ประเภทผลงานวิจัยดีเด่นของ สอพ.ปี 2557

ปี พ.ศ.	ประเภทงานวิจัย	ระดับ	ชื่องานวิจัยดีเด่น	นักวิจัย	หมายเหตุ
2557	พื้นฐาน	ดี	1. พัฒนาแบคทีเรีย Bacillus subtilis สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา Alternaria brassicicola	บุษราคัม อุดมศักดิ์ (รพ.)	
	ประยุกต์	ชมเชย	2. การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย Xanthomonas axonopodis pv. citri สาเหตุโรคแคงเคอร์เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์	ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล (รพ.)	

พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

Development of New Isolate of *Bacillus subtilis* to Control *Alternaria brassicicola* , a Causal Agent of Chinese Kale Leaf Spot

บุษราคัม อุดมศักดิ์ [1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] สุรีย์พร บัวอาจ [1/]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/] รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง [1/]
Boossaracum Udomsak [1/] Nuttima Kositcharoenkul [1/] Sureeporn Bua-art [1/]
Buranee Puawongphat [1/] Rossukon Rungjang [1/]

ABSTRACT

Chinese kale leaf spot, causes by *Alternaria brassicicola*, has been one of important diseases of chinese kale causing damage at every growth stage in all production areas and brought about more fungicides use to control the disease. Biological control is an alternative consideration to reduce chemical usage. However, a limiting factor for biological control is the un-survival of antagonists on plant leaf surface. Promising antagonists may be the bacteria in Bacillus group which has a special ability in producing endospores that could tolerance and grew well in field condition. During October 2011 – September 2013, 135 isolates of *Bacillus* spp. isolated from soil, manure, and planting materials, were evaluated for the ability to inhibit growth of *A. brassicicola* using dual culture technique and 5 isolates found to highly inhibit mycelia growth of *A. brassicicola* were 20W1 20W5 20W4 20W12 and 17G18. These isolates were then tested for the disease control in the screen house by spraying of its cell suspension prior to the inoculation of the pathogen . We found that all isolates could effectively reduce chinese kale leaf spot disease to 46.77%, 52.81%, 59.99%, 60.45% and 71.31% respectively compared to 73.79% of the disease in non-antagonist spraying treatment. Field trial at Ta Maka District, Kanchanaburi province also showed the similar results. Those 5 isolates of *Bacillus* spp., then, were formulated into powder formulation and brought back to test at the same field. The results showed that all isolates could significantly control the disease better than a non-antagonist spraying treatment. *B. subtilis* 20W1 was the most effective one which could reduce the disease to 32.88%. Efficacy trial of the 20W1 isolate at 20-30 grams/20 liters of water showed the disease control at the same level as using mancozeb 80% WP at 40 grams/20 liters of water and significantly control the disease when applied at 40-50 grams/20 liters of water. In conclusion, *B. subtilis* 20W1 is a new isolate that showed high potential to develop to be bio-fungicide to use in farmers' field and upgrade to a commercial scale.

Key-words : *Alternaria brassicicola* , Chinese Kale Leaf Spot, Bacillus

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

โรคใบจุดคะน้า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เป็นโรคที่มีความสำคัญ ทำความเสียหายกับคะน้าทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกแหล่งปลูก ทำให้มีการใช้สารเคมีในปริมาณสูง การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะลดการใช้สารเคมีได้ แต่ที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบยังมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถเจริญบนพืชได้ ยกเว้นแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานและสามารถเจริญได้ดีบนพืช จึงได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 ทำการคัดเลือกเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture technique จาก *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ไอโซเลท 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มีศักยภาพสูงสุด นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบการควบคุมโรคเบื้องต้นในโรงเรือนโดยพ่น cell suspension ของ *Bacillus* spp. ก่อนปลูกเชื้อ *A. brassicicola* พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ 73.79 นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบในแปลงปลูกที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิธีพ่นด้วย cell suspension พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง นำไปทดสอบในแปลงปลูกเดิม พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การทดสอบอัตราการใช้ของ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 พบว่า อัตรา 20 - 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพ ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงเกษตรกร และสามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

คำหลัก: คะน้า โรคใบจุด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

คำนำ

ปัญหาหลักของการปลูกคะน้าคือโรคและแมลงศัตรู โดยโรคพืชที่สำคัญคือ โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire เป็นเชื้อราที่มักทำให้เกิดโรคกับพืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้านใบ และลำต้น และพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการในต้นแก่มักพบบนใบและก้านใบ เป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง ซึ่งจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของเชื้อราแพร่ไปตามลม น้ำ แมลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือ ระบาดมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้พบได้ทุกแหล่งปลูก สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเป็นอันดับแรก และมักใช้อย่างผิดวิธีจึงทำให้เกิดผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าว การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในต่างประเทศมีการผลิตจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น *Bacillus subtilis* MBI 600 ; Integral ® หรือ *Bacillus subtilis* QST 713 ซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา หรือ Environment Protection Agency ; EPA (WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถพบได้ทั่วไปในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม-สามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอุลตร้าไวโอเลต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker and Cook, 1974) นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994) ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาเป็นชีวินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช แบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้เช่นเดียวกับ Pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง (นิพนธ์, 2538) พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลองที่ปลูกข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48 52.53 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 65.46% อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ณัฏฐิมา

และคณะ (2548) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ 70-100% วรรณวิไล และคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และWS 18 เพื่อควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำนึ่ง ในปี พ.ศ. 2550 บุษราคัมและ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอกและวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4 22W10 20W12 17G18 และ 20W4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. solani* ได้ 100%

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานีสจะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ บุษราคัมและณัฏฐิมา (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 มิลลิลิตร ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียนี้ชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำให้ใช้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบให้อาหารกับหนูทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัว เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ที่มีความทนทาน สามารถพัฒนาและเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพแวดล้อม เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูกให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมโรคพืชที่ระบบรากมักประสบความสำเร็จ แต่การนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบมักมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิสูง จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาพแปลงปลูก จึงต้องทำการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรค

สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ ตลอดจนขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dextrose agar) PSA (Potato sucrose agar) PSB (Potato sucrose broth) และผงทัลคัม
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 135 ไอโซเลท
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) และตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
4. วัสดุเกษตร เช่น ดินปลูก กระถางปลูก ปุ๋ยเคมี และสารกำจัดแมลง

วิธีการ: ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์โรคพืช (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955) ดังนี้

- เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA และเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PSA จนกระทั่งโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร PDA ไว้แล้ว ใช้ Loop แตะเบา ๆ ที่โคโลนีของ *Bacillus* spp. ที่จะนำมาทดสอบ ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาขีดเป็นเส้นตรงขนานกับโคโลนีของเชื้อราทดสอบ 4 ด้าน โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 เซนติเมตร โดยใช้ *Bacillus* spp.

1 ไอโซเลทต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) ที่ใช้น้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทดสอบ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ± 3 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล : บันทึกผลโดยวัด inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆ ที่เชื้อรา *A. brassicicola* ไม่เจริญเติบโต โดยวัดระยะห่างจากแนวเส้น *Bacillus* spp. ถึงขอบเชื้อรา *A. brassicicola* ทั้งสี่ด้าน นำมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของ inhibition zone โดยตรวจผลเมื่อกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อรา *A. brassicicola* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากนั้นคัดเลือกไอโซเลท 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือนต่อไป

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง

นำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

วิธีดำเนินการ:

ปลูกคะน้าในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว 5 ต้นต่อกระถาง จำนวน 20 กระถางต่อกรรมวิธี รวมทั้งสิ้น 140 กระถาง

นำ cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ที่เลี้ยงโดยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร พ่นลงบนคะน้าที่มีอายุประมาณ 60 วัน ให้ชุ่มทั้งใบและต้น ด้วยกระบอกฉีดน้ำแบบอัดลม เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่น cell suspension เชื้อรา *A. brassicicola* ความเข้มข้นประมาณ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control -) พ่นด้วย และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control +) พ่นด้วย *A. brassicicola*

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรคโดยประเมินพื้นที่ใบและต้นคะน้าที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มนับจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 21 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง : เตรียมแปลงขนาดกว้าง 1.2 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร หว่านเมล็ดคะน้า และถอนแยกให้มีระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 10 เซนติเมตรและระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 25 เซนติเมตร เมื่อคะน้ามีอายุ 35 วัน จึงเริ่มดำเนินการทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบ: เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5ไอโซเลท บนอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน นำมาทำเป็น cell suspensionโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ขูดเอาเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารออก จากนั้นนำไปกวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร(magnetic stirrer) ปรับความเข้มข้นโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงไป เพื่อให้ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตรสำหรับเชื้อรา *A. brassicicola* เตรียมโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension โดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ *Bacillus* spp. ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร

การทดสอบ: พ่น cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp.ที่เตรียมไว้ลงบนต้นคะน้า โดยใช้เครื่องพ่นชนิดอัดลม พ่นเชื้อ *Bacillus* spp. 2 ครั้งๆ ที่ 1 ก่อนพ่นเชื้อ *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน และครั้งที่ 2 หลังจากพ่น *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วัน หลังการทดสอบ

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง

- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร PSB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมงแล้ว เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงไป เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่าของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมได้ คนให้เข้ากัน นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) นำมาบดให้ละเอียด เก็บในขวดแก้วและถุงพลาสติก ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ทดสอบ ต่อไป (Figure2)

การทดสอบ :

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ดำเนินการทดลองที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยนำชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ละลายน้ำ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นลงบนต้นคะน้าที่เตรียมไว้ 2 ครั้งโดยพ่นชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ก่อน การพ่นเชื้อรา *A. brassicicola* 2 วัน และหลังการพ่น *A. brassicicola* 2 วัน พ่นด้วยถังพ่นชนิดอัดลม

การบันทึกข้อมูล :บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 Control (+) พ่น เชื้อรา *A. brassicicola*

กรรมวิธีที่ 8 Control (-) พ่นน้ำเปล่า

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดสอบ:

- เตรียมแปลงปลูกคะน้า ที่ อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี จำนวน 16 แปลง โดยมีขนาดแปลง เท่ากับ 1.50 x 30 เมตร ปลูกคะน้าโดยวิธีหยอดเมล็ด เมื่อคะน้าอายุได้ 60 วัน ทำการพ่นสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 อัตราต่างๆ ตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4

การบันทึกข้อมูล: บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 7 วันหลังการทดสอบ

การจัดจำแนกสปีชี่ส์ Bacillus : จัดจำแนกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API ® strip range technique (แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร อ. ท่ามะกา และ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท พบว่า มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 90 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA โดยมี 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้แก่ 20W4 20W1 20W5 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.68 1.60 1.58 1.46 และ 1.36 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* ได้สูงสุด (Table1)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp.ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. (C+) โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรค รองลงมา ได้แก่ 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 73.79 (Table 2)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่า *Bacillus* spp.ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 2.70 และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.40 รองลงมาได้แก่ 20W4 และ 20W12 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.91 และ 6.44 ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 13.36 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 5 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท 20W1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.79 6.23 และ 1.90 ตามลำดับ โดยที่ไอโซเลท 20W4 20W1 และ 20W12 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 21.68 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.23 และ 2.42 ตามลำดับ โดยทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 23.50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3**)**

4. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในสภาพแปลงปลูก พบว่า หลังการทดสอบ 7 วัน กรรมวิธีที่มีการพ่น *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการพ่น *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 20W5 17G18 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 41.26 43.55 43.88 และ 48.52 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด โดยสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% (Table 4)

5. ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบ พบว่า การพ่นด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 ทุกอัตราที่ทดสอบได้แก่ 20 30 40 50 และ 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่พ่น *B. subtilis* โดย อัตรา 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5)

การจัดจำแนก *Bacillus* : ผลการการจัดจำแนก *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี API ® strip range technique พบว่า 20W5 20W12 20W4 และ 20W1 (Figure 1) เป็น *B. subtilis* สำหรับไอโซเลท 17G18 เป็น *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสปีชีส์หนึ่งที่ได้รับการขึ้นทะเบียนในต่างประเทศ ให้จำหน่ายเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช เช่นกัน (http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/21989.pdf)

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท โดยการพ่นด้วย cell suspension นั้น ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 20W4 แต่เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลท มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่า ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 41.26 โดยที่ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W5 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 43.55 และ 43.88 ตามลำดับ และไม่แตกต่างทางสถิติ กับ 20W1 ก็ตาม แต่ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่จะสามารถนำไปใช้ในแปลงปลูกซึ่งแต่ละพื้นที่ปลูกอาจจะมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของจุลินทรีย์นั้น จำเป็นจะต้องคัดเลือกสายพันธ์ที่มีศักยภาพสูงสุด เมื่อมีการนำไปผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่เกษตรกรสามารถใช้ได้สะดวก ง่าย ไม่ยุ่งยากนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวจะต้องสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และเพิ่มปริมาณในสภาพธรรมชาติได้ดี จึงจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ดังนั้นในงานทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์จึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์จนถึงระดับที่ทำเป็นสารชีวภัณฑ์ได้ จึงจะประสบผลสำเร็จ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่จำเป็นต้องคัดเลือกจนได้ไอโซเลทหรือสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเพียงหนึ่งเดียว ซึ่งก็เพียงพอต่อการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ เช่น Yun *et al.* (2013) ได้ทำการคัดเลือก *B. subtilis* ที่มีศักยภาพสูงสุดจากแบคทีเรีย Bacillus จำนวน 60 ไอโซเลทที่แยกได้จากธรรมชาติ เพื่อนำมาควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบศักยภาพเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 135 ไอโซเลท คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพสูงสุด เพื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในแปลงปลูกคะน้า พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงเพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *A. brassicicola* ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *B. subtilis* โดยอัตราการใช้ที่เหมาะสมคือ 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร พ่นเมื่อเริ่มพบการเกิดโรค

ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B subtilis* สายพันธุ์ใหม่ซึ่งคัดได้จากเศษวัสดุเกษตรมีศักยภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงปลูก และมีแนวโน้มที่สามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เจ้าหน้าที่ส่งเสริม และเกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า และพืชตระกูลกะหล่ำอื่นในแปลงปลูก
2. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการพัฒนา หรือต่อยอดกับงานวิจัยในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เพื่อขยายผลสู่เชิงพาณิชย์
3. เป็นทางเลือกในการนำไปใช้ในการผลิตพืชผักอินทรีย์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร. ศรีสุข พูลผลกุล เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆในการดำเนินการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ , อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. *ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. *ใน: เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช.* สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211.*ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ* .(บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ. เมือง จ. พิษณุโลก.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) : 4-12.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด.หน้า 93-94. *ใน: คู่มือโรคผัก*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวราภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. *ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 40 ม.เกษตรศาสตร์

อมรรัตน์ ทัศนกิจและมณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนูถีบจักร. หน้า 99-104.*ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 กรุงเทพฯ.

Baker, K.F. and R. J. Cook. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. W.H.Freeman, San Francisco. 433 p.

Environment Protection Agency. แหล่งที่มา: WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm., 28 พฤศจิกายน 2557

Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, J. Appl. Bacteriol. 76 (4) : 395-405.

Helene, C.; B.Wagner; F.Patrick and O. Marc.2011. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, Walloon Centre of Industrial Biolog , Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege , Belgium, Brazil. แหล่งที่มา: http://cdn.intechopen. com/pdfs-wm/21989.pdf, 7 เมษายน 2558

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon Sclerotium rolfsii. Phytopathology. 45:417-420.

Mugg, P; S.Seymour and S.Clark. A New Method for the Identification of Bacillus spp. And Related Species involved in Food Poisoning and Spoilage. แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document, 20 มกราคม 2558

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

Yun, C.; Fang Y. and G. Jian-hua. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus Subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediat Iing biofilm formation, J. Environmental microbiology. Mar 2013 ; 15(3): 848-864

Table 1 Five isolates of *Bacillus* spp. that could highly inhibited the mycelial growth of *Alternaria brassicicola*, a causal pathogen of chinese kale leaf spot, in laboratory.

***Bacillus* spp. isolates**	**Average of Inhibition zone (cm.)**
20W4	1.68
20W1	1.60
20W5	1.58
20W12	1.46
17G18	1.36
Control[1]	0.00

[1] compare to sterile water

Table 2 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 21 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* sp., compared to *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), in screen house.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	46.77
20W5	52.81
20W4	59.99
20W12	60.45
17G18	71.31
Control (-)	0.00
Control (+)	73.79

Table 3 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 3 5 and 7 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**		
	3 DAI[1/]	**5 DAI**[1/]	**7 DAI**[1/]
20W4	2.91 a	2.79 a	1.23 a
20W12	6.44 ba	10.38 cb	12.86 c
20W1	2.70 a	6.23 ba	8.72 cb
17G18	10.82 cb	15.24 dc	14.02 c
20W5	12.70 cb	14.60 dc	13.93 c
mancozeb 80% WP	1.40 a	1.90 a	2.42 ba
Control (-)	0.00 a	0.12 a	0.14 a
Control (+)	13.36 c	21.68 d	23.50 d
CV (%)	68.33	50.73	40.60

[1/] Days after inoculation

Table 4 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	41.26 c
20W5	43.55 c
17G18	43.88 c
20W4	48.52 c
20W12	61.70 d
mancozeb 80% WP	23.37 b
Control (-)	0.00 a
Control (+)	79.70 e
CV (%)	11.21

Table 5 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of *Bacillus subtilis* 20W1 , 20 30 40 50 and 60 grams/20 liters of water compared to mancozeb 80 % WP, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province, Thailand.

