# การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของเส้นกลางใบในพืชสกุลส้มที่ได้รับผลกระทบจากโรคฮวงลองบิงด้วยเทคนิคการย้อมสี

# Anatomical Changes in Leaf Midrib of Huanglongbing-Affected Citrus by Staining Technique

**จุฑามาศ คงจักร[1,2] และอังสนา อัครพิศาล[1,2*]**

Jutamas Kongjak[1,2] and Angsana Akarapisan[1,2*]

Received: October 8, 2021
Revised: November 15, 2021
Accepted: November 17, 2021

**Abstract:** Huanglongbing (HLB), also knows as Citrus greening disease is an extremely destructive disease of citrus worldwide, caused by *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) which is a phloem-limited bacterium. HLB leads to decreased productivity and chlorosis of leaves which results in the collapse of phloem tissue. In this study, the Las infection status of all diseased leaf samples was verified by PCR. Tangerine, lime and pomelo were the representative citrus tested. The results showed that 13 samples were positive with Las from 28 samples. The basic structure of vascular and surrounding tissue from HLB-free and HLB-affected trees were examined under a compound microscope. The study of histological sections used a freezing microtome for sectioning. The tissue was stained with 0.1% Toluidine blue as a background stain and 3% Iodine to detect starch accumulation in midrib structures. The results showed that HLB affected the vascular tissue system, caused phloem fiber disorganization, hypertrophy of phloem parenchyma cells and thickening in phloem and massive starch accumulation.

**Keywords:** huanglongbing; HLB; midrib; citrus; staining technique

**บทคัดย่อ**: โรคฮวงลองบิงหรือกรีนนิ่งในพืชสกุลส้ม เป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงแก่พืชสกุลส้มทั่วโลก โดยมีเชื้อสาเหตุ คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร ความเสียหายที่เกิดจากโรคฮวงลองบิงทำให้ผลผลิตของพืชลดลง และใบด่าง ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากความเสียหายในส่วนของท่ออาหาร พืชสกุลส้มที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ ส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ โดยได้ผ่านการตรวจยืนยันเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงด้วยวิธีการ PCR ซึ่งพบเชื้อสาเหตุโรค 13 ตัวอย่างจากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาศึกษาโครงสร้างบริเวณท่อลำเลียง และเนื้อเยื่อโดยรอบของพืชปกติ และพืชที่มีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ซึ่งตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง freezing microtome และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย 0.1% Toluidine blue เพื่อให้เห็นความแตกต่างของเนื้อเยื่อชัดเจนมากยิ่งขึ้น และ 3% Iodine เพื่อดูการสะสมแป้งในโครงสร้างของเส้นกลางใบ ซึ่งผลได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุมีผลต่อระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ในส่วนของ phloem fiber มีความผิดปกติไม่เรียงตัวรอบท่ออาหาร เซลล์ท่ออาหาร มีการขยายตัวที่ผิดปกติ ทำให้ท่ออาหารมีความหนามากขึ้น และพบการสะสมแป้งที่เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติอย่างชัดเจน

**คำสำคัญ** : โรคฮวงลองบิง เอชแอลบี เส้นกลางใบ พืชสกุลส้ม เทคนิคการย้อมสี

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200
[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand
*Corresponding author: angsana.aka@gmail.com

