

การศึกษาและการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง(*Candidatus Liberibacter asiaticus*) ของส้มในประเทศไทย

Investigation and Detection on Causal Agent of Citrus Greening (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Thailand

คำนำ

ส้มเป็นไม้ผล อยู่ในวงศ์ (Family) Rutaceae และอยู่ในสกุล (Genus) *Citrus* เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่มีการปลูกส้มเกือบทุกภาคของประเทศ ทั้งในการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก และยังใช้ส้มในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ ใช้เป็นสมุนไพร และส้มเขียวหวานยังมีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ citronellol linalool citral cardinene และ limonene เปลือกของผลส้มเกลี้ยงและส้มตรานำมาทำแยมใช้ทาขนมปัง ส้มมีคุณค่าทางอาหารประกอบด้วยวิตามินซีและวิตามินดีในน้ำส้มเป็นกากอาหารช่วยระบบขับถ่าย การรับประทานส้มยังช่วยป้องกันการเกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคไข้หวัด โรคเลือดออกตามไรฟัน และโรคท้องผูก (อำไพวรรณ และคณะ, 2542)

ส้มที่มีในประเทศไทย ได้แก่ ส้มจี๊ด ส้มแก้ว ส้มจุก ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มเกลี้ยง ส้มตรา มะนาว มะกรูด ส้มแต่ละชนิดจะนิยมปลูกในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ส้มจี๊ดนิยมปลูกในกระถางเป็นไม้ประดับ เพราะขนาดต้นเล็ก ส้มแก้วมีปลูกมากในภาคกลางที่จังหวัดสมุทรสงคราม ส้มจุกปลูกมากที่สุดในภาคใต้ ส้มที่มีการปลูกมากที่สุดในประเทศไทย คือ ส้มเขียวหวาน จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดคือ จังหวัดสระบุรี นครนายก ลพบุรี และที่ภาคเหนือคือจังหวัดแพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงราย และกำแพงเพชร นอกจากนี้ยังมีการปลูกส้มโอในแถบจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี (อำไพวรรณ, 2545) ได้มีการกำหนดเขตส่งเสริมการปลูกส้มไว้เช่นกัน โดยพิจารณาจากสภาพความเหมาะสมของภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และปัจจัยเสริมด้านอื่น ๆ ซึ่งก็สามารถสรุปได้ว่าพื้นที่ที่มีความเหมาะสมต่อการปลูกส้มในประเทศไทยนั้นควรอยู่ในพื้นที่ของจังหวัดต่าง ๆ รวม 33 จังหวัด คือ พะเยา เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ น่าน สุโขทัย ชัยนาท สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี พระนครศรีอยุธยา ปทุมธานี อ่างทอง กาญจนบุรี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี สุพรรณบุรี นครนายก ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี นราธิวาส และ ยะลา

เนื่องจากการระบาดของโรคส้มที่เกิดอาการรากเน่าและโรคกรีนนิ่งระบาดอย่างรุนแรง เกษตรกรหลายรายเลิกอาชีพการปลูกส้ม ไปโดยสิ้นเชิง จากพื้นที่การผลิต 20,000 – 30,000 ไร่ ในอดีตจึงลดลงเหลือ 8,000 – 10,000 ไร่ ในปัจจุบัน ซึ่งโรคสามารถเกิดกับการปลูกส้มได้ตั้งแต่ระยะแรกปลูก เกิดได้กับทุกส่วนของต้นส้ม เพราะสามารถเกิดระบาดได้ตลอดระยะเวลาของการปลูก บางครั้งความเสียหายจากปัญหาด้านโรคที่เกิดขึ้นนั้นอาจรุนแรงมากจนทำให้ผู้ปลูกส้มไม่ประสบความสำเร็จในอาชีพต่างๆที่ในบางสภาพหรือสภาวะการณั้้นผู้ปลูกสามารถป้องกันและแก้ไขปัญหาล่วงได้ก่อนที่ความเสียหายจะเกิดขึ้น ซึ่งโรคที่เข้าทำลายส้มนั้นเกิดได้จากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ได้แก่โรคแคงเกอร์ โรครากเน่าโคนเน่า โรคเมลานอส โรคแผลสะเก็ด โรคขี้เน่าผลเน่า โรคทริสเทซา (Citrus Tristeza) นอกจากนั้นยังมีแมลงและไรศัตรูส้มที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่การปลูกส้ม ได้แก่ หนอนขนอบส้ม หนอนแก้วส้ม เพลี้ยไฟ ไรแดง และไรสนิม (อำไพพรรณ และคณะ, 2543) ส่วนโรคที่มีความสำคัญต่อเกษตรกรผู้ปลูกส้มที่สำคัญคือโรคกรีนนิ่ง ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อสาเหตุมีการเจริญเติบโตในท่ออาหารของพืช ไม่สามารถนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ เมื่อเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อส้ม ทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบแสดงอาการคล้ายขาดธาตุอาหารโดยเฉพาะการขาดธาตุสังกะสี ทำให้ผลผลิตของส้มลดลง ผลส้มไม่ได้มาตรฐาน ส่งผลต่อการขยายพันธุ์ของส้มและทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของเกษตรกรผู้ปลูก โรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทย เกิดจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Garnier *et al.*, 2000) สามารถถ่ายทอดโรคโดยอาศัยแมลงพาหะ คือ เพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri*, Toorawa, 1998) ซึ่งต้นที่เป็นโรคจะแสดงอาการ คือ ใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียวในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง อาการที่พบบนผลคือผลมีขนาดเล็กไม่สม่ำเสมอ รสชาติขม ผลมีอาการแฉ่เขียว เมล็ดของผลมีลักษณะผิดปกติคือเมล็ดลีบหรือมีขนาดเล็กและมียอดดำ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคให้มีความรวดเร็ว และแม่นยำ และหาวิธีการป้องกันกำจัด เพื่อใช้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการของโรครินนึ่งในพื้นที่ปลูกส้มต่างๆ
2. พัฒนารูปแบบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครินนึ่ง และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ โดยใช้เทคนิค PCR
3. โคลนยีนในส่วนของโปรตีนของไรโบโซมและผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำโดยวิธีเซรัมวิทยา

การตรวจเอกสาร

1. โรครินนิง (Citrus Greening)

โรครินนิงเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดมากในแถบเอเชียและแอฟริกา ซึ่งเชื้อสาเหตุนี้เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถเลี้ยงหรือเจริญเติบโตได้ในอาหารสังเคราะห์ แบคทีเรียจะจำกัอยู่ในท่ออาหาร (phloem) ของพืชอาศัย (Hocquellet *et al.*, 1999) จะมีความเข้มข้นต่ำเมื่ออยู่ใน sieve tubes ของพืชอาศัย (Hung *et al.*, 1999) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน alpha subdivision *Proteobacteria* มี 2 สายพันธุ์ คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* (Murray and Schleifer, 1994) การเรียกชื่อโรคนั้นก็มีความแตกต่างในแต่ละประเทศในแถบแอฟริกา ฝรั่งเศส และประเทศไทยเรียกว่า “Greening” ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า “Leaf mottling” ประเทศอินเดีย เรียกว่า “Decline” ประเทศ อินโดนีเซีย และ อังกฤษ เรียกว่า “Vein phloem degeneration” ประเทศจีน เรียกว่า “Huang long bing” หรือ HLB ประเทศไต้หวัน เรียกว่า “Likubin” และในประเทศสเปน เรียกว่า “Enverdecimiento” (Planet *et al.*, 1995)

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของโรครินนิง

เชื้อสาเหตุของโรครินนิงนั้นอยู่ในสกุล *Candidatus Liberibacter* เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และปรากฏอาการเมื่อเชื้อเข้าไปเจริญในต้นพืช (Buitendag and von Broembsen, 1993; Lin *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1986) เป็นแบคทีเรียที่มี peptidoglycan ประกอบคล้ายผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมลบ (Moll and Martin, 1973; Garnier and Bove, 1983) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโครงสร้างของเชื้อสาเหตุของโรครินนิงเป็นท่อนยาวคดขนาด 350-550 x 600-1500 นาโนเมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100-200 นาโนเมตร (Moll and Martin, 1973) หนา 20-25 นาโนเมตร เมื่อเจริญในสิ่งมีชีวิตอื่นรูปร่างแบบท่อน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 700-800 นาโนเมตร แบคทีเรียสาเหตุโรครินนิงนั้นมี 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่พบในแอฟริกาใต้ คือ *Candidatus Liberibacter africanus* และสายพันธุ์ที่พบในเอเชีย คือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Garnier *et al.*, 2000) ส่วน subspecies ของ *Candidatus Liberibacter africanus* คือ *Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis* ซึ่งพบที่ The Western Cape ในประเทศแอฟริกาใต้ โดยพบในพืช *Calodendrum capensis* Thunb. ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของแอฟริกาใต้

และใน subspecies นี้ ก็สามารถที่จะเข้าทำลายส้มได้เช่นกัน Garnier *et al.* (2000) ได้เปลี่ยนชื่อสกุล (genus) ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิงจาก *Liberobacter* เป็น *Liberibacter* ที่รายงาน International Code of Nomenclature of Bacteria ซึ่งมีการพบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิงชนิดใหม่ที่ Sao Paulo ในประเทศบราซิลโดยจากการตรวจสอบด้านชีวโมเลกุลพบว่าในส่วนของ 16S rDNA มีความแตกต่างจาก *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* โดยใช้ชื่อใหม่ว่า *Candidatus Liberibacter americanus* (Teixeira *et al.*, 2005) การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิงนั้นอาศัยการเพิ่มจำนวนในแมลงพาหะ ยังไม่ทราบหลักฐานทางด้านชีวโมเลกุลว่าสามารถเพิ่มได้อย่างไร Moll and Martin (1973) ได้กล่าวว่าการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิงในแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ชนิด *Trioza erytrea* ใช้เวลามากกว่า 9 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในตัวแมลงพาหะ และแบคทีเรียมีโอกาสน้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ artificial media โดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลจะมุ่งศึกษาในความแตกต่างกันทางด้านพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ และดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบ (DNA probe) โดยมีการพัฒนาเพื่อให้มีความจำเพาะกับการตรวจสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ (Bove *et al.*, 1996; Garnier and Bove, 1996; Harakava *et al.*, 2000; Tiag *et al.*, 1996)