***Bacillus subtilis* 20W1 wettable powder (grams/20 liters of water)**	**Infected leaf area (%)**
20	7.79 b
30	5.76 b
40	1.88 a
50	0.91 a
60	5.85 b
mancozeb 40 grams	7.29 b
Control (-)	0.40 a
Control (+)	24.00 c
CV (%)	36.92

Figure 1 The colonies of *Bacillus subtilis* 20W1, on Potato Sucrose Agar medium

Figure 2 The wettable powder of *Bacillus subtilis* 20W1

การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหา แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

Using Real time PCR Technique for the Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Causal Agent of Citrus Canker for Certification of Canker Free Orchards

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ [1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/]
รุ่งนภา ทองเครั่ง [1/] บุญปิยะธิดา คล่องแคล่ว [2/]
Nuttima Kositcharoenkul [1/] Tippawan Kanhayart [1/] Buranee Puawongphat [1/]
Rungnapha Thong kreng [1/] Boonpiyatida Klongklew [2/]

ABSTRACT

To export pomelo (*Citrus maxima* Merr.) to the European Union (EU) Thailand is obliged to follow the International Standards for Phytosanitary Measures No. 6 (ISPM No. 6) the Guidance for Surveillance and the ISPM No.10 Guidelines for Surveillance Requirements for the Establishment of Pest Free Places of Production and Pest Free Production Sites. Canker disease of pomelo caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is a quarantine pest of the EU. Therefore, in Thailand Pomelo orchards certification for canker free is necessary and the effective detection method for *X. axonopodis* pv. *citri* needs to be developed. This work was to utilize the Real time PCR, the rapid and high accuracy technique, to detect *X. axonopodis* pv. *citri* for the canker-free certification of pomelo orchards. The primers 2/3 and D1/D2 were designs from avirulence/ pathogenicity gene (pthA gene) of *X. axonopodis* pv. *citri* which had high specificity and could detect as minimum as 5 picrograms of DNA or 81 cfu/mL the bacterial cells. The method showed high accuracy of detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in both symptom and symptomless samples. In 2014, this Real time PCR method was used for the establishment of canker-free places of production and canker-free production sites at pomelo orchards at Wiang Kaen Districts, Chiang Rai Province. From 130 orchards, 84 canker-free production orchards were successfully established. The Real time PCR method developed in this study was eventually accepted by the EU for the pomelo

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงจังหวัดเชียงราย
Cheng Rai Agriculture Research and Development Center

production in Thailand for export to the EU and representing as a model for the canker-free certification of others crops for countries where *X. axonopodis* pv. *citri* is a quarantine pests

Key-words : Real time PCR, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* , Canker, Citrus

บทคัดย่อ

จากการที่ประเทศไทยสามารถส่งออกส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ไปยังสหภาพยุโรป โดยต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (ISPM NO. 6) เรื่อง การเฝ้าระวังศัตรูพืช และฉบับที่ 10 (ISPM NO. 10) เรื่อง ข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช และต้องมีการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูก จึงจะสามารถส่งผลส้มโอไปยังสหภาพยุโรปได้ ซึ่งการตรวจรับรองแปลงปลูกจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ ที่มีประสิทธิภาพ การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Real time PCR ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง มาใช้ตรวจรับรองแปลงปลูกส้มโอปลอดจากโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR ใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity (pthA gene) มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* มีความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจนและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จากการนำวิธีการดังกล่าว ไปใช้ตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป โดยดำเนินการในปี 2557 ที่แปลงปลูกส้มโอที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 103 แปลง ผลการตรวจรับรองพบว่าการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อย่างแม่นยำ ทำให้สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ทั้งหมด 84 แปลง ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

คำหลัก : เทคนิค Real time PCR แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* แคงเคอร์ ส้มโอ

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burn) Merr.] เป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพมากในการส่งออกเนื่องจากมีพันธุ์ดีตรงความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ นโยบายที่สำคัญของการส่งออกส้มโอไปขายต่างประเทศของประเทศไทย มุ่งเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตส้มโอคุณภาพ เพื่อให้เป็นผู้นำในการผลิตและการตลาดส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) แต่ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการส่งออกส้มโอของประเทศไทย คือ ปัญหาเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแคงเคอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) โรคแคงเคอร์เป็นโรคที่สำคัญทางกักกันพืชของหลายประเทศ เชื้อสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและออสเตรเลีย โดยเฉพาะสหภาพยุโรป เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรง (EPPO/CABI, 2005) การนำเข้าพืชตระกูลส้ม จึงมีกฎหมายและระเบียบควบคุมการนำเข้าอย่างเข้มงวด สหภาพยุโรปเป็นตลาดใหญ่แห่งหนึ่งของโลกมีความต้องการนำเข้าส้มโอมีกฎระเบียบที่เข้มงวดต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดและเงื่อนไขการนำเข้าผลส้มโอของสหภาพยุโรปตาม Council Directive 2000/29/EU โดยต้องมีการรับรองอย่างเป็นทางการว่า ไม่พบโรคแคงเคอร์ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลส้ม ในแปลงผลิตและพื้นที่ติดต่อใกล้เคียงตั้งแต่เริ่มฤดูกาลผลิตที่แล้วจนถึงฤดูกาลผลิตปัจจุบัน ผลส้มที่เก็บเกี่ยวจากแปลงผลิตต้องไม่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ ผลส้มก่อนส่งออกต้องชุบด้วยสาร sodium orthophenylphenates หรือสารอื่นที่เป็นที่ยอมรับ ต้องแสดงไว้ในใบรับรองตามเงื่อนไข และผลส้มบรรจุกล่องในสถานที่หรือศูนย์การขนส่งที่ลงทะเบียนเพื่อใช้ในการนี้โดยเฉพาะ หรือผ่านระบบที่ยอมรับได้ว่าเท่าเทียมกันกับเงื่อนไขที่ได้กำหนดไว้

จากการสำรวจและติดตามการเกิดโรคแคงเคอร์ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่าแหล่งปลูกส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จ.เชียงราย เป็นแหล่งปลูกส้มโอขนาดใหญ่ ไม่พบการระบาดของโรคแคงเคอร์บนพันธุ์ทองดี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีรสชาดเป็นที่ต้องการของตลาดยุโรป จึงได้ดำเนินตรวจเพื่อการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures; ISPM) ฉบับที่ 6 (ISPM NO. 6) เรื่อง การเฝ้าระวังและติดตามศัตรูพืช และฉบับที่ 10 (ISPM NO. 10) เรื่อง ข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช โดยพัฒนาระบบการตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคที่เป็นที่ยอมรับของประเทศผู้นำเข้า ต้องมีการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอ มีการติดตามเฝ้าระวังการเกิดโรคในแหล่งผลิตเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูก ทำให้ประเทศไทยจะสามารถส่งออกส้มโอไป

จำหน่ายยังสหภาพยุโรปได้ โดยมีการระบุข้อความเพิ่มเติมในใบรับรองปลอดศัตรูพืช “Pomelo in this consignment has been inspected and treated under control of DOA Thailand according to EU 2000/29/EC annex 4A1 articles 16.2 c1, 16.3 A, 16.4 A, 16.5 C" ซึ่งหัวใจสำคัญของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบรับรองแปลงปลูกพืชให้เป็นที่ยอมรับของประเทศนำเข้า และการเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต คือวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ที่ถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ และมีรายงานการใช้เทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung *et.al*., 1993, Hartung *et.al*., 1996, ณัฏฐิมา และคณะ, 2548) จึงมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอเพื่อตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์และเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต แต่เนื่องจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR จะวิเคราะห์เมื่อสิ้นสุดขบวนการ PCR โดยต้องนำผลผลิต PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel eletrophoresis แล้วย้อมด้วยสาร ethediumbromide และตรวจภายใต้แสง UV ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR และ สาร ethediumbromide เป็นสารก่อมะเร็งที่มีอันตราย Mavrodieva และคณะ (2004) ได้มีพัฒนาเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเคอร์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆแผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* 10 CFU/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง มีความปลอดภัยสูง ไม่ต้องใช้สารที่เป็นอันตราย สามารถแสดงผลได้ในเวลาอันรวดเร็ว ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอเพื่อตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์และเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง LightCycler® 480

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ, เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ, LightCycler 480 SYBR green I master, LightCycler 480 Mutiwell plate 96

5. แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชกลุ่ม *Xanthomonas* spp.และแบคทีเรียอื่นๆ

วิธีการ

การเตรียม DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

ทำการเตรียม DNA โดยการแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้ม อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลายใน 1 ul ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) จำนวน 100 ul ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ul ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ul ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 ^{o}C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) จำนวน 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 ^{o}C จำนวน 378 ul ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 150 ul ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ul วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ให้ได้ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05 , 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR

การเตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

นำแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เลี้ยงในอาหาร LB medium ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วัดความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าดูดซับคลื่นแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ 600 nm สารละลายเชื้อที่ได้นำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ทุกความเข้มข้นของ dilution นำไปตรวจที่ปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 50 ul เขี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร Semi-selective for *Xanthomonas* (SX medium) (Schaad, 1988) เก็บไว้ที่ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

การตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์โดยวิธี Real time PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา Real time PCR การทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ทดสอบกับเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ซึ่งเป็นสารละลายผสม(Master mix) ทีjมี SYBR green ที่มีสี fluorescent dye เป็นตัวตรวจปฏิกิริยา Real time PCR ตัวอย่างจะทำปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) ในการทำปฏิกิริยาจะต้องมี ตัวควบคุมลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นแทน DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และตัวควบคุมบวก (positive control) ใช้ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทุกครั้ง

การทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 uM primer และ 1 ul DNA ของ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยมีโปรแกรม สำหรับปฏิกิริยา Real time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	94	00:04:00	4.40	none
Amplification	40	94	00:00:15	4.40	none
		58	00:00:15	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
		72	00:05:00	4.40	single
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		72	00:01:00	2.20	none
		97	00:00:00	0.11	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

การทำปฏิกิริยา Real time PCR ในขณะที่ทำปฏิกิริยาเครื่อง LightCycler® 480 จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา Real time PCR

ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า background ค่า Cp จึงใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย และบอกได้ถึงปริมาณของผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยถ้ามีผลผลิต PCR เป้าหมายมาก ค่า Cp จะต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ตัวที่สองในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมายเพราะว่าค่า melting curve ช่วยในการตรวจสอบการสร้างผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยผลผลิต PCR เป้าหมายที่ได้จากปฏิกิริยา Real time PCR ของแต่ละชนิดแบคทีเรีย ให้ลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature (Tm)) เฉพาะตัวแตกต่างกันไป การวิเคราะห์ค่า Tm จึงสามารถใช้ในการจำแนกผลผลิต PCRที่ไม่ใช่เป้าหมายและ primer-dimer ที่เกิดขึ้น การรายงานผลทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับค่า Cp และ การวิเคราะห์ melting curve

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer ทั้ง 3 คู่ ใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *citri* ที่ แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆในประเทศไทยจำนวน 50 ไอโซเลท (Table 1) และ เชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* ได้แก่ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae, X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* (Table 1) โดยความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อแคงเคอร์ (sensitivity) ของ primer โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอจากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลตัวอย่างโรค โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm นำตัวอย่างใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำส่วนน้ำใส 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการใช้วิธี standard PCR ด้วย primer D1/D2 (ณัฏฐิมา และคณะ 2548) และ primer 2/3 (Hartung *et.al*., 1993) และทุกตัวอย่างนำมาแยกเชื้อบนอาหาร semi-selective for *Xanthomonas* (SX media) โดยนำตัวอย่างโรคแคงเคอร์แต่ละตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรไปเกลี่ยให้ทั่วบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28° C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

การทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเคอร์ โดยเก็บตัวอย่างใบของส้มโอ ที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ และตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 50 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่เติมด้วย 25 ml ของสารละลาย PBS นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นน้ำใส เก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS จำนวน 500 µl นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR โดยใช้ primer 2/3 ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทำการตรวจเชื้อบนอาหาร SX medium ในทุกตัวอย่าง

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

การตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ เป็นไปตามประกาศของกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลส้มโอไปสหภาพยุโรป พ.ศ. 2556 ต้องปฏิบัติตามระเบียบ EC Plant Health Directive 2000/29/EC ได้กำหนดเงื่อนไขการอนุญาตนำเข้า ผลของพืชสกุลส้มจากประเทศไทย ต้องได้รับการตรวจรับรองแหล่งผลิตว่าปลอดจากโรคแคงเคอร์ ที่ผลต้องไม่ปรากฏอาการของโรคข้างต้นและทำการจุ่มผลในสารละลายกำจัดเชื้อโรค ที่อาจปนเปื้อนที่ผิว ซึ่งการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ให้ปฏิบัติตามคู่มือ การปฏิบัติงานตรวจสอบและรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ของกรมวิชาการเกษตร (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2550) โดยเกษตรกร ผู้ใดประสงค์จะขอใบสำคัญแสดงการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ สำหรับการส่งออกไปสหภาพยุโรป ให้ยื่น ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ภายในเดือนธันวาคมของทุกปี จากนั้นกลุ่มบริการส่งออก ส่งรายชื่อเกษตรกรพร้อมข้อมูลแปลงปลูกให้กับสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย จากนั้นเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย ไปตรวจแปลงผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปยังสหภาพยุโรป โดยการสังเกตลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์บนต้นส้มโอ ทุก 60 วัน ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของรอบการเจริญเติบโตของส้มโอ จนถึงช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว พร้อมเก็บตัวอย่างกิ่งส้มโอที่มีใบคลี่เต็มที่แล้ว (ใบเพสลาด)โดยสุ่มเก็บจำนวน 3 กิ่ง/ต้น จำนวน 25 ต้น/สวน นำมาตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

การตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

การตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตามวิธีการของ อรพรรณ และคณะ (นำตัวอย่างกิ่งส้มโอ เก็บเฉพาะใบส้มโอ ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ที่เติมด้วย สารละลาย PBS buffer จำนวน 250 ml นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียที่ติดอยู่ภายนอกใบส้มโอถูกล้างออกมา จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นน้ำใส เก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS buffer จำนวน 500 µl นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Real time PCR ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media)

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.57 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

specific primer จากการสืบค้นข้อมูลพบ primer มีรายงานว่าสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer ที่ ออกแบบมาจาก ยีน pathogenicity gene *(pthA gene)* ของแบคทีเรีย *X. axonopodis pv. citri* ซึ่ง *pthA gene* พบเฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียชนิดนี้ในการชักนำให้เกิดโรคแคงเคอร์ในพืชตระกูลส้ม (Swarup *et al.*, 1991) โดยยีนนี้จะทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Duan *et al.* 1999) ลำดับเบสของ *pthA gene* ถูกอนุรักษ์ไว้ให้เหมือนกันและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อๆ ไป การเลือกprimer ที่ออกแบบจาก *pthA gene* จะทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ในการทดลองจึงได้เลือก primer จำนวน 4 ชุด ดังนี้

1. Primer D1 (GGCCTTGATCAAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGGGGACGGTTTA) จากรายงานของ ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ที่ออกแบบจาก *pthA* gene ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A
2. primer 2 (CACGGGTGCAAAAAATCT) และ 3 (TGGTGTCGTCGCTTGTAT) จากรายงานของ Hartung *et.al* (1993)
3. primer VM3 (GCATTTGATGACGCCATGAC0 VM4 (TCCCTGATGCCTGGAG GATA) จากรายงานของ Mavrodieva et.al (2004)

นำลำดับเบสของ primer ทั้ง 4 ชุดไปสั่งสังเคราะห์ primer จากหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ

การทดสอบ primer จากการทดสอบ primer ทั้ง 3 คู่ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ primer กับ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต้นแบบ (annealing) ที่ 58 ºC พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จาก DNA ต้นแบบ โดยมีการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ พบว่า มีค่า Tm ที่แตกต่างกัน โดย Tm ของคู่ primer D1/D2 primer 2/3 และ primer VM3/VM4 คือ 89.03ºC , 87.73 ºC และ 88.1 ºC ตามลำดับ (Fig 1)

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท (Table 2) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae, X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* โดยให้ค่า Cp สูงกว่า 35 รอบ และการวิเคราะห์ melting curve พบว่าค่า Tm ที่ได้ของแต่ละชนิดแบคทีเรียไม่ตรงกับค่า Tm ที่ได้จากแบคทีเรีย *X . axonopodis* pv. *citri* (Table 2; Fig 2) ผลการทดสอบพบว่า primer 2/3 ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดที่ 18.54 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูง ถึง 36.343 (Fig 3) ส่วน primer D1/D2 ให้ค่า Cp ต่ำรองลงมาที่ 19.61 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูงเท่ากับ primer 2/3 (Fig 4) ในขณะที่ primer VM3/VM4 ให้ค่า Cp สูงที่ 23.33 แต่ให้ค่า SYBR green fluorescence สูงที่สุดที่ 42.329 (Fig 5)

จากผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์เท่านั้น เนื่องจาก primer ทั้ง 3 คู่ออกแบบมาจาก ยีน *pth A* ที่เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะอาการของจุดแผลตกสะเก็ดปากแผลแตกออกคล้ายปล่องภูเขาไฟ (Swarup *et al.*, 1991) ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์จะมีอยู่เฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* เท่านั้น (Duan *et al.* 1999) โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 50 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ และแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ซึ่งที่พบในประเทศไทย เป็น สายพันธุ์ canker A (ณัฏฐิมาและวงศ์, 2546) ผลการทดสอบได้ผลเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ (Hartung *et al.*,1993; ณัฏฐิมา และคณะ, 2548 และ Mavrodieva *et al.*,2004)

ผลการทดสอบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ของ primer ทั้ง 3 คู่ พบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจเชื้อ *X .axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ของ DNA คือ 5 พิโคกรัม (Table 3) และความเข้มข้นของ เซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ 81 CFU/ml (Table 4; Fig 3 และ 4) เช่นเดียวกัน ในขณะที่ ความไวในการตรวจของ primer VM3/VM4 ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 500 pg (Table 3) และความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ $8.1x10^6$ CFU/ml (Table 4; Fig 5) จากผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความไวในการตรวจการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่า primer VM3/VM4 โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ primer VM3/VM4 ยังเกิด primer dimers ที่เกิดจากการจับกันเองของ primer ในหลุมที่มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต่ำๆ โดยทำให้เกิด peak ในการวิเคราะห์ melting curve จำนวน 2 peak อาจเนื่องจากขนาดของผลผลิต PCR มีขนาดเล็ก ทำให้มีโอกาสที่ primer จะจับกันเองสูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ดี (Chou *et al*. 1992) จากผลการทดลองการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถใช้primer D1/D2 และ primer 2/3 ให้ผลการทดสอบเหมือนกันทั้ง ความเฉพาะเจาะจงและความไว

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

ผลการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างส้มโอที่สงสัยว่าเป็นโรคแคงเคอร์ที่เก็บมาแปลงปลูกส้มโอ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 พบว่าวิธี Real time PCR สามารถตรวจพบโรคแคงเคอร์ทั้งจำนวน 10 ตัวอย่าง ทั้งprimer D1/D2 และ primer 2/3 (Table 5) เช่นเดียวกับการตรวจหาด้วยวิธี standard PCR ที่สามารถตรวจพบโรคแคงเคอร์ได้ทั้ง 10 ตัวอย่างและการแยกเชื้อด้วยอาหาร SX ที่พบโคโลนีของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เจริญในอาหาร จำนวน 10 ตัวอย่าง (Table 5) แต่การตรวจสอบโดยเทคนิค Real time PCR ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยเห็นผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง หน้าจอของเครื่อง Real time ไม่ต้องรอเสร็จสิ้นปฏิกิริยา และไม่ต้องนำไปทำ electrophoresis ใน แผ่น agrarose gel และย้อมด้วย ethedium bromide เหมือนกับ วิธี standard PCR ซึ่ง ethedium bromide เป็นสารอันตรายที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ และการตรวจด้วยอาหาร SX ต้องใช้เวลา 3-4 วัน จึงจะทราบผลว่าตัวอย่างใดปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และการใช้ดังนั้นการใช้ เทคนิค Real time PCR จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็วทำให้ปลอดภัย และการประหยัดเวลา และสามารถนำไปใช้ในงานตรวจรับรองสินค้าเพื่อการส่งออกและตรวจรับรองเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ได้ต่อไปในอนาคต

การทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

จากการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเคอร์ในจังหวัดเชียงราย พิจิตร ปทุมธานี ชัยนาท และ นครปฐม จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างที่แสดง

อาการของโรคแคงเคอร์ จำนวน 24 ตัวอย่างและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการจำนวน 26 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าวิธี Real time PCR โดยใช้primer 2/3สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบทั้งหมด 44 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% โดยวิธี Real time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่างได้ (Table 6) เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้ 38 ตัวอย่าง (Table 6) โดยพบว่า ตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมดตรงกับที่ตรวจได้จากวิธี Real time PCR และตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี Real time PCR แล้วไม่พบก็ไม่สามารถแยกเชื้อบนอาหาร SX media ได้เช่นกัน แต่จากผลทดลองพบว่าการแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกได้น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อโดยวิธี Real time PCR เนื่องมาจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ (selective medium) มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดที่ไปลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้แยกเชื้อได้น้อยกว่า โดยพบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium (plating efficiency) อยู่ที่ 54.4 % เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหาร nutrient agar (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่ไม่สามารถใช้อาหาร NA ในการแยกนับเชื้อได้เนื่องจากเชื้อแซปโปรไฟท์ชนิดอื่นๆ ที่มีปะปนอยู่จะเจริญได้เร็วกว่าและขึ้นคลุมทับก่อนที่เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จะเจริญ นอกจากนี้การที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (viable but nonculturable state (VBNC)) (Oliver, 2005) ซึ่ง Oliver (2000) ได้รายงานระยะ VBNC ของแบคทีเรียที่ทำให้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นประจำ แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิต และสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ได้ เซลล์ในระยะนี้มีระดับการเจริญเติบโตต่ำ แต่สามารถฟื้นฟูให้เจริญเติบโตบนอาหารได้อีกครั้ง ได้มีรายงานการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่มสารประกอบทองแดง ไปกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะ VBNC เพื่อความอยู่รอด เช่น *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi *et al.*, 1999), *Erwinia amylovora* (Ordax *et al.*, 2006) เป็นต้น ซึ่งในการป้องกันกำจัดโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย มีการใช้สารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ ในการป้องกันกำจัดซึ่งอาจไปกระตุ้นให้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไปอยู่ในระยะ VBNC ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ แต่วิธี Real time PCR นั้นมีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ของเชื้อ สามารถตรวจเซลล์ที่อยู่ในระยะ VBNC และเซลล์ที่ตายได้ (Wolf *et al.*, 2000) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้วิธี Real time PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ ดังนั้นวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง เพื่อการตรวจรับรองแปลงปลอดโรคแคงเคอร์ในอนาคตได้

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

การตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ เพื่อส่งไปสหภาพยุโรป ในปี 2556-2557 มีเกษตรกรผู้ประสงค์จะขอใบสำคัญแสดงการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ สำหรับการส่งออกไปสหภาพยุโรป มีจำนวน 93 ราย รวม 103 แปลง เจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงรายได้ สุ่มเก็บตัวอย่างกิ่งส้มโอ จำนวน 2 ครั้ง คือในเดือนมีนาคม และเดือนมิถุนายน 2557 โดยสุ่มเก็บจำนวน 3 กิ่ง/ต้น จำนวน 25 ต้น/สวน นำมาตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยเทคนิค Real time PCR ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจพบว่า ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ จำนวน 19 แปลง โดยตรวจพบในเดือน มีนาคม 2557 จำนวน 11 แปลง และตรวจพบเพิ่มในเดือน มิถุนายน 2557 จำนวน 8 แปลง (Table 7) ทุกตัวอย่างที่ตรวจพบสามารถแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium ได้ ยกเว้นตัวอย่างที่มีค่า Cp 35 ซึ่งมีปริมาณเชื้อน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถเจริญขึ้นบนอาหารได้ (Table 7) เนื่องจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ (selective medium) มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดทำให้ลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ลงทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อในจำนวนน้อย ๆได้ แปลงปลูกส้มโอที่มีการตรวจพบตั้งแต่ครั้งแรกในเดือนมีนาคม 2557 จะถูกตัดออกไป ไม่มีการตรวจแปลงและสุ่มตัวอย่างมาตรวจละเอียดในห้องปฏิบัติการอีกในครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน 2557 กลุ่มวิจัยโรคพืช รายงานผลการตรวจชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการไปยังศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย เพื่อดำเนินการออกและนำส่งหนังสือสำคัญแสดงการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอ ให้แก่ด่านตรวจพืชเชียงของ จังหวัดเชียงราย หรือกลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร เพื่อดำเนินการควบคุมในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช โดยมีการระบุข้อความเพิ่มเติมในใบรับรองปลอดศัตรูพืช “Pomelo in this consignment has been inspected and treated under control of DOA Thailand according to EU 2000/29/EC annex 4A1 articles 16.2 c1, 16.3 A, 16.4 A, 16.5 C" ผลจากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง ทำให้ในปี 2556-2557 สามารถรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ได้จำนวน 84 แปลง ได้ออกใบรับรองสุขอนามัยพืชไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 19 ฉบับ ปริมาณ 208,440 กิโลกรัม รวมเป็นรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอในอำเภอเวียงแก่นคิดเป็นมูลค่า 3,126,600 บาท โดยไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง (ข้อมูลจากด่านตรวจพืชเชียงของ) จากดำเนินจะเห็นได้ว่า การใช้วิธี Real time PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ

ทำให้สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity *(pthA gene)* มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว(sensitivity) ในการตรวจ ชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของDNA เท่ากับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 CFU/ml นำไปทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเคอร์จากแปลงปลูกส้มโอ ที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 10 ตัวอย่าง วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจนและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ ผลจาการนำวิธี Real time PCR ไปใช้ตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป โดยดำเนินการในปี 2556-2557 ที่แปลงปลูกส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 103 แปลง ผลการตรวจรับรองพบว่าการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ทั้งหมด 84 แปลง ได้ออกใบรับรองสุขอนามัยพืชไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 19 ฉบับ ปริมาณ 208,440 กิโลกรัม รวมเป็นรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอในอำเภอเวียงแก่นคิดเป็นมูลค่า 3,126,600 บาท โดยไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง

การนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR เป็นวิธีตรวจสอบ ที่มีประสิทธิภาพมีความไวและความเฉพาะเจาะจง ตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ สามารถนำไปใช้ในการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์เพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ผลผลิตส้มโอที่ได้เมื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปแล้วไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของ

สหภาพยุโรปและวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้ ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช 2550. คู่มือการตรวจรับรองส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์เพื่อการส่งออกไปสหภาพยุโรป สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 28 หน้า

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 เล่มที่2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.หน้า 932 – 948.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช ปีที่19 ฉบับที่1-2 หน้า 35-46.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J., and Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number mplifications.Nucleic Acids Research. Apr 11, 1992; 20(7)1717

Duan, Y.P., A.L. Castaneda, G. Zhao, and D.W. Gabriel. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. Mol. Plant Microbe Interact. 12: 556-560.