## คำนำ

พืชสกุลส้มเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคตลาดมีความ-ต้องการสูง ทั้งภายในประเทศ และภายนอกประเทศ จากสถิติผลผลิตของส้มเขียวหวานในปี 2562 ประเทศไทยมีผลผลิตทั้งสิ้น 213,743 ตัน โดยในภาคเหนือมีผลผลิตมากถึง 205,741 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) โรคฮวงลองบิง (Huanglongbing : HLB) หรือกรีนนิ่ง (greening) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อพืชสกุลส้มทั่วโลกและกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตพืชสกุลส้ม (Da Graça, 1991) เชื้อสาเหตุมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ใน ชั้น Alphaproteobacterial และ อันดับ Rhizobiales คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) *Candidatus* Liberibacter africanus (Laf) และ *Candidatus* Liberibacter americanu (Lam) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม alpha-proteobacterium ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารได้ และอาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืช (phloem-limited bacteria) สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (Asian citrus psyllid : *Diaphorina citri*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ (Bove, 2006: Sechler *et al*., 2009; Hao *et al*., 2019) อาการส่วนใหญ่ของโรคฮวงลองบิง คือ อาการด่างเขียวบนใบ เมื่ออาการรุนแรงแสดงอาการคล้ายกับการขาดธาตุสังกะสี (Ploetz, 2003) ต้นพืชสกุลส้มที่ถูกเข้าทำลายจะทำให้ท่ออาหาร หรือส่วนระบบท่อลำเลียงของต้นอุดตัน ส่งผลให้ความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารของพืชถูกจำกัด (Akarapisan *et al*., 2016) เชื้อสาเหตุโรคสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งถูกนำมาใช้ระบุเชื้อสาเหตุโรค HLB ทั้งสามสายพันธุ์ ในกลุ่ม Liberibacter (Albrigo *et al*., 2019) เพื่อยืนยันความถูกต้องในการวินิจฉัยโรค นอกจากนี้ความผิดปกติของพืชที่เป็นโรคสามารถตรวจสอบด้วยการดูในส่วนของโครงสร้างเนื้อเยื่อพืชบริเวณท่อลำเลียง ซึ่งโรคมีผลทำให้เซลล์ท่ออาหารเกิดความผิดปกติ ผนังเซลล์ผิดรูป นอกจากนี้ทำให้เกิดผนังเซลล์สลาย รวมไปถึงส่วนของ cortex ray และ vascular parenchyma ที่เป็นส่วนสำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้มีการสะสมแป้งที่ผิดปกติ (Etxeberria and Narciso, 2012) ซึ่งการตรวจสอบความผิดปกติที่เกิดขึ้นสามารถใช้เทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชด้วยสารละลาย 0.1% Toluidine blue ซึ่งช่วยให้เห็นความผิดปกติของเนื้อเยื่อได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากเนื้อเยื่อติดสีแตกต่างกัน โดย xylem และ sclerenchyma ติดสีน้ำเงินปนเขียว phloem collenchyma และ parenchyma ติดสีแดงไปจนถึงสีม่วง แต่ส่วนของ callose และแป้งจะไม่ติดสี (Parker *et al*., 1982) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ 3% Iodine ในการตรวจสอบการสะสมแป้ง โดยส่วนที่มีแป้งจะติดสีน้ำเงินไปจนถึงสีดำ ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลายไอโอดีนกับอะไมโลส (amylose) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืช (Smith, 2021) ซึ่งในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อท่อลำเลียงในพืชสกุลส้มที่ได้รับความเสียหายจากโรคฮวงลองบิง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. เก็บตัวอย่างพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิง จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชปกติ และพืชที่แสดงอาการของโรคฮวงลองบิง ในพืชทั้งหมด 3 ชนิด คือ ส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเก็บตัวอย่างส้มเขียวหวาน 6 ตัวอย่าง มะนาว 12 ตัวอย่าง และส้มโอ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างจะเลือกเก็บในส่วนของใบ ประมาณ 20-40 ใบต่อต้น โดยเก็บใส่ถุงพลาสติกพร้อมทั้งให้ความชื้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

### 2. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR)

เริ่มด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (ดัดแปลงวิธีการจาก Dellaporta *et al*., 1983) โดยนำใบพืชมาตัดให้เหลือแต่ส่วนของเส้นกลางใบ ชั่งให้มีน้ำหนัก 0.5 กรัม และเติม grinding buffer 4 mL บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นบดให้ละเอียดและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ 500 µL