โรคกรีนนิงที่พบในแถบแอฟริกันนั้นลักษณะอาการจะปรากฏได้ต้องมีอุณหภูมิที่เย็น (ต่ำกว่า 25° ซ) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อความร้อน (Heat – sensitive strain) โดยจะไม่พบลักษณะอาการของโรคเมื่อมีอุณหภูมิสูงกว่า 27° ซ ดังนั้นถ้าจะศึกษาต้องมีการเลี้ยงพืชที่จะใช้ทดสอบในสภาพโรงเรือนที่มีการปรับสภาพของอุณหภูมิ และในแถบแอฟริกาใต้จะพบลักษณะอาการของโรคกรีนนิงชัดเจนในช่วงของฤดูหนาวมากกว่าฤดูร้อน โดยจากการสำรวจพบว่าจะพบลักษณะอาการของโรคได้นั้นโดยพื้นที่ต้องมีความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 700 เมตร โรคกรีนนิงที่พบในประเทศอินเดียนั้นจะพบลักษณะอาการได้ดีในสภาพอุณหภูมิที่ร้อนโดยมีอุณหภูมิมากกว่า 25° ซ ก็สามารถพบอาการได้ ส่วนโรคกรีนนิงที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงนั้นลักษณะอาการจะปรากฏให้เห็นได้ง่ายกว่าและภายใต้อุณหภูมิที่ร้อนได้ (มากกว่า 27° ซ) เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อความร้อน (heat – tolerant strain) และจะพบลักษณะอาการของโรคได้น้อยหรืออาจจะไม่พบลักษณะอาการของโรคได้ที่ระดับความสูง 1,500 เมตร ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่สภาพความสูงนั้นไม่พบแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ (Aubert, 1987) ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบลักษณะอาการของโรคกรีนนิงที่แสดงออกบนใบของทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า ที่อุณหภูมิ 22° ซ ถึง 24° ซ พบลักษณะอาการของโรคกรีนนิงสายพันธุ์แอฟริกาปานกลาง แต่ที่ อุณหภูมิ 27° ซ ถึง 32° ซ นั้นจะไม่พบลักษณะอาการของโรค

ส่วนในสายพันธุ์ของเอเชียซึ่งนำตัวอย่างมาจากประเทศฟิลิปปินส์และประเทศอินเดียพบว่าลักษณะอาการของโรคนั้นปรากฏได้ทั้งสองช่วงของอุณหภูมิ

เชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* เป็นเชื้อสาเหตุของโรครินนิ่งที่พบในแถบเอเชีย โดยจากการศึกษาพบว่าน่าจะมีการพัฒนาของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในพืชตระกูลส้มเท่านั้น ส่วนใน *Candidatus Liberibacter africanus* นั้นการพัฒนาของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอาจจะมีพืชอาศัยอื่นด้วยคือพืชพื้นเมืองที่พบในแถบแอฟริกาซึ่งอยู่ในวงศ์ Rutaceous โดยจากการศึกษาพืชพื้นเมือง *Toddaria lanceolata* โดยพบว่าพืชนี้เป็นพืชอาศัยที่ดีของเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* และแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว *Trioza erytrea* (Garnier and Bove, 1996) Lin and Lin (1990) ได้พิสูจน์โรครินนิ่งสายพันธุ์เอเชียในทางตะวันออกเฉียงเหนือของจังหวัด Guangdong ในประเทศจีน พบว่าอาจจะเป็นไปได้ที่เชื้อสาเหตุโรครินนิ่งมีจุดเริ่มต้นของพื้นที่การระบาดคล้ายกับการเข้าทำลายของเพลี้ยไก่อั่ว *Diaphorina citri* โดยเพลี้ยไก่อั่วนี้ น่าจะมีการพัฒนาการแพร่ระบาดคล้ายกับกับ *Diaphorina species* ในประเทศอินเดีย

3. การเคลื่อนย้ายของเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Distributions of Citrus Greening)

ความสำคัญของการเคลื่อนย้ายเชื้อสาเหตุของโรครินนิ่งนั้นส่วนใหญ่เกิดขึ้นในพืชวงศ์ Rutaceous หรือโดยอาศัยแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว จากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่งโดยที่แมลงพาหะนั้นมีเชื้อแบคทีเรียอยู่ พบว่าในประเทศแถบเอเชียที่มีการรายงานและพบโรครินนิ่งนั้น คือ ประเทศจีน ประเทศฮ่องกง เกาะทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่น ประเทศไทย และประเทศเวียดนาม และจากหลักฐานการสำรวจพบว่าโรครินนิ่งแพร่ระบาดในประเทศญี่ปุ่น (Subandiyah *et al.*, 2000) ได้มีการยืนยันโรครินนิ่งโดยการวินิจฉัยทางด้านชีวโมเลกุลใน 4 พื้นที่ของ Okinawa เริ่มการศึกษาจากการสำรวจโรครินนิ่งที่พบใน เกาะทางตอนใต้ของ Iriomote จากนั้นก็ทำการสำรวจโรครินนิ่งในประเทศอินเดีย บังกลาเทศ ภูฏาน เนปาล และประเทศปากีสถาน ในแถบมหาสมุทรอินเดีย หลังจากนั้นก็มีพบโรครินนิ่งครั้งแรกใน ประเทศศรีลังกา เกาะ Comoros, Madagasca , Mauritius และ Reunion ซึ่งในพื้นที่ที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นพบว่ามีประชากรของแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว *Diaphorina citri* และเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครินนิ่งที่พบในแถบเอเชีย ใน Mauritius และ Reunion พบว่ามีเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* ซึ่งเป็นโรครินนิ่งที่พบในแถบแอฟริกาและประชากรของแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่วชนิด *Trioza erytrea* คล้ายที่พบในประเทศซาอุดีอาระเบีย peninsula และในประเทศเยเมนซึ่งพบเชื้อสาเหตุของ

โรคกรีนนิ่งทั้งสองสายพันธุ์ (Garnier and Bove, 1983) ส่วนในประเทศแถบทวีปแอฟริกา คือ ประเทศ เบนิน ไค แคเมอรูน สาธารณรัฐแอฟริกากลาง เอธิโอเปีย เคนยา มาลาวิ รวันดา โชมาเลีย แอฟริกาใต้ สวาซิลแลนด์ แทนซาเนีย และ ซิมบับเว ซึ่งประเทศที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นมี เชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งที่พบในแถบแอฟริกา และประชากรของ แมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว *Trioza erytrea* และมีการสำรวจพบแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว *Diaphorina citri* ในประเทศอิหร่าน (Toorawa, 1998) Verma and Atriri (1993) ได้รายงานว่ามากกว่า 50% ของพืชในพื้นที่ของประเทศไนจีเรีย แสดงอาการของโรคกรีนนิ่งแต่ไม่พบเชื้อสาเหตุของโรค กรีนนิ่งและได้มีการศึกษาและยืนยันผลโดยวิเคราะห์ทางด้านชีวโมเลกุล พบว่าประเทศลาวและ ประเทศพม่าว่ามีโรคกรีนนิ่งที่เกิดจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Garnier and Bove, 2002) ได้มีรายงานเพิ่มชื่อของประเทศกัมพูชาว่ามีการพบโรคกรีนนิ่ง และโรคกรีนนิ่งนั้นยังมีการ พบได้ในประเทศปาปัว นิวกินี ปี 1999 (Lee, 2002) และมีรายงานเพิ่มเติมว่าพบในประเทศบรูไน และประเทศสิงคโปร์ เมื่อเดือนกรกฎาคมปี 2004 พบว่ามีรายงานการพบโรคกรีนนิ่งระบาดใน ประเทศบราซิลโดย Fundecitrus (Anon, 2004)

4. การเข้าทำลายพืชและลักษณะอาการ

โรคกรีนนิ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญกับผลผลิตส้ม มีการสำรวจพบว่าเมื่อ 8 ปี ที่ผ่านมาของ Reunion Island ต้นไม้ได้รับความเสียหายมากกว่าร้อยละ 65 และไม่สามารถให้ผลผลิต และ ขยายพันธุ์ต่อได้ (Aubert, 1987) ในประเทศไทยต้นส้มมีการตายแบบช้าๆ เมื่อเริ่มให้ผลผลิตแล้ว 5-8 ปี หลังจากที่ได้รับเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง (Roistacher, 1996) Roistacher (1996) ได้กล่าวว่า เชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งสามารถเจริญอยู่ในต้นพืชเป็นเวลาอย่างน้อย 10 ปี โดยจะเริ่มติดเชื้อจากที่ใบ และเชื้อก็จะสามารถแพร่ระบาดไปยังใบอื่นๆ ลักษณะอาการที่พบนี้อาจมีความคล้ายกับการขาด ธาตุอาหารของพืชโดยจะคล้ายกับการขาดธาตุสังกะสี และใบจะมีลักษณะอาการด่าง (mottle) ซึ่ง อาการด่างนั้นก็จะมีความแตกต่างกันกับการขาดธาตุอาหารของพืช โดยอาการด่างของโรคกรีนนิ่ง นั้นการด่างบริเวณใบ ส่วนการขาดธาตุอาหารนั้นจะปรากฏอาการด่างบริเวณเส้นใบซึ่งขึ้นอยู่กับว่า พืชขาดธาตุอาหารชนิดใด และจะทำให้เกิดอาการที่ผลโดยการพัฒนาของผลจะหยุดลงและทำให้ ขนาดเล็กลง และเกิดอาการกิ่งแห้งตาย นอกจากนี้ยังมีลักษณะอาการอื่นๆคือ ผลมีขนาดเล็ก ขนาด ของผลลีบ รสชาติขม เมล็ดลีบ (Capoor *et al.*, 1974) ส่วนลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่งที่พบใน ประเทศไทยนั้น อาการที่พบบนใบนั้นจะมี 2 ลักษณะคือ ลักษณะที่ 1 ใบจะแสดงอาการเหลืองโดย เส้นใบมีสีเขียวชัดเจน บนใบแก่อาจพบเส้นใบและเนื้อใบติดกันโปร่งใสกว่าปกติ (vein clearings)