Ghezzi, J.I. and T.R. Steck. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. FEMS Microbiol. Ecol. 30 : 203-208.

Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P .1993. Detection of Xanthomonas campestris pv. citri by the polymerase chain reaction method. Appl Environ Microbiol ;59:1143-8

Hartung, J. S., Pruvost, O. P ,Villemot I.,and Alvarez, A. 1996. Rapid and colorimetric detection of Xanthomonas axonopodis p.v. citri by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. Phytopathology 86:95-101.

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. 43 : 93-100.

Oliver, J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. *In* R.R. Colwell and D.J.Grimes (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. American Society for Microbiology Press, Washington,D.C.

Ordax, M.E., Marco-Noales, M.M. Lopez and E.G. Biosca. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against Copper : Induction of the Viable-but-Non culturable state. Appl. Environ. Microbiol. 76 : 3482-3488.

Picher, D. G., N. A. Saunders, and R. Owen. 1989. Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156.

Roberts ,P. R., Jone,J. B., Chandler,C. K., Stall,R. E. and Berger, R. D.1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primer and nested polymerase chain reaction . Plant Dis. 80 :1283-1288.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed. American Phytopathological Society , St. Paul , Minnesota.

Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from Xanthomonas citri enables strains from several pathovars of X. campestris to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.

Wolf, J.M., S.G.C. Vriend, P. Kastelein, E.H. Nijhuis, P.J. van Bekkum and J.W.L. van Vuurde. 2000. Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. Euro. J. Plant Pathol. 106: 123–133.

Table 1 Strains of *Xanthomonas* spp. used in this study.

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*				
873	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
950	ส้มฟรีมองต์	เชียงใหม่	2532	1
956	มะนาวไข่	มุกดาหาร	2532	1
967	มะกรูด	ชลบุรี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
1047	ส้มโอ	ปทุมธานี	2533	1
1049	มะนาว	นนทบุรี	2533	1
1055	มะกรูด	นนทบุรี	2533	1
1095	ส้มโอ	เชียงราย	2534	1
1110	ส้มโอ	พัทลุง	2534	1
1123	ส้มโอ	นครพนม	2534	1
1189	ส้มโอ	พิจิตร	2535	1
1582	ส้มโอ	เชียงราย	2544	1
1584	ส้มโอ	พิษณุโลก	2544	1
1588	ส้มโอ	ชลบุรี	2545	1
1619	ส้มเขียวหวาน	จันทบุรี	2545	1
1623	มะนาว	ปทุมธานี	2545	1
1627	ส้มโอ	พิจิตร	2546	1
1628	ส้ม	ชุมพร	2546	1
1629	มะนาว	ตาก	2546	1
1632	ส้มโอ	กำแพงเพชร	2546	1
1720	ส้มตรา	เชียงราย	2547	1
1754	ส้มโอ	สกลนคร	2547	1
1767	ส้มโอ	ตราด	2547	1
1782	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1783	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1784	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1788	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1791	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1805	ส้มโอ	ปัตตานี	2547	1
1814	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1816	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1819	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1

Table 1 (Continued)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
1823	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1825	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1826	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1830	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1831	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1832	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1833	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1834	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1841	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1843	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1855	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1856	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1880	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1886	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
1887	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
X. axonopodis pv. *malvacearum*				
1232	ฝ้าย	ปราจีนบุรี	2536	1
X. axonopodis pv. *glycines*				
1330	ถั่วเหลือง	สุโขทัย	2537	1
X. axonopodis pv. *vesicatoria*				
1726	พริก	ลำปาง	2547	1
X. axonopodis pv. *differenbachiae*				
1058	หน้าวัว	กรุงเทพฯ	2534	1
X. campestris pv. *campestris*				
1104	ผักกาดเขียว	สงขลา	2534	1
X. oryzae pv. *oryzae*				
TB0003	ข้าว	นครพนม	2543	1
X. axonopodis pv. *manihotis*				
1682	มันสำปะหลัง	ระยอง	2546	1

1/ หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Table 2 The result of specificity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

รายชื่อเชื้อ	ค่า Cp ของการตรวจโดยวิธี Real time PCR		
	Primer D1/D2	**Primer 2/3**	**Primer VM3/VM4**
X. axonopodis pv. *citri* (50) [1/]	19.61	18.56	23.33
X. axonopodis pv. *malvacearum*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *glycines*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *vesicatoria*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *differenbachiae*	>35	>35	>35
X. campestris pv. *campestris*	>35	>35	>35
X. oryzae pv. *oryzae*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *manihotis*	>35	>35	>35

Table 3 The result of sensitivity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

DNA concentration	**primers** D1/D2	**primers** 2/3	**Primers** VM3/VM4
	Cp	**Cp**	**Cp**
50 ng	20.92	22.22	28.46
5 ng	23.08	26.00	31.65
1 ng	25.58	29.67	32.75
500 pg	26.76	30.67	33.19
50 pg	29.02	32.36	>35
5 pg	33.06	33.88	>35
1 pg	>35	>35	-
100 fg	-	-	-

Table 4 The result of sensitivity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

Bacterial cells	**CFU/ ml**	**primers** D1/D2	**primers** 2/3	**Primers** VM3/VM4
		Cp	**Cp**	**Cp**
O.D. 0.1 $_{600\ nm.}$	$8.1x10^{8}$	19.25	18.73	23.33
10^{-1}	$8.1x10^{7}$	23.47	22.31	25.02
10^{-2}	$8.1x10^{6}$	25.15	26.09	28.17
10^{-3}	$8.1x10^{5}$	25.68	26.73	>35
10^{-4}	$8.1x10^{4}$	26.72	29.71	>35
10^{-5}	$8.1x10^{3}$	30.09	30.15	>35
10^{-6}	$8.1x10^{2}$	30.18	32.19	>35
10^{-7}	81	31.61	33.63	>35
10^{-8}	8	35	35	-

Table 5 The result of detected *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* in pomelo canker disease using Real time PCR and Standard PCR with primers D1/D2 and primer 2/3 and isolated on selective media for Xanthomonas (SX media)

Sample	Real time PCR		Standard PCR		SX media
	Primer D1/D2 Cp	Primer 2/3 Cp	Primer D1/D2	Primer 2/3	
1	29 (+)	28 (+)	+	+	+
2	21.65 (+)	20.65 (+)	+	+	+
3	29 (+)	28 (+)	+	+	+
4	27.08 (+)	26.60 (+)	+	+	+
5	33 (+)	32.04 (+)	+	+	+
6	34 (+)	33.65 (+)	+	+	+
7	20.4 (+)	19.56 (+)	+	+	+
8	30 (+)	28 (+)	+	+	+
9	29.5 (+)	28 (+)	+	+	+
10	28.6 (+)	27 (+)	+	+	+

Table 6 Real time PCR testing methods in the detection of Xanthomonas axonopodis pv. citri from Pomelo Orchards.