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติม CTAB buffer 500 µL ลงไป และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม Chloroform/Isoamyl (24:1) 500 µL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ 400 µL เติม isopropanol 400 µL ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน และล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol 200 µL และปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที เท 70 % ethanol ทิ้ง และตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 25 µL และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำมาตรวจสอบเชื้อสาเหตุ Las ด้วยวิธี PCR ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Akarapisan *et al*. (2016) และ Fujikawa and Iwanami (2012) ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย specific primers คือ forward primer Las606 (5'-GGAGAGGTGAGTGGAATTCCGA-3') และ reverse primer LSS (5'ACCCAACATCTAGGTAAAAACC-3') ซึ่งจะเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในส่วน specific fragments และปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 25 µL มีส่วนประกอบ ดังนี้ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (distilled water) Quick Tag HS DyeMix 20 µM specific primer Las606/LSS และ DNA template จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Gradient Thermal Cycler (A200; Hangzhou LongGene Scientific Instruments Co., Ltd, China) ซึ่งมีเงื่อนไขปฏิกิริยา คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยขั้นตอน denaturation ถึง extension จะทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย Gel electrophoresis ด้วยเครื่อง Bioer Mini Run (GE-100; Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., China) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที โดยใช้ 1.2% agarose gel electrophoresis ที่ผสมสีย้อมแถบดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (iNtRON BIOTECHNOLOGY, INC., Korea) ใน 0.5X TBE buffer และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง UltraSlim LED illuminators (MaestroGen Inc., Taiwan) พร้อมบันทึกภาพ

**3. การศึกษาโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง**

ตรวจสอบโดยดูโครงสร้างเนื้อเยื่อบริเวณเส้นกลางใบ ซึ่งตัดตามขวางเพื่อดูเนื้อเยื่อในส่วนของท่ออาหาร นอกจากนี้ยังดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง ในตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงเข้าทำลายเปรียบเทียบกับพืชปกติ โดยใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบควบคุมอุณหภูมิ (freezing microtome, Leica CM1850; Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., US) ในการตัดโดยใช้อุณหภูมิ -25 °C และตัดที่ความหนาประมาณ 30 µm ซึ่งใช้ชิ้นพืชบริเวณเส้นกลางใบในส่วนที่อยู่เหนือโคนใบประมาณ 2 – 5 เซนติเมตร

3.1 การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สารละลาย 0.1% Toluidine blue

เนื้อเยื่อพืชที่ต้องการศึกษาจะย้อมสีด้วย 0.1% Toluidine blue โดยอ้างอิงตามวิธีของ Zhou (2017) ซึ่งช่วยเพิ่มความคมชัด และช่วยให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เป็นระยะเวลา 2-5 นาที จากนั้นหยดน้ำกลั่น ย้ายชิ้นพืชที่ได้ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip และนำไปตรวจดูเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope เพื่อตรวจดู และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในบริเวณท่อลำเลียงของพืชสกุลส้มที่ปกติ และพืชที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเนื้อเยื่อที่ศึกษาจะวัดขนาดด้วยโปรแกรม IMT iSolution Lite version 9.1 และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในการวัดขนาดเนื้อเยื่อจะเลือกสุ่มตรวจในพืชปกติและพืชที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรค ในส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ โดยสุ่มเลือก 6 ตัวอย่างในแต่ละชนิดพืช และวัดขนาดของเนื้อเยื่อที่ได้ในแต่ละใบทั้งหมด 4 ซ้ำ

3.2 การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สารละลาย 3% Iodine

ย้อมสีเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการศึกษา ด้วยสารลาย 3% Iodine โดยดัดแปลงวิธีการจาก Lugol's solution ซึ่งพัฒนาโดย Jean Guillaume August Lugol ในปี 1829 (Calissendorff and Falhammar, 2017) เป็นระยะเวลา 2-5 นาที จากนั้นหยดน้ำกลั่นและย้ายชิ้นพืชที่ได้ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip และนำไปตรวจดูเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope เพื่อตรวจดู และเปรียบเทียบการสะสมแป้งของเนื้อเยื่อในบริเวณท่อลำเลียงที่เกิดขึ้นภายในตัวอย่างพืชสกุลส้มที่ปกติ และถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรค

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. เก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชสกุลส้มที่ใช้ศึกษา ได้แก่ ส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ โดยเลือกเก็บตัวอย่างพืชสกุลส้มที่ปกติ และแสดงอาการของโรคฮวงลองบิง โดยมีอาการด่าง และคล้ายอาการขาดธาตุอาหาร (Figure 1) จากพื้นที่ อำเภอเมือง ฝาง และสันป่าตอง ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยตัวอย่างที่เก็บมานั้น ประกอบด้วย ส้มเขียวหวาน 6 ตัวอย่าง มะนาว 12 ตัวอย่าง และส้มโอ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

