 isolate was similar to subgroup A, E, F and N; (b.) *Taq*I, (c.) *BstU*I, and (d.) *Bfa*I restriction patterns showed the TH5-2 isolate was different from subgroup E, F and N, respectively. The most similar is the reference pattern of the 16Sr group XII, subgroup A (GenBank accession: AF248959), with a similarity coefficient of 0.97

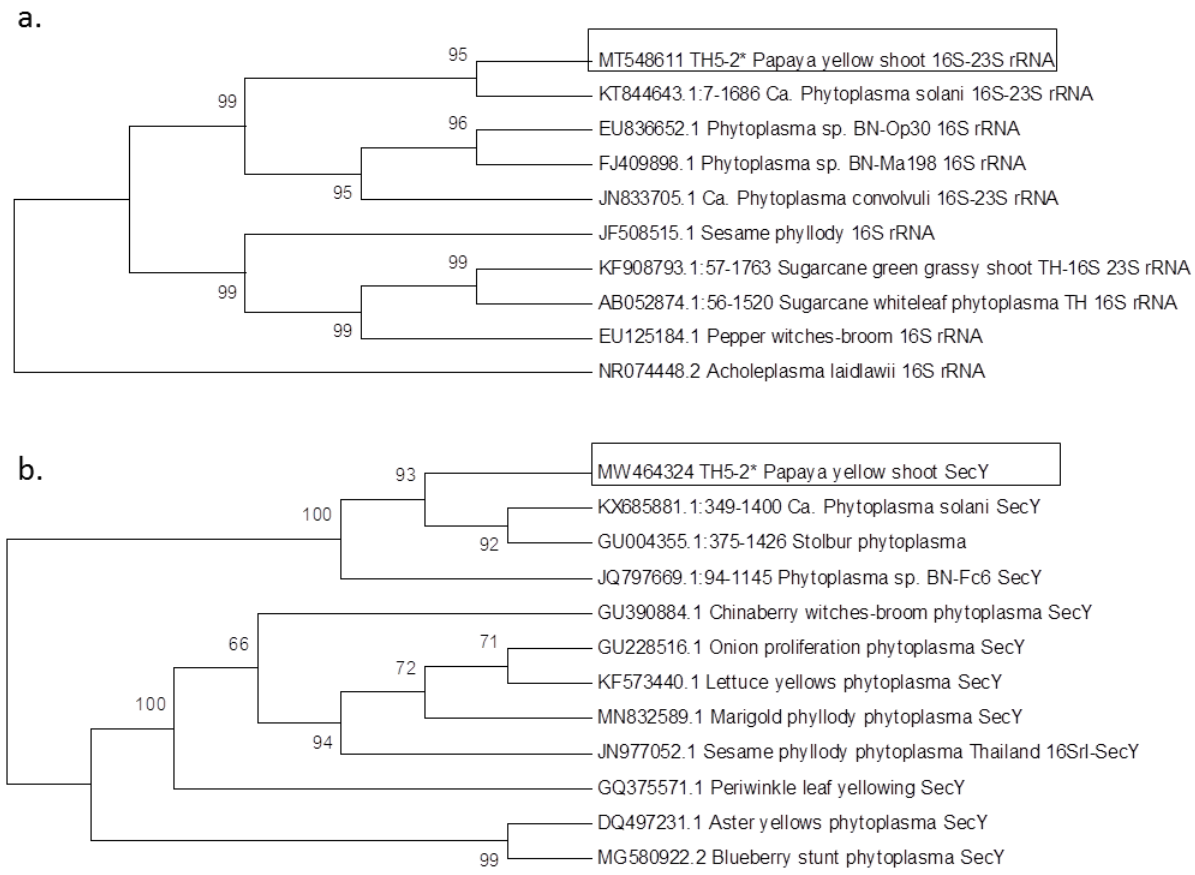

Figure 4 The UPGMA phylogenetic trees were constructed using MEGA 6.0, bootstrap 1,000 replicates of 16S-23S rRNA gene sequences and *secY* gene sequences of the TH5-2* isolate compared to sequences from GenBank, NCBI: (a.) 16S-23S rRNA gene sequences of TH5-2* isolate compared to eight phytoplasma reference strains and *Acholeplasma morum* as outgroup strain, (b.) *secY* gene sequences of TH5-2* isolate compared to eleven phytoplasma reference strains