มักพบอาการใบเหลืองและมีแต้มสีเขียวกระจาย (Blotchy mottling) ยอดมักแห้งตายอย่างรวดเร็ว มีอาการตายจากปลายกิ่ง ลักษณะที่ 2 ใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียว ในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง คล้ายการขาดธาตุสังกะสี ใบมักตั้งขึ้น (ธีระ, 2532; Schwarz, 1965; Schneider, 1968) อาการที่พบบนผลคือผลมีขนาดเล็กขนาดไม่สม่ำเสมอ รสชาติขม (McClean and Schwarz, 1970) เนื่องจากความเข้มข้นของกรดสูงจนน้ำตาล ผลมีอาการแฉกเขียว เมล็ดของผลมีลักษณะผิดปกติคือเมล็ดลีบหรือมีขนาดเล็กและมืดดำ (McClean and Schwarz, 1970; Kapu *et al.*, 1978) ส่วนในมะนาว ไม่ค่อยพบลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่งเพราะมีไวรัสระบาดรุนแรงมาก จึงอาจเป็นอาการของโรคไวรัสขมอาการของโรคกรีนนิ่งได้ (อำไพวรรณ, 2520) ได้พบลักษณะอาการที่คล้ายกับอาการของโรคกรีนนิ่ง และได้นำลักษณะอาการดังกล่าวมาตรวจสอบและไม่พบว่าเป็นโรคกรีนนิ่งโดยลักษณะอาการที่เก็บมานั้นมีอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสีของพืช (Davis *et al.*, 2000)

Toorawa (1998) ศึกษาโดยใช้ค่าทางสถิติ ตรวจสอบและหาค่าการเข้าทำลายของโรคกรีนนิ่งทั่วโลก พบว่ามีต้นพืชประมาณ 50 ล้านต้นในทางเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งเข้าทำลาย อีก 3 ล้านต้นที่เป็นโรคกรีนนิ่งในประเทศอินโดนีเซีย และอีก 10 ล้านต้นนั้นเป็นโรคกรีนนิ่งที่พบในแถบแอฟริกา ส่วนในประเทศอินเดียและประเทศซาอุดีอาระเบียพบว่าต้นส้มที่ผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมมีการตายแบบทรุดโทรม ทำให้เกิดความเสียหายกับการผลิตส้ม ซึ่งเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งเข้าทำลาย

5. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

การถ่ายทอดเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งส่วนใหญ่มีการแพร่กระจายโดยอาศัยแมลงพาหะคือ เพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri*) มักแพร่ระบาดในแปลง (Roistacher, 1991) จากการทดลองนำแมลงดังกล่าวมาเลี้ยงพบว่า เพียง 5-7 ชั่วโมง แมลงสามารถถ่ายทอดโรคกรีนนิ่งเข้าสู่ต้นพืชที่ไม่เป็นโรคได้ (Xu *et al.*, 1988) และเชื้อสาเหตุเพิ่มจำนวนในแมลงพาหะนั้น (Moll and Martin, 1973; Aubert, 1987) พบว่าตัวเต็มวัยและตัวอ่อนในวัยที่ 4-5 ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มสามารถแพร่กระจายเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยใช้เวลาเพียง 1-25 วัน (Roistacher, 1991; Xu *et al.*, 1988) ซึ่งตัวอ่อนวัยที่ 4-5 มีเชื้อสาเหตุของโรคเจริญได้จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยก็จะแพร่ระบาดโรคกรีนนิ่งได้อย่างรวดเร็วหลังจากที่เมล็ดงอกแล้ว และมีรายงานว่าสามารถที่จะแพร่ระบาดได้ภายใน

24 ชั่วโมง สำหรับโรคกรีนนิ่งที่เกิดในแอฟริกา (Buitendag and von Broembsen, 1993) ส่วนตัวอ่อนในวัยที่ 1-3 นั้นไม่มีการแพร่ระบาดของโรค (Xu *et al.*, 1988)

Hung *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม (*Diaphorina citri*) ซึ่งเป็นพาหะของโรคกรีนนิ่งในส้มแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า เชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สามารถอยู่ภายในตัวแมลงได้นาน 12 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในตัวแมลง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากแมลงพาหะมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในระยะตัวเต็มวัย และตัวอ่อนวัยที่ 3-5 ของเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม ซึ่งระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-2 จะไม่พบเชื้อโรคในแมลง จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่พบในแมลงไม่สามารถถ่ายทอดไปยังแมลงตัวอื่นได้ และยังมีการศึกษาเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในแมลงที่เป็นตัวเบียนของเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม โดยใช้วิธี Long PCR ในการตรวจสอบ (Marjorie *et al.*, 2001)

ในการวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งในสมัยแรกจะใช้ต้นพืชเป็นตัวอย่างทดสอบ ในแอฟริกาได้ใช้ต้นพืช 2 ชนิดในการทดสอบคือ Valencia sweet orange และ Orlando tangelo ประเทศไต้หวัน ใช้พืช Ponkan mandarin และประเทศอินเดียใช้ Kagzi lime เป็นพืชทดสอบ โดยใช้วิธีการติดตามต้นที่ใช้ทดสอบ และอาการของโรคจะประจักษ์ใช้เวลา 3-4 เดือน การติดตามนั้นทำในสภาพโรงเรือนที่อุณหภูมิ 21-23/12° ซ (Matsumoto *et al.*, 1968)

จากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้รวดเร็วขึ้นในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของพืชที่เป็นโรค และการตรวจสอบได้มีการปรับปรุงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) เพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้อบริเวณท่ออาหารของต้นส้มที่ติดเชื้อโรคกรีนนิ่ง (Lafleche and Bove, 1970)

เมื่อหลายปีที่ผ่านมาการตรวจสอบโรคนั้นค่อนข้างทำได้ยากและวิธีการตรวจสอบยังมีไม่มาก ปัจจุบันเริ่มมีการใช้ DNA probes ตรวจสอบโรคซึ่งก็ได้ผลดีสำหรับการตรวจสอบ *Candidatus Liberibacter spp.* และยังสามารถตรวจสอบพืชที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อและแมลงพาหะ (Bove *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1996) เชื้อแบคทีเรียสามารถที่จะตรวจสอบได้โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือวิธีทางเซรุ่มวิทยาคือวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Garnier and Bove, 1993) และตรวจสอบโดยวิธี Biological assay Roistacher (1991) ได้

ให้รายละเอียดวิธีการตรวจสอบสำหรับการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในการตรวจสอบโรคเบื้องต้นนั้นดูจากลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏบนใบพืช โดยใช้วิธีการประมาณการเกิดโรคโดยดูจากลักษณะอาการที่เกิดคิดเป็นร้อยละ 15- 20 ของลักษณะอาการที่พบบนใบพืช ซึ่งวิธีการนี้ก็เป็นวิธีการเบื้องต้นในการตรวจสอบโรค และได้มีการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด TEM ตรวจสอบเชื้อ Mycoplasma- like organism ในท่ออาหารของส้มที่เป็นโรครินนิ่ง โดยพบแบคทีเรียที่มีความยาวประมาณ 2000 นาโนเมตร และมีความกว้าง 100-200 นาโนเมตร คล้ายกับโครงสร้างที่มีการสำรวจพบในแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ซึ่งเป็นแมลงพาหะของโรครินนิ่ง (Chen *et al.*, 1973; Moll and Martin, 1973)

ได้มีการเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งกับเชื้อสาเหตุโรค citrus stubborn ซึ่งเกิดจากเชื้อ Spiroplasma โดยเปรียบเทียบในส่วนของ outer membrane พบว่า outer membrane ของเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งมีขนาดที่หนากว่าเชื้อ Spiroplasma โดย outer membrane ของเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งมีความหนา 25 นาโนเมตร แต่เชื้อ Spiroplasma มีความหนา 10 นาโนเมตร

ได้มีการศึกษาพื้นฐานของแบคทีเรียสาเหตุของโรครินนิ่งและศึกษา peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบใน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Garnier *et al.*, 1984) จากนั้นได้มีการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในการจำแนกและตั้งชื่อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ โดยเรียกชื่อเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ว่า “*Candidatus*” สกุล (genus) *Liberibacter* และจัดอยู่ใน subdivision alpha *Proteobacteria* (Jagoueix *et al.*, 1994)

มีการนำ monoclonal antibodies ที่ผลิตโดยใช้โปรตีนบริสุทธิ์จากพืชที่เป็นโรครินนิ่งในแถบแอฟริกา และประเทศจีนและในประเทศอินเดียก็สามารถใช้ตรวจสอบได้โดยเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยในประเทศต่างๆ ได้มีการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยาเพื่อใช้ในการตรวจสอบโรครินนิ่ง โดย monoclonal antibodies ที่แยกได้นั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งและสามารถใช้ในการตรวจสอบโรครินนิ่งได้ (Garnier *et al.*, 1987)

ในการวิเคราะห์ทางด้านชีวโมเลกุลที่นำมาศึกษากันมากคือ PCR และการใช้ DNA probes ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง *Candidatus Liberibacter* spp.แต่ละชนิดโดยนำวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลมาตรวจสอบการพัฒนาของแบคทีเรียที่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารได้