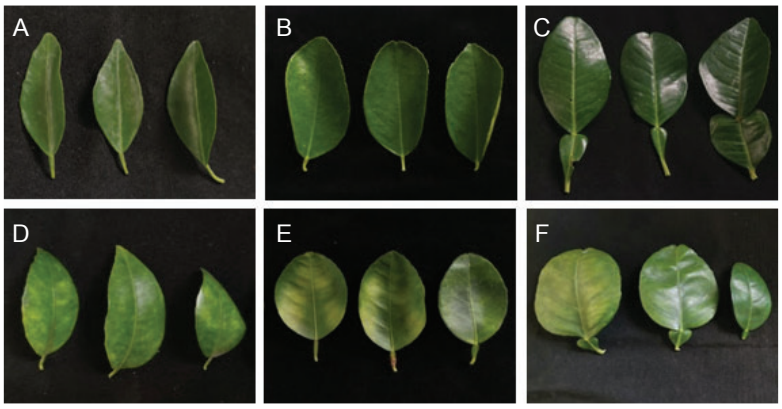


**Figure 1** Citrus leaf samples; A) HLB-free tangerine leaves; B) HLB-free lime leaves; C) HLB-free pomelo leaves; D) HLB-infected tangerine leaves E) HLB-infected lime leaves F) HLB- infected pomelo leaves1

### 2. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากการเก็บตัวอย่างพืชสกุลส้มที่ปกติ และคาดว่ามีเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง จำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยสกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบพืช และการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบพืชด้วย specific primer ที่จำเพาะกับ 16S rDNA ด้วย specific primer Las606/LSS โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp ถือว่าเป็นผลบวก (Figure 2) ซึ่งการตรวจในครั้งนี้ได้ผลตรงกับการศึกษาของ Fujikawa and Iwanami (2012) และ Akarapisan *et al*. (2016) พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างส้มเขียวหวาน 3 ตัวอย่าง มะนาว 7 ตัวอย่าง และ ส้มโอ 3 ตัวอย่าง (Table 1)

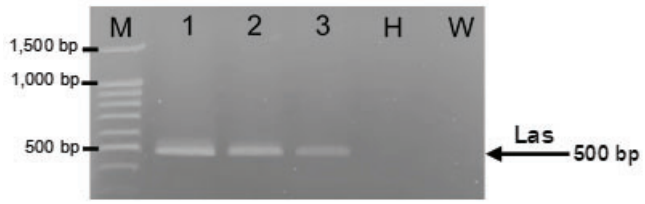


**Figure 2** PCR products amplified Las positive citrus by using primers LSS/Las606 (500 bp) (lane M, 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder as size marker; lane 1, 2, and 3 denote isolates of Las from tangerine leaves, lime leaves and pomelo leaves, respectively.; H healthy tangerine leaves; W negative control without DNA (distilled water)

**Table 1** Summary of host information and polymerase chain reaction (PCR) detection of Las.

| Host | Total sample | PCR detection | |
|---|---|---|---|
| | | Negative | Positive |
| Tangerine (*Citrus reticulata*) | 6 | 3 | 3 |
| Lime (*Citrus aurantifolia*) | 12 | 5 | 7 |
| Pomelo (*Citrus maxima*) | 10 | 7 | 3 |
| Total | 28 | 15 | 13 |

**3. การศึกษาโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง**

3.1 การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สารละลาย 0.1% Toluidine Blue