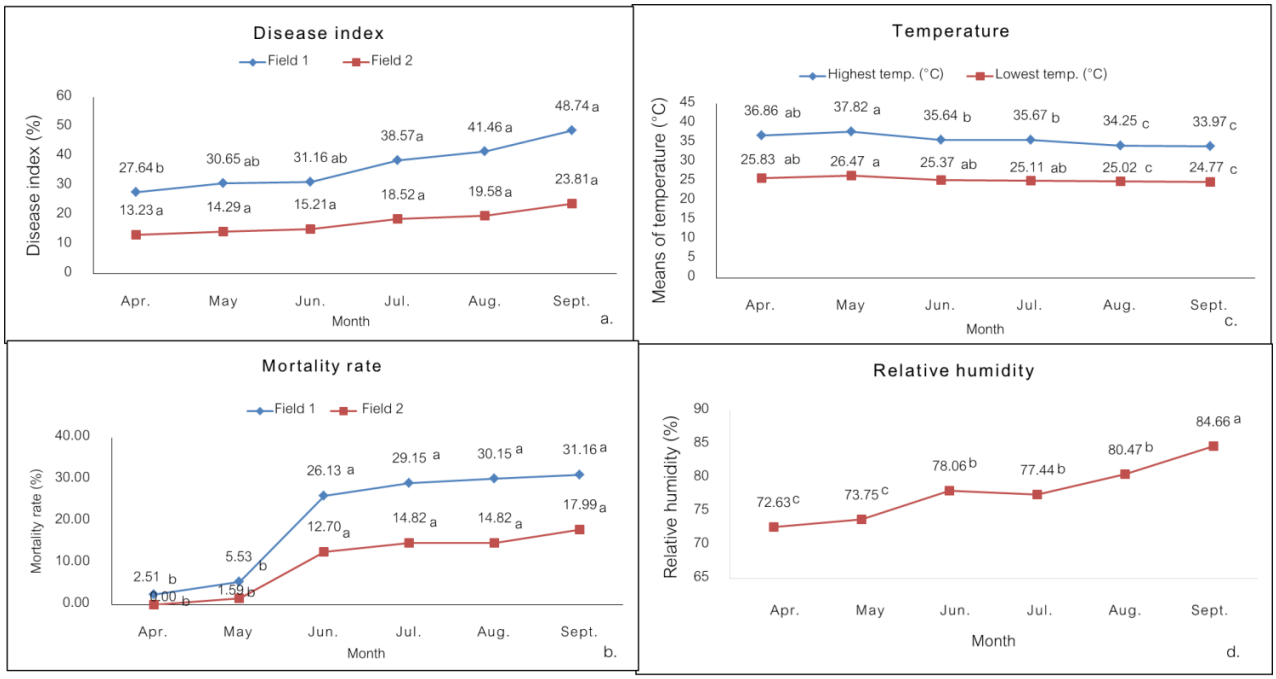

Figure 5 Incidence of yellow shoot/ dieback disease of papaya in two different fields in Nakhon Pathom province since April to September, 2020:

(a.) disease indexs and (b.) percentage of mortality rates, mean values within the same field followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey' s HSD test ($P < 0.01$), (c.) means of high-low temperatures and (d.) %humidity ($P < 0.01$)

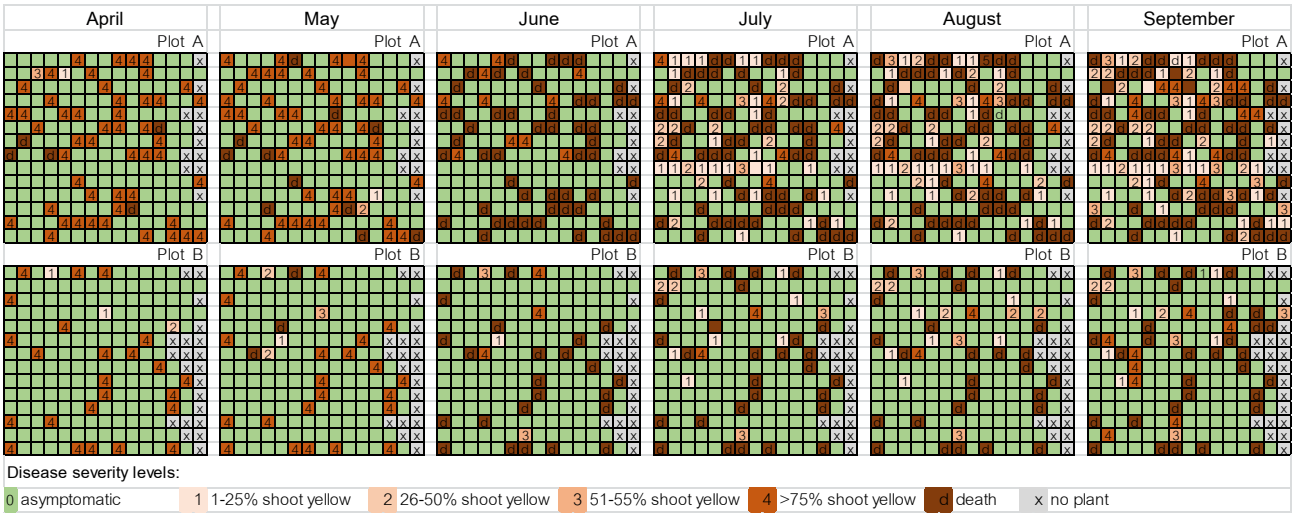

Figure 6 Occurrence and distribution of yellow shoot/ dieback disease of papaya in two different fields, plot A and B in Nakhon Pathom province since April to September, 2020