Villechanoux *et al.* (1992) ได้แยกสกัดดีเอ็นเอจากใบของแพงพวย (periwinkle) ที่เป็นโรครินนึ่ง (Indian Greening) และตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปทำการโคลน และตรวจสอบโคลน ด้วยการ hybridization ด้วยดีเอ็นเอจากต้นปกติและต้นที่เป็นโรครินนึ่ง โดยได้ขนาดของดีเอ็นเอ insert ที่มีขนาด 2.6 1.9 และ 0.6 กิโลเบส และมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียโรครินนึ่ง โคลนที่มีขนาดใหญ่ 2 โคลนนั่นเป็น Asian forms โดยไม่มี African form และในโคลนที่มีขนาด 0.6 คู่เบส จะเกิดปฏิกิริยากับ Indian Greening เพียงชนิดเดียว และได้้นำโคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ของทั้ง 3 โคลน พบว่าโคลนที่มีขนาดใหญ่ คือ 2.6 คู่เบส ประกอบด้วยยีน nusG-rplIKAJL-rpoBC operon ส่วน 1.9 คู่เบส เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ bacteriophage type DNA polymerase และลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 0.6 กิโลเบส ไม่ได้ match กับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Villechanoux *et al.*, 1992)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคในห้วงปฏิบัติการและการวินิจฉัยเชื้อโรค ข้อดีของเทคนิค PCR คือเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงสามารถขยายปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองรวดเร็ว ได้ปริมาณตัวอย่างสูง (Rowhani *et al.*, 1998) ตรวจสอบความแตกต่างของ *Candidatus Liberibacter* spp. ทั้งสองสายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (Jagoueix *et al.*, 1996) ซึ่งเทคนิค PCR สามารถใช้ในการตรวจสอบ Asian citrus greening และ African citrus greening ได้และในการนำตัวอย่างมาทำ PCR นั้นจะใช้ใบที่แสดงลักษณะอาการ blotchy mottle จะทำให้ผลปฏิกิริยาที่เป็นบวกและสามารถตรวจสอบโรคได้ผลบวกทุกครั้ง และในเดือนเมษายน ปี 2004 ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบยืนยันการเป็นโรครินนึ่งใน Sao Paulo และสามารถจำแนกเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* โดยใช้ตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรครินนึ่งจากทั้งหมด 43 ตัวอย่างพบว่าสามารถตรวจสอบได้ผลบวกทุกตัวอย่างโดยตัวอย่างที่เก็บมานั้นมีการเข้าทำลายของแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่ง *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* แต่อย่างไรก็ตาม Teixeira *et al.*, (2005) มีการตรวจสอบโรครินนึ่งโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* จากตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัวอย่างพบว่าไม่เกิดผลบวกทุกตัวอย่าง และพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งชนิดใหม่ซึ่งมีลักษณะอาการแบบ blotchy mottle โดยมีการตรวจสอบพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งอีก 1 สายพันธุ์ มีชื่อใหม่ว่า *Candidatus Liberibacter americanus*

Jagoueix *et al.* (1996) ใช้ universal primer สำหรับเพิ่มปริมาณยีนของ procaryote ใน ส่วนของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter* ทั้งสองชนิด (species) โดยขยาย (amplification) ชิ้นส่วน 16S rDNA ได้ 1160 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของ ribosomal DNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค PCR และแยกความแตกต่างของ แบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งที่เป็น Asian form และ African form โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* จะตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1160 คู่เบส ของ *Candidatus Liberibacter africanus* ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 3 ชิ้น คือชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 520 คู่เบส 516 คู่เบส และ 130 คู่เบส แต่ถ้าเป็น Asian form เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* จะตัดชิ้น ดีเอ็นเอขนาด 1160 คู่เบส ของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 2 ชิ้น คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 640 คู่เบส และ 520 คู่เบส

Hocquellet *et al.* (1999) ได้วิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA และ β -operon (*rp/KAJL* - *rpoBC*) แยกโดยใช้ PCR และสุ่มตรวจโคลนของดีเอ็นเอในพืชที่เป็นโรค โดยเลือกดีเอ็นเอของ พืชที่ติดเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* มา 3 ชิ้นส่วน เพิ่มจำนวนยีนโดยใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) สุ่มเลือกโคลน จากนั้นใช้ PCR ในการตรวจสอบพบว่า บนชิ้นส่วน DNA จำแนกยีนได้ 4 ยีน คือ *nusG*, *pgm*, *omp* และ hypothetical protein gene

Teixeira *et al.* (2005) ศึกษาชิ้นส่วนของ 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคือ ไพรเมอร์ OI1, OI2c และ OA1 ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสามชนิดสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Candidatus Liberobacter asiaticus* และ เชื้อ *Candidatus Liberobacter africanus* แต่ เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบกับตัวอย่างส้มที่เป็นโรคใน Sao Paulo พบว่าไม่สามารถเพิ่ม ปริมาณยีนได้และได้มีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่คือ GB1 และ GB3 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ได้และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าตำแหน่งของเบสในบางตำแหน่งมีความ แตกต่างจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์และมีส่วนของดีเอ็นเอบางส่วนขาดหายไป ทำให้พบว่ามี แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่คือ *Candidatus Liberibacter americanus* ซึ่งพบในประเทศบราซิลและ พบว่าใน Sao Paulo มีการระบาดของโรคกรีนนิ่งที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวระบาดโดยทั่วไป

Jagoueix *et al.* (1997) เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S/23S Intergenic spacer จาก rRNA operon ของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* ในรายงาน ครั้งนี้สามารถจำแนกได้ว่า *Candidatus Liberibacter africanus* มียีน isoleucine tRNA ($tRNA^{Ile}$)

และ alanine tRNA (tRNA^{Ala}) แยกจากกัน 11 นิวคลีโอไทด์ ส่วน Intergenic spacer ของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* พบยีน alanine tRNA (tRNA^{Ala}) เพียงยีนเดียว ซึ่งระดับความเหมือนของ Intergenic spacer ของ *Candidatus Liberibacter* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เท่ากับ 79.46 % Ribosomal operon และ 16S/23S spacer region ที่ศึกษามานี้ น่าจะเป็นส่วนที่แสดงความแตกต่างของ 2 สายพันธุ์นี้

Hung *et al.* (1999) ใช้วิธีการตรวจสอบโรคโดยใช้ PCR และ ออกแบบไพรเมอร์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA เชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยใช้ชื่อไพรเมอร์ว่า 226- primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถใช้ได้กับต้นส้มที่เป็นโรครินนึ่งในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้

Hocquellet *et al.* (1997) ใช้วิธีการ Non – radioactive probe hybridization ในการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ DNA จากยีน β -operon ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในพืชที่เป็นโรคจากในโรงเรือนและจากแหล่งต่างๆ

การตรวจสอบโดยใช้วิธี biological index ก็สามารถที่จะใช้เป็นวิธีในการวินิจฉัยโรครินนึ่งได้ โดย Miyakawa (1980) ได้เริ่มใช้ส้ม Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) และ Orlando tangelo (*Citrus tangelo*) ซึ่งเป็นตัวทดสอบที่ดีโดยตรวจสอบใน Citrus tristeza virus (CTV) เพื่อตรวจสอบวินิจฉัยลักษณะอาการที่แสดงออกมาบนใบ การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนึ่งอาจศึกษาจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคโดยเนื้อเยื่อนั้นยังอ่อนหรืออาจต้องมีการเทคนิคในการตรวจสอบหลายๆ วิธีมาใช้ในการวินิจฉัยโรค หรืออาจจะเป็นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลหรือเทคนิคอื่นๆ ที่นำมาใช้เพื่อประหยัดเวลา และได้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ สามารถตรวจสอบได้ชัดเจน แม่นยำ และมีความถูกต้อง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่รวดเร็วและเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบได้ตลอดไป

6. ระบาดวิทยาของโรครินนึ่ง

6.1 การถ่ายทอดโดยอาศัยแมลงพาหะ (Insect transmission)

การเข้าทำลายของแมลงพาหะเพลี้ยไก่อัจฉรีนั้นระยะตัวเต็มวัยจะสามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชตระกูลส้มได้มากที่สุด โดยแมลงจะมีความยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ลักษณะตัวแก่มีขนาดสีน้ำตาล ลำตัวเล็ก มีปีกโต 2 คู่ ปีกจะพับติดกันตรงกลางเมื่อเวลาเกาะอยู่กับที่ มีวงจรชีวิตประมาณ 15 – 47 วัน ตัวแก่เป็นช่วงที่เข้าทำลายโดยตัวแก่วางไข่ที่ใบอ่อน และยอดอ่อน เมื่อไข่ถูกฟักออกเป็นตัว ตัวอ่อนจะดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณนั้นโดยไม่เคลื่อนไหว และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หลังจากฟักออกจากไข่ดูดกินน้ำเลี้ยงที่ยอดอ่อนและใบอ่อนได้ประมาณ 10 – 20 วัน จึงเจริญเป็นตัวแก่ จะเห็นได้ว่าช่วงที่เป็นตัวอ่อนมีอายุได้ไม่เกิน 20 วัน ที่ทำลายยอดอ่อนใบอ่อนชะงักการเจริญเติบโต ทำให้ตาใบ ตาดอกและใบเหี่ยวแห้งและหงิกงอ โดยเพลี้ยไก่อัจฉรีจะถ่ายน้ำหวานออกมา และจะทำให้พวกราดำเข้าทำลายบนน้ำหวานนั้น เกิดเป็นโรคราดำตามภายหลังและเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชได้ โดยจากการศึกษาของ Catling (1970) พบว่าเพลี้ยไก่อัจฉรี *Diaphorina citri* มีวงจรชีวิตสั้นและให้ลูกตก โดยตัวเมียจะใช้เวลา 12 วัน ก่อนที่จะวางไข่และจะให้ไข่ประมาณ 800 ฟองต่อตัว และระยะไข่จะใช้เวลาในการฟัก 2-23 วัน ในฤดูหนาวหรือในช่วงฤดูร้อน ระยะตัวอ่อน (nymphs) นั้นจะมีทั้งหมด 5 ระยะ และในระยะตัวอ่อนจะใช้เวลา 11-30 วัน แต่ถ้าในช่วงอุณหภูมิ 25° ซ ถึง 27° ซ ตัวเมียจะมีการออกไข่ 8 ฟองต่อวัน และจะมีการพัฒนาของระยะตัวอ่อนโดยใช้เวลาประมาณ 11-15 วัน จึงทำให้ได้แมลงที่เป็นตัวเต็มวัยเป็นจำนวนมากในการเข้าทำลายพืช