เนื้อเยื่อของพืชสกุลส้มที่ถูกตัดบริเวณเส้นกลางใบ มีส่วนประกอบของ upper cuticle (UC) upper epidermis (UE) collenchyma tissue (CoT) parenchyma cell (PC) phloem fibre (PF) phloem (Ph) xylem (Xy) และ pith (Pi) (Figure 3A, B) ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อพืชผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีการทาง PCR เพื่อยืนยันพืชปกติ และพืชที่มีการเข้าทำลายของโรค โดยพืชปกติให้ผลลบ ส่วนพืชที่แสดงอาการ HLB ให้ผลบวก ในเนื้อเยื่อพืชปกติ พบว่าส่วนของ phloem fibre, phloem และ xylem เรียงเป็นระเบียบ และเป็นสัดส่วน ส่วนเนื้อเยื่อของพืชสกุลส้มที่ผิดปกติพบว่า phloem fiber มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น การเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ส่วนของ phloem มีความกว้างจาก xylem ไปจนถึง phloem fiber ที่มากขึ้นเกือบ 2 เท่า เมื่อเทียบกับพืชปกติ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) พบว่าตัวอย่างส้มเขียวหวาน ในพืชปกติมีความกว้างเฉลี่ย 576.48±40.62 µm (Figure 3C) และในพืชผิดปกติมีความกว้างเฉลี่ย 1270.25±99.54 µm (Figure 3D) ตัวอย่างมะนาว ในพืชปกติมีความกว้างเฉลี่ย 567.54±52.03 µm (Figure 3E) และในพืชผิดปกติมีความกว้างเฉลี่ย 1129.51±159.49 µm (Figure 3F)และตัวอย่างส้มโอ ในพืชปกติมีความกว้างเฉลี่ย 732.52±109.18 µm (Figure 3G) ในพืชผิดปกติมีความกว้างเฉลี่ย 1563.99±85.86 µm (Figure 3H) โดยผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ามีการเกิด hypertrophic parenchyma cells ในส่วนของ phloem เป็นผลทำให้ปริมาณเซลล์มากขึ้นผิดปกติ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Deng *et al*. (2019)

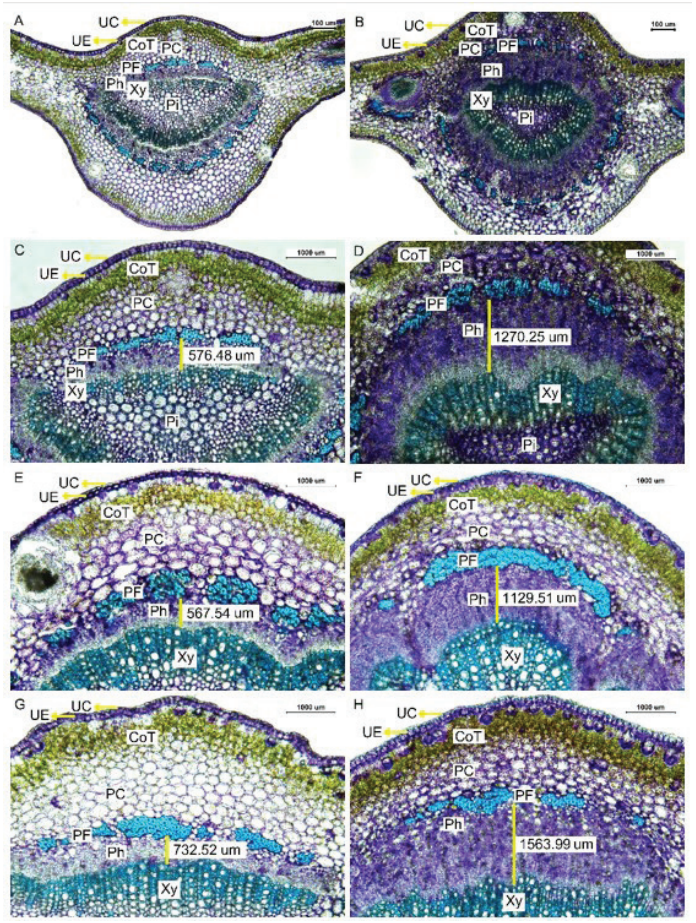


**Figure 3** Cross-section of a citrus leaf midrib and stained by 0.1% Toluidine Blue. A,C) HLB-free tangerine leaf; B,D) HLB-infected tangerine leaf; E) HLB-free lime leaf; F) HLB-infected lime leaf; G) HLB-free pomelo leaf and H) HLB-infected pomelo leaf (upper cuticle (UC); upper epidermis (UE); collenchyma tissue (CoT); parenchyma cell (PC); phloem fibre (PF); phloem (Ph); xylem (Xy) and pith (Pi))