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	Real time PCR[1/]	Isolation SX media[2/]
1. ตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์	24[3/]	24[4/]	24
2. ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์	26	20	14
รวม	**50**	**44**	**38**

1/ การตรวจด้วยวิธี **Real time PCR** จากการวิจัยในครั้งนี้

2/ การตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium

3/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ

4/ จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

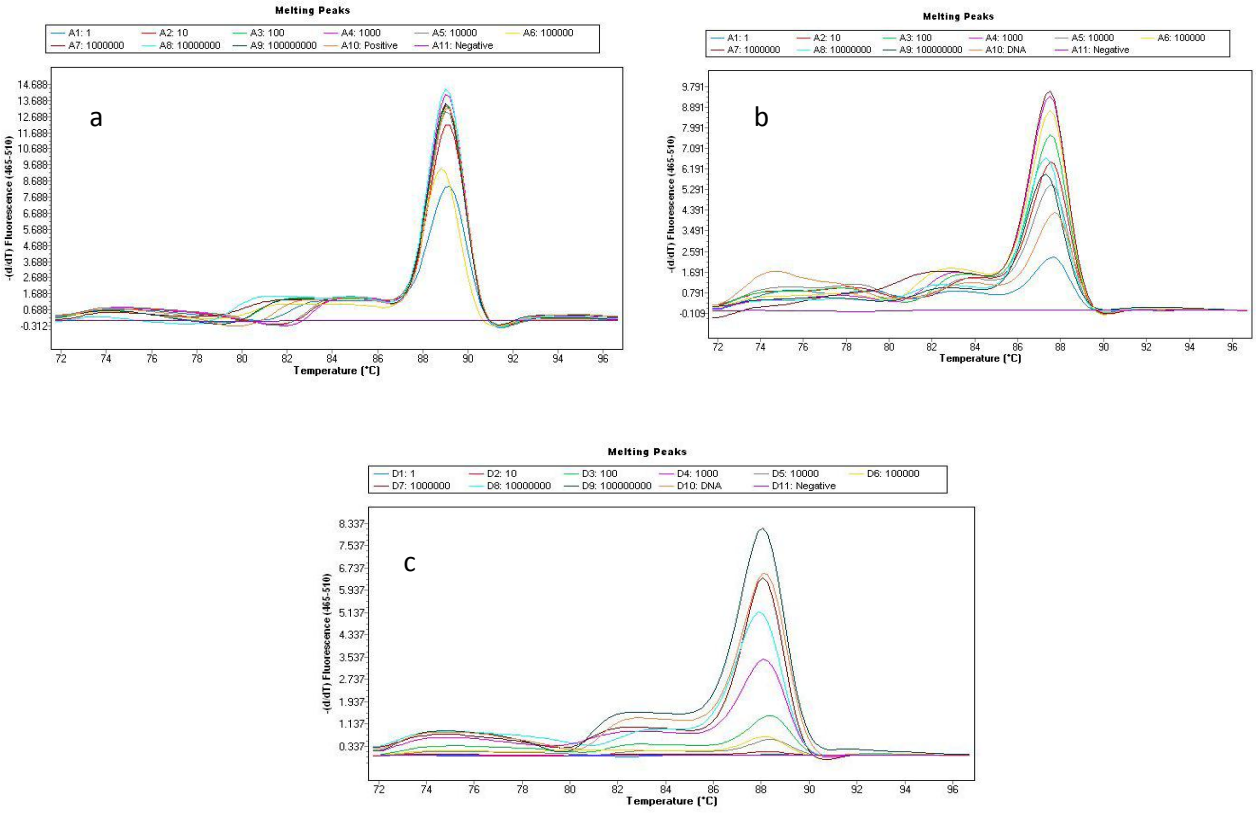

Fig. 1 Analysis melting curve of PCR product from detected primer pair 3 it was found Tm different.

a. Tm of PCR product from primer D1/D2 of 89.03°C

b. Tm of PCR product from primer 2/3 of 87.73 °C

c. Tm of PCR product from primer VM3/VM4 of 88.1 °C

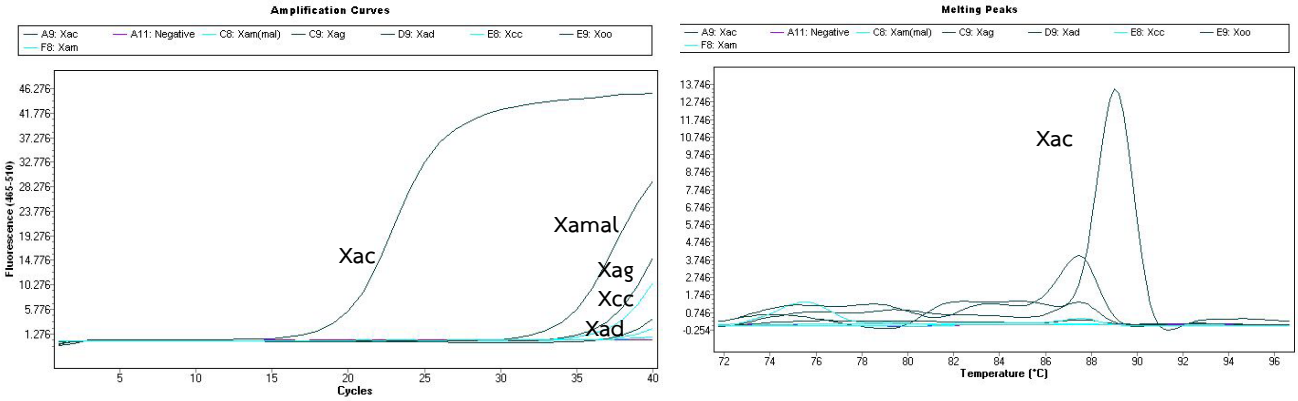

Fig. 2 The result of specificity using primer D1/D2 detected *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) and *Xanthomonas* such as *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xamal), *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xcg), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* (Xad), *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), *X campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *X. oryzae* pv.*oryzae* (Xoo)

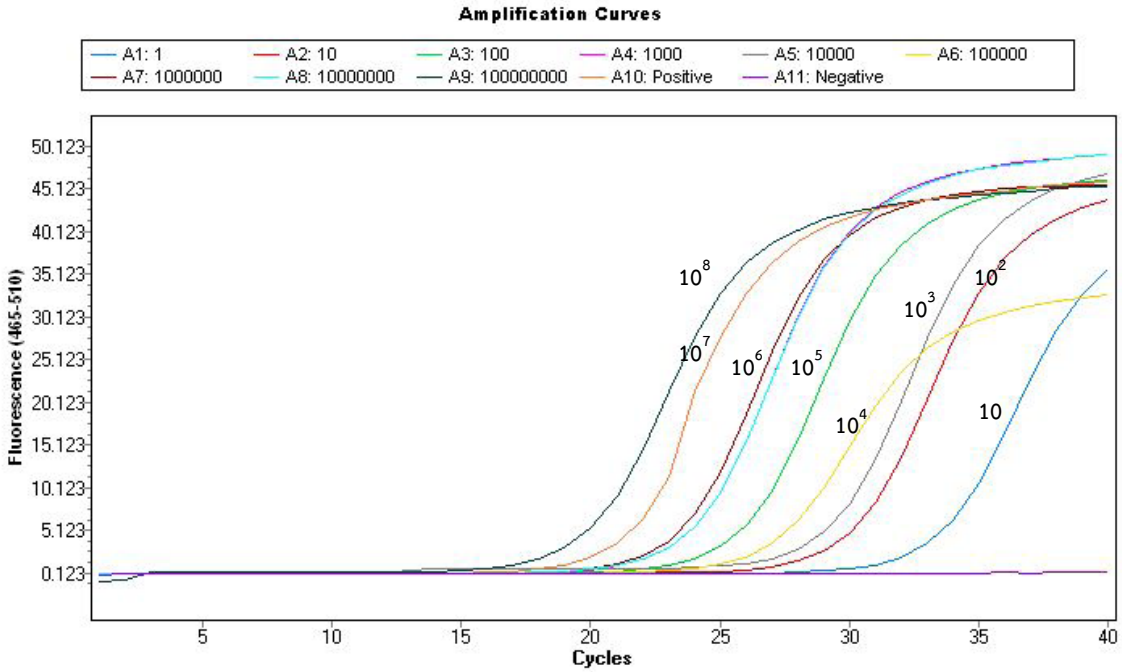

Fig. 3 The result of sensitivity using primer D1/D2 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

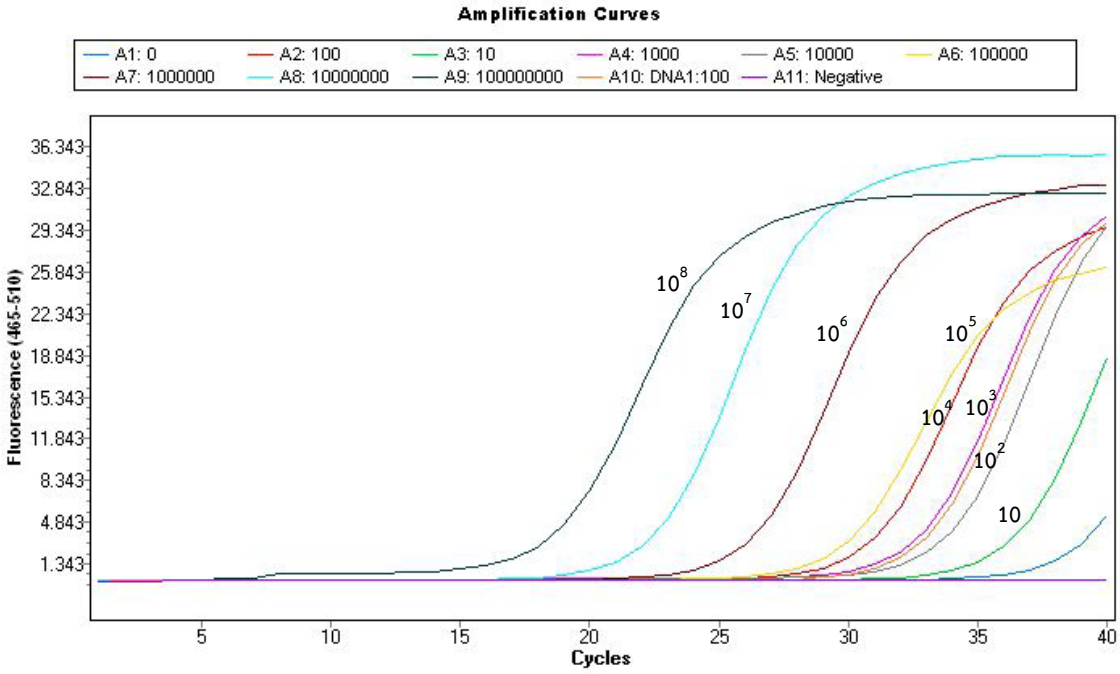

Fig. 4 The result of sensitivity using primer 2/3 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