ส่วนเพลี้ยไก่อัจฉรี *Trioza erytreae* นั้นเป็นแมลงพาหะที่มีความไวต่อความร้อนเช่นเดียวกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* สาเหตุโรครินนิงสายพันธุ์ที่พบในแถบแอฟริกา (Catling, 1973) ซึ่งจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิที่ร้อน และแมลงจะชอบพื้นที่ที่มีสภาพอากาศเย็นและมีความชื้น โดยพื้นที่ต้องมีความสูงมากกว่า 500-600 เมตร โดยแมลงตัวผู้และตัวเมียจะผสมพันธุ์กัน 2-4 ครั้ง ตัวเมียหนึ่งตัวจะให้ไข่ 2,000 ฟอง ระยะไข่ใช้เวลาในการฟักตัว 6-15 วัน และพัฒนาเป็นตัวอ่อน (nymphs) โดยใช้เวลา 17-43 วัน ระยะตัวอ่อนมีทั้งหมด 5 ระยะ โดยที่ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาได้ดีและรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 10° ซ ถึง 12° ซ

Hung et al. (2004) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรครินนิงกับแมลงพาหะโดยเทคนิค PCR พบว่าในตัวเต็มวัยเพียงหนึ่งตัวก็สามารถที่จะพบเชื้อสาเหตุโรครินนิง การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิงในระยะตัวอ่อนในแต่ละระยะพบว่าตัวอ่อนในระยะที่หนึ่งและระยะที่สองนั้นไม่พบเชื้อสาเหตุของโรครินนิงแม้จะตรวจสอบโดยการแยกตรวจทีละตัวหรือตรวจสอบโดยใช้ตัวอ่อนระยะที่หนึ่งและระยะที่สองหลายตัวพร้อมกันก็ตามไม่พบโรครินนิง จากนั้นก็ได้ทำการตรวจสอบในระยะไข่พบว่าระยะไข่ไม่มีเชื้อสาเหตุของโรครินนิง และในการ

ตรวจหาความสัมพันธ์ของเชื้อกับแมลงพาหะนั้นพบว่าเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนึ่งมีการเพิ่มจำนวนในตัวแมลง (persistent) ก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยเชื้อแบคทีเรียจะอยู่ภายในตัวแมลงได้นานที่สุด 12 สัปดาห์ ซึ่งในการควบคุมโรคนั้นควรจะควบคุมในระยะที่เป็นตัวอ่อน (nymphs) ซึ่งในระยะนี้การเคลื่อนย้ายของแมลงนั้นเป็นไปได้ยากและถ้าแมลงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยแล้วการควบคุมนั้นก็ทำได้ยากเพราะแมลงสามารถที่จะเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่ไกลทำให้การระบาดของโรคนั้นมีมากขึ้น

การแพร่ระบาดโดยอาศัยแมลงพาหะนั้นสามารถที่จะทำให้โรคเกิดการแพร่ระบาดได้มากที่สุด แมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ *Diaphorina citri* เมื่อได้รับเชื้อภายในเวลา 30 นาที ก็สามารถแพร่ระบาดโรครินนึ่งได้ (Roistacher, 1991) ส่วนเพลี้ยไก่แจ้ *Trioza erytreae* จะใช้เวลาภายใน 24 ชั่วโมงก็สามารถแพร่ระบาดเชื้อสาเหตุโรครินนึ่ง (African Greening) Buitendag and Broembsen (1993) ได้มีการทดลองโดยการปล่อยให้แมลงเพลี้ยไก่แจ้ดูดกินต้นส้มที่เป็นโรครินนึ่ง พบว่าแมลงพาหะใช้เวลาในการดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นส้มที่เป็นโรคโดยใช้เวลา 5-7 ชั่วโมงก็สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนึ่งในตัวแมลงได้ ส่วนในช่วงเวลา 1-3 ชั่วโมงที่แมลงเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงนั้นไม่สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่ง (Xu *et al.*, 1988) โดยที่เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งสามารถเพิ่มปริมาณในตัวแมลงได้ (Abert, 1987; Moll and Martin, 1973; Xu *et al.*, 1988) นอกจากนี้การตรวจสอบทางด้านชีวโมเลกุลพบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรครินนึ่งทั้งสองสายพันธุ์นั้นมีการกระตุ้นอวัยวะของแมลงพาหะเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อได้อย่างไรและจากการทดลองยังมีการตรวจสอบอยู่ เพลี้ยไก่แจ้ส้มทั้งสองชนิดนั้นสามารถแพร่ระบาดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งได้ (Garnier and Bove, 1996)

การแพร่ระบาดของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนั้นอาศัยแมลงพาหะที่เป็นตัวเต็มวัย (persistent) เป็นตัวแพร่ระบาดซึ่งตัวอ่อนในระยะที่ 4 และระยะที่ 5 ของเพลี้ยไก่แจ้ *Diaphorina citri* สามารถที่จะแพร่ระบาดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งหลังจากช่วง latent period โดยใช้ระยะเวลาที่สั้นเพียงหนึ่งวัน หรือระยะเวลาที่ยาวกว่าคือ 25 วันในการแพร่ระบาดโรคได้ (Roistacher, 1991; Xu *et al.*, 1988) ซึ่งระยะที่ 4 และระยะที่ 5 ของตัวอ่อนของ Asian citrus psyllids สามารถที่จะมีเชื้อแบคทีเรียคงอยู่ได้จนกว่าแมลงจะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย จะสามารถแพร่ระบาดโรครินนึ่งได้อย่างรวดเร็ว ตัวอ่อนระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 3 ยังไม่สามารถแพร่ระบาดเชื้อแบคทีเรียได้ โดยในเพลี้ยไก่แจ้ *Trioza erytreae* มีช่วง latent period 24 ชั่วโมง ในการแพร่ระบาดของเพลี้ยไก่แจ้นั้นเชื้อแบคทีเรียจะถูกปล่อยออกมาตามต่อมน้ำลายของแมลง

Candidatus Liberibacter spp. มีประสิทธิภาพที่จะอาศัยอยู่ได้ภายในตัวแมลงก่อนที่จะแมลงจะไปแพร่ระบาดโรคได้โดยเชื่อจะมีการเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากก่อน จากการทดลองพบว่าสภาพภูมิอากาศมีผลต่อการแพร่ระบาดเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp ของแมลงเพลี้ยไก่อั่ว แต่ยังไม่มีความรู้พื้นฐานการแพร่ระบาดของเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp ผ่านระยะไข่ได้ จากการทดลองพบว่าเพลี้ยไก่อั่ว *Diaphorina citri* มีระยะของการฟักไข่อย่างรวดเร็วบนต้นส้มที่เป็นโรคจึงไม่สามารถที่จะถ่ายทอดโรคกรีนนิ่งไปยังต้นพืชทดสอบได้ (Buitendag and Broembsen, 1993; Xu *et al.*, 1988) และได้มีการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียโรคกรีนนิ่ง (African Greening) ผ่านระยะไข่ของเพลี้ยไก่อั่ว *Trioza erythrae* และ van den Berg *et al.* (1992) พบว่าตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่อั่ว *Trioza erythrae* มีการพัฒนาเพื่อเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว โดยตัวเต็มวัยจะดูดกินบนต้นพืชและจะผสมพันธุ์กันบนต้นพืชที่เป็นโรค หลังจากนั้น 14 วัน ก็จะเก็บตัวเมียไปปล่อยในพืชที่เป็นต้นทดสอบที่ไม่เป็นโรคเพื่อใหวางไข่และฟัก และนำตัวเต็มวัยที่ได้จากไข่ที่ฟักแล้วไปปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นพืชที่กำลังเจริญเติบโตโดยปล่อยให้ดูดกินใช้เวลา 30 วัน จากนั้นเก็บแมลงที่ไม่มีโรคติดอยู่และตรวจสอบโรคกรีนนิ่งหลังจากนั้นอีก 6 เดือน พบว่า ต้นพืช 10 ต้นพบต้นที่เป็นโรคกรีนนิ่ง 1 ต้น

Bove *et al.* (1993) รายงานว่าสามารถตรวจสอบ *Candidatus Liberibacter* spp. ได้ในแมลงพาหะเพียงตัวเดียว ผลจากการทดลองหลายๆ งานทดลองนั้นก็แสดงให้เห็นว่าสามารถที่จะตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งในแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่วได้และมีโอกาสการแพร่ระบาดโดยแมลงที่หลากหลายแตกต่างกันของแต่ละพื้นที่ โดยแมลงเพลี้ยไก่อั่วที่เก็บมาจากประเทศมาเลเซียในเดือนตุลาคม ปี 1992 ตรวจพบว่ามีเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งอยู่ร้อยละ 39 และเก็บมาจากประเทศอินเดียนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค DNA hybridization เป็นโรคกรีนนิ่งร้อยละ 1 (Bove *et al.*, 1993) Toorawa (1998) พบว่าการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งในแมลงตรวจสอบเชื้อในตัวแมลงโดยใช้เทคนิค DNA hybridization อาจเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบเชื้อที่เกิดผลบวกในตัวแมลงและความสามารถในการเข้าทำลายพืชของแมลง

6.2 การถ่ายทอดโดยการติดต่อกิ่ง (Grafting transmission)

โรคกรีนนิ่งถ่ายทอดโดยการติดต่อกิ่งได้ (Bove *et al.*, 1996; van Vuuren, 1993) อย่างไรก็ตามการถ่ายทอดโรคโดยการติดต่อกิ่งของเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp นั้นก็มีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่จะมาติดต่อกิ่ง เนื้อเยื่อพืชที่ใช้และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ

โรคที่แยกได้ การถ่ายทอดโรคโดยการติดต่อกิ่งของต้นที่เป็นโรค African greening พบว่าสามารถถ่ายทอดได้ตั้งแต่ร้อยละ 0-50 ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่เป็นโรคที่ใช้ในการติดต่อกิ่ง (van Vuuren, 1993) ตำแหน่งของการติดต่อนั้นก็มีความสำคัญต่อการเคลื่อนย้ายของเชื้อภายในต้น ส่วนที่เป็น fruit stem และถ้าใช้ bark strips ในการติดต่อนั้นเป็นส่วนที่ไม่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรค (van Vuuren, 1993) Lin and Lin (1990) รายงานว่า 7 เดือนหลังจากการติดตาของต้นที่เป็นโรคลงบนต้นพืชพืชปกติ พบว่าตาของต้นพืชที่เป็นโรคที่ติดลงบนต้นปกติเจริญต่อได้มีทั้งหมดร้อยละ 58 ส่วนอีกร้อยละ 20 แสดงลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่ง และได้ทำการทดลองต่อโดยทำการต่อกิ่งโดยที่บนกิ่งจะมีตาอยู่ พบว่ากิ่งที่ทำการต่อกิ่งนั้นแสดงอาการของโรคกรีนนิ่ง 10-16 % ส่วนอีก 40% นั้นยังไม่แสดงอาการของโรคและเมื่อเวลาผ่านไป 3-9 เดือนกิ่งนั้นก็แสดงอาการของโรคกรีนนิ่งได้ โดยพบว่าโรคกรีนนิ่งสามารถที่จะถ่ายทอดโดยการติดตาและการต่อกิ่งได้

6.3 การถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (Seed transmission)

มีรายงานน้อยเกี่ยวกับการถ่ายทอดโดยผ่านทางเมล็ดของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ส่วนใหญ่นั้นโรคกรีนนิ่งจะทำให้ผลล้มเสียหาย ลดรูป และยังทำให้เมล็ดที่อยู่ในผลที่เป็นโรคนั้นสืบไม่ สามารถที่จะงอกเป็นต้นพืชได้ แต่อย่างไรก็ตาม Tirtawidjaja (1981) ได้เลือกผลที่ปกติและผลที่เป็นโรคกรีนนิ่งและนำเมล็ดมาตรวจสอบ โดยนำเมล็ดที่ได้จากผลไม่เป็นโรคไปปลูกพบว่าสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่เป็นปกติ และนำเมล็ดที่มีขนาดเล็ก ซึ่งผลนั้นเป็น greening- affected ทำให้ต้นที่งอกออกมานั้นแคระแกร็น และไม่เจริญเติบโต Miyakawa *et al.* (1990) รายงานว่าโรคกรีนนิ่งติดไปกับ Troyer citrange trees ที่แสดงอาการของโรคที่ใบเพียงเล็กน้อยก็สามารถเป็น good crop และมีจำนวนเมล็ดลึบมาก ซึ่งถ้ามีการถ่ายทอดผ่านเมล็ดของ citrange ปรากฏในแปลงปลูกก็สามารถที่จะใช้ต้นส้มเป็นต้นต่อแทนได้ ซึ่งการถ่ายทอดส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับตา (budding) มากกว่าส่วนอื่น

6.4 พืชอาศัยและความจำเพาะเจาะจงของแมลงพาหะ (Host range and vector specificity)

พืชอาศัยของแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* มีพืชหลายชนิดที่มีความใกล้ชิดกับส้ม (citrus relatives) (ตารางผนวกที่ ก1) จากการสำรวจใน Florida โดย DPIs Citrus Arboretum in Winter Harven พบว่าพืชที่มีโอกาสที่จะเป็นพืชอาศัยที่ดีของแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* ซึ่งมีในสกุล *Zanthoxylum* อยู่ 2 ชนิดคือ ผลจากการทดสอบยืนยันว่าไม่พบแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* บนต้น

Zanthoxylum clavaherculis อย่างไรก็ตาม *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg มีโอกาสที่จะเป็นพืชอาศัยของแมลงเพลี้ยไก่อั่วได้และ *Zanthoxylum fagara* เป็นพืชอาศัยที่มีเพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricida*) อาศัยอยู่และมีประชากรของแมลงเพิ่มจำนวนในต้นพืชนี้ ซึ่งเป็นเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล และมีการพบตัวอ่อนของเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* บ้างเพียงเล็กน้อยและพบประชากรของแมลงเพลี้ยไก่อั่วต่ำ จากการสำรวจพบว่าพืชอาศัยของแมลงเพลี้ยไก่อั่วเป็นจำนวนมาก Tsai and Lui (2000) ทดสอบพืชอาศัยในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พืช *jasmine* (*Murraya paniculata*) *rough lemon* (*Citrus jambhi*) *sour orange* (*Citrus aurantium*) และ *grapefruit* (*Citrus x paradisi*) พบว่า *grapefruit* เป็นพืชอาศัยที่ดีของแมลงเพลี้ยไก่อั่ว โดยพืชอีก 3 ชนิดเมื่อนำมาทดสอบพบว่าเป็นพืชอาศัยของแมลงเพลี้ยไก่อั่วโดยพืชทั้งสามชนิดนั้นไม่มีค่าความแตกต่างทางด้านสถิติ มีการรายงานพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุของโรครินนึ่งไม่มากเพราะว่าเครื่องมือที่จะใช้วัดว่ามีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งที่พบอยู่บนพืชอาศัยนั้นทำได้ยากและที่มีรายงานไว้แสดงในตารางผนวกที่ ก2 ซึ่งพืชตระกูลส้มทั้งหมดเป็นพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรครินนึ่ง และระดับความอ่อนแอของพืชนั้นก็มีความแตกต่างกัน พบว่ามีบางชนิด คือ *Citrus indica* และ *Citrus macroptera* จะไม่แสดงอาการของโรค แม้จะมีเชื้อสาเหตุอยู่ภายในพืชก็ตาม (Bhagabati, 1993) *Citrus limetta* นั้นไม่พบลักษณะอาการของโรคแม้จะมีการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งไปแล้ว (Nariani, 1981)

Murraya paniculata เป็นพืชอาศัยของแมลงเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการยอมรับว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุของโรครินนึ่ง ซึ่งได้มีการศึกษาโดยใช้เทคนิค dot blot hybridization โดย Hung et al. (2000) ศึกษาเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนึ่งจากประเทศไต้หวันพบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อใน *Murraya paniculata* และ *Murraya koenigii* Tirtawidjaja (1981) ได้มีการสำรวจลักษณะอาการที่พบทั้ง internal และ external symptom ซึ่งสามารถเกิดอาการได้ร้อยละ 25-30 บนต้น *Murraya paniculata* ซึ่ง Asian greening อาจจะมีจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันเมื่ออยู่บนพืชอาศัยแต่ละชนิด ในความเป็นจริงแล้ว *Murraya spp.* เป็นพืชอาศัยที่ดีของแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่วส้ม *D. citri* แต่พืชนี้อาจจะมีความต้านทานหรือทนทานต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่ง

ได้มีการนำพืชที่มีความใกล้ชิดกับพืชตระกูลส้มมาตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนึ่งโดยใช้เทคนิคใหม่ โดยพืชที่นำมาตรวจสอบนั้น คือ *Severinia buxifolia* (Hung et al., 2000) *Limonia acidissima* (Su et al., 1995; Koizumi et al., 1996; Hung et al., 2000) และ *Toddalia lanceolata* (Korsten et al., 1996) ซึ่งพืชที่มีความใกล้ชิดกับพืชตระกูลส้มหลายชนิด

สามารถที่จะเป็นพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่ง แต่ลักษณะอาการนั้นเป็นมาตรฐานเดียวกัน (ตารางผนวกที่ ก2) จากการทดลองพบว่าโรครินนิ่งสามารถถ่ายทอดไปยังพืชอาศัยอื่นๆ ได้ในวงศ์ Rutaceae หลายชนิด และโรครินนิ่งสามารถถ่ายทอดได้ทางฝอยทอง (dodder) (*Cuscuta sp.*) ซึ่งเป็นพืชที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ Rutaceae และยังสามารถที่จะถ่ายทอดไปยังแพงพวย (*Catharanthus roseus*, Tirtawidjaja, 1981) และ *Nicotiana tobacum* (Ganier and Bove, 1993) โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณได้ในฝอยทองก่อนที่จะมีการถ่ายทอดไปยังต้นพืชอื่น (Su and Huang, 1990) ได้มีการสำรวจแมลงพาหะ *D. citri* ในพื้นที่ Stapleton state of the Northern Territory of Australia พบว่าในพื้นที่นี้ยังไม่มีรายงานการพบแมลงพาหะ ซึ่งผลการสำรวจพบว่าพืชที่อยู่ในตระกูล Rutaceous ที่สำรวจจาก 6 พื้นที่ไม่พบว่ามีแมลงพาหะ *D. citri* และพบว่าต้นพืชที่เป็นสัมนั้นที่แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากโรครินนิ่ง และได้นำไปพืชนั้นมาตรวจสอบโรคพบว่าเกิดผลที่เป็นลบเมื่อนำมาตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่ง (Bellis *et al.*, 2005)

7. การควบคุมโรค

การควบคุมแมลงพาหะ *D. citri* และโรครินนิ่งนั้นต้องมีการจัดการแบบผสมผสานในหลายๆวิธีร่วมกันซึ่งใช้หลักการพื้นฐานของ Integrated Pest Management (IPM)

7.1 การควบคุมโดยใช้สารเคมี (Chemical control)