3.2 การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สารละลาย 3% Iodine

เนื้อเยื่อบริเวณท่อลำเลียงที่ถูกย้อมด้วยสารละลาย 3% Iodine ในตัวอย่างส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ พบการเกิดสีดำของ starch granule โดยพบกระจายตัวในส่วนของ collenchyma tissue, parenchyma cell, phloem และ xylem ซึ่งพบในส่วนของ collenchyma tissue และ parenchyma cell มากที่สุด โดยเป็นส่วนบนใบที่มีคลอโรฟิลล์จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวมีการสะสมแป้งมากกว่าปกติ ในการศึกษาพบการเกิดสีดำของ starch granule ในพืชที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรคมากกว่าพืชปกติ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Etxeberria and Narciso, (2012) ซึ่งกล่าวว่าการเข้าทำลายของโรคมีผลต่อการเคลื่อนย้ายผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง และส่งผลให้มีการสะสมแป้งที่มากกว่าปกติ นอกจากนี้รูปแบบการเกิดสีดำที่ปรากฏจากการย้อมด้วย 3% Iodine ในพืชสกุลส้มทั้ง 3 ชนิด (Figure 4) ตรงกับการศึกษาของ Parker *et al.* (2021)

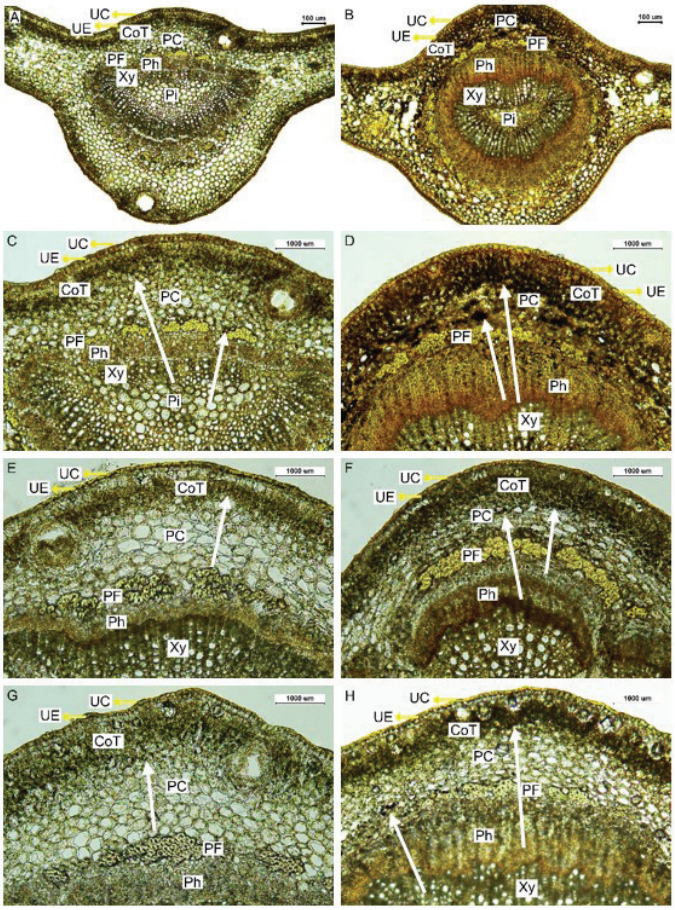


**Figure 4** Cross-section of a citrus leaf midrib and stained by 3% Iodine. A,C) HLB-free tangerine leaf; B,D) HLB-infected tangerine leaf; E) HLB-free lime leaf; F) HLB-infected lime leaf; G) HLB-free pomelo leaf and H) HLB-infected pomelo leaf (upper cuticle (UC); upper epidermis (UE); collenchyma tissue (CoT); parenchyma cell (PC); phloem fibre (PF); phloem (Ph); xylem (Xy) and pith (Pi))