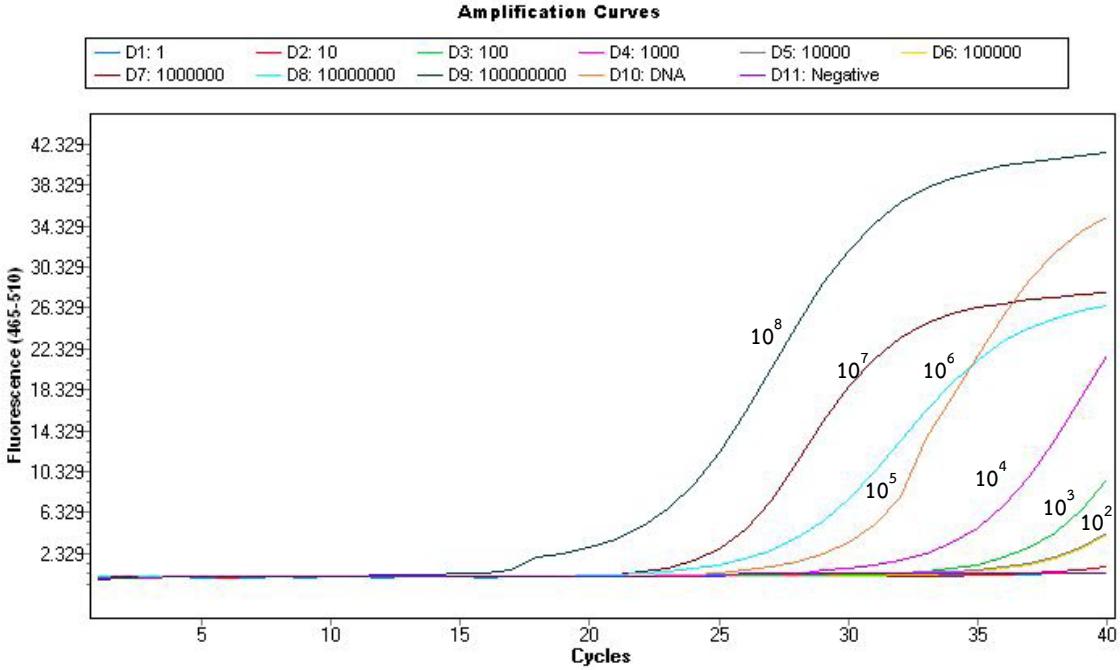

Fig. 5 The result of sensitivity using primer VM3/VM4 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

Table 7 Result of Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Causal Agent of Citrus Canker for Certification of Canker Free Orchards

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
001	นายทอง อินเทพ	18 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
002	นายอำนวย อินเทพ	16/2 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
003	นางมาลี เรียงยาย	หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
004	นายสีทน อินเทพ	16 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
005	นายเกรียงศักดิ์ บุดดี	141 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
006	นายปั้น ยาละ	20/2 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
007	นายสมศาสตร์ บุดดี	35 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	32.39	+	+
008	นายสว่าง บุดดี	14 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
009	นางมุกดา ยาละ	29 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
010	นายบุญทา อินเทพ	49 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
011	นายบุญช่วย อินเทพ	108 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
012	นายตาคำ โนขัติ	11/1 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
013	นางดวงคำ เทพสุติน	4 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
014	นายสมพงษ์ อินเทพ	73 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
015	นายฤทธ์ ประชุมพร	57 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
016	นางอาภา ภูมิภาคิน	48 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
017	นายคะนอง บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
018	นายเจริญ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
019	นางแพน ขันทะ	18 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
020	นายทวี ทิพย์หมึก	113 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
021	นายทวี ทิพย์หมึก	113 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
022	นายชัชวาลย์ รวมจิตร	109 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
023	นายบุญตุ้ม พึ่งบุญ	37 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
024	นายวิชัย เรียงยาย	53 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
025	นายนิมากร รวมจิตร์	65 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
026	นายนพดล ยาละ	75/2 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
027	นายชัชวาลย์ บุคดี	79/2 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
028	นายไชยวัฒน์ นันไชยา	195/3 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
029	นายสุพล ปงลังกา	23 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
030	นายอารุณ อินเทพ	25 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
031	นายรณฤทธิ์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	26.60	+	ND	ND	+
032	นายรณฤทธิ์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
033	นายวรศักดิ์ เรียงยาย	119 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
034	นายปรีชา อินเทพ	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
035	นางจำปี บุดดี	หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
036	นายจำรอง บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
037	นางศรีพลอย นันไชย	91 บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
038	นายเจษฎา อินเทพ	106/3 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
039	นายพล อินจา	98/1 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
040	นายไวพจน์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
041	นายนิรันดร์ นิลเนตร	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
042	นายวุฒิพงษ์ คำลือ	99/2 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
043	นายสุขจันทร์ อินทะ	หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
044	นายถนอม กาวงศ์	114/2 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
045	นายนิคม จันทร์วิเศษ	108/3 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
046	นายนิมิตร ทองสุข	51 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
047	นายนิมิตร ทองสุข	51 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	32.33	+	+

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
048	นายประคอง บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
049	นายปรีชา ยอดฝั้น	20 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
050	นายปรีชา ยอดฝั้น	20 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
051	นางกิติยา มั่งมูล	198 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
052	นางบัวแก้ว ยอดฝั้น	135/1 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
053	นายจิรัฏฐ์ บุดดี	135 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
054	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
055	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
056	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
057	นายสมรัตน์ ยานัน	137 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
058	นายสมรัตน์ ยานัน	137 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	20.56	+	ND	ND	+
059	นายรัตน์ ยานัน	136 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
060	นางเขมาภรณ์ จิรสิงห์	34 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
061	นางเขมาภรณ์ จิรสิงห์	34 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
062	นายสมาน คงทะ	29 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
063	นายสว่าง บุญยวง	27 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
064	นางภัทรนันท์ ยานัน	202 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
065	นางวิไลวรรณ์ ทองสุข	22/3 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
066	นายวิลัย เตรียมทนะ	6 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
067	นายสังวรณ์ เรียงยาย	171/3 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
068	นางสุพิน โนระ	144/1 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
069	นางเกษร กองมงคล	2 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
070	นางอรวรรณ กันคำ	194 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
071	นายอุทัต เตรียมธนะ	169 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
072	นายศรีเนตร ไชยเลิศ	180 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
073	นายพงษ์พันธ์ โนขัติ	167 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	33.39	+	+
074	นายนคร อินเทพ	80/4 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
075	นายบุญวาด บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
076	นายเสนีย์ นันชัย	213 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
077	นายเสน่ห์ นันชัย	55/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.09	+	ND	ND	+
078	นายเสน่ห์ นันชัย	55/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
079	นายปรทรัพย์ บุญยวง	237 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
080	นายประภาส กันคำ	162 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
081	นายสุรศักดิ์ บุดดี	บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
082	นางรัญจวน ชัยวงศ์	21/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
083	นายนิธิพัฒน์ บุญยวง	180 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	31.28	+	ND	ND	+
084	นายอนุรักษ์ คงทะ	96 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
085	นางสมพร บุดดี	หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
086	นายทัตพล ชัยวงศ์	หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
087	นายคำรณ บุดดี	91 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
088	นายบุญส่ง รักพ่อ	หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
089	นายสงัด บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
090	นายสมศักดิ์ ทิพย์ตา	หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
091	นายจำเนียร บัวแก้ว	108 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
092	นายอรุณ มหานิล	66/2 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
093	นางสาวดรุณี ยาละ	152 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
094	นายณรงค์ฤทธิ์ อินต๊ะ	9 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
095	นายชาญไชย บุดดี	28/2 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
096	นายวิรัตน์ บุดดี	10 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
097	นายนิมากร บุดดี	12/4 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
098	นายสุรชาติ บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
099	นายสุรชาติ บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
100	นายเทียมจิต ถาริยะ	51 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
101	นายบรรดิษฐ์ จันต๊ะ	9/4 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
102	นายพิชิต รวมจิตร	45 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
103	นางสุริยนต์ วรพัฒน์	13 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-