ถ้ามีแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้และต้นพืชนั้นเป็นโรครินนิ่ง ซึ่งในการควบคุมส่วนใหญ่จะมีการควบคุมแมลงพาหะโดยใช้สารเคมีป้องกันแมลง (Tolley, 1990) ซึ่งการควบคุมแมลงพาหะโดยใช้สารเคมีนั้นจะเป็นการป้องกันต้นพืชนั้นจากการเป็นโรครินนิ่งได้ (Aubert, 1990) พบว่าควร spray สารเคมีในช่วงระยะตัวอ่อนระยะที่ 3 และระยะที่ 5 เมื่อเป็นตัวเต็มวัยแล้วโดย spray สองครั้งสามารถลดจำนวนประชากรของแมลงได้ ในประเทศไทยมีการควบคุมแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้เมื่อช่วงเวลาที่จำเริญและเมื่อมีการระบาดแล้ว (Roistacher, 1996) Su *et al.* (1986) ได้แนะนำให้มีการฉีดพ่นสารเคมีในช่วง 10-20 วันก่อนที่จะเป็นช่วงของ infection period ของแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้และที่สำคัญในการควบคุมแมลงพาหะของเกษตรกรที่ผลิตสัมนั้นควรใช้สารเคมีในการควบคุมแมลงให้เหมาะสม (Aubert, 1990) ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช Aubert (1988) ได้แนะนำให้ใช้แผ่นพลาสติกที่มีสีเหลืองสำหรับตรวจดูจำนวนประชากรของแมลง

D. citri เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการควบคุมแมลง ใน Florida ได้ใช้วิธีการ trapping พบว่าในช่วงของ spring นั้นการบินหาอาหารของแมลง *D. citri* นั้นมีมากและรวดเร็วและมีการเพิ่มจำนวนประชากรที่เป็นตัวเต็มวัยอย่างรวดเร็ว

ได้มีรายงานโดย Deacon *et al.* (1989) โดยใช้ Chitin ยับยั้งระยะไข่และระยะตัวอ่อนระยะที่ 1 ของแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* การใช้สารปฏิชีวนะในการฉีดเข้าไปยังต้นส้มที่เป็นโรคนั้นสามารถใช้ในการควบคุมได้ชั่วคราว (Su *et al.*, 1986; Lim *et al.*, 1990; Buitendag and von Broembsen, 1993) การฉีดสารปฏิชีวนะเข้าไปยังต้นส้มนั้นเป็นวิธีการหนึ่งของ IPM ที่ใช้ในประเทศอินเดีย โดยในการฉีดสารปฏิชีวนะ Tetracycline เข้าไปเพื่อลดจำนวนของแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งไม่ให้มีผลหรือแพร่ระบาดไปยังต้นอื่นหรือใช้ในการติดตามตอกิ่งและเป็นการรักษาดันส้มเพื่อไม่ให้เป็นโรค ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะอาการของโรคจะมาปรากฏอีกครั้งหลังจากที่เราฉีดด้วยสารปฏิชีวนะแล้ว 1-1.5 ปี (Zhou, 1981) สารปฏิชีวนะ Tetracycline ที่ใช้ในการ treat ในส่วนของ budwood นั้นใช้ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ของ Tetracycline hydrochloride ใช้เวลาในการ treat 2 ชั่วโมง หรือ 500 µg/ml ใช้เวลาในการ treat 3 ชั่วโมง (Zhou, 1981) Martinez *et al.* (1970) ได้รายงานว่าใช้ Tetracycline hydrochloride ฉีดพ่น หรือใช้ส่วนขยายพันธุ์แช่ในสารละลายก่อนนำไปปลูก ในแอฟริกาใต้ใช้ฉีด Tetracycline hydrochloride เข้าไปยังต้นพืชที่แสดงอาการของโรครินนิ่ง (Schwarz and van Vuuren, 1970) อย่างไรก็ตาม Tetracycline hydrochloride เป็นอันตรายต่อพืช ควรใช้ในความเข้มข้นไม่เกิน 250 ppm (Miyakawa, 1979)

การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 47°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เชื้อสาเหตุของโรค กรินนิ่งลดลงได้ (Cheema *et al.*, 1982) และการใช้ความร้อนกับต้นพืชที่ยังเล็กอยู่ควรใช้ที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-4 สัปดาห์ ก็จะทำลายเชื้อสาเหตุของโรคได้ (Huang *et al.*, 1980; Nariani and Bhagabat, 1980) การควบคุมโรคโดยใช้ความร้อนนั้นเป็นวิธีที่ทำลายโรครินนิ่งได้ในเบื้องต้นเท่านั้น

7.2 การควบคุมโดยชีววิธี (Biological control)

Aubert (1987) ได้ใช้เชื้อราในการควบคุมตัวอ่อนของแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* พบว่าสามารถทำลายได้ร้อยละ 60-70 โดยให้มีความชื้นต่ำสุดประมาณร้อยละ 87.9 ซึ่งได้ทำการทดลองที่ Reunion Island เชื้อราโรคพืช 2 ชนิดที่นำมาใช้ควบคุมแมลงเพลี้ยไก่แจ้และมีรายงานไว้คือ

Cladosporium sp. nr. *oxysporum* และ *Capnodium citri* Etienne *et al.* (2001) ได้กล่าวว่าเชื้อรา *Hirsutella citriformis* เป็นเชื้อทั่วไปที่เจริญได้ในช่วงที่มีความชื้นร้อยละ 80 ใช้เป็น insect pathogenic fungi

การใช้แมลงที่เป็นตัวเบียน (parasite) ในการควบคุมแมลงพาหะซึ่งแมลงที่เป็นตัวเบียนที่นำมาใช้คือ แตนเบียน *Tamarixia radiata* โดยเป็น endoparasite และ *Diaphorencyrtus aligarhensis* ตัวเบียน *Tamarixia radiata* พบว่ามีประสิทธิภาพในการเป็น parasite ที่ดีของแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* มากกว่าแตนเบียน *D. aligarhensis* (Tang, 1989) ในการสำรวจที่ Reunion พบว่า *Tamarixia radiata* จะเป็นตัวเบียนของตัวอ่อนของแมลงพาหะเพลี้ยไก่แจ้ได้ร้อยละ 60-70 ส่วน *D. aligarhensis* จะเป็นตัวเบียนได้ร้อยละ 20 (Aubert, 1987) โดยที่แตนเบียนทั้งสองชนิดนี้ใช้ในการควบคุมประชากรแมลงได้ในระดับที่สูงโดยจัดเป็น hyperparasitism (Garnier and Bove, 1993) นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเป็น parasite ของแตนเบียนและการเข้าทำลายของแตนเบียนรวมทั้งได้มีการศึกษาวงจรชีวิตของแตนเบียนในแถบเอเชีย (Tang and Wu, 1991; Xu and Tang, 1993) ซึ่งได้มีการสำรวจและศึกษาเกี่ยวกับแตนเบียน *Tamarixia radiata* โดยพบว่าถ้ามีจำนวนประชากรของแตนเบียนมากจะทำให้ประชากรของแมลงเพลี้ยไก่แจ้นั้นมีปริมาณน้อย ซึ่งในการดำรงชีวิตของแตนเบียนนั้นเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมเป็นสำคัญ ได้มีการศึกษาในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าสามารถลดการแพร่ระบาดของแมลงพาหะได้ (Supriyanto and Whittle, 1991)

ใน Mauritius การควบคุมแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *T. erytrae* โดยชีววิธีมีประสิทธิภาพมากกว่าการควบคุมแมลงเพลี้ยไก่แจ้ *D. citri* เนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนประชากรของแมลง *T. erytrae* มีน้อยกว่าการเพิ่มประชากรของแมลง *D. citri* ซึ่งแมลง *T. erytrae* จะมีการเพิ่มจำนวนบนต้นส้มเท่านั้น แต่แมลง *D. citri* สามารถเพิ่มประชากรได้บนต้น *M. paniculata* ซึ่งสภาพภูมิอากาศมีผลต่อการเพิ่มจำนวนประชากรแมลง *D. citri* มากกว่าแมลง *T. erytrae* และประการที่สองคือตัวเบียนของแมลง *T. erytrae* คือ *Tamarixia dryi* นั้นมีพืชอาศัยที่เป็น alternate host ซึ่ง *Tamarixia radiata* ซึ่งเป็นตัวเบียนของแมลง *D. citri* นั้นไม่มีพืชอาศัยที่เป็น alternate host (Toorawa, 1998)

Tamarixia radiata พบใน Guadeloupe ในเดือนมกราคม ของปี 1999 และเป็นแตนเบียนที่สำคัญและใช้ในการควบคุมจำนวนประชากรของแมลงพาหะ *D. citri* ได้อย่างมาก (Etienne *et al.*, 2001) แตนเบียน *Tamarixia radiata* และ *Diaphorencyrtus aligarhensis* ได้มีทดสอบใน Florida

(McFerland and Hoy, 2001) ซึ่งปล่อยทั้งสองชนิดพบว่ามีเพียงแตนเบียน *Tamarixia radiata* เพียงชนิดเดียวที่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนประชากรและยังคงอยู่ได้ใน Florida (Michaud, 2002) และได้มีรายงานโดย Michaud (2004) ได้ใช้ *Tamarixia radiata* เป็นตัวเบียนของแมลงพาหะ *D. citri* พบว่าสามารถที่จะทำลายตัวอ่อนของแมลงได้ร้อยละ 1.3 0.2 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดนั้นสำรวจใน Central Florida