สรุป

เชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดอาการยอดเหลืองและอาการไหม้จากปลายยอดของมะละกอในประเทศไทยระบุได้เป็นเชื้อ *Ca.* Phytoplasma solani กลุ่มย่อย 16SrXII-A โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16SrRNA คล้ายคลึงเชื้อ *Ca*. Phytoplasma solani (GenBank accession: AF248959) 99.5% ยืนยันผลการจำแนกเชื้อด้วยการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบริเวณ 16S-23S rRNA และ ยีน *secY* และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ *In silico* RFLP โดยใช้โปรแกรม *i*PhyClassifier ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อแยกออกจากกลุ่มย่อยอื่นได้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I *Taq*I *BstU*I และ *Bfa*I

จากการประเมินติดตามการเกิดโรคยอดเหลือง/ ไหม้จากปลายยอดของมะละกอในแปลงปลูก ใน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยศึกษาเปรียบเทียบจำนวน 2 แปลง ถึงแม้ว่าทั้งสองแปลงมีการติดเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน แต่พบว่าดัชนีการเกิดโรคและอัตราการตายของทั้งสองแปลงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากมีแมลงพาหะภายในแปลงทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคภายในแปลงจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งได้เนื่องจากทั้งสองแปลงไม่มีการกำจัดแมลงภายในแปลง และพบว่าเมื่อความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นมีการเกิดโรคเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโรคยอดเหลืองหรือไหม้จากปลายยอดของมะละกอเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีแนวโน้มสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกมะละกอในอนาคตเป็นอย่างมาก เนื่องจากอาการยอดเหลืองมีการพัฒนาอาการรุนแรงขึ้นจนเกิดเป็นอาการไหม้และยืนต้นตายในที่สุด การวินิจฉัยโรคที่มีความแม่นยำจะนำไปสู่การควบคุมโรคที่ถูกวิธี ซึ่งการควบคุมโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาที่สำคัญ เช่น การกำจัดต้นที่เป็นโรคทิ้งก่อนที่จะมีการระบาดรุนแรงเป็นวงกว้างซึ่งเป็นการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเกษตรกรผู้ปลูกมะละกอ นอกจากนี้การควบคุมแมลงพาหะเพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อกรณีที่มีต้นที่ติดเชื้อในแปลงหรือแหล่งของเชื้อ (inoculum) ซึ่งควรทำการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของแมลงพาหะที่ถ่ายทอดโรคเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถควบคุมโรคได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร ภายใต้โครงการ “การเพิ่มศักยภาพการผลิตมะละกอ” เลขที่สัญญา RDG6220016

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร ดอนเหนือ บุณยาพร ภาคภูมิ และ เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์. 2564. *Candidatus* phytoplasma solani สาเหตุโรคของมะละกอที่เกิดจากไฟโตพลาสมาในประเทศไทย. แก่นเกษตร. 49(5): 1249-1258.

สุภาพร กลิ่นคง. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช. โรงพิมพ์บริษัทศูนย์การพิมพ์เพชรรุ่ง จำกัด, นนทบุรี.

Bau, H. J., S. C. Hung , W. C. Chang, and Y. K. Chen. 2011. First report of group 16SrXII phytoplasma associated with papaya yellows in Taiwan. Plant Disease. 95: 1581.

Christensen, N.M., H. Nyskjold, and M. Nicolaisen. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quanti fication. P. 245-252. In: M. Dickinson and J. Hodgetts . Phytoplasma: Methods and Protocols. Humana Press, London.

Fialova, R., P. Valova, G. Balakishiyeva, J. L. Danet, D. Safarova, X. Foissac, and M. Navratil. 2009. Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia (Czech Republic). Journal of Plant Pathology. 91: 411-416.

Gibb, K. S., B. Schneider, and A.C. Padovan. 1998. Differential detection and genetic relatedness of phytoplasmas in papaya. Plant Pathology. 47: 325-332.

Lee, I.-M., K.D. Bottner-Parker, Y. Zhao, R. E. Davisand and N.A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 2887-2897.

McMaugh, T. 2005. Guidelines for surveillance for plant pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No.119, ACIAR, Canberra.

Melo, L., E. Silva, D. Flôres, J. Ventura. H. Costa, and I. Bedendo. 2013. A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with Papaya apical curl necrosis. European Journal of Plant Pathology. 137: 445–450.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

White, D.T., L.L. Blackall, P.Y. Scott, and K.B. Walsh. 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in ' *Candidatus* Phytoplasma australiense ' and a new taxon, ' *Candidatus* Phytoplasma australasia'. International Journal of Systematic Bacteriology. 48: 941-951.

Zhao, Y., W. Wei, I. Lee, J. Shao, X. Suo, and R. E. Davis. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *i*PhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 2582–2593.