## สรุป

จากการศึกษาพืชสกุลส้มทั้งหมด 28 ตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งผลการศึกษาได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ตำแหน่ง 16S rDNA พบว่ามีพืชปกติ 15 ตัวอย่าง และพืชที่มีการติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ซึ่งพบในตัวอย่างใบส้มเขียวหวานจำนวน 3 ตัวอย่าง มะนาว 7 ตัวอย่าง และส้มโอ 3 ตัวอย่าง นอกจากนี้ การศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อพบว่าพืชสกุลส้มทั้ง 3 ชนิด ที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง มีผลทำให้เนื้อเยื่อบริเวณท่อลำเลียงส่วนของ phloem fibre เรียงตัวผิดปกติ ส่วนของ phloem มีความกว้างจาก xylem ถึง phloem fibre เพิ่มมากขึ้น และมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมของแป้งในส่วนของ collenchyma tissue และ parenchyma cell มากกว่าพืชปกติอย่างชัดเจน

## เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. ตารางแสดงรายละเอียดส้มเขียวหวาน. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th/view/1/ตารางแสดงรายละเอียดส้มเขียวหวาน/TH-TH (10 ตุลาคม 2563).

Akarapisan, A., W. Kuenpech, and K. Srimai. 2016. Huanglongbing (HLB) incidence

on 2-3 years old tangerine trees (*Citrus reticulata*) grown from disease-free nursery stock. Journal of Agricultural Technology 12(1): 1-9.

Albrigo, L.G., L.L. Stelinski and W.L. Timmer. 2019. Citrus (2). Boston, MA: CABI, USA. 324 p.

Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88(1): 7-37.

Calissendorff, J. and H. Falhammar. 2017. Lugol's solution and other iodide preparations: perspectives and research directions in Graves' disease. Endocrine 58: 467–473.

Da Graça, J.V. 1991. Citrus greening disease. Annual Review of Phytopathology 29:109-136.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(4): 19-21.

Deng, H., D. Achor, E. Exteberria, Q. Yu, D. Du, D. Stanton, G. Liang and F.G. Gmitter, Jr. 2019. Phloem regeneration is a mechanism for Huanglongbing-tolerance of "Bearss" lemon and "LB8-9" Sugar Belle® mandarin. Frontiers in Plant Science 10(277): 1-13.

Etxeberria, E. and C. Narciso. 2012. Phloem anatomy of citrus trees: Healthy vs. greening-affected. Proceedings of the Florida State Horticultural Society125: 67-70.

Fujikawa, T. and T. Iwanami. 2012. Sensitive and robust detection of citrus greening (huanglongbing) bacterium "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" by DNA amplification with new 16S rDNA specific primers. Molecular and Cellular Probes 26: 194-197.

Hao, G., D. Ammar, Y. Duan and E. Stover. 2019. Transgenic citrus plants expressing a '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' prophage protein LasP235 display Huanglongbing-like symptoms. Agri Gene 12 (100085): 1-10.

Parker, A.J., E.F. Haskins and I. Deyrup-Olsen. 1982 . Toluidine blue: A simple, effective stain for plant tissues. The American Biology Teacher 44(8): 487–489.

Parker, M.L., P. Ryden, P.J. Wilde and C.H. Edwards. 2021. A simple and effective method for observing starch in whole plant cells and in raw and processed food ingredients. Starch – Stärke 73: 2000056.

Ploetz, R. 2003. Diseases of Mango, pp. 327-363. *In*: R.C. Ploetz (ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops.CABI Publishing. Wallingford, UK.

Sechler, A., E.L. Schuenzel, P. Cooke, S. Donnua, N. Thaveechai, E. Postnikova, A.L. Stone, W.L. Schneider, V. D. Damsteegt, and N.W. Schaad. 2009. Cultivation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', '*Ca.* L. africanus', and '*Ca.* L. americanus' associated with Huanglongbing. Phytopathology 99:480-486.

Smith, A. 2021. What happens when the leaf is dipped in iodine solution?. (Online): Available Source: https://rehabilitationrobotics.net/what-happens-when-the-leaf-is-dipped-in-iodine-solution/#What_happens_when_the_leaf_is_dipped_in_iodine_solution, (June 17, 2021).

Zhou, J. 2017. Histochemistry. Xi'an Jiaotong University Press Co., China 242 p.