แมลงตัวห้ำของแมลงเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* อีกหนึ่งชนิด (species) คือ *Scymnus* (Coccinellidae) ซึ่งมีรายงานพบที่ประเทศบราซิล (Gravena *et al.*, 1996) Syrphids จัดอยู่ในสกุล (genus) *Allograpta* ใน Florida มีรายงานแมลงที่เป็นตัวห้ำคือพวก coccinellidae และ chrysophids แต่ยังไม่มียข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการลดจำนวนประชากรของแมลงเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* หลังจากนั้นได้มีรายงานของ Michaud (2001) พบว่า coccinellid เป็นแมลงตัวห้ำที่มีความสำคัญในการควบคุมแมลงเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* โดยชีววิธีใน Florida Al-Ghamdi (2000) ได้รายงานสำรวจพบว่ามีแมงมุม (spider) ที่เป็นแมลงตัวห้ำของเพลี้ยไก่อั่ว *D. citri* ในประเทศซาอุดีอาระเบีย ซึ่งในประเทศซาอุดีอาระเบียแมงมุมมีจำนวนทั้งหมดร้อยละ 33.6 ของแมลงที่เป็นตัวห้ำทั้งหมดที่สำรวจพบ นอกจากนั้นยังมีแมลงที่เป็นตัวห้ำอีกหลายชนิดซึ่งรวมทั้งแมลงพวก beetle คือแมลง *Saprinus chalcites* Illider และแมลงตัวห้ำพวก carabid คือแมลง *Egapola crenulata* ซึ่งเป็นแมลงตัวห้ำที่มีความสำคัญในประเทศซาอุดีอาระเบีย (Al-Ghamdi, 2000) โดยแมลงตัวห้ำที่มีรายงานในประเทศคิวบา นั้นคือพวก Coccinellidae, Chrysopidae และ Syrphidae (Gonzalez *et al.*, 2003)

การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งนั้นมีข้อจำกัดเนื่องจากจำนวนเชื้อสาเหตุและเชื้อจะอาศัยอยู่ภายในท่ออาหารของพืช ในการควบคุมนั้นจะทำการควบคุมแมลงพาหะมากกว่าที่จะมีการควบคุมเชื้อแบคทีเรียโดยชีววิธี ถ้าต้นพืชเป็นโรครินนิ่งจะพบว่ามีแมลงพาหะเป็นตัวแพร่ระบาดเชื้อเป็นส่วนใหญ่ และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งจะเจริญอยู่ในท่ออาหารของพืชถ้ามีการควบคุมจะมีการควบคุมแมลงที่เป็น pest phloem เช่น whiteflies, mealybugs และ scales เป็นต้น ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธียังไม่มีการศึกษาที่แพร่หลายซึ่งได้ทราบว่าแบคทีเรียโรครินนิ่งนี้มีอยู่สองสายพันธุ์คือ Asian และ African greening bacteria (Garnier *et al.*, 1996)

7.3 การใช้พันธุ์ต้านทาน (Host plant resistance)

Citrus spp. ทุกชนิดนั้น ไม่ได้มีความต้านทานที่แท้จริงต่อโรครินนิ่ง แต่มีบางชนิดหรือบางพื้นที่ปลูกเท่านั้นที่มีความทนทาน (tolerant) ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่ง Koizumi *et al.* (1993) ได้สำรวจในแปลงพบว่าต้นที่ปลูกในแปลงมีบางต้นที่มีการอ่อนแอต่อโรคน้อยกว่าต้นอื่น และนำต้นที่มีความอ่อนแอน้อยมาตรวจสอบและใช้ในการศึกษา ต้นส้มพวก sweet orange ส่วนใหญ่เมื่อถูกทำลายโดยแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งแล้วต้นจะตายและมีความอ่อนแอต่อโรครมาก ในขณะที่ Grapefruit จะมีความทนทานต่อโรครปานกลาง โดยทั่วไปแล้ว sweet orange, mandarins และ tangelos มีความอ่อนแอต่อโรครมากที่สุด และ lime, *Poncirus trifoliata* และ citrus orange มีความทนทานต่อโรครมาก (Lee, 1996)

7.4 การควบคุมโดยใช้วิธีเขตกรรม (Cultural protection)

การควบคุมโรครินนิ่งเพื่อไม่ให้มีการแพร่ระบาดเข้ามาในแปลงปลูกโดยใช้วิธีเขตกรรมนั้น โดยในตอนเริ่มปลูกต้นส้มอาจจะมีการเชื้อแฝงอยู่แต่มื่อนำมาปลูกในแปลงพบว่าเชื้อปรากฏลักษณะอาการของโรคออกมา เชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคก็จะมีการแพร่ระบาดจากต้นที่เป็นโรครไปยังต้นอื่นๆในแปลงปลูกได้ถ้ามีการตัดแต่งกิ่งต้นที่เป็นโรครและนำอุปกรณ์ไปตัดแต่งกิ่งต้นที่ไม่เป็นโรครทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครแพร่ระบาดไปยังต้นพืชอื่นได้เป็นการช่วยให้เชื้อแบคทีเรียแพร่ระบาดโรคร Buitendag and von Broembsen (1993) ได้แนะนำว่าถ้าต้นพืชมีการติดเชื้ออย่างน้อย 5 ปี เชื้อจะสามารถแพร่ระบาดไปยังส่วนอื่นของต้นพืชได้ ถ้าอยู่ระหว่าง 6-10 ปี สามารถแพร่ระบาดเชื้อไปยังต้นพืชได้ประมาณร้อยละ 75 โดยจะมีการเคลื่อนย้ายจากกิ่งไปยังส่วนอื่นๆได้ และถ้ามีเชื้อเข้าไปทำลายมากกว่า 10 ปี จะทำให้พืชนั้นเกิดอาการโทรมและตายได้

Roistacher (1996) ได้อ้างอิงข้อมูลจาก Chinese Program for rehabilitation of citrus ในจังหวัด Fujian ซึ่งในการควบคุมโรครโดยวิธีเขตกรรมนั้นจะต้องมีการศึกษาถึงทิศทางของลมเพื่อป้องกันต้นพืชจากแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั้วที่จะแพร่ระบาดมากับทิศทางของลม โดยจะมีประสิทธิภาพมากในการลดการถ่ายทอดโรครโดยอาศัยแมลงพาหะ มีการตรวจสอบต้นพืชในแปลงที่เป็นโรครินนิ่งและนำต้นที่เป็นโรครไปทำลายและนำออกจากแปลงปลูกเพื่อป้องกันต้นพืชที่ยังเป็นต้นปกติไม่ให้มีการติดเชื้อของโรครินนิ่ง (Ke and Xu, 1990)

7.5 มาตรการควบคุม (Regulatory measures)

ถ้าไม่พบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งในแมลงพาหะเพลี้ยไก่อแจ้ซึ่งเป็นแมลงที่เป็นสาเหตุหลักในการถ่ายทอดโรครินนิ่งการใช้วิธี Regulatory measure ก็จะใช้ในการควบคุมไม่ได้ อย่างไรก็ตามการควบคุมกับวัสดุปลูกและพืชอาศัยก็เป็นการจัดการกับโรครินนิ่งได้ โดยเริ่มแรกนั้นการทดสอบเรานิยมใช้ส่วนที่เป็น budwood ของสั้มาทดสอบเพื่อยืนยันว่าต้นสั้มนั้นปลอดโรคหรือมีการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่ง การปลูกและวัสดุปลูกควรมีการปลูกในที่ที่แมลงพาหะยังไม่ทำลายได้ซึ่งแมลงพาหะนั้นเป็นแหล่งของเชื้อ *Candidatus Liberibacter spp.* Lin and Lin (1990) ได้แนะนำเกี่ยวกับการการเคลื่อนย้ายสั้มออกจากโรงเรือนควรมีการปลูกให้ห่างโรงเรือนอย่างน้อย 5-8 กิโลเมตร เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งแพร่ระบาดมายังโรงเรือนที่ใช้เป็น nurseries ในการกักกันเชื้อโรคเข้ามาทำลายต้นสั้มนั้นที่สำคัญควรปลูกต้นสั้มให้ห่างจากพืช *Murraya* และ *Clausena* เพราะเป็นพืชที่เป็นแหล่งอาศัยของแมลงพาหะเพลี้ยไก่อแจ้ได้มีการแนะนำห้ามมีการนำต้นสั้มและพืชตระกูล Rutaceous อื่นๆ เข้ามาในพื้นที่ปลูกเนื่องจากอาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งมาจากภายนอกแล้ว และในการทดสอบโรครินนิ่งนั้นจะใช้พืช newly plant trees มาทำการทดสอบและยืนยันว่าส่วนที่นำมาทดสอบนั้นปลอดโรคหรือเป็นโรครินนิ่ง

7.6 การจัดการโดยใช้วิธีผสมผสาน (Integrated management)

ยังไม่มีพื้นที่ใดในโลกนี้ที่เป็นโรครินนิ่งแล้วและมีการจัดการโรคได้ประสบความสำเร็จ โดยถ้าในพื้นที่ใดมีการระบาดของโรครินนิ่งแล้วก็จะทำให้ต้นสั้มบริเวณนั้นปริมาณลดลง ผลผลิตเกิดความเสียหายทั้งหมดหรือบางส่วน พื้นที่ที่มีการปลูกสั้มทั่วโลกมักจะประสบปัญหาเกี่ยวกับโรครินนิ่งและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคก็จะมีการปรับตัวในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจัดการโรคเพื่อให้ประสบความสำเร็จนั้นต้องมีการรวมหลายๆวิธีการมาใช้ในการจัดการโรคโดยหลักใหญ่แล้วควรมีการควบคุมแมลงพาหะเพลี้ยไก่อแจ้ *D. citri* หรือการจัดการกับพืชที่เป็น alternate host ของแมลงพาหะและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค Hung *et al.* (2000) และ Su *et al.* (1986) ได้กล่าวถึงวิธีการหลักในการจัดการโรครินนิ่ง คือ โรงเรือนที่ใช้ในการขยายพันธุ์นั้นจะต้องสะอาด ต้องมีการควบคุมแมลงพาหะเพลี้ยไก่อแจ้ และมีการนำส่วนที่เป็นที่สะสมของเชื้อโรคออกจากแปลงที่มีการปลูกสั้ม วิธีการจัดการโรครินนิ่งนั้นต้องมีการใช้วิธีการที่มีค่าใช้จ่ายอย่างประหยัดและทำให้ผลผลิตนั้นมีความเสียหายน้อยที่สุด ต้องมีค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจน้อยที่สุดสำหรับในแปลงที่มีการผลิตสั้ม ไม่ทำลายแมลงที่เป็นศัตรูธรรมชาติ ต้องมีการใช้การจัดการที่ใช้ได้ในปัจจุบัน เป็นวิธีการที่ใช้ง่าย มีความแม่นยำในการจัดการ